

Vorkommen und Bedeutung von *Enterobacteriaceae* in Säuglingsfertiernahrungsmitteln unter besonderer Berücksichtigung von *Enterobacter sakazakii*

Charlotte Kurz



INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines

Dr. med. vet.

beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen



édition scientifique
VVB LAUFFERSWEILER 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. Ewald Usleber

**Vorkommen und Bedeutung von *Enterobacteriaceae*
in Säuglingsfertignahrungsmitteln
unter besonderer Berücksichtigung von
*Enterobacter sakazakii***

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines

Dr. med. vet.

beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

CHARLOTTE KURZ

Tierärztin aus Lauterbach/Hessen

Gießen 2009

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

Dekan: Prof. Dr. Dr. habil. G. Baljer

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

Gutachter: Prof. Dr. Dr. habil. H. Eisgruber

Tag der Disputation: 05.05.2009

Meinen Eltern und Großeltern

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

KURZ, C., C. KRESS, A. HASSAN, Ö. AKINEDEN, E. SCHNEIDER und E. USLEBER (2006):

Qualitativer und quantitativer Nachweis von *Enterobacteriaceae* in Säuglings- und Kleinkindernahrung des deutschen Marktes unter besonderer Berücksichtigung von *E. sakazakii*

Posterpräsentation, 47. Arbeitstagung des Arbeitsgebietes Lebensmittelhygiene der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft, 26.-29. September 2006 in Garmisch-Partenkirchen, Deutschland

KURZ, C. (2006):

Vorkommen und Bedeutung von *Enterobacteriaceae* in Säuglingsnahrungsmitteln

Vortrag, Vortragsveranstaltung des Vereins der Freunde und Förderer der Veterinärmedizin an der JLU Gießen zum Thema „Aktuelle Arbeiten aus Klinik und Paraklinik“, 22. November 2006, Gießen, Deutschland

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I	
Tabellenverzeichnis	V	
Abbildungsverzeichnis	VIII	
Abkürzungsverzeichnis	IX	
1	EINLEITUNG	1
2	LITERATURÜBERSICHT	3
2.1	Risikobewertung von <i>Enterobacteriaceae</i> in Säuglingsferti- gnahrung	3
2.2	Rechtliche Regelungen für <i>Enterobacteriaceae</i> in Säuglingsferti- gnahrung	7
2.3	Säuglingsferti- gnahrung: Definitionen	9
2.4	Potentielle Kontaminationswege, über die <i>Enterobacteriaceae</i> in Säuglingsferti- gnahrung gelangen können.....	11
2.5	Empfehlungen zur Zubereitungs-, Lagerungs- und Handhabungspraxis von Säuglingsferti- gnahrung.....	12
2.6	Mögliche Ansätze zur Minimierung der <i>Enterobacteriaceae</i> -Kontamination von Säuglingsferti- gnahrung während der Herstellung	14
2.7	<i>E. sakazakii</i>	15
2.7.1	Allgemeines	15
2.7.2	Erkrankungen durch <i>E. sakazakii</i>	16
2.7.2.1	Klinische Manifestation.....	16
2.7.2.2	Risikogruppen.....	17
2.7.2.3	Vorkommen von Erkrankungen durch <i>E. sakazakii</i>	17
2.7.2.4	Minimale Infektionsdosis und Pathogenese	24
2.7.3	Vorkommen von <i>E. sakazakii</i>	26
2.7.3.1	Vorkommen von <i>E. sakazakii</i> in Säuglingsferti- gnahrung	26
2.7.3.2	Ubiquitäres Vorkommen von <i>E. sakazakii</i>	32
2.7.4	Überleben und Vermehrung von <i>E. sakazakii</i> in Säuglingsferti- gnahrung	33
2.7.5	Methoden zum Nachweis von <i>E. sakazakii</i>	34
2.7.5.1	Mikrobiologische Methoden zum Nachweis von <i>E. sakazakii</i>	34
2.7.5.2	Molekularbiologische Methoden zum Nachweis von <i>E. sakazakii</i>	37
2.8	Salmonellen	38

2.8.1	Allgemeines.....	38
2.8.2	Erkrankungen durch Salmonellen	39
2.8.2.1	Klinische Manifestation	39
2.8.2.2	Vorkommen von Salmonellosen	40
2.8.2.3	Minimale Infektionsdosis und Pathogenese	44
2.8.3	Vorkommen von Salmonellen in Säuglingsfertignahrung	44
2.8.4	Methoden zum Nachweis von Salmonellen	45
2.9	Andere fakultativ pathogene <i>Enterobacteriaceae</i>	45
2.9.1	Allgemeines.....	45
2.9.2	<i>Enterobacteriaceae</i> der WHO-Risiko-Kategorie B	47
2.9.2.1	<i>Citrobacter</i> spp.....	47
2.9.2.2	<i>Enterobacter</i> spp. (ohne <i>E. sakazakii</i>).....	48
2.9.2.3	<i>Escherichia</i> spp.	49
2.9.2.4	<i>Hafnia</i> spp.	50
2.9.2.5	<i>Klebsiella</i> spp.	50
2.9.2.6	<i>Pantoea</i> spp.	52
2.9.2.7	<i>Serratia</i> spp.	53
2.9.3	Vorkommen von <i>Enterobacteriaceae</i> in Säuglingsfertignahrung.....	54
2.9.4	Methoden zum Nachweis von <i>Enterobacteriaceae</i>	60
3	MATERIAL UND METHODEN	61
3.1	Materialien.....	61
3.1.1	Probenmaterial.....	61
3.1.2	Anreicherungsmedien, Nährmedien, Reagenzien und Biochemika des mikrobiologischen Nachweises von <i>Enterobacteriaceae</i>	65
3.1.3	Chemikalien, Biochemika, Primer, Lösungen und Puffer des molekularbiologischen Nachweises von <i>E. sakazakii</i>	67
3.1.4	Materialien zur Lagerung der <i>Enterobacteriaceae</i>	68
3.1.5	Geräte und sonstige Materialien.....	68
3.1.6	Bakterien-Referenzstämme	70
3.2	Methoden.....	71
3.2.1	Mikrobiologischer Nachweis von <i>Enterobacteriaceae</i>	71
3.2.1.1	Qualitativer Nachweis von <i>Enterobacteriaceae</i> (exclusive Salmonellen).....	71
3.2.1.2	Qualitativer Nachweis von Salmonellen	82

3.2.1.3	Quantitativer Nachweis von <i>Enterobacteriaceae</i>	84
3.2.2	Molekularbiologische Bestätigung der <i>E. sakazakii</i> -Isolate.....	85
3.2.2.1	Extraktion der bakteriellen DNA.....	85
3.2.2.2	Durchführung der Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	86
3.2.2.3	Gelelektrophorese und optische Darstellung der Fragmente.....	87
4	ERGEBNISSE	88
4.1	Ergebnisse des mikrobiologischen Nachweises von <i>Enterobacteriaceae</i> in Säuglingsfertiernahrung.....	88
4.1.1	Ergebnisse des qualitativen Nachweises	88
4.1.1.1	Vorkommen von <i>Enterobacteriaceae</i>	88
4.1.1.2	Nachgewiesene <i>Enterobacteriaceae</i> -Spezies	95
4.1.2	Ergebnisse des quantitativen Nachweises	104
4.2	Ergebnisse des Nachweises von <i>E. sakazakii</i>	107
4.2.1	Ergebnisse des mikrobiologischen Nachweises von <i>E. sakazakii</i>	107
4.2.2	Ergebnisse des molekularbiologischen Nachweises von <i>E. sakazakii</i>	111
4.3	Ergebnisse der Untersuchungen zur Ermittlung der optimalen Bebrütungsdauer der Voranreicherung sowie zur Ermittlung der optimalen Art des Überimpfens aus der Voranreicherung.....	113
5	DISKUSSION	114
5.1	Mikrobielle Risiken in Säuglingsfertiernahrung.....	114
5.2	Vorkommenshäufigkeit von <i>Enterobacteriaceae</i> in Säuglingsfertiernahrung	114
5.3	Identifizierung des <i>Enterobacteriaceae</i> -Keimspektrums in Säuglingsfertiernahrung.....	116
5.3.1	<i>E. sakazakii</i>	118
5.3.2	Salmonellen	121
5.4	Quantitativer Nachweis von <i>Enterobacteriaceae</i> in Säuglingsfertiernahrung	122
5.5	Rechtliche Bewertung des Vorkommens von <i>Enterobacteriaceae</i> in Säuglingsfertiernahrung bezüglich Verordnung (EG) 1441/2007.....	123
5.6	Risikobewertung zum Vorkommen von <i>Enterobacteriaceae</i> in Säuglingsfertiernahrung.....	125

6	ZUSAMMENFASSUNG.....	129
7	SUMMARY	132
8	LITERATURVERZEICHNIS.....	134
9	ANHANG.....	155

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Einstufung von Mikroorganismen in Säuglingsfertiernahrung hinsichtlich des Infektionsrisikos (FAO/WHO, 2004 und 2006).....	6
Tabelle 2:	Publizierte Daten zu <i>E. sakazakii</i> -Erkrankungen bei Neugeborenen, Säuglingen und Kleinkindern mit gesicherter oder sehr wahrscheinlicher Beteiligung von Säuglingsfertiernahrungsmitteln (angelehnt an FAO/WHO, 2006; IVERSEN & FORSYTHE, 2003; LAI, 2001).....	20
Tabelle 3:	Publizierte Daten zu <i>E. sakazakii</i> -Erkrankungen bei Neugeborenen, Säuglingen und Kleinkindern, für die keine eindeutige Infektionsquelle ermittelt wurde (angelehnt an FAO/WHO, 2006; IVERSEN & FORSYTHE; 2003; LAI, 2001)	21
Tabelle 4:	Zusammenstellung von Literaturdaten zum Vorkommen von <i>E. sakazakii</i> in Säuglingsfertiernahrungsmitteln	28
Tabelle 5:	Vorkommen von <i>E. sakazakii</i> in Säuglingsfertiernahrung nach Berichten staatlicher Einrichtungen der Lebensmittelüberwachung.....	30
Tabelle 6:	Aktuelle, in der Presse bekannt gegebene Rückrufaktionen deutscher Säuglingsnahrungshersteller aufgrund von Kontamination der Säuglingsnahrung mit <i>E. sakazakii</i>	31
Tabelle 7:	Mikrobiologische (kulturell-biochemische) Methoden zum Nachweis von <i>E. sakazakii</i> (angelehnt an FAO/WHO, 2006).....	36
Tabelle 8:	Publizierte Daten zu Salmonellose-Ausbrüchen bei Säuglingen, für die Säuglingsfertiernahrung als Infektionsquelle ermittelt wurde	42
Tabelle 9:	Zusammenstellung von Literaturdaten zum Vorkommen von <i>Enterobacteriaceae</i> in Säuglingsfertiernahrungsmitteln	57
Tabelle 10:	Übersicht über die untersuchten Säuglingsfertiernahrungsmittel - aufgeschlüsselt nach verschiedenen Produktgruppen und der jeweils untersuchten Probenanzahl	62
Tabelle 11:	Übersicht über die untersuchten Säuglingsfertiernahrungsmittel - aufgeschlüsselt je nach empfohlenem Verwendungsalter (entsprechend Herstellerangaben) und der jeweils untersuchten Probenanzahl	63

Tabelle 12:	Übersicht über die untersuchten Säuglingsfertignahrungsmittel - aufgeschlüsselt in Anfangs- und Folgenahrung, Beikost und diätetische Lebensmittel sowie die jeweils untersuchte Probenanzahl.....	63
Tabelle 13:	Aufstellung der verwendeten Referenzstämme	70
Tabelle 14:	Übersicht über die insgesamt aus Säuglingsfertignahrung isolierten <i>Klebsiella</i> spp. und deren Ergebnis der Harnstoff-Reaktion in den unterschiedlichen Testsystemen sowie deren endgültige Identifizierung ...	79
Tabelle 15:	Zusammensetzung des Reaktionsgemisches zur Durchführung der PCR...	86
Tabelle 16:	Vorkommen von <i>Enterobacteriaceae</i> in den untersuchten Säuglingsfertignahrungsmitteln (Probenmenge je 333 g) - aufgeschlüsselt in die unterschiedlichen Produktgruppen	89
Tabelle 17:	Vergleichende Darstellung des Vorkommens von <i>Enterobacteriaceae</i> der insgesamt untersuchten und der erstuntersuchten Proben (in den unterschiedlichen Produktgruppen).....	92
Tabelle 18:	Vorkommen von <i>Enterobacteriaceae</i> in den untersuchten Säuglingsfertignahrungsmitteln (Probenmenge je 333 g) - aufgeschlüsselt nach dem vom Hersteller empfohlenen Verwendungsalter.....	93
Tabelle 19:	Vorkommen von <i>Enterobacteriaceae</i> in den untersuchten Säuglingsfertignahrungsmitteln (Probenmenge je 333 g) - aufgeschlüsselt in Anfangs- und Folgenahrung, Beikost und diätetische Lebensmittel	94
Tabelle 20:	Vergleich des Vorkommens von <i>Enterobacteriaceae</i> in Säuglingsfertignahrungsmitteln (Probenmenge je 333 g) aus konventioneller und ökologischer Produktionsweise	94
Tabelle 21:	Relative Häufigkeit (in %) der nachgewiesenen <i>Enterobacteriaceae</i> -Spezies in den untersuchten Säuglingsfertignahrungsmitteln (Probenmenge je 333 g) - aufgeschlüsselt in die unterschiedlichen Produktgruppen (Spezies sortiert nach absteigender Vorkommenshäufigkeit auf Gattungsebene)	99
Tabelle 22:	Relative Häufigkeit (in %) der nachgewiesenen <i>Enterobacteriaceae</i> -Spezies in den untersuchten Säuglingsfertignahrungsmitteln (Probenmenge je 333 g) - aufgeschlüsselt nach vom Hersteller empfohlenen Verwendungsalter (Spezies sortiert nach absteigender Vorkommenshäufigkeit auf Gattungsebene)	100
Tabelle 23:	Relative Häufigkeit (in %) der nachgewiesenen <i>Enterobacteriaceae</i> -Spezies in den untersuchten Säuglingsfertignahrungsmitteln (Probenmenge je 333 g)	

	- aufgeschlüsselt in Anfangs- und Folgenahrung, Beikost und diätetische Lebensmittel (Spezies sortiert nach absteigender Vorkommenshäufigkeit auf Gattungsebene)	102
Tabelle 24:	Nachweis verschiedener <i>Enterobacteriaceae</i> -Spezies in Erzeugnissen unterschiedlicher Hersteller	103
Tabelle 25:	Detaillierte Untersuchungsergebnisse der quantitativ am höchsten mit <i>Enterobacteriaceae</i> kontaminierten Säuglingsfertignahrungsmittel	106
Tabelle 26:	Vorkommen von <i>E. sakazakii</i> in den untersuchten Säuglingsfertignahrungsmitteln (Probenmenge je 333 g) - aufgeschlüsselt in die unterschiedlichen Produktgruppen.....	108
Tabelle 27:	Vorkommen von <i>E. sakazakii</i> in den untersuchten Säuglingsfertignahrungsmitteln (Probenmenge je 333 g) - aufgeschlüsselt nach vom Hersteller empfohlenen Verwendungsalter.....	109
Tabelle 28:	Vorkommen von <i>E. sakazakii</i> in den untersuchten Säuglingsfertignahrungsmitteln (Probenmenge je 333 g) - aufgeschlüsselt in Anfangs- und Folgenahrung, Beikost und diätetische Lebensmittel	109

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Anzahl untersuchter Proben je Hersteller	65
Abbildung 2: Schematische Darstellung des Untersuchungsgangs zum Nachweis von <i>Enterobacteriaceae</i> in Säuglingsfertignahrungsmitteln	72
Abbildung 3: Schematische Darstellung des Untersuchungsgangs zum Nachweis von Salmonellen in Säuglingsfertignahrungsmitteln.....	83
Abbildung 4: Relative Häufigkeit (in %) von <i>Enterobacteriaceae</i> in den unterschiedlichen Produktgruppen der untersuchten Säuglingsfertignahrungsmittel	90
Abbildung 5: Relative Häufigkeit (in %) der nachgewiesenen <i>Enterobacteriaceae</i> -Gattungen in den untersuchten Säuglingsfertignahrungsmitteln.....	96
Abbildung 6: Relative Häufigkeit (in %) der nachgewiesenen <i>Enterobacteriaceae</i> -Spezies in den untersuchten Säuglingsfertignahrungsmitteln (n = 152, Probenmenge je 333 g)	97
Abbildung 7: Übersicht über die ermittelten Kontaminationshöhen (<i>Enterobacteriaceae</i> -positiv: > 0,30 Kbe/100 g, <i>Enterobacteriaceae</i> -negativ: < 0,30 Kbe/100 g) in Säuglingsfertignahrung (n = 152).....	104
Abbildung 8: Ergebnisse des quantitativen Nachweises von <i>Enterobacteriaceae</i> in Säuglingsfertignahrungsmitteln - aufgeschlüsselt je nach Verwendungsalter	105
Abbildung 9: Typisches Amplikon (952 Bp) des 16S rRNA-Gens verschiedener <i>E. sakazakii</i> -Isolate aus Säuglingsnahrung nach PCR unter Verwendung der Primer Saka-1a und Saka-2b nach HASSAN et al. (2007)	112

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AGES	Agentur für Gesundheit und Ernährungssicherheit in Österreich
ATCC	American Type Culture Collection
a_w	Activity of water, für mikrobielle Aktivität in einem Milieu zur Verfügung stehende Flüssigkeit
Bp	Basenpaar(e)
BPLS	Brillantgrün-Phenolrot-Laktose-Saccharose-Agar
BPW	Buffered Peptone Water, gepuffertes Peptonwasser
bzw.	beziehungsweise
c	Anzahl der Probeneinheiten einer Stichprobe, deren Werte über m oder zwischen m und M liegen
ca.	circa
CASO	Caseinpepton-Sojamehlpepton-Agar
cfu	colony forming units, Kolonie bildende Einheiten
DFI	Druggan-Forsythe-Iversen-Agar
diät. Nahrung	diätetische Nahrung, hier: diätetische Lebensmittel für besondere medizinische Zwecke, die für Säuglinge von Geburt an bestimmt sind
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphate
DSM	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
EEB	<i>Enterobacteriaceae</i> Enrichment Broth, <i>Enterobacteriaceae</i> Anreicherungsbouillon nach MOSSEL
EFSA	European Food Safety Authority, Europäische Behörde für Lebensmittelsicherheit
EG	Europäische Gemeinschaft
<i>E. sakazakii</i>	<i>Enterobacter sakazakii</i>
ESE	<i>Enterobacter sakazakii</i> Enrichment Broth
ESIA	<i>Enterobacter sakazakii</i> Isolation Agar
ESPHGAN	European Society of Paediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition
ESPM	<i>Enterobacter sakazakii</i> Plating Medium

ESSB	<i>Enterobacter sakazakii</i> Selective Broth
ESSM	<i>Enterobacter sakazakii</i> Screening Medium
et al.	et alii, und Mitarbeiter
EU	Europäische Union
FAO	Food and Agriculture Organisation, Welternährungsorganisation
FDA	Food and Drug Administration
g	Gramm
h	Stunde
hypoallerg.	hypoallergen
H ₂ S	Wasserstoffperoxid
ICMSF	International Commission on Microbiological Specifications for Food
ISO	International Standard Organisation
k.A.	keine Angabe
KbE	Kolonie bildende Einheit(en)
KOH	Kaliumhydroxid
l	Liter
LMBG	Lebensmittel- und Bedarfsgegenstände-gesetz
m	Schwellenwert
M	Grenzwert
mA	Milliampère
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
min	Minuten
ml	Milliliter
mLST	modified Lauryl Sulfate Tryptose Broth, modifizierte Laurylsulfat-Trypton-Bouillon, mit 0,5 M NaCl und 10 mg/l Vancomycin
mmol/l	Millimol pro Liter
MPN	Most Probable Number-Technik
n	Anzahl n, Anzahl der Probeneinheiten einer Stichprobe
NA + α-MUG	Nähragar mit Zusatz von 4-Methylumbelliferyl-alpha-D-Glucopyranosid
NaCl	Natriumchlorid
n.d.	nicht durchgeführt
O ₂	Sauerstoff

o.g.	oben genannte
PCR	polymerase chain reaction, Polymerase-Kettenreaktion
PFGE	Pulsfeldgelelektrophorese
PNP-Test	Test zum Nachweis der α -Glucosidase-Aktivität, bei positiver Reaktion wird das Substrat 4-Paranitrophenyl- α -D-Glucopyranosid gespalten in α -D-Glucose und 4- Paranitrophenol
RAPD	Random Amplification of Polymorphic DNA
RNA	Ribonukleinsäure
RV-Bouillon	Magnesium-Malachitgrün-Medium nach Rappaport-Vassiliadis
SC	Selenit-Cystin-Medium
sp.	Spezies (Singular)
spp.	Spezies (Plural)
Tab.	Tabelle
Taq	Thermus aquaticus
TSA	Trypton Soya Agar
UK	England
u.N.	unterhalb der Nachweisgrenze
USA	Vereinigte Staaten von Amerika
VO	Verordnung
VRBG	Violet Red Bile Glucose Agar, Kristallviolett-Neutralrot-Galle-Agar
WHO	World Health Organization, Weltgesundheitsorganisation
XLD	Xylose-Lysin-Desoxycholat-Agar
z.B.	zum Beispiel
ZNS	Zentralnervensystem
z.T.	zum Teil
%	Prozent
°C	Grad Celsius
μ l	Mikroliter

1 EINLEITUNG

Säuglinge sind im Hinblick auf lebensmittelbedingte Infektionen eine besonders sensible Verbrauchergruppe. Relativ wenig ist in der Öffentlichkeit bekannt, dass es sich bei pulverförmigen Säuglingsfertignahrungsmitteln nicht um sterile Produkte handelt, sodass eine bakterielle Kontamination - auch mit potentiell pathogenen Keimen - jederzeit möglich ist.

Ein eindeutiger kausaler Zusammenhang zwischen dem Konsum von Säuglingsfertignahrung und Erkrankungen ist bisher nur für *Enterobacter sakazakii* (*E. sakazakii*) und *Salmonella enterica* beschrieben worden, weshalb diese Mikroorganismen in der systematischen Eingruppierung von Mikroorganismen in Säuglingsnahrung im Hinblick auf das Erkrankungsrisiko durch die FAO/WHO (2004 und 2006) in Risikokategorie A eingestuft wurden. Ein möglicher Kausalzusammenhang besteht aber auch für andere *Enterobacteriaceae*, die daher in Risikokategorie B eingruppiert wurden (FAO/WHO, 2004 und 2006).

Gemessen am Konsum von Säuglingsfertignahrungsmitteln ist die Zahl der beschriebenen Erkrankungsfälle von Säuglingen zwar relativ gering, die Erkrankungen weisen jedoch meist sehr schwere Verlaufsformen auf. Beispielsweise verlaufen Erkrankungen durch *E. sakazakii* bei Neugeborenen und Säuglingen häufig mit lebensbedrohender Meningitis, Sepsis oder nekrotisierender Enterokolitis.

In rechtlichen Regelungen für Krankheitserreger in Säuglingsfertignahrung nach „Verordnung (EG) 1441/2007“ wird das Nichtvorhandensein von *E. sakazakii* und Salmonellen gefordert in getrockneter Säuglingsanfangsnahrung und in getrockneten diätetischen Lebensmitteln für besondere medizinische Zwecke, die für Säuglinge unter 6 Monaten bestimmt sind, sowie das Nichtvorhandensein von Salmonellen in getrockneter Folgenahrung.

Trotz Vorhandenseins dieser gesetzlichen Regelungen existieren nur sehr spärliche Daten über das qualitative und quantitative Vorkommen von *Enterobacteriaceae* in Säuglingsfertignahrungsmitteln des deutschen Marktes. Daher war es Ziel dieser Arbeit,

einen Überblick darüber zu erhalten und somit Daten zur aktuellen Bewertung der mikrobiologischen Sicherheit von Säuglingsfertignahrungsmitteln bereitzustellen.

2 LITERATURÜBERSICHT

2.1 Risikobewertung von *Enterobacteriaceae* in Säuglingsfertiernahrung

Grundlage für die Bewertung mikrobieller Risiken von Lebensmitteln ist immer der aktuelle wissenschaftliche Kenntnisstand. Die Bewertung unterliegt daher einem dynamischen Prozess, der entsprechend dem wissenschaftlichen Erkenntnisfortschritt ständig aktualisiert wird. In den letzten Jahren traten weltweit mehrere Erkrankungs- und Todesfälle durch das „emerging pathogen“ *E. sakazakii* in Säuglingsfertiernahrungsmitteln auf. *E. sakazakii* war somit wegberaubend für eine ganze Reihe von wissenschaftlichen Arbeiten zur Risikobewertung in Bezug auf die mikrobiologische Sicherheit von Säuglingsfertiernahrungsmitteln. Eine kurze Chronologie soll im Folgenden wiedergegeben werden.

Im Jahre 2002 wurde *E. sakazakii* von der ICMSF (International Commission on Microbiological Specifications for Food) als “Severe hazard for restricted populations, life threatening or substantial chronic sequelae of long duration” eingestuft (ICMSF, 2002). Damit ist *E. sakazakii* in dieselbe Kategorie eingestuft wie beispielsweise *Listeria monocytogenes* oder *Clostridium botulinum* Typ A und B.

Kurze Zeit später wurde *E. sakazakii* in den USA als mikrobielles Risiko in Säuglingsfertiernahrung bestätigt (FDA, 2003 a). Dieses Risiko gelte besonders für bestimmte Risikogruppen, beispielsweise Früh- und Neugeborene. Inwieweit auch gesunde Säuglinge einem Risiko ausgesetzt sind, sei noch nicht einschätzbar.

In einer Stellungnahme (opinion) beschäftigte sich die EFSA (Europäische Behörde für Lebensmittelsicherheit) 2004 mit mikrobiologischen Risiken in Säuglingsfertiernahrung (EFSA, 2004). Salmonellen und *E. sakazakii* in Säuglingsanfangsnahrung, Folgenahrung und Nahrung für spezielle medizinische Zwecke wurden darin als besonders problematisch eingestuft, da immer wieder sporadische Erkrankungen und Infektions-Ausbrüche durch *Salmonella* spp. und *E. sakazakii* bei Säuglingen und Kleinkindern vorkommen. In einigen dieser Fälle wurde Säuglingsnahrung als Quelle der Erkrankungen identifiziert. Obwohl es bei den *Enterobacteriaceae* auch physiologisch vorkommende Kommensalen gibt, sollten

laut EFSA (2004) andere *Enterobacteriaceae*-Spezies in Säuglingsfertiernahrung (wie z.B. *Citrobacter diversus*, *Citrobacter freundii*, enterotoxische *Escherichia coli*, *Klebsiella oxytoca*, *Serratia marcescens*) als opportunistisch pathogene Mikroorganismen angesehen werden. Es wurde empfohlen, ein „Güteziel“ (Performance Objective) für Säuglingsanfängernahrung in Pulverform und Folgenahrung mit angestrebten niedrigen Konzentrationen von Salmonellen und *E. sakazakii* (z.B. Nichtvorhandensein in 1, 10 oder 100 kg) einzuführen. Die Überprüfung dieser „Güteziele“ sollte durch Tests auf *Enterobacteriaceae* in der Umgebung und im Produkt bestätigt werden. *Enterobacteriaceae* sollten demnach als Indikatoren für einen Anstieg von Salmonellen und *E. sakazakii* herangezogen werden. Aufgrund der weiten Verbreitung von *E. sakazakii* in Säuglingsfertiernahrung wird in der Stellungnahme der EFSA (2004) davon ausgegangen, dass die Aufnahme von geringen Keimzahlen in Säuglingsanfängernahrung und Folgenahrung bei gesunden Säuglingen und Kleinkindern nicht zu Infektionen führt. Ein erhebliches Risiko durch *E. sakazakii* entstehe jedoch durch fehlerhafte Zubereitung (Rekonstitution) der Säuglingsnahrung und einer damit verbundenen Vermehrung des Erregers. Besonders infektionsgefährdet seien Säuglinge unter sechs Wochen Lebensalter, insbesondere Frühgeburten, immunsupprimierte oder untergewichtige Säuglinge.

Eine von WHO und FAO (World Health Organization und Food and Agriculture Organization) erstmals publizierte Arbeit basierend auf einem Expertentreffen zum Thema „*E. sakazakii* and other microorganisms in powdered infant formula“ beschäftigte sich mit der systematischen Eingruppierung von Mikroorganismen in Säuglingsnahrung im Hinblick auf das Erkrankungsrisiko (FAO/WHO, 2004). In dieser Arbeit (ergänzt durch FAO/WHO 2006) wurde die im Folgenden und in Tabelle 1 dargestellte Einteilung vorgenommen:

Kategorie A-Organismen (klarer Beweis der Kausalität)

In Kategorie A befinden sich derzeit die *Enterobacteriaceae*-Spezies *E. sakazakii* und *Salmonella enterica*. Beide rufen Erkrankungen bei Säuglingen und Kleinkindern hervor und sind in Säuglings- und Kleinkindernahrung nachgewiesen worden. Die kontaminierte Nahrung ist epidemiologisch und mikrobiologisch als Quelle und Vehikel identifiziert worden. Somit stellt Kategorie A die höchste Risikokategorie dar.

Kategorie B-Organismen (Kausalität möglich, jedoch nicht bewiesen)

In Kategorie B sind derzeit eine Vielzahl weiterer *Enterobacteriaceae*-Spezies namentlich erwähnt (siehe Tabelle 1). Des Weiteren befindet sich *Acinetobacter* spp. als Nicht-*Enterobacteriaceae*-Spezies in Kategorie B. Bakterien der Kategorie B verursachen Erkrankungen bei Säuglingen und Kleinkindern und sind in Säuglings- und Kleinkindernahrung gefunden worden, ein eindeutiger kausaler Zusammenhang ist jedoch noch nicht bewiesen. Den Kategorie B-Organismen wird eine steigende Relevanz als neonatale Pathogene zugeschrieben. Beispielsweise ist Säuglingsnahrung als Vehikel eines Infektions-Ausbruches durch *Citrobacter freundii* identifiziert worden (THURM & GERICKE, 1994).

Kategorie C-Organismen (Kausalität weniger plausibel oder noch nicht bewiesen)

In Kategorie C befinden sich derzeit die Nicht-*Enterobacteriaceae*-Spezies *Bacillus cereus*, *Clostridium difficile*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium botulinum*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* und Koagulase-negative Staphylokokken. Die Kategorie C umfasst somit ebenfalls Mikroorganismen, die als obligat bzw. fakultativ pathogen anzusehen sind. Jedoch sind diese Spezies entweder bisher noch nicht in Säuglingsfertiernahrung nachgewiesen worden (*Listeria monocytogenes*, *Clostridium perfringens*) oder aber es wurde bisher noch nicht von Erkrankungen berichtet, obwohl der Erreger prinzipiell in Säuglingsfertiernahrung vorkommt (*Bacillus cereus*). In diesem Zusammenhang ist zu erwähnen, dass *Bacillus cereus* in Verordnung (EG) 1441/2007 als Prozesshygienekriterium aufgeführt wird.

Tabelle 1: Einstufung von Mikroorganismen in Säuglingsfertignahrung hinsichtlich des Infektionsrisikos (FAO/WHO, 2004 und 2006)

Kategorie A	Kategorie B	Kategorie C
<i>E. sakazakii</i>	<i>Pantoea agglomerans</i>	<i>Bacillus cereus</i>
<i>Salmonella enterica</i>	<i>Escherichia vulneris</i>	<i>Clostridium difficile</i>
	<i>Hafnia alvei</i>	<i>Clostridium perfringens</i>
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Clostridium botulinum</i>
	<i>Citrobacter koseri</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>
	<i>Citrobacter freundii</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
	<i>Klebsiella oxytoca</i>	Koagulase-negative Staphylokokken
	<i>Enterobacter cloacae</i>	
	<i>Escherichia coli</i>	
	<i>Serratia</i> spp.	
	<i>Acinetobacter</i> spp.	

Aus den o.g. Risikokategorien wird deutlich, dass *Enterobacteriaceae* (Risikokategorie A und B) von hoher Relevanz im Hinblick auf eine Gesundheitsgefährdung von Säuglingen und Kleinkindern durch Säuglingsfertignahrung sind.

Zur Risikobewertung hinsichtlich der Infektionsgefahr durch *Enterobacteriaceae* in Säuglingsfertignahrung müssen ferner auch Angaben zur Verzehrshäufigkeit von Säuglingsfertignahrungsmitteln berücksichtigt werden. In der Literatur sind kaum aussagefähige Daten zur tatsächlichen Verzehrshäufigkeit publiziert. Die einzigen für Deutschland verfügbaren Daten wurden in der DONALD - Studie (Dortmund nutritional anthropometrical longitudinally designed - Studie) ermittelt (KERSTING et al., 1998). Nach dieser Literaturquelle erhält ein schwer abzuschätzender Anteil der in Deutschland geborenen Kinder bereits ab den ersten Lebenstagen Säuglingsfertignahrung, ab einem Lebensalter von drei Monaten erhalten 50 % aller Säuglinge kommerzielle Säuglingsanfangsnahrung und Folgenahrung und 17 % aller Säuglinge Getreidebeikost oder getreidehaltige Beikost. Ab einem Lebensalter von sechs Monaten erhalten 94 % aller Säuglinge kommerzielle Säuglingsfertignahrungsmittel. Bei Kontamination der Säuglingsfertignahrung mit *E. sakazakii*, Salmonellen oder anderen fakultativ pathogenen

Enterobacteriaceae kann also davon ausgegangen werden, dass ein hoher Prozentsatz der Säuglinge in Deutschland einem Expositionsrisiko ausgesetzt ist.

Wie häufig die orale Aufnahme von *Enterobacteriaceae* über Säuglingsfertignahrung tatsächlich zu Erkrankungen führt, bleibt schwer abzuschätzen. Auch wenn eine intestinale Kolonisation mit *Enterobacteriaceae* nicht direkt zu Erkrankungen führt, kann sie jedoch auch Vorbote zu Erkrankungen sein. So beschreiben WESTRA-MEIJER et al. (1983), dass eine Kolonisation mit *Klebsiella* spp. das Risiko erhöht, an neonataler nekrotisierender Enterokolitis zu erkranken.

Des Weiteren beschreiben einige Autoren ein generell höheres Erkrankungsrisiko für fertignahrungsernährte Säuglinge im Gegensatz zu gestillten Säuglingen. Nach LUCAS & COLE (1990) erkrankten fertignahrungsernährte Säuglinge im Gegensatz zu Muttermilchkonsumenten beispielsweise zehnfach häufiger an nekrotisierender Enterokolitis. In Untersuchungen von LLANOS et al. (2002) wurden von den an nekrotisierender Enterokolitis erkrankten Säuglingen 72 % mit Fertignahrung ernährt, 13 % ausschließlich mit Muttermilch und 13 % mit einer Kombination aus Fertignahrung und Muttermilch. Offen bleibt bei diesen Ergebnissen jedoch, ob die Erkrankungen durch die direkte Aufnahme von *Enterobacteriaceae* oder die aufgrund nutritiver Faktoren unterschiedlich entwickelte Gastrointestinalflora der Säuglinge bedingt waren.

2.2 Rechtliche Regelungen für *Enterobacteriaceae* in Säuglingsfertignahrung

Für Säuglingsnahrung gelten neben den gesetzlichen Regelungen hinsichtlich der Zusammensetzung, der Verwendung von Zusatzstoffen und Grenzwerten für Rückstände und Farbstoffe außerdem bakteriologische Anforderungen.

Gemäß der seit 2005 geltenden „Verordnung (EG) 2073/2005 über mikrobiologische Kriterien für Lebensmittel“ mussten getrocknete Säuglingsanfangsnahrung und getrocknete diätetische Lebensmittel für besondere medizinische Zwecke, die für Säuglinge unter 6 Monaten bestimmt sind („getrocknete Säuglingsanfangsnahrung und getrocknete diätetische Lebensmittel“) auf *E. sakazakii* (nicht nachweisbar in 30 x 10 g Probe) und Salmonellen (nicht nachweisbar in 30 x 25 g Probe) untersucht werden; dies jedoch nur, wenn eine vorhergehende Untersuchung der als Indikatorkeime

herangezogenen *Enterobacteriaceae* ein positives Ergebnis (nachweisbar in 10 x 10 g Probe) erbracht hatte. In einem aktuellen Gutachten (EFSA, 2007) wurde diese Regelung jedoch in Frage gestellt. In diesem EFSA-Gutachten wurde festgestellt, dass keine Korrelation zwischen *Enterobacteriaceae* und Salmonellen hergestellt werden kann und keine generelle Korrelation zwischen *Enterobacteriaceae* und *E. sakazakii* besteht. Auf der Ebene einzelner Betriebe kann jedoch eine betriebsspezifische Korrelation zwischen *Enterobacteriaceae* und *E. sakazakii* nachgewiesen werden.

Durch **Verordnung (EG) 1441/2007** wurde eine entsprechende Änderung zu den in Verordnung (EG) 2073/2005 festgelegten Vorschriften vorgenommen. Nunmehr ist das Lebensmittelsicherheitskriterium „*E. sakazakii*“ in Säuglingsnahrung auch unabhängig vom Nachweis von *Enterobacteriaceae* zu prüfen. Konkret wurde unter Lebensmittelsicherheitskriterien zu „1.24 Getrocknete Säuglingsanfangsnahrung und getrocknete diätetische Lebensmittel für besondere medizinische Zwecke, die für Säuglinge unter 6 Monaten bestimmt sind“ bezüglich *E. sakazakii* festgelegt: „Eine Paralleluntersuchung auf *Enterobacteriaceae* und *E. sakazakii* ist durchzuführen, sofern nicht eine Korrelation zwischen diesen Mikroorganismen auf Ebene der einzelnen Betriebe festgestellt wurde. Werden in einem Betrieb in einer Probeneinheit *Enterobacteriaceae* nachgewiesen, ist die Partie auf *E. sakazakii* zu untersuchen. Der Hersteller muss zur Zufriedenheit der zuständigen Behörde nachweisen, ob zwischen *Enterobacteriaceae* und *E. sakazakii* eine derartige Korrelation besteht.“ Das Lebensmittelsicherheitskriterium „Salmonellen“ ist nunmehr für „1.22 Getrocknete Säuglingsanfangsnahrung und getrocknete diätetische Lebensmittel für besondere medizinische Zwecke, die für Säuglinge unter 6 Monaten bestimmt sind“ und für „1.23 Getrocknete Folgenahrung“ als eigenständiges Kriterium (Abwesenheit in 30 x 25 g Probe) zu interpretieren. Unbefriedigende Ergebnisse bezüglich Salmonellen und *E. sakazakii* haben nach Artikel 7 der Verordnung (EG) 2073/2005 Maßnahmen zur Verhinderung eines Verzehrs derartiger Waren durch den Verbraucher, gegebenenfalls einschließlich von Rückrufaktionen von bereits im Handel befindlicher Ware, zur Folge.

Auf internationaler Ebene des **Codex Alimentarius** gelten teilweise noch vom EU-Recht abweichende Regelungen. Die Codex Alimentarius-Kommission empfiehlt für die internationale Hygienepaxis von getrockneten und Instant-Produkten für Säuglinge und Kleinkinder bezüglich *Enterobacteriaceae* folgende Werte (Codex Alimentarius

Commission, CAC/RCP 21-1979): In maximal einer von fünf Proben à 1 g dürfen 3 - 20 Coliforme (zu denen auch *E. sakazakii* gehört) enthalten sein. Salmonellen dürfen in 60 Proben à 25 g nicht nachweisbar sein. Die Codex Alimentarius-Kommission ist ein unter dem Dach der FAO/WHO arbeitender Ausschuss. Ihre Vorgaben haben somit internationalen Charakter. Bezüglich Säuglingsnahrung handelt es sich um Empfehlungen.

2.3 Säuglingsfertignahrung: Definitionen

Zur Abgrenzung verschiedener auf dem Markt befindlicher Säuglingsfertignahrungsmittel haben sich Begriffe eingebürgert, die sich z.T. in gesetzlichen Regelungen wieder finden. Das entscheidende Kriterium bei dieser Abgrenzung ist das Verwendungsalter der Säuglingsfertignahrungsmittel. Die Verordnung (EG) 2073/2005 verweist bezüglich der Definition „für Säuglinge bestimmte Lebensmittel“ auf die „EG-Richtlinie 91/321/EWG über Säuglingsanfangsnahrung und Folgenahrung“.

Säuglingsanfangsnahrungen werden in der EG-Richtlinie 91/321/EWG definiert als „Lebensmittel, die für die besondere Ernährung von Säuglingen während der **ersten vier bis sechs Lebensmonate** bestimmt sind und die für sich allein den Ernährungserfordernissen dieser Personengruppe entsprechen“. Säuglingsanfangsnahrung kann die Muttermilch somit von Geburt an ersetzen und ist als alleiniges Lebensmittel während der ersten vier bis sechs Lebensmonate geeignet.

Folgenahrungen werden definiert als „Lebensmittel, die für die besondere Ernährung von Säuglingen **über vier Monate** bestimmt sind und den größten flüssigen Anteil einer nach und nach abwechslungsreichen Kost dieser Personengruppe darstellen“.

Auf internationaler Ebene des Codex Alimentarius gelten teilweise noch vom EU-Recht abweichende Definitionen hinsichtlich Säuglingsanfangsnahrung und Folgenahrung. Folgenahrung wird durch die Codex Alimentarius-Kommission als Lebensmittel definiert, welches für Säuglinge „**über sechs Monate**“ bestimmt ist (Codex Alimentarius Commission, CODEX STAN 156-1987). Daraus ergeben sich international also verschiedene Definitionen bezüglich Säuglingsanfangsnahrung und Folgenahrung. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit finden die auf europäischem Recht basierenden Definitionen Anwendung.

Von der Säuglingsanfangsnahrung und Folgenahrung abzugrenzen ist die so genannte **Beikost**. Nach „Richtlinie 2006/125/EG der Kommission vom 5. Dezember 2006 über Getreidebeikost und andere Beikost für Säuglinge und Kleinkinder“ werden Getreidebeikost und andere Beikost für Säuglinge und Kleinkinder „als Teil einer abwechslungsreichen Kost verabreicht und bilden nicht den einzigen Bestandteil der Ernährung von Säuglingen und Kleinkindern“. Sie wird während der Entwöhnungsphase verwendet, während der die Säuglinge von der alleinigen Ernährung mit Milchnahrung auf normale Kost umgestellt werden. Unter dem Begriff Beikost werden also alle Säuglingsnahrungsmittel zusammengefasst, die nicht unter den Begriff Muttermilch oder Säuglingsanfangs- und Folgenahrung fallen. So sind beispielsweise Milch- und Getreidebreie als Beikost zu nennen.

Einen Sonderstatus nehmen die „**Lebensmittel für besondere medizinische Zwecke**“ ein. Hinsichtlich dieser Bezeichnung wird durch die Verordnung (EG) 2073/2005 auf die „Richtlinie 1999/21/EG der Kommission vom 25. März 1999 über diätetische Lebensmittel für besondere medizinische Zwecke“ verwiesen. Nach Artikel 1 (2) b) der Richtlinie 1999/21/EG werden „Lebensmittel für besondere medizinische Zwecke“ definiert als „Lebensmittel für eine besondere Ernährung, die auf besondere Weise verarbeitet oder formuliert und für die diätetische Behandlung von Patienten gedacht und unter ärztlicher Aufsicht zu verwenden sind. Ihr Zweck ist die ausschließliche oder teilweise Ernährung von Patienten mit eingeschränkter, behinderter oder gestörter Fähigkeit zur Aufnahme, Verdauung, Resorption, Verstoffwechslung oder Ausscheidung gewöhnlicher Lebensmittel oder bestimmter darin enthaltener Nährstoffe“. Unter diesen Begriff fallende Säuglingsnahrungsmittel sind auf der Verpackung als solche zu kennzeichnen. Sie sind freiverkäuflich im Einzelhandel erhältlich. Zu den „Lebensmitteln für besondere medizinische Zwecke“ gehören beispielsweise Heilnahrungen für Säuglinge mit Durchfall oder milchfreie Spezialnahrungen. Die relativ weit verbreiteten Produkte des Typs „hypoallergene Nahrung“ werden dagegen in der Regel als normale Säuglingsanfangs- oder Folgenahrungen kategorisiert.

Die auch als so genannte „Gläserware“ bezeichneten Vollkonserven gebrauchsfertiger Säuglings- und Kleinkindernahrungsmittel sind mikrobiologisch als steril anzusehen. Hier ist ausschließlich eine Rekontamination im Haushalt als relevant anzusehen. Im Rahmen dieser Arbeit werden derartige Erzeugnisse nicht weiter besprochen.

2.4 Potentielle Kontaminationswege, über die *Enterobacteriaceae* in Säuglingsfertignahrung gelangen können

Als Ursache für das Vorkommen von *Enterobacteriaceae* in Säuglingsfertignahrung werden Kontaminationswege bei der Prozessierung, Trocknung oder Verpackung vermutet.

Die Herstellung der Säuglingsfertignahrung erfolgt mittels Nassmixprozess, Trockenmixprozess oder einer Kombination dieser beiden. Beim Nassmixprozess werden alle Zutaten in flüssiger Form gemischt, wärmebehandelt (pasteurisiert oder sterilisiert), anschließend getrocknet und schließlich mit filtrierter Luft gekühlt (EFSA, 2004). Dieser Prozess scheint hinsichtlich einer bakteriellen Kontamination das sicherste Verfahren zu sein (EFSA, 2004). Beim Trockenmixprozess werden die bereits getrockneten Zutaten vermischt. Bei diesem und auch beim kombinierten Herstellungsverfahren kann der Eintrag von *Enterobacteriaceae* durch nicht-wärmebehandelte Zutaten, wie z.B. Stärke, Laktose, Vitamine oder Mineralstoffe erfolgen (MULLANE et al., 2006; FAO/WHO, 2004; EFSA, 2004). Als besonders kritische Rohstoffe hinsichtlich einer Kontamination mit *E. sakazakii* sind nach SANJAQ (2008) die Verdickungsmittel Stärke und Johannisbrotkernmehl, die Emulgatoren Mono- und Diglyceride und Sojalecithin und des Weiteren Apfelpulver anzusehen.

Eine weitere Eintragsmöglichkeit (in Form einer Rekontamination) bietet das Produktionsumfeld der entsprechenden Herstellungsräumlichkeiten. Dieses kann als Reservoir für *Enterobacteriaceae* dienen, aus dem heraus eine Kontamination erfolgen kann. Dabei sind insbesondere Feuchtigkeitsquellen (Kondens-, Reinigungswasser) kritisch zu sehen, weil dort eine Vermehrung der eventuell vorhandenen Erreger möglich ist und somit durch eine stärkere Kontamination des Produktionsumfeldes ein höheres Eintragsrisiko in das Erzeugnis besteht (FAO/WHO, 2006). Eine bestehende Kontamination des Produktionsumfeldes, sei es mit *E. sakazakii*, Salmonellen oder *Enterobacteriaceae*, ist nach verschiedenen Literaturangaben nur schwer unter Kontrolle zu bringen. Salmonellen erschweren die Dekontamination unter anderem durch das Phänomen der Nesterbildung, *Enterobacteriaceae* durch ihr nahezu ubiquitäres Vorkommen (EFSA, 2004). Einige *E. sakazakii*-Stämme zeichnen sich zudem durch die Fähigkeit zur Biofilmbildung und zur Adhäsion an Glas und PVC (Polyvinylchlorid) aus (LEHNER et al., 2005).

Da Säuglingsfertiernahrung häufig auf Milchpulverbasis hergestellt wird, ist auch die mikrobiologische Qualität des Milchpulvers von besonderer Bedeutung. Diese ist vor allem vom Herstellungsverfahren abhängig. Eine Kontamination des Milchpulvers über die Rohmilch kann ausgeschlossen werden, da Milchpulver aus pasteurisierter Milch (mind. 72 °C, 15 sec) hergestellt wird und *Enterobacteriaceae* Pasteurisierungstemperaturen nicht überleben. Im Vergleich zu anderen *Enterobacteriaceae* weist *E. sakazakii* zwar eine hohe Thermotoleranz auf (NAZAROWEC-WHITE et al., 1999), wobei Pasteurisierungstemperaturen aber anscheinend nicht überlebt werden. Eine weitere Wärmebehandlung der Milch stellt der eigentliche Trocknungsprozess dar. Wird zur Milchtrocknung das Walzentrocknungsverfahren angewendet, so wird die Milch konzentriert hohen Temperaturen ausgesetzt und es entsteht ein relativ keimarmes Milchpulver. Beim Sprühtrocknungsverfahren werden zwar Trocknungstemperaturen von 170-250 °C genutzt, die Temperatur im Inneren der versprühten Milchtröpfchen liegt jedoch lediglich bei 70-80 °C (BRÄUNIG & BARTELT, 2004) und ermöglicht somit eventuell das Überleben verschiedener Bakterien. Ein weiteres Risiko für eine Kontamination von Milchpulver mit Mikroorganismen stellen Luftströmungen dar, die z.B. bei der Kühlung des Milchpulvers verwendet werden, da hier eine Mobilisierung von Keimen auch aus weiter entfernten Bereichen des Produktionsumfeldes stattfinden kann.

Neben der hier beschriebenen herstellungsbedingten Kontaminationsmöglichkeit von Säuglingsfertiernahrung, ist eine Kontamination des Nahrungsmittels auch während der Rekonstitution, Lagerung und der Handhabung in Haushalt oder Klinik möglich.

2.5 Empfehlungen zur Zubereitungs-, Lagerungs- und Handhabungspraxis von Säuglingsfertiernahrung

Obwohl pulverförmige Säuglingsfertiernahrung kein steriles Produkt ist, besteht bei verschlossenen Packungen (aufgrund des niedrigen a_w -Wertes des Nahrungspulvers) kein Risiko einer Keimvermehrung. Die trinkfertig rekonstituierte Säuglingsfertiernahrung hingegen stellt ein exzellentes Medium für die Vermehrung von Bakterien dar. Somit kann fehlerhafte Zubereitung oder unsachgemäße Lagerung der rekonstituierten Nahrung im Verbraucherhaushalt zu einem erheblichen Gesundheitsrisiko für Säuglinge führen. Daher haben die einschlägigen Gesundheits- bzw. Ernährungsorganisationen Empfehlungen zum Umgang mit Säuglingsfertiernahrung herausgegeben (FAO/WHO, 2004; ESPGHAN, 2004;

DGKJ, 2004). Es werden jeweils Empfehlungen zur Zubereitung und Handhabung im privaten Haushalt und in Krankenhäusern genannt.

1. Empfehlungen für den Umgang mit Säuglingsfertignahrungsmitteln im privaten Haushalt:

- Säuglingsfertignahrung sollte für jede Mahlzeit frisch zubereitet werden und unverzüglich auf Trinktemperatur abgekühlt und verfüttert werden; auf keinen Fall sollte sie nach Rekonstitution länger als 4 Stunden der Raumtemperatur ausgesetzt sein
- eventuell vorhandene bakterielle Kontaminationen können durch die Verwendung von 70 °C warmem Wasser bei der Rekonstitution reduziert werden
- um eine Kreuzkontamination aus der Umgebung oder durch Zubereitungsutensilien zu vermeiden, sollte im Zubereitungsbereich auf gute Hygiene geachtet werden
- nicht verbrauchte Nahrungsreste sollten verworfen und nicht für die folgende Mahlzeit aufbewahrt werden

2. Empfehlungen für den Umgang mit Säuglingsfertignahrungsmitteln im Krankenhaus:

- für Hochrisikogruppen (Neu- und Frühgeborene) sollte bevorzugt sterile Flüssignahrung anstelle von Säuglingsfertignahrung in Pulverform verwendet werden
- das Personal sollte geschult werden und sich an schriftlich vorliegende Hygienerichtlinien halten
- um eine Kreuzkontamination aus der Umgebung oder durch Zubereitungsutensilien zu vermeiden, sollte im Zubereitungsbereich auf gute Hygiene geachtet werden
- sofern die Nahrung im Krankenhaus einmal täglich zubereitet und dann portionsweise zu Fütterungszeiten aufgewärmt wird, sollte sie direkt nach Zubereitung auf 4 °C abgekühlt und bis zur Verwendung bei dieser Temperatur aufbewahrt werden; die Erwärmung auf Trinktemperatur sollte erst unmittelbar vor der Fütterung erfolgen
- die einmal täglich zubereitete Säuglingsfertignahrung sollte in kleinen Portionen abgekühlt und aufbewahrt werden, denn je größer die zubereitete Portion ist, desto länger dauert der Abkühlungsprozess und desto höher ist das Risiko der Keimvermehrung und somit das Infektionsrisiko

- bei protrahierter Fütterung oder Dauersondierung sollten Restmengen nach vier Stunden verworfen werden

Diese Empfehlungen werden von neueren Untersuchungen zur Risikoanalyse und zum Risikomanagement von Säuglingsfertignahrung unterstützt (FAO/WHO, 2006). Das höchste Risiko besteht bei einer Säuglingsfertignahrungs-Rekonstitution mit 40-50 °C warmem Wasser und bei einer Lagerung der rekonstituierten Nahrung über längere Zeit bei ungeeigneten Temperaturen. Eine signifikante Inaktivierung von *E. sakazakii* konnte bei der Rekonstitution mit 70 °C heißem Wasser ermittelt werden. Einer generellen Umstellung auf eine Zubereitungstemperatur von 70 °C zur Reduzierung des mikrobiologischen Risikos stehen zurzeit noch verschiedene Gründe entgegen. Zu beachten ist der eventuelle Verlust hitzesensibler Zutaten, wie z.B. der Vitamine. Laut FAO/WHO (2006) ist die Reduzierung der Vitamin-Gehalte jedoch nur beim Vitamin C signifikant. Des Weiteren könnten durch die Zubereitung mit 70 °C heißem Wasser *Bacillus cereus* oder andere Sporenbildner aktiviert werden, das Pulver verklumpen oder zugesetzte Probiotika zerstört werden. Ein gewisses Risiko durch höhere Temperaturen wird auch für die zubereitende Person (Verbrühen) und den Säugling (Verbrennungen im Ösophagus) genannt.

Da viele Verbraucher nicht wissen, dass es sich bei Säuglingsfertignahrung in Pulverform nicht um ein steriles Produkt handelt, wurde empfohlen, folgende Hinweise auf Säuglingsfertignahrungs-Packungen aufzudrucken (FAO/WHO, 2006): a) Instruktionen zur Zubereitung und b) Warnung vor Gesundheitsgefahren bei inadäquater Zubereitung. Dieser Aufdruck wird ebenfalls durch das „International Code of Marketing of Breast milk Substitutes“ empfohlen. Instruktionen zur Zubereitung befinden sich bereits auf sämtlichen Verpackungen der im deutschen Handel erhältlichen Produkte. Auch ein Hinweis zur Aufbewahrungszeit für die fertig zubereitete Nahrung ist vorhanden. Dass eine Nicht-Einhaltung dieser Zubereitungshinweise zu gesundheitlichen Gefahren führen kann, wird bisher jedoch nur von wenigen Herstellern explicit aufgeführt.

2.6 Mögliche Ansätze zur Minimierung der *Enterobacteriaceae*-Kontamination von Säuglingsfertignahrung während der Herstellung

Zur Minimierung der *Enterobacteriaceae*-Kontamination seitens der Säuglingsfertignahrungs-Hersteller sollten alle Zutaten regelmäßig auf ihre

mikrobiologische Qualität überprüft werden, um den Eintritt von Mikroorganismen in die Produktionsräume zu minimieren (EFSA, 2004). Während die Anwesenheit von Wasser nicht unbedingt einen direkten Einfluss auf die Präsenz von Salmonellen hat, so beeinflusst sie jedoch unmittelbar den Anstieg der *Enterobacteriaceae*-Anzahl (EFSA, 2004). In den Produktionsräumen sollten daher unerwünschte Feuchtigkeitsquellen (Kondensations-, Reinigungs-, Regenwasser) möglichst vermieden werden, bzw. sollten, wo die Möglichkeit besteht, Nassreinigungs- durch Trockenreinigungsprozesse ersetzt werden (EFSA, 2004).

In der Literatur wurden auch Ansätze beschrieben, unter Verwendung von γ -Strahlung eine Keimreduzierung in Säuglingsfertiernahrung herbeizuführen (OSAILI et al., 2007). Abgesehen von der rechtlichen Problematik einer Bestrahlung von Lebensmitteln, dürfte jedoch eine Behandlung von Säuglingsfertiernahrung mit ionisierenden Strahlen weltweit kaum Akzeptanz finden. Andere theoretische Ansätze zur Minimierung von *E. sakazakii* in Säuglingsfertiernahrung liegen im Einsatz von Bakteriophagen (KIM et al., 2007) oder Monocaprylin (NAIR et al., 2004).

2.7 *E. sakazakii*

2.7.1 Allgemeines

Ursprünglich wurde *E. sakazakii* als „gelb-pigmentierter *Enterobacter cloacae*“ bezeichnet (URMENYI & FRANKLIN, 1961), 1980 dann aber als eigenständige Spezies klassifiziert (FARMER et al., 1980). Diese Nomenklaturänderung erfolgte aufgrund von Unterschieden in der DNA-DNA-Hybridisierung, den biochemischen Reaktionen und der Produktion von gelbem Pigment durch *E. sakazakii* im Gegensatz zu *Enterobacter cloacae*. Der Name *E. sakazakii* wurde zu Ehren des japanischen Bakteriologen Riichi Sakazaki gewählt. *E. sakazakii* wird derzeit in 16 Biogruppen unterteilt. Diese Unterteilung basiert auf dem unterschiedlichen Verhalten einzelner *E. sakazakii*-Stämme hinsichtlich biochemischer Reaktionen (FARMER et al., 1980; IVERSEN et al., 2007). Aktuell wird eine Nomenklaturänderung vorgeschlagen, derzufolge *E. sakazakii* sowie einige weitere Spezies der neuen Gattung *Cronobacter* zugeordnet werden. IVERSEN et al. (2007) schlugen folgende Genusbezeichnungen vor: *Cronobacter* gen. nov., *Cronobacter sakazakii* comb. nov., *Cronobacter muytjensii* sp. nov., *Cronobacter dublinensis* sp. nov.,

Cronobacter turicensis sp. nov. und *Cronobacter* genomspecies I. Diese Vorschläge basieren auf Unterschieden von *E. sakazakii*-Stämmen, die mittels AFLP (amplified fragment length polymorphisms), Ribotypisierung, 16S rRNA-Gen-Sequenzierung und DNA-DNA-Hybridisierung festgestellt werden konnten.

2.7.2 Erkrankungen durch *E. sakazakii*

2.7.2.1 Klinische Manifestation

E. sakazakii ist ein fakultativ pathogener Keim, der zu seltener, aber lebensbedrohender Meningitis, Sepsis und nekrotisierender Enterokolitis bei Neugeborenen und Säuglingen führen kann (siehe Tabelle 2). Die Infektionen sind häufig von schwerwiegendem und lethalem Verlauf gekennzeichnet. Im Rahmen der durch *E. sakazakii* bedingten Meningitis kommt es oft zu Komplikationen wie Zystenbildung, Ventrikulitis, nekrotisierender Meningoencephalitis, Zerebritis, Abszessen, Nekrosen und Hydrocephalus (BAR-OZ et al., 2001; GALLAGHER & BALL, 1991; BIERING et al., 1989; WILLIS & ROBINSON, 1988; NAQVI et al., 1985; MUYTJENS et al., 1983; KLEIMANN et al., 1981; JØKER et al., 1965).

Nach neuesten Erkenntnissen scheinen hinsichtlich der klinischen Manifestation bei *E. sakazakii*-Infektionen von Säuglingen folgende Unterschiede zu existieren (FAO/WHO, 2006; BOWEN & BRADEN, 2006). In Form von Meningitis manifestieren sich *E. sakazakii*-Infektionen anscheinend meist bei zeitlich normal geborenen Säuglingen (> 37 Wochen Schwangerschaftsdauer) während der neonatalen Periode (erste vier Lebenswochen). In Form von Bakteriämie manifestieren sich *E. sakazakii*-Infektionen hingegen häufig bei zu früh geborenen Säuglingen außerhalb der neonatalen Periode (meist jedoch noch während eines Lebensalters von < 2 Monaten).

Die Mortalitätsrate von *E. sakazakii*-Erkrankungen unterscheidet sich je nach klinischer Manifestation. Insbesondere die Mortalität hinsichtlich der *E. sakazakii* bedingten Meningitis ist sehr hoch, nach IVERSEN & FORSYTHE (2003) sterben 40-80 % der betroffenen Säuglinge, nach FAO/WHO (2006) 44 %. Überlebende tragen meist neurologische Spätschäden davon, wie z.B. geistige und körperliche Entwicklungsstörungen. Die Mortalität hinsichtlich der durch *E. sakazakii* bedingten

Bakteriämie beträgt 8 % (FAO/WHO, 2006); die Mortalität hinsichtlich der nekrotisierenden Enterokolitis 10-55 % (IVERSEN & FORSYTHE, 2003).

2.7.2.2 Risikogruppen

Erkrankungen durch *E. sakazakii* sind zwar bei allen Altersgruppen beschrieben worden, speziell als Risikogruppe werden jedoch Säuglinge (d.h. Menschen im ersten Lebensjahr) genannt. Innerhalb der Altersgruppe der Säuglinge werden als Höchststrisikogruppen Frühgeborene (vor Vollendung der 37. Schwangerschaftswoche Geborene), Neugeborene (Säuglinge bis zu einem Lebensalter von vier Wochen), Säuglinge, die jünger als zwei Monate sind, Säuglinge mit geringem Geburtsgewicht, immunsupprimierte und abwehrgeschwächte Säuglinge, Säuglinge mit medizinischen Komplikationen, hospitalisierte Säuglinge und Säuglinge HIV-positiver Mütter genannt (FAO/WHO, 2006 und 2004; EFSA, 2004; FDA, 2003 a). Die meisten bisher erfassten Erkrankungen durch *E. sakazakii* traten bei diesen Risikogruppen auf.

2.7.2.3 Vorkommen von Erkrankungen durch *E. sakazakii*

Erstmals mit einem Säuglings-Todesfall in Verbindung gebracht wurde *E. sakazakii* 1958 als Ursache von zwei schweren Fällen neonataler Meningitis (URMENYI & FRANKLIN, 1961). Seither wurde weltweit immer wieder von sporadischen Erkrankungsfällen und Infektions-Ausbrüchen durch *E. sakazakii* bei Neugeborenen und Säuglingen berichtet. Eine Übersicht über die von 1958-2006 publizierten Daten über *E. sakazakii*-Erkrankungen dieser Altersgruppen ist in Tabelle 2 und Tabelle 3 dargestellt. Weltweit sind in diesem Zeitraum circa 70 *E. sakazakii*-Erkrankungen bei Neugeborenen und Säuglingen aufgetreten. Die jährliche Inzidenz invasiver *E. sakazakii*-Erkrankungen beträgt nach Angaben des „U.S. FoodNet survey“ (FAO/WHO, 2006) 1 pro 100.000 bei Säuglingen, 8,7 pro 100.000 bei Neugeborenen mit geringem Geburtsgewicht (< 2500 g) und 9,4 pro 100.000 bei Neugeborenen mit sehr geringem Geburtsgewicht (< 1500 g).

Bei einer Vielzahl der bisher erfassten *E. sakazakii*-Infektionen blieben Erregerreservoir und Übertragungsweg unbekannt. Bisherige Daten lassen jedoch darauf schließen, dass Säuglingsfertiernahrung auf Milchpulverbasis in 50-80 % der Fälle sowohl Quelle als auch Vehikel der *E. sakazakii*-induzierten Erkrankungen war (FAO/WHO, 2004).

In Tabelle 2 werden *E. sakazakii*-Erkrankungen mit gesicherter oder sehr wahrscheinlicher Beteiligung von Säuglingsfertignahrungsmitteln (Anfangs- und Folgemilch) aufgeführt.

Ein **gesicherter Kausalzusammenhang** zwischen *E. sakazakii* in Nahrung und Erkrankungen wurde in einer Reihe von Arbeiten geführt (BIERING et al., 1989; SIMMONS et al., 1989; CLARK et al., 1990; VAN ACKER et al., 2001; CDC, 2002; MINISTRY OF HEALTH, 2005; COIGNARD & VAILLANT, 2006; COIGNARD et al., 2006). In diesen Studien wurde die Bestätigung des Kausalzusammenhangs entweder durch mikrobiologische, molekularbiologische oder aber durch epidemiologisch-statistische Methoden durchgeführt. Sehr wahrscheinlich ist die Beteiligung von Säuglingsfertignahrung an den *E. sakazakii*-Erkrankungen bei den von MUYTJENS et al. (1983), NORIEGA et al. (1990), BAR-OZ et al. (2001) und BLOCK et al. (2002) beschriebenen Fällen. Von diesen Autoren konnte *E. sakazakii* zwar jeweils aus der verwendeten, fertig zubereiteten Säuglingsnahrung und den zur Zubereitung verwendeten Gerätschaften nachgewiesen werden, nicht jedoch aus ungeöffneten Packungen des gleichen Säuglingsnahrungs-Produktes. Die Identität der *E. sakazakii*-Isolate aus Blut oder Cerebrospinalflüssigkeit der Patienten und der Isolate aus Säuglingsnahrung wurde von diesen Autoren anhand übereinstimmender Eigenschaften bezüglich der Antibiotikumsresistenzmuster, der biochemischen Merkmale oder mittels Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE) nachgewiesen. Während so bestätigt werden konnte, dass Säuglingsfertignahrung das Vehikel der Erkrankungen war, blieb jedoch ungeklärt, ob die Nahrung auch Quelle der Erkrankung war.

Da hinsichtlich der in Tabelle 2 genannten „Anzahlen der Betroffenen“ in der Literatur unterschiedliche Angaben existieren, wurde versucht, in Tabelle 2 nur die gesicherten Erkrankungsfälle zusammenzustellen. Hinsichtlich des Infektionsausbruchs in Belgien (VAN ACKER et al., 2001) kann auch von 12 erkrankten Säuglingen ausgegangen werden, hinsichtlich des Infektionsausbruches 2001 in den USA (CDC, 2002) auch von 11 erkrankten. Während einiger Infektionsausbrüche kam es zusätzlich zu den in Tabelle 2 angegebenen Erkrankungsfällen zu Kolonisationen weiterer Säuglinge mit *E. sakazakii*. So berichten BAR-OZ et al. (2001) von drei weiteren Neugeborenen mit *E. sakazakii*-Kolonisation, das MINISTRY OF HEALTH, New Zealand (2005) von vier weiteren Säuglingen und COIGNARD et al. (2006) von fünf weiteren Neugeborenen.

Aus Deutschland liegen bezüglich Infektionen mit *E. sakazakii* so gut wie keine Daten vor. Lediglich RIES et al. (1994) berichteten von einem Neugeborenen, das an Meningitis durch *E. sakazakii* erkrankte.

In Tabelle 3 sind Erkrankungsfälle bei Säuglingen durch *E. sakazakii* zusammengestellt, bei denen der **Kausalzusammenhang bezüglich der Infektionsquelle unklar** blieb, wobei die Infektionsquelle entweder nicht untersucht wurde oder aber nicht ermittelt werden konnte.

Tabelle 2: Publierte Daten zu *E. sakazakii*-Erkrankungen bei Neugeborenen, Säuglingen und Kleinkindern mit gesicherter oder sehr wahrscheinlicher Beteiligung von Säuglingsfertiernahrungsmitteln (angelehnt an FAO/WHO, 2006; IVERSEN & FORSYTHE, 2003; LAI, 2001)

Jahr des Ausbruchs/Falles	Land	Anzahl der Betroffenen	Todesfälle	Alter der Betroffenen	Symptome	Referenz
1977-1981	Niederlande	8	6	3 - 9 Tage	Meningitis Sepsis nekrotisierende Enterokolitis	MUYTJENS et al., 1983
1986-1987	Island	3	1	5 Tage	Meningitis Bakteriämie	BIERING et al., 1989 CLARK et al., 1990
1988	USA	4	0	13 - 57 Tage	blutige Diarrhoe Sepsis	SIMMONS et al., 1989 CLARK et al., 1990
1988	USA	1	0	6 Monate	Bakteriämie	NORIEGA et al., 1990
1998	Belgien	1*	1	33 Tage	nekrotisierende Enterokolitis Bakteriämie	VAN ACKER et al., 2001
1999-2000	Israel	2	0	3 + 4 Tage	Meningitis Sepsis	BAR-OZ et al., 2001; BLOCK et al., 2002
2001	USA	1**	1	11 Tage	Meningitis	CDC, 2002
2004	Neuseeland	1***	1	k.A.	Meningitis	Ministry of Health, New Zealand, 2005
2004	Frankreich	4****	2	k.A.	Meningitis Konjunktivitis hämmorrhagische Colitis	COIGNARD & VAILLANT, 2006; COIGNARD et al., 2006

* = je nach Angabe auch 12 erkrankte; ** = je nach Angabe auch 11 erkrankte; *** = je nach Angabe auch 5 erkrankte; **** = je nach Angabe auch 9 erkrankte; k.A.=keine Angabe

Tabelle 3: Publierte Daten zu *E. sakazakii*-Erkrankungen bei Neugeborenen, Säuglingen und Kleinkindern, für die keine eindeutige Infektionsquelle ermittelt wurde (angelehnt an FAO/WHO, 2006; IVERSEN & FORSYTHE; 2003; LAI, 2001)

Jahr des Ausbruchs/Falles	Land	Anzahl der Betroffenen	Todesfälle	Alter der Betroffenen	Symptome	Referenz
1958	England	2	2	5 + 10 Tage	Meningitis	URMENYI & FRANKLIN, 1961
1958	Dänemark	1	0	4 Tage	Meningitis	JØKER et al., 1965
1958	USA	1	0	7 Tage	Bakteriämie	MONROE & TIFT, 1979
1958	USA	1	0	5 Wochen	Meningoencephalitis	KLEIMAN et al., 1981
1958	USA	1	0	5 Wochen	Meningitis Sepsis	ADAMSON & ROGERS, 1981
1984	USA	1	0	21 Tage	Meningitis	NAQVI et al., 1985
1984	Griechenland	4*	4	2 Tage - 2 Monate	Sepsis Meningitis	ARSENI et al., 1987
1984	USA	2	0	8 Tage + 4 Wochen	Meningitis Bakteriämie	WILLIS & ROBINSON, 1988
1981-1988	Portugal	1	1	k.A.	Meningitis	LECOUR et al., 1989
1986-1987	Spanien	4	0	Neonaten	Konjunktivitis Appendicitis Wundexsudat	REINA et al., 1989

* = insgesamt lag bei elf Neugeborenen eine Kolonisation mit *E. sakazakii* vor, vier der elf Neugeborenen zeigten klinische Symptome; k.A. = keine Angabe

Fortsetzung Tabelle 3

Jahr des Ausbruchs/Falles	Land	Anzahl der Betroffenen	Todesfälle	Alter der Betroffenen	Symptome	Referenz
1988	USA	1	0	2 Tage	Meningitis Bakteriämie	GALLAGHER & BALL, 1991
k.A.	Deutschland	1	0	8 Tage	Meningitis Sepsis	RIES et al., 1994
k.A.	Kanada	1	0	20 Monate	infizierte, intradurale Dermoidzyste	TEKKÖK et al., 1996
2000	USA	1	0	6 Tage	Meningitis Bakteriämie	BURDETTE & SANTOS, 2000
1999-2000	USA	1	0	3 Jahre	Bakteriämie	LAI, 2001
2002	Brasilien	1	1	14 Tage	Meningitis	BARREIRA et al., 2003
k. A.	USA	1	k. A.	k. A.	k. A.	CDC, unpublished data
k. A.	USA	6	k. A.	k. A.	k. A.	CDC, unpublished data
k. A.	Frankreich	2	k. A.	k. A.	k. A.	CDC, unpublished data
k. A.	USA	2	k. A.	k. A.	k. A.	CDC, unpublished data
k. A.	USA	2	k. A.	k. A.	k. A.	CDC, unpublished data

k.A. = keine Angabe; CDC unpublished data: aus FAO/WHO (2006)

Bei der Zusammenstellung der weltweit erfassten Erkrankungen durch *E. sakazakii* muss berücksichtigt werden, dass besonders im Hinblick auf neonatale Diarrhoen wahrscheinlich hohe Dunkelziffern existieren und daher die Möglichkeit der Unterschätzung der Vorkommenshäufigkeit von Diarrhoen durch *E. sakazakii* gegeben ist. Gerade Diarrhoen, die aufgrund der nekrotisierenden Enterokolitis entstehen, gehen jedoch mit Nekrosen und Pneumosis intestinalis und somit einem schwerwiegenden Krankheitsverlauf einher. Nach MIHATSCH et al. (2002) ist die Häufigkeit der nekrotisierenden Enterokolitis trotz verbesserter Therapiemethoden in den letzten Jahren nicht gesunken (jedes zehnte Frühgeborene mit einem Geburtsgewicht unter 1500 g erkrankt an nekrotisierender Enterokolitis) und die Mortalitätsrate beträgt bis zu 50 %. Eine eindeutige Ursache der nekrotisierenden Enterokolitis ist bisher nicht bekannt. VAN ACKER et al. (2001) erwähnen jedoch eine Unterschätzung der pulverisierten Milchnahrung bei der Entwicklung der nekrotisierenden Enterokolitis. LUCAS & COLE (1990) berichten von einer zehnfach höheren Erkrankungshäufigkeit an nekrotisierender Enterokolitis bei fertignahrungsernährten Säuglingen im Gegensatz zu gestillten Säuglingen.

E. sakazakii scheint zwar nach gegenwärtigem Wissensstand primär bei Säuglingen zu Erkrankungen zu führen, es wurde aber auch von Erkrankungsfällen bei Erwachsenen berichtet. Zwar kommen Infektionen durch *E. sakazakii* bei Erwachsenen wesentlich seltener vor, durch folgende Fälle wird jedoch die Pathogenität von *E. sakazakii* beim Erwachsenen deutlich. Es wird berichtet von *E. sakazakii*-Bakteriämie oder -Sepsis (JIMENEZ & GIMENEZ, 1982; HAWKINS et al., 1991; EMERY & WEYMOUTH, 1997; LAI, 2001; SEE et al., 2007), von Pneumonie (LAI, 2001), Osteomyelitis und orthopädischen Infektionen (CORTI et al., 2007; PRIBYL et al., 1985), Vaginitis (ONGRÁDI, 2002) und multiplen Abszessen in der Milz (SEE et al., 2007). Offensichtlich führt eine *E. sakazakii*-Infektion beim Erwachsenen also zu anderen Erkrankungssymptomen als beim Säugling und Kleinkind, lediglich die Bakteriämie und Sepsis scheinen bei allen Altersklassen aufzutreten. *E. sakazakii*-Meningitiden sind beim Erwachsenen bisher nicht aufgetreten. EMERY und WEYMOUTH (1997) berichten zwar von Hirnatrophie bei einem 68jährigen Mann; bei diesem wurde *E. sakazakii* jedoch nur aus Blut und Urin und nicht aus Cerebrospinalflüssigkeit nachgewiesen. Es handelt sich bei den Patienten sowohl um jüngere als auch ältere Erwachsene. Todesfälle sind bisher bei den über 68 Jährigen zu verzeichnen.

2.7.2.4 Minimale Infektionsdosis und Pathogenese

Über die minimale Infektionsdosis und die Pathogenese von *E. sakazakii* ist bisher noch wenig bekannt. Die minimale Infektionsdosis dürfte aber relativ niedrig liegen. Erkrankungen wurden auf Säuglingsnahrungsmittel mit Gehalten an *E. sakazakii* von wenigen Kolonie bildenden Einheiten (KbE) pro 100 g zurückgeführt. Beispielsweise wurden während eines *E. sakazakii*-Infektionsausbruches in den USA (SIMMONS et al., 1989) nur 8 KbE *E. sakazakii*/100 g in einer angebrochenen Dose der den Ausbruch verursachenden Säuglingsfertignahrung nachgewiesen. Allerdings wurde in diesem Fall durch unsachgemäße Rekonstitution bzw. längere Lagerung des rekonstituierten Erzeugnisses praktisch eine unfreiwillige Keimanreicherung durchgeführt.

Da bisher keine exakte Infektionsdosis von *E. sakazakii* bekannt ist, stellten IVERSEN & FORSYTHE (2003) ein Rechenexempel auf, welchem eine angenommene Infektionsdosis von 1000 Zellen *E. sakazakii* zu Grunde liegt (dies entspricht z.B. der Infektionsdosis von *Escherichia coli* O157). Bei einer angenommenen Ausgangskontamination der pulverförmigen Säuglingsfertignahrung von 0,36 KbE/100 g (was z.B. den quantitativen Untersuchungsergebnissen von MUYTJENS et al., 1988 entspricht) und einer Mahlzeit, die mit 18 g Pulver zubereitet wird, könnte die zubereitete Mahlzeit (115 ml) 0,0648 *E. sakazakii*-Zellen enthalten. Während der Lagerung bei 37 °C (Fläschchenwärmer) wäre die Infektionsdosis von 1000 Zellen innerhalb von 7 h erreicht, während der Lagerung bei 21 °C (Raumtemperatur) nach 17,9 h.

E. sakazakii scheint eine Affinität zum Zentralen-Nervensystem zu haben, da der Erreger in mehreren Fällen Meningitis verursachte. Um nach oraler Aufnahme Meningitis hervorrufen zu können, muss ein Mikroorganismus die Fähigkeit besitzen, die Acidität des Magensaftes zu überleben, am Mukosa-Epithel des Magen-Darm-Traktes zu haften, den Übergang ins Blut vorzunehmen, dem Immunsystem des Wirtes auszuweichen, die Blut-Hirn-Schranke zu passieren und in der Cerebrospinalflüssigkeit zu überleben. Dazu untersuchten MANGE et al. (2006) die Adhäsions-Fähigkeit von *E. sakazakii* an den beiden epithelialen Zelllinien HEp-2 und Caco-2 und der Zelllinie HBMEC, welche eine Endothel-Zelllinie des mikrovaskulären Systems im Gehirn darstellt. An allen drei Zelllinien konnte *E. sakazakii* haften. Es wurden zwei unterschiedliche Adhäsionsmuster festgestellt: zum einen eine diffuse Adhäsion, zum anderen eine Formation von

Aggregaten. Einige *E. sakazakii*-Stämme wiesen beide Adhäsionsmuster auf. Es scheint also eine Heterogenität bezüglich der Adhäsion der unterschiedlichen *E. sakazakii*-Stämme vorzuliegen. Nach MANGE et al. (2006) ist die Adhäsionsfähigkeit von *E. sakazakii* zum Großteil wahrscheinlich nicht durch Fimbrien bedingt. Um die Blut-Hirn-Schranke passieren zu können, besitzen die meisten Mikroorganismen Zellwandglycopeptide, Endotoxine, Proteasen, Collagenasen oder Elastasen. Welche Faktoren *E. sakazakii* nutzt, ist noch nicht geklärt (IVERSEN & FORSYTHE, 2003). Nach Untersuchungen von PAGOTTO et al. (2003) an Babymäusen scheinen Enterotoxine von *E. sakazakii* als Virulenzfaktoren an der Pathogenese mitbeteiligt oder ursächlich zu sein. In einer aktuellen Studie konnte das bereits von PAGOTTO et al. (2003) beschriebene Enterotoxin von *E. sakazakii* näher charakterisiert werden (RAGHAV & AGGARWAL, 2007). Die höchste Aktivität wies das Enterotoxin bei einem pH-Wert von 6 auf, es erwies sich bei 90 °C über 30 min stabil (RAGHAV & AGGARWAL, 2007). Außerdem konnten zythopathogene Effekte (Zell-Lyse) an CHO-, Vero- und Y-Zelllinien durch *E. sakazakii* beobachtet werden (PAGOTTO et al., 2003). Zwei der von PAGOTTO et al. (2003) untersuchten *E. sakazakii*-Stämme wiesen niedrige letale Level bei der intraperitonealen Infektion der Mäuse auf, waren jedoch nicht letal bei der Gabe von hohen oralen Dosen. Eventuell fehlen diesen Stämmen zusätzliche Virulenzfaktoren, die das Überleben im Magen oder die Translokation durch die Darmwand ermöglichen (PAGOTTO et al., 2003). Hitzestabile Endotoxine (in Form von Lipopolysacchariden), welche die Permeabilität des intestinalen Epithels erhöhen und *E. sakazakii* und anderen Bakterien die Translokation aus dem Darm erleichtern oder ermöglichen können, sind von TOWNSEND et al. (2007) in Säuglingsfertiernahrung aus verschiedenen Ländern nachgewiesen worden. Die von TOWNSEND et al. (2007) nachgewiesenen Endotoxinlevel betragen 40 bis $5,5 \times 10^4$ EU (endotoxin units) pro Gramm Säuglingsfertiernahrung. Des Weiteren konnten diese Autoren am Rattenmodell nach intraperitonealer Injektion von Lipopolysacchariden und anschließender oraler Infektion mit *E. sakazakii*, Bakterien im Mesenterium, Milz, Blut und Cerebrospinalflüssigkeit nachweisen (TOWNSEND et al., 2007). Bei Vorhandensein von Endotoxinen in Säuglingsfertiernahrung könnten also auch *E. sakazakii*-Stämme die Darmwand passieren, denen spezielle Virulenzfaktoren dazu fehlen.

2.7.3 Vorkommen von *E. sakazakii*

Das natürliche Habitat von *E. sakazakii* ist noch unbekannt, es gibt aber Hinweise darauf, dass er ursprünglich aus pflanzlichem Material stammt (MULLANE et al., 2006). *E. sakazakii* wurde bereits aus unterschiedlichen Lebensmitteln, aus Umfeldproben lebensmittelherstellender Betriebe sowie aus Proben aus dem Haushaltsbereich isoliert, ist also offensichtlich recht weit verbreitet. Trotz dieser Nachweise von *E. sakazakii*, bleibt die Frequenz der Kontamination unbekannt, sodass das letztendliche Expositionsrisiko nur schwer abgeschätzt werden kann (MULLANE et al., 2006).

2.7.3.1 Vorkommen von *E. sakazakii* in Säuglingsfertiernahrung

In 50-80 % der Fälle von *E. sakazakii*-induzierten Erkrankungen wurde Säuglingsfertiernahrung auf Milchpulverbasis sowohl als Quelle als auch als Vehikel identifiziert (FAO/WHO, 2004). Tabelle 4 zeigt einen Überblick über bisher publizierte Untersuchungen zum Vorkommen von *E. sakazakii* in Säuglingsfertiernahrungsmitteln. In dieser Tabelle nicht aufgeführt werden Untersuchungen, die jeweils aufgrund eines Infektionsausbruches zur Ursachenermittlung durchgeführt worden sind.

Weltweit wurden bisher Ergebnisse für circa 1500 Proben Säuglingsfertiernahrung publiziert. In 0-22,7 % der jeweils untersuchten Proben (siehe Tabelle 4) wurde eine Kontamination mit *E. sakazakii* festgestellt. Im Durchschnitt erwiesen sich somit rund 9 % dieser Proben als kontaminiert mit *E. sakazakii*. Dabei ist jedoch zu berücksichtigen, dass die Nachweishäufigkeit abhängig von der untersuchten Probenmenge und der zum Nachweis angewandten Methode war. Die höchsten Nachweisraten wurden zumeist in solchen Studien gefunden, bei denen Probenmengen von 333 g untersucht worden waren. Die angewandten Methoden unterschieden sich hinsichtlich ihrer Selektivität für den Nachweis von *E. sakazakii*. Die Kontaminationshöhen waren in Bereichen zwischen 0,36 und 66 KbE/100 g angesiedelt.

Zu beachten bleibt bei den Darstellungen in Tabelle 4, dass einige der Autoren ausschließlich Säuglingsanfangsnahrungen und Folgenahrungen untersuchten (MUYTJENS et al., 1988; NAZAROWEC-WHITE & FARBER, 1997; FDA, 2003 b, LEUSCHNER et al., 2004; FAO/WHO, 2006; ESTUNINGSIH, 2006; SANJAQ, 2008). Säuglingsanfangsnahrungen und Folgenahrungen sowie des Weiteren auch

Säuglingsfertignahrungen, wie z.B. Beikost, diätetische Nahrungen, Produkte auf Getreide- oder Sojabasis und milchfreie Produkte wurden von HEUVELINK et al. (2005), IVERSEN & FORSYTHE (2004), KRESS et al. (2005), WITTHUHN et al. (2007) und SHAKER et al. (2007) untersucht. Ein Problem der exakten Zuordnung bzw. Vergleichbarkeit der untersuchten Proben liegt in der teilweise unzureichenden Beschreibung der Zusammensetzung sowie des empfohlenen Verwendungsalters.

Aus Deutschland wurden Säuglingsfertignahrungen von MUYTJENS et al. (1988) LEUSCHNER et al. (2004), KRESS et al. (2005) und SANJAQ (2008) untersucht. MUYTJENS et al. (1988) untersuchten zehn Proben aus Deutschland, von denen fünf (50 %) mit *E. sakazakii* kontaminiert waren, LEUSCHNER et al. (2004) untersuchten drei Proben, von denen keine (0 %) mit *E. sakazakii* kontaminiert war und KRESS et al. (2005) untersuchten 224 Proben, von denen sich 42 (18,8 %) als kontaminiert mit *E. sakazakii* erwiesen. SANJAQ (2008) berichtet ebenfalls über Untersuchungen von Säuglingsfertignahrung in Deutschland, bei denen sie eine Kontaminationshäufigkeit von 2,97 % bezüglich *E. sakazakii* ermittelte.

Tabelle 4: Zusammenstellung von Literaturdaten zum Vorkommen von *E. sakazakii* in Säuglingsfertiernahrungsmitteln

Referenz	Herkunftsland der Proben	Probenanzahl n	<i>E. sakazakii</i> -positive Proben n	%	Kontaminationshöhe [KbE/100g]	Methode zur Isolierung und Identifizierung von <i>E. sakazakii</i>	Probenmenge [g]
MUYTJENS et al., 1988	35 verschiedene Länder	141	20	14,2	0,36 - 66	BPW, EEB, VRBG, Schafblutagar, Eosinmethylenblauagar, Gelbpigmentierung, DNase, α -Glucosidase, api 20E	333 g
NAZAROWEC-WHITE & FARBER, 1997	Kanada	120	8	6,7	0,36	destilliertes Wasser, EEB, VRBG, api 20E	333 g
HEUVELINK et al., 2005	Niederlande	40	1	2,5	n.d.	BPW, EEB, VRBG, TSA, α -Glucosidase, Mac Conkey, api 20E, api ZYM, PCR, PFGE	25 g
Untersuchungsjahr 2002	Niederlande	101	2	2,0	n.d.	“	25 g
Untersuchungsjahr 2003	Niederlande	101	0	0	n.d.	“	50 g
Untersuchungsjahr 2004	Niederlande	139	5	3,6	n.d.	BPW, mLST, TSA, α -Glucosidase, api 20E, PCR, PFGE	50 g
FDA, 2003 b	k. A.	22	5	22,7	0,36	FDA-Methode (2002)	333 g
IVERSEN & FORSYTHE, 2004	Europa, Afrika, Asien, USA	131	7	5,3	n.d. (nur für <i>Enterobacteriaceae</i>)	BPW, EEB, VRBG, DFI, TSA, api 20E	25 g

Referenz	Herkunftsland der Proben	Probenanzahl n	<i>E. sakazakii</i> -positive Proben n	Kontaminationshöhe [KbE/100g]	Methode zur Isolierung und Identifizierung von <i>E. sakazakii</i>	Probenmenge [g]	
LEUSCHNER et al., 2004	11 Länder, vorwiegend UK und Australien	58	8	13,8	n.d.	BPW, EEB, VRBG, NA- α -MUG, api 20E, Tween 80-Esterase	variierend
KRESS et al., 2005	Deutschland	224	42	18,8	0,36 - 7,5	BPW, EEB/mLST, DFI/ESIA/VRBG, TSA, api 20E, ID 32E, Tween 80-Esterase, PCR	300 g
FAO/WHO, 2006 (personal communication with R. Santos)	k.A.	98	12	12,2	0,22 - 1,61	FDA & BAX	500 g
ESTUNINGSIH et al., 2006	Südostasien (Indonesien, Malaysia)	74	10	13,5	n.d.	Salmonellen/Shigellen-spezifische US, anschl. VRBG, TSA, ESIA, api 20E	50 g
RESTAINO et al., 2006	USA	20	0	0	n.d.	FDA- & ESPM-ESSM-Methode, api 20E, Biolog MicroLog3 4.20	ca. 370 g
WITTHUHN et al., 2007	Südafrika	22	4	18,2	900 KbE/ g - Überwucherung der Nährbodens	FDA (2002), api 20E, PCR	100 g
SHAKER et al., 2007	Jordanien	23	4	17,4	n.d.	FDA (2002), api 24E, DFI	10 g
SANJQAQ, 2008	k.A.	269	8	3,0	0,3-0,92	FDA (2002), ISO 22964	333 g

BPW = Buffered Peptone Water; EEB = *Enterobacteriaceae* Enrichment Broth; VRBG = Violet Red Bile Glucose Agar; n.d. = nicht durchgeführt; TSA = Trypton Soya Agar; PCR = Polymerase-Kettenreaktion; PFGE = Pulsfeldgelelektrophorese; mLST = modified Lauryl Sulfate Tryptose Broth; k.A. = keine Angabe; FDA = Food and Drug Administration; DFI = Druggan-Forsythe-Iversen-Agar; UK = England; NA- α -MUG = Natrium- α -Methylumbelliferyl; ESIA = *E. sakazakii* Isolation Agar; US = Untersuchung; ESPM = *E. sakazakii* Plating Medium; ESSM = *E. sakazakii* Screening Medium; ISO = International Standard Organisation

Auch in den Berichten zahlreicher staatlicher Einrichtungen der Lebensmittelüberwachung finden sich Angaben zum Vorkommen von *E. sakazakii* in Säuglingsfertiernahrung. Es handelte sich dabei wohl zum Teil um Verdachtsproben. Angaben zu Probenmenge und Untersuchungsverfahren sind in diesen Berichten meist nicht angegeben. Tabelle 5 zeigt eine Übersicht über Ergebnisse aus einigen dieser Berichte. Im Gegensatz zu den in Tabelle 4 genannten Untersuchungen wurden durch die staatlichen Einrichtungen der Lebensmittelüberwachung seltener Kontaminationen von Säuglingsfertiernahrung mit *E. sakazakii* festgestellt; im Durchschnitt bei unter 2 % der untersuchten Säuglingsfertiernahrungsmittel.

Tabelle 5: Vorkommen von *E. sakazakii* in Säuglingsfertiernahrung nach Berichten staatlicher Einrichtungen der Lebensmittelüberwachung

Unters.- jahr	Proben- anzahl	<i>E. sakazakii</i> - pos. Proben		Art der Probe	untersuchende Behörde
		n	%		
2002	12	1	8,3	Säuglingsnahrung Trockenmilchbasis	CVUA Karlsruhe
2002	8	0	0	Säuglingsnahrung	CVUA Sigmaringen
2004	19	0	0	Säuglingsnahrung Trockenmilchbasis	Landesveterinär- und Lebensmitteluntersuchungs- amt Mecklenburg- Vorpommern
2004	56	0	0	36Anfangsmilchen 19 Folgemilchen 1 Milchbrei	Bayrisches Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit
2005	215	0	0	161 Anfangs- und Folgemilchen 54 Milchbreie	Bayrisches Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit
2006	84	0	0	74 Anfangs- und Folgemilchen 10 Milchbreie	Bayrisches Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit
2007	91	7	7,7	Säuglingsnahrung	Österreichische Agentur für Gesundheit und Ernährungssicherheit

Unters. = Untersuchungs; pos. = positive; CVUA = Chemisches und Veterinäruntersuchungsamt

Das Problem der Kontamination von Säuglingsfertignahrungsmitteln mit *E. sakazakii* wird nicht nur durch die in Tabelle 4 und Tabelle 5 erwähnten Untersuchungen belegt, sondern auch durch verschiedene Rückrufaktionen von Säuglingsfertignahrung aus dem Handel. 2001 erfolgte der Rückruf einer Säuglingsfertignahrung in USA (Tennessee) als Reaktion auf einen Todesfall bei einer Frühgeburt durch mit *E. sakazakii* kontaminierter Säuglingsfertignahrung (CDC, 2002). Eine weitere Rückrufaktion eines Säuglingsfertignahrungsprodukts erfolgte in Belgien (IBFAN, 2002) aufgrund eines an Meningitis verstorbenen Säuglings, welche durch *E. sakazakii* in Säuglingsnahrung hervorgerufen worden war. Während eines *E. sakazakii*-Infektionsausbruches 2006 in Frankreich (COIGNARD et al., 2006) wurde ebenfalls die Charge der ursächlichen Säuglingsfertignahrung zurückgerufen. Mit diesem Ausbruch in Zusammenhang stehen Rückrufaktionen in Brasilien, Hongkong, Irland, Gambia und UK. Seit Juni 2007 wurden auch in Deutschland mehrere Rückrufaktionen von Säuglingsfertignahrungsmitteln aufgrund von Kontamination mit *E. sakazakii* durch die Presse bekannt gegeben. Eine Übersicht über diese Rückrufaktionen in Deutschland ist in Tabelle 6 dargestellt.

Tabelle 6: Aktuelle, in der Presse bekannt gegebene Rückrufaktionen deutscher Säuglingsnahrungshersteller aufgrund von Kontamination der Säuglingsnahrung mit *E. sakazakii*

Säuglingsnahrungs-hersteller	Produkt	Grund des Rückrufes	Zeitpunkt d. Rückrufes
Bebivita, München	Anfangsmilch 1	positiver Befund während Routinekontrolle im Herstellerbetrieb	Juni 2007
Milupa, Friedrichsdorf	Milumil 1 Anfangsnahrung	positiver Befund während Routinekontrolle im Herstellerbetrieb	Juni 2007
Hipp, Pfaffenhofen	Hypoallergene Anfangsnahrung HA 1	positiver Befund während Monitoring durch die AGES	Juli 2007
Babylove, Karlsruhe	Dauermilch 1	positiver Befund während Monitoring durch die AGES	Juli 2007
Bebivita, München	Anfangsmilch 1	positiver Befund während Routinekontrolle im Herstellerbetrieb	September 2007

d. Rückrufes = des Rückrufes; AGES = Agentur für Gesundheit und Ernährungssicherheit in Österreich

2.7.3.2 Ubiquitäres Vorkommen von *E. sakazakii*

E. sakazakii wurde nicht nur in Säuglingsfertignahrung, sondern auch in zahlreichen anderen Lebensmitteln nachgewiesen, wie z.B. in Lebensmitteln pflanzlichen Ursprungs (Getreideprodukte wie z.B. Reis und Mehl; Hülsenfruchtprodukte wie z.B. Tofu, Mungobohnensprossen und Alfalfa; Gemüse, wie z.B. Salate, Tomaten und Kartoffeln; Nüsse; Tee; Kräuter; Gewürze), in Lebensmitteln tierischen Ursprungs (Fleisch, Würstchen, Milch, Käse, Eier, Fisch) und in Wasser, auch Trinkwasser und Mineralwasser in Flaschen (FRIEDEMANN, 2007). Es wiesen sowohl rohe als auch verarbeitete (frische, tiefgefrorene, fermentierte, gekochte) Nahrungsmittel Kontaminationen mit *E. sakazakii* auf (FRIEDEMANN, 2007). Im Gegensatz zur Säuglingsfertignahrung sind andere Lebensmittel bisher aber nicht als Quelle von *E. sakazakii*-Infektionen beschrieben worden.

Grundsätzlich scheint *E. sakazakii* auch in der Umwelt häufig vorzukommen. *E. sakazakii* wurde in Bodenproben und Rohöl gefunden; darüber hinaus scheint das Vorkommen des Erregers auch in Krankenhausluft möglich zu sein (IVERSEN & FORSYTHE, 2003). Nach Untersuchungen von KANDHAI et al. (2004) enthielten Umfeldproben aus Lebensmittel-herstellenden Betrieben und privaten Haushalten in 9-44 % der Fälle *E. sakazakii*.

Auch Ratten (GAKUYA et al., 2001), Fliegen (KUZINA et al., 2001) und der Verdauungstrakt von Mücken (HAMILTON et al., 2003) können *E. sakazakii* beherbergen. Die Stallfliege *Stomoxys calcitrans* kann *E. sakazakii* bis zu 20 Tage beherbergen und währenddessen unter Umständen Lebensmittel mit *E. sakazakii* kontaminieren (MRAMBA et al., 2007).

Wie bereits erwähnt, wurde *E. sakazakii* aus klinischem Probenmaterial von Menschen isoliert, die in Zusammenhang mit Erkrankungen durch *E. sakazakii* untersucht worden waren. In einer Übersichtsarbeit führen IVERSEN & FORSYTHE (2003) folgendes Probenmaterial auf: Cerebrospinalflüssigkeit, Blut, Knochenmark, Speichel, Urin, Stuhl, Intestinal- und Respirationstrakt, Blinddarmgewebe, Wundexsudat, Augensekret.

2.7.4 Überleben und Vermehrung von *E. sakazakii* in Säuglingsfertignahrung

E. sakazakii zeichnet sich durch eine hohe Resistenz gegenüber osmotischem und Trocknungsstress aus (BREEUWER et al., 2003), wodurch eine lange Überlebensdauer von *E. sakazakii* auch in getrockneten Nahrungsmitteln möglich wird. In Säuglingsmilchnahrungs-Pulver kann *E. sakazakii* 24 Monate lang überleben (IVERSEN & FORSYTHE, 2003). EDELSON-MAMMEL & BUCHANAN (2004) führten eine künstliche Kontamination von getrockneter Säuglingsmilchnahrung mit 10^6 KBE *E. sakazakii*/ml durch und konnten nach 650 Tagen Aufbewahrung des Materials bei Raumtemperatur immer noch 10^3 KBE/ml nachweisen. Das Überleben von *E. sakazakii* in verschlossenen Packungen pulverförmiger Säuglingsnahrung ist somit über relativ lange Zeiträume möglich, das Risiko einer Keimvermehrung besteht in unversehrten Packungen aufgrund des niedrigen a_w -Wertes aber nicht. Wird die pulverförmige Säuglingsnahrung jedoch im Haushalt oder Krankenhaus zu trinkfertiger Nahrung rekonstituiert, so kann sich *E. sakazakii* aufgrund seiner kurzen Generationszeiten relativ schnell vermehren.

Die Generationszeiten für *E. sakazakii* betragen 37-44 min bei 22° C und 4,2-5,5 h bei 10 °C (NAZAROWEC-WHITE & FARBER, 1997). In rekonstituierter Säuglingsmilchnahrung wiesen IVERSEN et al. (2004 b) Generationszeiten für *E. sakazakii* von 21 min bei 37 °C, 1,7 h bei 21 °C und 13,7 h bei 6 °C. Somit ist ein relativ rasches Wachstum von *E. sakazakii* in kontaminierter, rekonstituierter Säuglingsfertignahrung sowohl bei Fläschchenwärmer- als auch bei Raum- oder Kühlschrankschranktemperatur möglich.

Generell konnte die Vermehrungsfähigkeit von *E. sakazakii* in Säuglingsfertignahrung sowie in Kulturmaterialien in einem Temperaturbereich von 5,5 °C bis 45 °C nachgewiesen werden; ein *E. sakazakii*-Stamm war in Säuglingsmilchnahrung noch bei 47 °C zur Vermehrung fähig (IVERSEN et al., 2004 b). Eine dezimale Reduktionszeit (D-value) für *E. sakazakii* von 16,4 min bei 54 °C und 0,3 min bei 62 °C wurde von IVERSEN et al. (2004 b) beschrieben. EDELSON-MAMMEL & BUCHANAN (2004) fanden in ihren Untersuchungen eine hitzeresistente Variante von *E. sakazakii*, die in künstlich kontaminierter Säuglingsnahrung erst durch Zugabe von 70 °C heißem Wasser signifikant reduziert werden konnte. Laut Herstellerangaben auf den

Säuglingsfertignahrungspackungen soll zur Rekonstitution der Säuglingsnahrung 50 °C warmes Wasser zugegeben werden.

2.7.5 Methoden zum Nachweis von *E. sakazakii*

2.7.5.1 Mikrobiologische Methoden zum Nachweis von *E. sakazakii*

Aufgrund der spezifischen Problematik von *E. sakazakii* in Säuglingsnahrung wurden in den letzten Jahren zahlreiche Methoden zum selektiven Nachweis von *E. sakazakii* entwickelt. Eine Übersicht über mikrobiologische Methoden zum Nachweis von *E. sakazakii* ist in Tabelle 7 zusammengestellt. Bei der von MUYTJENS et al. (1988) bzw. der FDA (2002) veröffentlichten Methode wird zunächst eine nichtselektive Anreicherung zur Regeneration subletal geschädigter Zellen durchgeführt, gefolgt von einer für *Enterobacteriaceae* selektiven Anreicherung (in EEB, *Enterobacteriaceae* Enrichment Broth) und dem Beimpfen eines für *Enterobacteriaceae* selektiven Festnährmediums (VRBG, Violet Red Bile Glucose-Agar). Zur Identifizierung werden präsumtive *E. sakazakii* Kolonien auf die Fähigkeit zur Gelbpigmentbildung auf TSA (Trypton Soya Agar) ausgestrichen und anhand biochemischer Reaktionen endgültig identifiziert. Die Gesamtdauer dieser Nachweisverfahren beträgt bis zu sieben Tage. Mit beiden Methoden werden *Enterobacteriaceae* gleichzeitig auch quantitativ nachgewiesen. Dieser quantitative Nachweis basiert auf dem MPN-Verfahren und erfolgt durch die Einwaage von 3 x 100 g, 3 x 10 g und 3 x 1 g Nahrungspulver. Sowohl die Methode nach MUYTJENS et al. (1988) als auch die der FDA (2002) sind nur für den Nachweis von *Enterobacteriaceae* spezifisch, nicht aber für den Nachweis von *E. sakazakii*. Nach IVERSEN & FORSYTHE (2004) kann *E. sakazakii* bei Verwendung der FDA-Methode während des Voranreicherungs- oder Anreicherungs-schrittes von anderen *Enterobacteriaceae* überwuchert werden, was zu einer verminderten Detektion von *E. sakazakii* führen kann.

Zur Verbesserung des Nachweises für *E. sakazakii* wurden in den folgenden Jahren verschiedene für *E. sakazakii* selektive Medien entwickelt. Als selektive Anreicherungsbouillons für *E. sakazakii* wurden z.B. mLST („modifizierte Laurylsulfat-Trypton-Bouillon mit Vancomycin“ nach ISO/TS 22964), ESE („*E. sakazakii* Enrichment Broth“ nach IVERSEN & FORSYTHE, 2007) und ESSB („*E. sakazakii* Selective Broth“ der Firma AES Laboratoire) entwickelt. Die Verwendung von mLST wurde integriert in

die von GUILLAUME-GENTIL (2005) beschriebene Methode und in die ISO-Norm zum Nachweis von *E. sakazakii* (ISO/TS 22964). Als selektive Festmedien zum Nachweis von *E. sakazakii* wurden zahlreiche Medien entwickelt, die auf der α -Glucosidase-Aktivität von *E. sakazakii* basieren, wie z.B. DFI-Agar („Druggan-Forsythe-Iversen-Agar“ nach IVERSEN et al., 2004 a), ESIA-Agar („*E. sakazakii*-Isolation-Agar“ der Firma AES Laboratoire), NA- α MUG-Agar („Natrium- α Methylumbelliferylglucuronid-Agar“ nach LEUSCHNER et al., 2004), OK-Medium (OH & KANG, 2004), SFC-Medium (SONG et al., 2005) und ESPM-Agar („*E. sakazakii* Plating Medium“ nach RESTAINO et al., 2006). Die Verwendung des ESIA-Agars wurde in die ISO-Norm zum Nachweis von *E. sakazakii* (ISO/TS 22964) integriert. Zu berücksichtigen ist bei den auf der α -Glucosidase-Aktivität von *E. sakazakii* basierenden Nährmedien, dass auch andere *Enterobacteriaceae* das Enzym α -Glucosidase besitzen können und somit falsch positive Ergebnisse auf den genannten Festmedien erzeugen können, welches die Effektivität dieser Nährmedien reduziert. Beispielsweise können falsch positive Ergebnisse auf DFI-Agar hervorgerufen werden durch *Escherichia vulneris*, *Pantoea* spp., *Citrobacter koseri*, *Leclercia adecarboxylata* und *Proteus vulgaris* (IVERSEN et al., 2004 a). Weitere selektive Festnährmedien, mit denen spezielle Stoffwechseleigenschaften von *E. sakazakii* nachgewiesen werden können, sind der so genannte Tween-Esterase-Agar (ALDOVA et al., 1983) und das so genannte „R&F *E. sakazakii* Screening Medium“ (ESSM) von RESTAINO et al. (2006).

Tabelle 7: Mikrobiologische (kulturell-biochemische) Methoden zum Nachweis von *E. sakazakii* (angelehnt an FAO/WHO, 2006)

Referenz	nicht-selektive Voranreicherung	selektive Anreicherung (<i>E. sakazakii</i> oder <i>Enterobacteriaceae</i>)	primäre, kulturelle Isolierung	endgültige, kulturell-biochemische Identifizierung	Besonderheiten
MUYTJENS et al., 1988	BPW	EEB	VRBG Schafblutagar Eosin-Methylenblau-Agar	Gelbpigmentierung auf TSA α -Glucosidase-Aktivität DNase-Aktivität auf Toluidinblau-Agar api 20E	+ MPN
FDA, 2002	steriles, dest. Wasser	EEB	VRBG	Gelbpigmentierung auf TSA api 20E	+ MPN
IVERSEN et al., 2004 a	BPW	EEB	DFI	Gelbpigmentierung auf TSA api 20E / ID 32E	-
GUILLAUME-GENTIL, 2005	BPW	mLST mit Vancomycin	-	Gelbpigmentierung auf TSBA (TSA mit Gallensalzen) α -Glucosidase-Aktivität api 20E	-
ISO/TS 22964	BPW	mLST mit Vancomycin	ESIA	Gelbpigmentierung auf TSA miniaturisierte, biochem. Identifikationskits	-
RESTAINO et al., 2006	steriles, dest. Wasser	EEB	ESPM ESSM	Gelbpigmentierung auf TSA api 20E BiologMicroLog 3 4:20	-
IVERSEN & FORSYTHE, 2007	BPW	ESE	DFI	api 20E	-

BPW = Buffered Peptone Water; EEB = *Enterobacteriaceae* Enrichment Broth; VRBG = Violet Red Bile Glucose Agar; TSA = Trypton Soya Agar; MPN = Most Probable Number; dest. = destilliertes; DFI = Druggan-Forsythe-Iversen-Agar; mLST = modified Lauryl Sulfate Tryptose Broth; ESIA = *E. sakazakii* Isolation Agar; biochem. = biochemische; ESPM = *E. sakazakii* Plating Medium; ESSM = *E. sakazakii* Screening Medium; ESE = *E. sakazakii* Enrichment Broth

2.7.5.2 Molekularbiologische Methoden zum Nachweis von *E. sakazakii*

Da es sich beim mikrobiologischen Nachweis von *E. sakazakii* um relativ arbeits- und zeitaufwendige Methoden handelt, wurden einige molekularbiologische Methoden zum schnelleren Nachweis entwickelt. Weniger zeitaufwendige Methoden werden sowohl zur Diagnostik bei Erkrankungen als auch während Routineuntersuchungen von Säuglingsfertiernahrung seitens der Hersteller benötigt. Molekularbiologische Methoden wurden aber auch zur Ermittlung des genetischen Verwandtschaftsgrades von *E. sakazakii*-Stämmen sowie zur Klärung epidemiologischer Zusammenhänge bei Infektionsausbrüchen eingesetzt. Eine Charakterisierung klinischer Isolate und Zuordnung zu Isolaten aus Säuglingsfertiernahrung ist auch im Hinblick auf die Kausalkette erforderlich und mit mikrobiologischen Nachweismethoden allein nicht sicher möglich.

Zum molekularbiologischen Nachweis bzw. zur Identifizierung und Charakterisierung von *E. sakazakii* wurden bisher neben der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) auch die Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE) sowie die Ribotypisierung und RAPD (random amplification polymorphism)-Analyse eingesetzt. LEHNER et al. (2006) entwickelten eine PCR mit Primern für das die 1,6- α -Glucosidase codierende Gen von *E. sakazakii*. SEO & BRACKETT (2005) entwickelten eine quantitative real-time PCR zur Detektion von *E. sakazakii*, bei der das MMS (macromolecular synthesis operon) von *E. sakazakii* genutzt wird. Weitere real-time PCR-Methoden wurden von MALORNY & WAGNER (2005) und DERZELLE & DILASSER (2006) beschrieben. Des Weiteren wurden kürzlich einige 16S rRNA-genbasierte PCR-Methoden zum Nachweis von *E. sakazakii* entwickelt (HASSAN et al., 2007; LIU et al., 2006; LEHNER et al., 2004; RÖMERMANN et al., 2003). Während der Untersuchungen im Rahmen der Dissertation wurde die PCR-Methode 2 von HASSAN et al. (2007) verwendet (Primerpaar lokalisiert in der hypervariablen Region V1/V3). Ein kommerzielles PCR-System zur Identifizierung von *E. sakazakii* ist mittlerweile auch erhältlich (BAX[®]-*E. sakazakii*-kit, Oxoid). Verschiedene PCR-Methoden wurden in Kombination mit PFGE verwendet, um die genetische Verwandtschaft von klinischen Isolaten (BLOCK et al., 2002; NAZAROWEC-WHITE & FARBER, 1999; CLARK et al., 1990) oder von Isolaten aus Säuglingsfertiernahrung (LEHMACHER & FIEGEN, 2005; VAN ACKER et al., 2001) zu klären.

Nur wenige dieser molekularbiologischen Methoden zum Nachweis von *E. sakazakii* sind bisher jedoch hinreichend auf ihre Spezifität hin überprüft. Nach WEISS et al., 2005 ist sowohl der mikrobiologische als auch der molekularbiologische Nachweis von *E. sakazakii* derzeit noch weit davon entfernt, trivial zu sein.

2.8 Salmonellen

2.8.1 Allgemeines

Zur Gattung *Salmonella* (*S.*) der Familie *Enterobacteriaceae* zählen nach derzeit gültiger Nomenklatur zwei Spezies: *Salmonella enterica* und *Salmonella bongori* (TINDALL et al., 2005). Die Spezies *Salmonella enterica* wird wiederum in sechs Subspezies unterteilt: *enterica* (= I), *salamae* (= II), *arizonae* (= IIIa), *diarizonae* (= IIIb), *houtenae* (= IV) und *indica* (= VI). Die Einteilung der Salmonellen in zurzeit etwa 2500 Serovare erfolgt nach dem so genannten KAUFFMANN-WHITE-Schema aufgrund des Vorkommens unterschiedlicher O (Oberflächen)- und H (Geißel)-Antigene. Die größte Anzahl unterschiedlicher Serovare gehört zur Subspezies *S. enterica* spp. *enterica*. Zur Vereinfachung der Terminologie der *S. enterica* spp. *enterica*-Serovarietäten einigte man sich auf eine Schreibweise, bei der nur der Serotyp in nicht-kursiver Schreibweise, aber mit großem Anfangsbuchstaben genannt wird (KLEER, 2004). So wird beispielsweise *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar typhimurium abgekürzt mit *Salmonella* Typhimurium. Die einzelnen Serovarietäten können wiederum nach biochemischen Eigenschaften in Biovare und nach ihrer Empfindlichkeit gegenüber Bakteriophagen in Phagovare unterteilt werden, auch das Antibiotika-Resistenz-Muster wird zur Charakterisierung herangezogen. Diese Eigenschaften können zwar auch extrachromosomal kodiert sein, bleiben meist aber innerhalb eines Infektions-Ausbruchs stabil und können so, wie auch die molekularbiologischen Methoden zur Feindifferenzierung (PFGE, RAPD, Plasmid-Fingerprinting) zur epidemiologischen Aufklärung von Salmonellose-Ausbrüchen herangezogen werden (KLEER, 2004).

Salmonellen sind Gram-negative, 0,7-1,5 x 2-5 µm große, vorwiegend bewegliche, fakultativ anaerobe Stäbchenbakterien. Ein Wachstum dieses Erregers kann zwischen 8 °C

und 45 °C erfolgen. Die Hitzeresistenz mit einer dezimalen Reduktionszeit von $D_{60^{\circ}\text{C}} = 0,2-6,5$ min und $D_{65,5^{\circ}\text{C}} = 0,02-0,25$ min ist relativ gering (KLEER, 2004). Pasteurisierungstemperaturen werden von Salmonellen also nicht überlebt. Die Vermehrung sistiert bei a_w -Werten $< 0,94$ und bei pH-Werten $< 3,8$ bzw. $> 9,5$. Durch a_w -Werte $< 0,94$ wird zwar das Wachstum von Salmonellen verhindert, ein Überleben ist jedoch über Monate und Jahre hin möglich, so z.B. auch in Milchpulver oder Säuglingsfertiernahrung.

2.8.2 Erkrankungen durch Salmonellen

2.8.2.1 Klinische Manifestation

Die Enteritis-Salmonellen (Spezies und Subspezies *S. enterica* mit Ausnahme der Serovare Typhi und Paratyphi) verursachen die so genannten Salmonellosen, welche vorwiegend mit Enterocolitis einhergehen. Schwere Bakteriämien können durch *S. Typhimurium*, *S. Dublin* und *S. Choleraesuis* verursacht werden, jedoch sind septikämische Verlaufsformen auch bei anderen Serovaren nicht auszuschließen (KLEER, 2004). Als extraintestinale Komplikation kann sich das REITER-Syndrom mit septischer Polyarthrit, Urethritis und Konjunktivitis entwickeln (KLEER, 2004). Bei der Salmonellen-Enteritis kommt es nach einer Inkubationszeit von 12-36 h zu Leib- und Kopfschmerzen, Durchfall (meist ohne Blutbeimengung), mildem Fieber und z.T. zu Erbrechen (KLEER, 2004). Die Symptome halten 2-5 Tage an, die Infektion verläuft in der Regel selbstlimitierend. Eine Infektion mit schwerwiegenderen klinischen Symptomen tritt bei Kleinkindern, Älteren, Abwehrgeschwächten und Menschen mit chronischen Begleiterkrankungen auf. Ohne Einleitung entsprechender therapeutischer Maßnahmen kann eine Salmonellose tödlich sein. Als häufigste Ursache menschlicher Salmonellosen wurden in den letzten Jahren *S. Enteritidis* und *S. Typhimurium* genannt (SCVPH, 2003).

Den Enteritis-Salmonellen werden die „typhösen“ Salmonellen (*S. Typhi* und *S. Paratyphi*) gegenübergestellt. *S. Typhi* ist an den Menschen adaptiert und führt bei diesem zu Typhus. Typhus ist eine zyklische Infektionskrankheit mit Generalisationsstadium (Bakteriämie) und Organmanifestationen (PSCHYREMBEL, 1998). Nach überstandener Infektion können die Patienten zu Dauerausscheidern werden (KLEER, 2004). Infektionsgefahr besteht vor allem in Entwicklungsländern mit geringem hygienischen Status. Die

Infektionsübertragung erfolgt über menschliche Ausscheider (Schmierinfektion) oder durch von diesen kontaminierte Lebensmittel oder Trinkwasser (KLEER, 2004). Paratyphus, eine typhusähnliche Infektion, ausgelöst durch *S. Paratyphi* kann Mensch oder Tier betreffen und septikämisch oder gastroenterisch verlaufen (PSCHYREMBEL, 1998). Infektionsgefahr besteht ebenfalls vor allem in Entwicklungsländern (KLEER, 2004).

2.8.2.2 Vorkommen von Salmonellen

Im Jahr 2007 wurden in Deutschland 55.400 menschliche Salmonellose-Fälle gemeldet, welches einer Gesamtinzidenz von 67,3 Erkrankungen pro 100.000 Einwohnern entspricht (ROBERT KOCH INSTITUT, 2007). Die Inzidenz der Salmonellen ist jedoch nicht gleichmäßig über alle Altersgruppen verteilt. So lag die Inzidenz der Salmonellen bei Säuglingen in den USA im Jahr 2002 mit 139,4 Fällen pro 100.000 Einwohnern um das achtfache höher als in anderen Altersgruppen in den USA (CDC, 2004).

Salmonellen sind weit überwiegend durch Lebensmittel bedingt, in geringem Umfang auch durch Kontaktinfektionen von Mensch zu Mensch bzw. von Tier zu Mensch (PÖHN, 1982). Hauptinfektionsquelle für Salmonellen sind Lebensmittel tierischen Ursprungs, wie rohes Fleisch und Fleischprodukte, Eier und Eiprodukte, Eis und Rohmilch (SCVPH, 2003).

Säuglingsfertignahrungen sind im Hinblick auf die Empfänglichkeit der Verbrauchergruppe für Salmonellen von besonderer Bedeutung. *S. enterica* wurde bei der Risikobewertung von Mikroorganismen in Säuglingsnahrung im Hinblick auf das Erkrankungsrisiko in Risiko-Kategorie A eingestuft (2.1). *S. enterica* kann bei Säuglingen Ursache systemischer Infektionen, nekrotisierender Enterokolitis und schwerer Diarrhoe sein. Eine Kontamination von Säuglingsfertignahrungsmitteln mit Salmonellen ist nachgewiesen worden, zudem wurde in mehreren Fällen ein Kausalzusammenhang zwischen kontaminierter Säuglingsnahrung und der Infektion bei Säuglingen bewiesen. Aufgrund der Implementierung spezifischer Kontroll-Maßnahmen vor 30 bis 40 Jahren, ist die Kontamination pulverförmiger Milchprodukte und fertig verpackter Säuglingsnahrungsmittel mit Salmonellen zwar zurückgegangen, was Daten aus der Säuglingsnahrungsindustrie und den nationalen Kontrollbehörden belegen (FAO/WHO, 2006). Dass Säuglingsfertignahrung dennoch mit einem Risiko behaftet ist, zeigen die nach

wie vor sporadisch vorkommenden Salmonellose-Ausbrüche (Tabelle 8). Ein jüngst aufgetretener Infektionsausbruch in Frankreich (BROUARD et al., 2007) unterstreicht erneut das potentielle Gesundheitsrisiko durch Salmonellen in Säuglingsfertignahrung. Bei rechtzeitiger Behandlung ist das Risiko von Folgeschäden bzw. von Todesfällen bei Säuglingen aber offensichtlich sehr gering.

Erkrankungen durch Salmonellen in Säuglingsfertignahrung, die während der letzten 20 Jahre publiziert worden sind, wurden durch unterschiedliche *Salmonella enterica*-Serovare verursacht: *S. Agona* in Frankreich (BROUARD et al., 2007; ESPIÉ et al., 2005), *S. Saintpaul* in USA (BORNEMANN et al., 2002), *S. London* in Korea (PARK et al., 2004), *S. Anatum* in Europa (THRELFALL et al., 1998), *S. Senftenberg* in UK (RUSHDY et al., 1997), *S. Virchow* in Spanien (RUIZ et al., 1995), *S. Tennessee* in USA und Canada (CDC, 1993), *S. Ealing* in UK (ROWE et al., 1987) und *S. Bredeney* in Australien (FORSYTH et al., 2003). Eine Übersicht über die weltweit erfassten Salmonellose-Ausbrüche bei Säuglingen durch kontaminierte Säuglingsnahrungsmittel zeigt Tabelle 8.

Tabelle 8: Publizierte Daten zu Salmonellose-Ausbrüchen bei Säuglingen, für die Säuglingsfütterung als Infektionsquelle ermittelt wurde

Jahr des Ausbruchs	<i>Salmonella</i>-Serovar	Anzahl der Betroffenen	Land	Referenz
1977	<i>S. Bredeney</i>	k.A.	Australien	FORSYTH et al., 2003
1985	<i>S. Ealing</i>	48	UK	ROWE et al., 1987
1993	<i>S. Tennessee</i>	3	Canada & USA	CDC, 1993
1994	<i>S. Virchow</i>	48	Spanien	RUIZ et al., 1995; USERA et al., 1996&1998
1995	<i>S. Senftenberg</i>	5	UK	RUSHDY et al., 1997
1996-1997	<i>S. Anatum</i>	17	UK & Frankreich	THRELFALL et al., 1998
2000	<i>S. London</i>	29	Korea	PARK et al., 2004
2001	<i>S. Saintpaul</i>	7	USA	BORNEMANN et al., 2002
2005	<i>S. Agona</i>	21	Frankreich	ESPIÉ et al., 2005
2004-2005	<i>S. Agona</i>	136	Frankreich	BROUARD et al., 2007

S. = *Salmonella*; k.A. = keine Angabe; UK = England

Der jüngste durch Säuglingsfertignahrung verursachte Salmonellose-Ausbruch wurde 2005 in Frankreich festgestellt (BROUARD et al., 2007) und soll hier näher erläutert werden, da er als Beispiel für die aktuelle Aufklärungsstrategie von Salmonellose-Ausbrüchen dienen kann. Insgesamt erkrankten während des Ausbruchs in Frankreich 136 Säuglinge durch *S. Agona* in Säuglingsfertignahrung. Die Mehrzahl der erkrankten Säuglinge zeigte die typische klinische Symptomatik, insbesondere Diarrhoe (99 %, davon 56 % hämorrhagische Diarrhoe), Fieber (75 %), Bauchschmerzen (50 %) und Erbrechen (39 %). Ein erheblicher Anteil der Säuglinge (n=50) mussten stationär im Krankenhaus behandelt werden, wobei aber in keinem Fall lebensbedrohliche klinische Symptome auftraten. Der Ausbruch erfolgte in zwei Schüben. Der erste betraf 44 Säuglinge durch ein Produkt eines Herstellers (Nahrung A). Dieses Lebensmittel wurde vom Markt genommen. Kurz darauf erkrankten 92 weitere Säuglinge durch ein weiteres Produkt (Nahrung B) desselben Herstellers. Zunächst war dem „National Reference Center for *Salmonella*“ Anfang 2005 ein Anstieg der *S. Agona*-Infektionen bei Säuglingen aufgefallen. Daraufhin wurde eine epidemiologische Untersuchung eingeleitet, um den Ausbruch zu bestätigen und den Ursprung zu ermitteln. Dazu wurden die Eltern der betroffenen Säuglinge ausführlich befragt und verschiedene Proben entnommen. *S. Agona* wurde im Produktionsumfeld des Herstellerbetriebes und in Proben der beiden betroffenen Chargen der Nahrung A und B isoliert, obwohl die laufenden Routineuntersuchungen des Herstellers alle negativ für Salmonellen gewesen waren. Sowohl die klinischen Isolate als auch die *S. Agona*-Stämme des Herstellerbetriebs und der Säuglingsfertignahrungen wiesen das gleiche PFGE-Profil auf. Es erfolgte ein Rückruf der Nahrung B, woraufhin keine weiteren Erkrankungsfälle mehr auftraten. Länder, in welche die Nahrungen A und B exportiert worden waren, erhielten eine Warnung mittels des „Rapid Alert System for Food and Feed“ (der Europäischen Kommission bzw. durch „Infosan“ der WHO). Dieser Ausbruch demonstrierte die Bedeutung der internationalen Zusammenarbeit und die Vorteile eines schnellen Informationssystems (Global Salm-Surv, Epidemiological Surveillance Network for *Salmonella* der WHO) zur Minimierung lebensmittelbedingter Infektionskrankheiten. Zudem zeigt dieser Fall, dass die Routinekontrollen im Herstellerbetrieb nicht immer ausreichen, um die typischerweise sehr sporadischen Kontaminationen von Säuglingsfertignahrung mit Salmonellen zu entdecken.

Problematisch bei der Erfassung Säuglingsfertignahrungs-assoziiertes Salmonellosen ist vor allem, dass eine Kontamination von Milchtrockenprodukten und somit auch von

Säuglingsfertignahrung mit Salmonellen sehr inhomogene Verteilungsmuster aufweist (Nesterbildung). Unter Umständen sind auch die Untersuchungsverfahren nicht hundertprozentig zuverlässig, da z.B. Lactose-verstoffwechselnde Salmonellen bei vielen der üblicherweise verwendeten Nährmedien (z.B. BGA, XLD) nicht erfasst werden können. Zwar sind Lactose-verstoffwechselnde Salmonellen selten, sie kommen jedoch vor, wie z.B. der Ausbruch durch Laktose-positive (und -negative) *S. Virchow*-Stämme 1994 in Spanien zeigt (RUIZ et al., 1995; USERA et al., 1996 & 1998).

2.8.2.3 Minimale Infektionsdosis und Pathogenese

Die minimale Infektionsdosis ist abhängig von der Pathogenität des jeweiligen Salmonellen-Serovars, von Alter und Gesundheitszustand des Betroffenen und dem aufgenommenen Lebensmittel (z.B. protektiver Effekt für Salmonellen bei der Magenpassage durch hohe Fettgehalte des Lebensmittels). Versuche aus den 50er Jahren lassen bei gesunden Erwachsenen auf eine minimale Infektionsdosis von 10^5 - 10^6 aufgenommenen Salmonellen schließen (KLEER, 2004). Es wurde aber auch berichtet von Erkrankungsfällen, die durch wesentlich geringere Infektionsdosen ausgelöst worden sind. So erkrankte beispielsweise ein neun Monate altes Kind durch eine tägliche Dosis von weniger als 50 *Salmonella* Schwarzengrund-Zellen, ein einjähriges Kind durch eine Dosis von ≤ 200 *Salmonella* Schwarzengrund-Zellen (FAO/WHO, 2006).

Im Hinblick auf die Pathogenität von Salmonellen sind eine Vielzahl von verschiedenen Pathogenitätsfaktoren erwähnt worden, wie z.B. Enterotoxine, zytotoxisch wirksames Protein, Enterobactin, Vi-Polysaccharid-Antigen und Virulenz-Plasmide (KLEER, 2004).

2.8.3 Vorkommen von Salmonellen in Säuglingsfertignahrung

Untersuchungen zum Vorkommen von Salmonellen in Säuglingsfertignahrungsmitteln ohne unmittelbaren Bezug zu einem Infektionsausbruch wurden von MUYTJENS et al. (1988); IVERSEN & FORSYTHE (2004); LEUSCHNER et al. (2004); HEUVELINK et al. (2005); ESTUNINGSIH et al. (2006) und WITTHUHN (2007) beschrieben. Bei diesen Untersuchungen wurde Säuglingsfertignahrung nicht ausschließlich auf das Vorkommen von Salmonellen, sondern zumeist allgemein auf das Vorkommen von *Enterobacteriaceae* untersucht. Die Anzahl der untersuchten Proben ist daher Tabelle 9 zu entnehmen. Bei

keiner der durchgeführten Untersuchungen wurden Salmonellen in Säuglingsfertignahrung nachgewiesen.

2.8.4 Methoden zum Nachweis von Salmonellen

Die Standardmethode zum Nachweis der Salmonellen ist die kulturelle Anzucht. Dazu erfolgt meist eine selektive Voranreicherung in SC, RV-Bouillon oder MUELLER-KAUFFMANN-Medium mit anschließender Anzucht auf Selektivnährböden (BPLS-, XLD-, ASAP-Agar oder andere). Nach der Isolierung von Reinkulturen erfolgt dann die biochemische und serologische Bestätigung. Da die kulturelle Anzucht relativ zeitaufwendig ist, wurden verschiedene Schnellverfahren entwickelt, wie z.B. PCR, Sandwich-Immunoassay und die immunomagnetische Separation in Kombination mit ELISA-Verfahren (KLEER, 2004).

Trotz strenger Anforderungen, die im Hinblick auf die Probennahme und die Untersuchungsmethoden an die Produzenten gestellt werden, kann zum Teil durch die inhomogene Verteilung im Lebensmittel, keine Salmonellenfreiheit garantiert werden.

2.9 Andere fakultativ pathogene *Enterobacteriaceae*

2.9.1 Allgemeines

Neben Salmonellen und *E. sakazakii* wird heute der gesamten Familie der *Enterobacteriaceae* im Hinblick auf Gesundheitsrisiken für Säuglinge vermehrt Bedeutung beigemessen. Zur Familie der *Enterobacteriaceae* gehören die Gattungen *Alterococcus*, *Arsenophonus*, *Candidatus*, *Brenneria*, *Buchnera*, *Budvicia*, *Buttiauxella*, *Calymmatobacterium*, *Cedecea*, *Citrobacter*, *Edwardsiella*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Escherichia*, *Ewingella*, *Hafnia*, *Klebsiella*, *Kluyvera*, *Leclercia*, *Leminorella*, *Moellerella*, *Morganella*, *Pantoea*, *Pectobacterium*, *Photorhabdus*, *Plesiomonas*, *Pragia*, *Proteus*, *Providencia*, *Rahnella*, *Saccharobacter*, *Salmonella*, *Serratia*, *Shigella*, *Sodalis*, *Tatumella*, *Trabulsiella*, *Wigglesworthia*, *Xenorhabdus*, *Yersinia* und *Yorkanella* (BRENNER & FARMER, 2005). Die taxonomische Einteilung der *Enterobacteriaceae* ist nach wie vor fließend, wobei neben der Verschiebung von Spezies zwischen Genera auch

die Etablierung neuer Genera (z.B. *Cronobacter*) zu verzeichnen ist. Dies erschwert teilweise auch eine Risikobewertung einzelner Spezies.

Enterobacteriaceae sind Gram-negative Stäbchenbakterien und weisen gewöhnlich eine Größe von 0,3-1,0 x 1,0-6,0 µm auf. Es existieren sowohl bewegliche als auch unbewegliche Gattungen. *Enterobacteriaceae* sind fakultativ anaerob. Die Spaltung von Glucose und anderen Kohlenhydraten erfolgt meist unter Bildung von Säure und Gas und kann sowohl oxidativ als auch fermentativ stattfinden. Die meisten *Enterobacteriaceae* sind Oxidase-negativ und reduzieren Nitrat zu Nitrit.

Enterobacteriaceae sind weltweit verbreitet; sie wurden nachgewiesen im Erdboden, in Wasser, Früchten, Fleisch, Eiern, Gemüse, Pflanzen, Insekten, Mensch und Tier (BRENNER & FARMER, 2005). Einige Gattungen der Familie gehören zur physiologischen Darmflora des Menschen; einige Gattungen sind fakultativ pathogen und verursachen meist Diarrhoe, aber auch extraintestinale Infektionen wie Septikämie, Respirationstrakts-, Harnwegs-, und Wundinfektionen und Meningitis (BRENNER & FARMER, 2005). *Enterobacteriaceae* sind für 50 % aller nosokomialen Infektionen verantwortlich, unter diesen insbesondere *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp., *Proteus* spp., *Providencia* spp. und *Serratia marcescens* (HOLT et al., 1994). Als obligat pathogen anzusehen sind *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Yersinia* spp. und enteropathogene *E. coli* (HOLT et al., 1994).

Die von der WHO in Risiko-Kategorie B eingestuften *Enterobacteriaceae* (*Citrobacter freundii*, *Citrobacter koseri*, *Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli*, *Escherichia vulneris*, *Hafnia alvei*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Pantoea agglomerans* und *Serratia* spp.) können Infektionen bei Säuglingen und Kleinkindern verursachen und sind in Säuglingsfertiernahrung identifiziert worden, ein eindeutiger kausaler Zusammenhang ist bisher jedoch noch nicht bewiesen. Die Gattungen der Kategorie B werden im Folgenden genauer beschrieben.

2.9.2 *Enterobacteriaceae* der WHO-Risiko-Kategorie B

2.9.2.1 *Citrobacter* spp.

Zur Gattung *Citrobacter* (*C.*) gehören die Spezies *C. amalonaticus*, *C. braakii*, *C. farmeri*, *C. freundii*, *C. gillenii*, *C. koseri* (ehemals *C. diversus*), *C. murliniae*, *C. rodentium*, *C. sedlakii*, *C. werkmanii* und *C. youngae* (BRENNER & FARMER, 2005). Sie wurden im Erdboden, im Wasser, in Abwässern und in Nahrungsmitteln nachgewiesen und kommen in der physiologischen Flora des Gastrointestinaltrakts von Mensch und Tier vor (BRENNER & FARMER, 2005). *Citrobacter* spp. sind opportunistisch pathogene Erreger (BRENNER & FARMER, 2005); d.h. Erreger, die nur bei geschwächter Wirtsabwehr eine Erkrankung auslösen können. Als Krankheitserreger spielen sie eine Rolle bei Infektionen der Harnwege, des Respirationstraktes und von Wunden.

Bei Säuglingen standen sie jedoch auch mit Meningitis in Zusammenhang. Beispielsweise berichten RAE et al. (1991) von neonataler Meningitis durch *C. freundii*, STRAUSSBERG et al. (2001) von zwei Fällen neonataler Meningitis (mit Abszessbildung) durch *C. koseri*, ALLER & CHUSID (2002) von Meningitis bei einem Säugling durch *C. koseri* (dieser litt zusätzlich an einer Pneumonie durch *C. koseri*), KLINE & KAPLAN (1987) von neonataler Meningitis (mit Hirnabszess-Bildung) durch *C. diversus*, GRAHAM et al. (1981) von neonataler Meningitis (die bei vier der fünf Erkrankten mit Hirnabszess-Bildung verlief).

Die Relevanz von *C. freundii* wird durch Berichte zum Vorkommen von Shiga-like-Toxinen als Pathogenitätsfaktoren bei dieser Spezies unterstrichen, wobei diese Toxinbildung allerdings nicht über einen längeren Zeitraum hinweg beobachtbar war (SCHMIDT et al., 1993).

Säuglingsfäkalnahrung wurde in einem Fall von Infektion durch *C. freundii* als Vehikel identifiziert (THURM & GERICKE, 1994). Dieser Fall ereignete sich 1990 auf einer Neugeborenen-Intensivstation in Deutschland. Die aus der entsprechenden Säuglingsfäkalnahrung und dem klinischen Probenmaterial isolierten *C. freundii*-Stämme wiesen ein identisches Enzym- und Protein-Muster auf. Eine molekularbiologische Bestätigung erfolgte nicht.

2.9.2.2 *Enterobacter* spp. (ohne *E. sakazakii*)

Zur Gattung *Enterobacter* (*E.*) gehören die Spezies *E. amnigenus*, *E. asburiae*, *E. cancerogenus*, *E. cloacae*, *E. dissolvens*, *E. gergoviae*, *E. hormaechei*, *E. kobei*, *E. nimipressuralis*, *E. pyrinus*, und *E. sakazakii* (BRENNER & FARMER, 2005). *Enterobacter* spp. kommen weit verbreitet in der Natur vor (Erdboden, Wasser, Abwasser und Gemüse), aber auch als Kommensalen des menschlichen Gastrointestinaltraktes (BRENNER & FARMER, 2005). Als Pathogene sind *Enterobacter* spp. in den letzten Jahren allgemein jedoch immer bedeutsamer geworden. Dies hängt zum einen mit der steigenden Inzidenz als Ursache nosokomialer Infektionen, aber auch mit der Resistenzentwicklung gegenüber Antibiotika zusammen. *Enterobacter* spp. wurden mit unterschiedlichsten Erkrankungen in Verbindung gebracht. Es wurden Bakteriämien, Endokarditiden sowie Infektionen der Haut, des Respirations- und Gastrointestinaltraktes, der Harnwege, der Knochen und Gelenke, der Augen und des ZNS beschrieben (SANDERS & SANDERS, 1997). Die Bakteriämie ist die häufigste Erkrankung durch *Enterobacter* spp. Vor allem Neugeborene und alte Menschen waren bisher betroffen. *E. cloacae* oder *E. aerogenes* scheinen hierbei die wichtigsten Spezies zu sein. Als Eintrittspforten für *Enterobacter* spp. werden hinsichtlich der Bakteriämien unterschiedliche genannt: Respirationstrakt, Urogenitaltrakt, intravaskuläre Katheter, Wunden, aber auch der Gastrointestinaltrakt, womit die Möglichkeit der oralen Infektion gegeben ist (SANDERS & SANDERS, 1997).

Auch *E. cloacae* wurde mehrfach als Krankheitserreger bei Neugeborenen, Säuglingen und Kleinkindern beschrieben. Erkrankungen durch *E. cloacae* auf Neugeborenen- oder Neugeborenen-Intensivstationen, bei denen z.T. mehrere Säuglinge gleichzeitig betroffen waren, sind von mehreren Autoren beschrieben worden (KUBOYAMA et al., 2003; SELENIC et al., 2003; VAN DIJK et al., 2002; LIU et al., 2002; TRESOLDI et al., 2000; YU et al., 2000; HARBARTH et al., 1999; VAN NIEROP et al., 1998 und FINNSTRÖM et al., 1998). Die Mehrzahl der Neugeborenen erkrankte auch hier an Bakteriämie. Es wurde jedoch auch von nekrotisierender Enterokolitis (VAN NIEROP et al., 1998) und Pneumonie (HARBARTH et al., 1999) berichtet. Die Übertragungswege wurden nur in wenigen Fällen ermittelt. TRESOLDI et al. (2000) identifizierten eine parenterale Ernährungslösung, VAN DIJK et al. (2002) ein Fieberthermometer und HARBARTH et al. (1999) das Krankenhauspersonal als Überträger. Von KUBOYAMA et al. (2003) wurde

eine Mortalitätsrate von 34 % nach Infektion mit *E. cloacae* bei Neugeborenen ermittelt. Einzelne Säuglinge erkrankten auch an Meningitis durch *E. cloacae* (SEDAGHATIAN et al., 2004).

Neben der Endotoxinbildung von *Enterobacter* spp. (SANDERS & SANDERS, 1997), besitzen einige Spezies weitere Pathogenitätsfaktoren. Die meisten Stämme von *Enterobacter amnigenus*, *E. cloacae* und *E. sakazakii* produzieren ein Hämagglutinin, das mit Typ-1-Fimbrien assoziiert ist (BRENNER & FARMER, 2005). PATON & PATON (1996) isolierten im Zusammenhang mit einem Fall von „Hämolytisch-Urämischen-Syndrom“ bei einem Säugling *E. cloacae* mit der Fähigkeit zur Bildung von Shiga-like-Toxin.

2.9.2.3 *Escherichia* spp.

Zur Gattung *Escherichia* (*E.*) gehören die Spezies *E. blattae*, *E. coli*, *E. fergusonii*, *E. hermannii*, und *E. vulneris* (BRENNER & FARMER, 2005). Diarrhoe bei Erwachsenen können *E. coli*, *E. fergusonii*, *E. hermannii* und *E. vulneris* verursachen (CHAUDHURY et al., 1999). *E. coli* ist die weitaus bekannteste Spezies dieser Gattung. Sie gehört zur physiologischen Flora des Intestinaltrakts bei Mensch und Tier, bei Verschleppung in andere Organe können *E. coli* jedoch auch Peritonitis (post OP), Harnwegsinfektionen und bei Neugeborenen Meningitis hervorrufen. *E. coli* ist die zweithäufigste Ursache neonataler Meningitis (BONACORSI & BINGEN, 2005). Bei den pathogenen *E. coli*-Stämmen werden vier Kategorien unterschieden: enteropathogene (EPEC), enterotoxische (ETEC), enteroinvasive (EIEC) und enterohämorrhagische (EHEC) *E. coli*. EPEC-Stämme verursachen vor allem bei Säuglingen und Kleinkindern Diarrhoe und Enteritis. Als Pathogenitätsfaktor ist der EPEC-Adhärenzfaktor bekannt (BÜLTE, 2004). ETEC-Stämme verursachen die sogenannte Reisediarrhoe. Als Pathogenitätsfaktoren besitzen diese Enterotoxine (das hitzelabile Toxin LT und das hitzestabile Toxin ST) und Adhäsine (BÜLTE, 2004). EIEC-Stämme verursachen Enterocolitis und Diarrhoe. Die Invasivität wird durch verschiedene äußere Membranpolypeptide ermöglicht. EHEC-Stämme verursachen hämorrhagische Colitis und Diarrhoe; als extraintestinale Komplikationen bei Kleinkindern das Hämolytisch Urämische Syndrom (HUS) und bei alten Menschen die thrombotisch-thrombozytopenische Purpura. Als Virulenzfaktoren bilden sie Hämolysine und die sogenannten Verotoxine (Shiga-Toxine), weshalb sie auch unter dem Namen

Verotoxin-bildende *E. coli* (VTEC) oder Shiga-Toxin-bildende *E. coli* bekannt sind (BÜLTE, 2004).

Auch *E. vulneris* wird als fakultativ pathogener Vertreter dieser Gattung angesehen. Die meisten Isolate von *E. vulneris* sind aus Wunden isoliert worden (BRENNER et al., 1982; PIEN et al., 1985). Berichte über invasive *E. vulneris*-Infektionen sind relativ selten, es wurde berichtet von Meningitis (MOHANTY et al., 2005), Peritonitis (SENANAYAKE et al., 2006), Osteomyelitis (LEVINE & GOLDBERG, 1994), Urosepsis (AWSARE & LILLO, 1991), Bakteriämie (SPAULDING & ROTHMAN, 1996) und septischem Schock (HORII et al., 2001). Hinsichtlich Infektionen durch *E. vulneris* bei Säuglingen und Kleinkindern berichten MOHANTY et al. (2005) von Meningitis bei einem 4 Jahre alten Mädchen.

2.9.2.4 *Hafnia* spp.

Derzeit ist der einzige Vertreter dieser Gattung die Spezies *Hafnia (H.) alvei*. *H. alvei* kommt in den menschlichen Fäces, Säugetieren, Vögeln, dem Erdboden, in Wasser, Abwasser und Milchprodukten vor (BRENNER & FARMER, 2005). *Hafnia* ist äußerst selten als Infektions-Ursache beim Menschen beschrieben worden. JANDA & ABBOTT (2006) erwähnen Bakteriämie, Gastroenteritis und Infektionen des Respirationstrakts. Bei Frühgeburten wurde von Sepsis durch *H. alvei* berichtet (PÉREZ et al., 2004).

2.9.2.5 *Klebsiella* spp.

Zur Gattung *Klebsiella (K.)* gehören die Spezies *K. mobilis* (ehemals *Enterobacter aerogenes*), *K. oxytoca*, *K. ornithinolytica*, *K. planticola*, *K. pneumoniae* (mit den Subspezies *ozaenae*, *pneumoniae*, *rhinoscleromatis*) und *K. terrigena* (BRENNER & FARMER, 2005). Nach DRANCOURT et al. (2001) werden *K. ornithinolytica*, *K. planticola* und *K. terrigena* der neuen Gattung *Raoultella* zugeordnet. *Klebsiella* spp. kommen ubiquitär vor und wurden nachgewiesen auf der Oberfläche von Wasser, Abwasser, Erdboden und Pflanzen (BRENNER & FARMER, 2005). Als Kommensalen können sie im oberen Respirations- und Gastrointestinaltrakt von gesunden Menschen leben (BRENNER & FARMER, 2005). Als fakultativ pathogene Bakterien können sie je nach Immunitätslage jedoch auch Infektionen verursachen. Die meisten *Klebsiella* spp. gehören zu den nosokomialen Pathogenen, unter diesen insbesondere *K. pneumoniae* und

K. mobilis, aber auch *K. oxytoca*, *K. planticola* und *K. terrigena* (BRENNER & FARMER, 2005). Die klinisch relevanteste Spezies ist *K. pneumoniae*. 6-17 % aller nosokomialen Harnwegsinfektionen werden durch *K. pneumoniae* ausgelöst; häufig verursacht *K. pneumoniae* aber auch Bakteriämien (BRENNER & FARMER, 2005). *K. pneumoniae* subsp. *pneumoniae* kann zur so genannten Friedländer-Pneumonie führen (BRENNER & FARMER, 2005). *K. pneumoniae* subsp. *rhinoscleromatis* kann das Rhinosklerom (eine granulomatöse Entzündung in den Schleimhäuten der oberen Luftwege) verursachen; *K. pneumoniae* subsp. *ozaenae* eine chronische, atrophische Rhinitis (BRENNER & FARMER, 2005). FANG et al. (2007) berichten auch von pyogenen Leberabszessen durch *K. pneumoniae* (Genotyp 1), die in mehreren Fällen mit Endophthalmitis und Infektionen des ZNS einhergingen. Die Infektion erfolgt aerogen oder oral über kontaminierte Lebensmittel und Trinkwasser. Ein Teil der Infektionen erfolgt endogen.

Als Pathogenitätsfaktoren von *Klebsiella* spp. werden Polysaccharid-Kapseln und Fimbrien genannt (BRENNER & FARMER, 2005). Durch die Kapsel sind die Bakterien vor dem Angriff des Wirtsmechanismus geschützt, durch die Fimbrien werden sie zur Adhärenz an epithelialen Wirtszellen befähigt. In Bezug auf Infektionen des Respirationstraktes wurde bei *K. pneumoniae* das Siderophor Yersiniabactin nachgewiesen (LAWLOR et al., 2007). Nahezu alle *Klebsiella* spp. produzieren das Siderophor Enterocholin (BRENNER & FARMER, 2005). Sporadisch wird auch das Vorkommen von Cytotoxinen, Enterotoxinen und Hämolysinen bei *Klebsiella* spp. erwähnt (BRENNER & FARMER, 2005).

Fälle von Erkrankungen durch *K. pneumoniae* auf Neugeborenen-Intensivstationen, bei denen z.T. mehrere Säuglinge gleichzeitig betroffen waren, wurden von mehreren Autoren beschrieben (BÜYÜKYAVUZ et al., 2006; CASOLARI et al., 2005; GUPTA et al., 2004; ARREDONDO-GARCIA et al., 1992; DONOWITZ et al., 1981; HILL et al., 1974). Symptomatisch traten bei diesen Sepsis, Meningitis, Peritonitis, Pyelonephritis und nekrotisierende Enterokolitis auf. BONADIO (1989) ermittelte hinsichtlich Bakteriämie durch *K. pneumoniae* eine Mortalitätsrate von 20 % (bei 57 erkrankten Kindern innerhalb eines Zeitraums von 10 Jahren). Muttermilch als Quelle eines Bakteriämie-Ausbruchs durch *K. pneumoniae* wurde von DONOWITZ et al. (1981) auf einer Neugeborenen-Intensivstation identifiziert.

Bisher ist erst in einem Fall Säuglingsfertiernahrung als Ursache von Erkrankungen durch *K. pneumoniae* ermittelt worden. Auf einer Neugeborenen-Intensivstation in der Türkei wurde Säuglingsnahrung als Vehikel eines Septikämie-Ausbruches durch *K. pneumoniae* identifiziert (BÜYÜKYAVUZ et al., 2006). *K. pneumoniae* wurde im Blut bei acht Patienten nachgewiesen und gleichzeitig aus der verwendeten Säuglingsfertiernahrung. In der pädiatrischen Station desselben Krankenhauses konnte *K. pneumoniae* während des Ausbruchs bei einem Kind und gleichzeitig in einem Fläschchenwärmer nachgewiesen werden. Ob es sich bei den Patientenisolaten und den Isolaten aus Säuglingsfertiernahrung und Fläschchenwärmer um identische Isolate handelt, müsste durch genetische Analysen bestätigt werden.

2.9.2.6 *Pantoea* spp.

Zur Gattung *Pantoea* (*P.*) gehören Spezies wie *P. agglomerans* (früher *Enterobacter agglomerans*), *P. ananatis*, *P. citrea*, *P. dispersa*, *P. punctata*, *P. stewartii* und *P. terrea* (BRENNER & FARMER, 2005). Sie wurden isoliert von Pflanzen, Saatgut, Früchten, Erdboden, Wasser, Mensch (Urin, Blut, Wunden, innere Organe) und Tier (BRENNER & FARMER, 2005). Infektionen durch *Pantoea* spp. beim Menschen sind äußerst selten. Mit Erkrankungen assoziiert wird derzeit nur *P. agglomerans*. Bei Jugendlichen und Erwachsenen konnte *P. agglomerans* bisher als Ursache folgender Erkrankungen identifiziert werden: Arthritis (KRATZ et al., 2003; DE CHAMPS et al., 2000; FLATAUER & KHAN, 1978), Synovitis (OLEGINSKI et al., 1991; STRÖMQVIST et al., 1985), Otitis (LAPORTE et al., 2002), Bakteriämie, Septikämie und Endophthalmitis (BRENNER & FARMER, 2005) und Cholelithiasis (FLORES et al., 2003). Der Arthritis gingen Verletzungen durch Palmendornen bzw. hölzerne Weidepfosten voraus, der Otitis eine offene Tibia-Fraktur.

Bezüglich Infektionen durch *Pantoea* spp. bei Neugeborenen wird über einen Infektionsausbruch in Malaysia berichtet (HABSAH et al., 2005; VAN ROSTHENBERGE et al., 2006). Acht Neugeborene wurden durch eine parenterale Ernährungslösung mit *Pantoea* spp. infiziert, sieben dieser Patienten starben. Wahrscheinlich handelte es sich um *P. agglomerans*. Alle Neugeborenen litten an Pneumonie und septikämischem Schock, einige an Lungenblutungen und disseminierter intravasaler Gerinnung.

2.9.2.7 *Serratia* spp.

Zur Gattung *Serratia* (*S.*) gehören die Spezies *S. entomophila*, *S. ficaria*, *S. fonticola*, *S. grimesii*, *S. liquefaciens*, *S. marcescens*, *S. odorifera*, *S. plymuthica*, *S. proteamaculans* und *S. rubidaea* (BRENNER & FARMER, 2005). *Serratia* spp. kommen im Erdboden, Wasser, und auf Pflanzen vor oder als opportunistisch humanpathogene Erreger (BRENNER & FARMER, 2005). Die meisten *Serratia*-Spezies werden als apathogen angesehen. Auch *S. marcescens* wurde ursprünglich als apathogen eingestuft, gilt mittlerweile aber als bedeutender Erreger schwerer, nosokomialer Infektionen, wie Pneumonie, Wundinfektion, Harnwegsinfektion, Meningitis, Endocarditis, Endophthalmitis und Sepsis (DAVID et al., 2006).

Infektionsausbrüche durch *S. marcescens* auf Neugeborenen-Stationen wurden immer wieder beschrieben (DAVID et al., 2006; CASOLARI et al., 2005; STEPPBERGER, 2002; FLEISCH et al., 2002; PRASAD et al., 2001; VAN OGTRUP et al., 1997; ZAIDI et al., 1989; SMITH et al., 1984; LEWIS et al., 1983; McCORMACK & KUNIN, 1966). Symptomatisch kam es bei diesen durch *S. marcescens* erkrankten Neugeborenen zu Sepsis, Pneumonie oder Konjunktivitis. Auch von ZNS-Infektionen mit Zysten- und Abszessbildung durch *S. marcescens* bei Frühgeborenen wurde berichtet (MESSERSCHMIDT et al., 2004).

Hinsichtlich der Infektionsquellen gibt es bisher keine Anhaltspunkte. Die Möglichkeit des oralen Infektionsweges scheint zumindest für *S. marcescens* jedoch zu bestehen, wie ein Bericht von FLEISCH et al. (2002) zeigt. FLEISCH et al. (2002) konnten als Ursache eines Infektionsausbruches durch *S. marcescens* auf einer Neugeborenen-Intensivstation *S. marcescens* in Milch aus einer Milchflasche nachweisen, die zur Fütterung verwendet worden war.

Als Pathogenitätsfaktoren von *S. marcescens* wurden bisher Chitinasen, Lecithinasen, Hämolysin, Siderophore, Lipasen, Proteasen (Serralysin) und Nukleasen (KIDA et al., 2007), ein hitzelabiles Enterotoxin und Fimbrien (SINGH et al., 1997) nachgewiesen. Auch *S. rubidaea* besitzt ein hitzelabiles Enterotoxin und Fimbrien (SINGH et al., 1997).

Andere *Serratia* spp. werden nur äußerst selten mit Infektionen in Zusammenhang gebracht; *S. rubidaea* beispielsweise mit Sepsis (OKADA et al., 2002) und Gallenblasen-Infektion (URSUA et al., 1996).

2.9.3 Vorkommen von *Enterobacteriaceae* in Säuglingsfertiernahrung

Bisher wurden weltweit nur relativ wenige Untersuchungen zum Vorkommen von *Enterobacteriaceae* in Säuglingsfertiernahrung veröffentlicht. Die Mehrheit der Untersuchungen wurde aufgrund von Infektionsausbrüchen durch *E. sakazakii* zur Ermittlung der Infektionsquelle eingeleitet. In Tabelle 9 werden weltweit publizierte Studien zum Vorkommen von *Enterobacteriaceae* in Säuglingsfertiernahrungsmitteln dargestellt, die nicht aufgrund von Infektionsausbrüchen, sondern zur Ermittlung der Inzidenz von *Enterobacteriaceae* in Säuglingsfertiernahrung eingeleitet wurden.

Die in Tabelle 9 genannten Autoren ermittelten Kontaminationshäufigkeiten zwischen 6,0 % und 52,5 %. Im Durchschnitt erwiesen sich 26,2 % der untersuchten Säuglingsfertiernahrungen mit *Enterobacteriaceae* kontaminiert. Die Kontaminationshöhen lagen zumeist < 100 KBE/g. In der Mehrzahl der Studien wurde jedoch kein quantitativer Nachweis durchgeführt. Hinsichtlich des qualitativen Nachweises von *Enterobacteriaceae* in Säuglingsfertiernahrung erwies sich bei allen Untersuchungen eine besonders hohe Vorkommenshäufigkeit für *Enterobacter* spp., *Escherichia* spp., *Klebsiella* spp. und *Pantoea* spp.

Im Folgenden werden die Ergebnisse einiger publizierter Studien (Tabelle 9) zum Vorkommen von *Enterobacteriaceae* in Säuglingsfertiernahrung vorgestellt.

MUYTJENS et al. (1988) wiesen bei 141 untersuchten Säuglingsanfängernahrungen („powdered infant formula“) aus 35 Ländern am häufigsten *Enterobacter agglomerans* (heute *Pantoea agglomerans* bzw. *Escherichia vulneris*), *Enterobacter cloacae*, *E. sakazakii* und *Klebsiella pneumoniae* nach. CARNEIRO et al. (2003) untersuchten 90 Säuglingsanfängernahrungen („infant formula offered to low birth weight neonates“) aus Brasilien und wiesen am häufigsten *Klebsiella pneumoniae*, *Citrobacter freundii*, *Cedeceae davisae* und *Klebsiella planticola* nach. IVERSEN & FORSYTHE (2004) wiesen in 82 untersuchten Säuglingsanfängernahrungen („powdered infant formula“) aus

Europa, USA, Afrika und Asien am häufigsten *E. sakazakii* und *Pantoea* spp. nach. IVERSEN & FORSYTHE (2004) untersuchten auch Beikost („dried infant food“, n = 49) und Milchpulver (n = 72). Die Kontaminationshäufigkeit der Beikost mit *Enterobacteriaceae* betrug ca. 28,6 %, die der Milchpulver ca. 50 %. Die von IVERSEN & FORSYTHE (2004) untersuchte Beikost war am häufigsten mit *E. sakazakii* und *Pantoea* spp. kontaminiert, in den untersuchten Milchpulver-Proben war *Enterobacter cloacae* die am häufigsten nachgewiesene Spezies. LEUSCHNER et al. (2004) untersuchten 58 Säuglingsmilchnahrungen („milk formula products“) aus elf Ländern, die zumeist mit *Enterobacter agglomerans*, *E. sakazakii* und *Escherichia vulneris* kontaminiert waren. HEUVELINK et al. (2005) spezifizierten die nachgewiesenen *Enterobacteriaceae*-Spezies bei den aus den Niederlanden stammenden Säuglingsanfangs- (n = 62) und Folgenahrungen (n = 35) nicht näher, lediglich *E. sakazakii* wurde namentlich erwähnt. HEUVELINK et al. (2005) untersuchten auch „diätetische Lebensmittel für Säuglinge“ und Beikost für Kinder ab einem Alter von 12 Monaten („opvolg-/groeimelk“). Die Kontaminationshäufigkeit mit *Enterobacteriaceae* der „diätetischen Lebensmittel für Säuglinge“ betrug 9,5 % (4 von 42), die Kontaminationshäufigkeit der Beikost für Kinder ab einem Alter von 12 Monaten („opvolg-/groeimelk“) betrug 9,1 % (1 von 11). Sowohl in den untersuchten diätetischen Lebensmitteln als auch in Beikost wiesen HEUVELINK et al. (2005) ausschließlich *E. sakazakii* nach. ESTUNINGSIH et al. (2006) wiesen in 74 untersuchten Folgenahrungen („powdered follow-on formula“) aus Asien am häufigsten *Pantoea* spp., *E. sakazakii*, *Escherichia hermanii* und *Enterobacter cloacae* nach. SANJAQ (2008) untersuchte 269 Säuglingsanfangsnahrungen auf Trockenmilchpulverbasis. In der Dissertation (SANJAQ, 2008) erfolgte keine Angabe der aus diesen Nahrungen nachgewiesenen *Enterobacteriaceae*-Spezies (ausschließlich *E. sakazakii* wurde separat erwähnt, mit einer Kontaminationshäufigkeit von 2,97 %). Die Autorin gibt jedoch die bakterielle Betriebsflora in zwei Säuglingsnahrung herstellenden Betrieben an: es wurden *Enterobacter amnigenus*, *Enterobacter cloacae*, *E. sakazakii*, *Escherichia coli*, *Escherichia hermanii*, *Escherichia vulneris*, *Klebsiella pneumoniae*, *Leclercia adecarboxylata* und *Pantoea* spp. nachgewiesen.

Bisher wurden relativ wenige Studien zur mikrobiologischen Qualität von Säuglingsfertignahrung des deutschen Marktes - insbesondere zum Vorkommen von *Enterobacteriaceae* - publiziert. Im Rahmen ihrer Untersuchungen wiesen MUJTJENS et al. (1988) in zehn von zehn aus Deutschland stammenden Proben *Enterobacteriaceae*

nach. LEUSCHNER et al. (2004) untersuchten drei Proben aus Deutschland, von denen sich eine als kontaminiert mit *Enterobacteriaceae* erwies.

Tabelle 9: Zusammenstellung von Literaturdaten zum Vorkommen von *Enterobacteriaceae* in Säuglingsfertiernahrungsmitteln

Proben- anzahl	<i>Enterobacteriaceae</i> - positive Proben	n %	Kontaminations- höhe	Gattung	nachgewiesene Spezies	Herkunftsland der Proben	Referenz
141	74	52,5	< 1 KbE/100 g	<i>Buttiauxella</i> <i>Cedecea</i> <i>Citrobacter</i> <i>Enterobacter</i>	<i>agrestis</i> spp. <i>freundii, diversus</i> <i>agglomerans, cloacae,</i> <i>sakazakii, intermedium,</i> <i>amnigenus</i>	35 versch. Länder	MUYTJENS et al., 1988
				<i>Escherichia</i>	<i>coli, vulneris, hermannii,</i> <i>adecarboxylata</i>		
				<i>Hafnia</i>	<i>alvei</i>		
				<i>Klebsiella</i>	<i>pneumoniae, oxytoca</i>		
				<i>Rahnella</i>	<i>aquatilis</i>		
				<i>Serratia</i>	<i>plymuthica</i>		
				<i>Yersinia</i>	<i>intermedia, frederiksenii</i>		
90	17	18,9	k.A.	<i>Cedecea</i> <i>Citrobacter</i> <i>Enterobacter</i> <i>Klebsiella</i> <i>Kluyvera</i> <i>Pantoea</i>	<i>davisae, neteri</i> <i>freundii</i> <i>cloacae, intermedium</i> <i>pneumoniae, planicola</i> <i>ascorbata, cryocrescens</i> <i>agglomerans</i>	Brasilien	CARNEIRO et al., 2003

Fortsetzung Tabelle 9

Proben- anzahl	<i>Enterobacteriaceae</i> - positive Proben	n %	Kontaminations- höhe	Gattung	nachgewiesene Spezies	Herkunftsland der Proben	Referenz
203	57	28,1	< 100 KbE/g (1 Probe: zwischen 100 und 1000 KbE/g)	<i>Citrobacter</i> <i>Enterobacter</i> <i>Escherichia</i> <i>Klebsiella</i> <i>Leclercia</i> <i>Pantoea</i> <i>Rahnella</i> <i>Raoultella</i> <i>Serratia</i>	<i>freundii</i> <i>amnigenus, cloacae,</i> <i>sakazakii</i> <i>hermanii, vulneris, coli</i> <i>ozaenae, pneumoniae</i> <i>adecarboxylata</i> spp. <i>aquatilis</i> <i>terrigena</i> <i>ficaria</i>	Europa, Afrika, Asien, USA	IVERSEN & FORSYTHE, 2004
58	21	36,2	n.d.	<i>Cedecea</i> <i>Enterobacter</i> <i>Erwinia</i> <i>Escherichia</i> <i>Klebsiella</i> <i>Leclercia</i> <i>Rahnella</i> <i>Serratia</i>	<i>lapagei</i> <i>agglomerans, amnigenus,</i> <i>cloacae, sakazakii</i> spp. <i>hermanii; vulneris</i> <i>pneumoniae</i> <i>adecarboxylata</i> <i>aquatilis</i> <i>ficaria</i>	11 Länder, vorwiegend UK und Australien	LEUSCHNER et al., 2004

Fortsetzung Tabelle 9

Proben- anzahl	<i>Enterobacteriaceae</i> - positive Proben	n %	Kontaminations- höhe	Gattung	nachgewiesene Spezies	Herkunftsland der Proben	Referenz
150	9	6,0	n.d.	<i>Enterobacter</i> und andere	<i>sakazakii</i>	Niederlande	HEUVELINK et al., 2005
74	35	47,3	n.d.	<i>Citrobacter</i> <i>Enterobacter</i> <i>Escherichia</i> <i>Klebsiella</i> <i>Pantoea</i> <i>Serratia</i>	spp. <i>cloacae, sakazakii</i> <i>hermanii, coli</i> <i>pneumoniae</i> spp. spp.	Südostasien (Indonesien, Malaysia)	ESTUNINGSIH et al., 2006
269	45	16,7	0,3-21 KbE/100 g	*	*	k.A.	SANJAO, 2008

KbE = Kolonie bildende Einheiten; versch. = verschiedene; k.A. = keine Angabe; n.d. = nicht durchgeführt; UK = England; * = Angabe der Betriebsflora der herstellenden Betriebe: *Enterobacter amnigenus*, *Enterobacter cloacae*, *E. sakazakii*, *Escherichia coli*, *Escherichia hermanii*, *Escherichia vulnheris*, *Klebsiella pneumoniae*, *Leclercia adecarboxylata* und *Pantoea* spp.

2.9.4 Methoden zum Nachweis von *Enterobacteriaceae*

Die Standardmethode zum Nachweis von *Enterobacteriaceae* in Lebensmitteln ist die kulturelle Anzucht. Zunächst erfolgt eine selektive Anreicherung, um die Gram-positive Begleitflora weitestgehend zu unterdrücken. Es folgt die Anzucht auf selektiven Indikatornährböden (z.B. VRBG-Agar als Selektivmedium für *Enterobacteriaceae* allgemein) oder Selektivmedien für den Nachweis bestimmter Gattungen (z.B. DFI-Agar zum Nachweis von *E. sakazakii*, XLD- oder ASAP-Agar für den Nachweis von Salmonellen, usw.). Die endgültige Identifizierung und Differenzierung wird anhand biochemischer Tests („Bunte Reihe“ oder kommerziell erhältliche Systeme wie beispielsweise api 20E oder Enterotube) und anhand serologischer Nachweise durchgeführt. Je nach Spezies werden auch Toxinnachweise oder molekularbiologische Methoden verwendet. Die international gültige Standardmethode ISO 21528 (Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal methods for the detection and enumeration of *Enterobacteriaceae*) beinhaltet zusätzlich den quantitativen Nachweis von *Enterobacteriaceae*. Eine detaillierte Beschreibung dieser Methode erfolgt im Methodenteil dieser Arbeit.

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 Materialien

3.1.1 Probenmaterial

Im Zeitraum von Juli 2005 bis September 2006 wurden insgesamt 152 pulverförmige Säuglings- und Kleinkinderfertignahrungsmittel untersucht. Dazu gehörten Anfangs- und Folgemilchen, hypoallergene Anfangs- und Folgenahrungen, Milchbreie, Getreidebreie und diätetische Nahrungen (diätetische Lebensmittel für besondere medizinische Zwecke, die Säuglingen von Geburt an gegeben werden können). Die Anzahl der untersuchten Proben je Produktgruppe ist Tabelle 10 zu entnehmen. Die Proben stammten von 16 unterschiedlichen Herstellern (bzw. Vertriebsfirmen). Sie wurden stichprobenartig in verschiedenen Geschäften (Einzelhandelsgeschäfte, Großhandel, Supermärkte, Drogerien, Naturkostläden, Reformhäuser) im Raum Gießen erworben. Damit repräsentierten die Proben annähernd das zu dieser Zeit in Deutschland verfügbare Warenspektrum. Eine Zusammenarbeit mit den Produktionsfirmen wurde vermieden, um eine Vorselektion durch diese zu umgehen. Produkte, die eine erkennbar marktdominierende Stellung besaßen sowie Proben, in denen entweder *E. sakazakii* oder eine erhöhte Kontamination mit *Enterobacteriaceae* nachgewiesen worden war, wurden zur Nachuntersuchung erneut eingekauft und untersucht.

Tabelle 10: Übersicht über die untersuchten Säuglingsfertignahrungsmittel - aufgeschlüsselt nach verschiedenen Produktgruppen und der jeweils untersuchten Probenanzahl

Produktgruppe	Probenanzahl n
Anfangsmilch *	27
Folgemilch	30
Hypoallergene Anfangsnahrung	10
Hypoallergene Folgenahrung	8
Milchbrei **	52
Getreidebrei	11
Diätetische Nahrung***	7
Sonstige ****	7
Σ	152

* die Gruppe der Anfangsmilch beinhaltet 22 Anfangsmilchen und 5 Dauermilchen

** die Gruppe der Milchbreie beinhaltet 25 Milchbreie mit Zusatz von Frucht, 18 mit Getreide, 7 mit Keks, einen mit Honig & Flakes und einen hypoallergenen Milchbrei

*** Diätetische Nahrung = diätetische Lebensmittel für besondere medizinische Zwecke, die für Säuglinge „von Geburt an“ bestimmt sind

**** unter Sonstige wurden 2 Reisschleime, 1 Reisbrei, 1 Kartoffelbrei, 1 Apfelbrei, 1 Baby Müsli und eine milchfreie Anfangsnahrung zusammengefasst

Im Folgenden wurde zusätzlich zu der Einteilung der Säuglingsfertignahrung in unterschiedliche Produktgruppen auch eine Einteilung je nach empfohlenem Verwendungsalter (entsprechend Herstellerangaben) vorgenommen. Relevant ist die Berücksichtigung des Verwendungsalters aufgrund der Unterschiede hinsichtlich des Risikos einer bakteriellen Infektion je nach Lebensalter des konsumierenden Säuglings. Es erfolgte eine Gliederung nach vom Hersteller empfohlenen Verwendungsalter und zwar in Produkte zum Verzehr von Geburt an, nach dem 4. Lebensmonat sowie ab dem 6.

Lebensmonat (oder älter). Eine Einteilung des untersuchten Probenmaterials hinsichtlich des empfohlenen Verwendungsalters ist in Tabelle 11 dargestellt.

Tabelle 11: Übersicht über die untersuchten Säuglingsfertignahrungsmittel - aufgeschlüsselt je nach empfohlenem Verwendungsalter (entsprechend Herstellerangaben) und der jeweils untersuchten Probenanzahl

empfohlenes Verwendungsalter	Probenanzahl n
von Geburt an	45
nach dem 4. Monat	72
> 6 Monate	35
Σ	152

Unterteilt man die Säuglingsfertignahrungsmittel in Anfangs- und Folgenahrung, Beikost und diätetische Lebensmittel, so ergibt sich die in Tabelle 12 dargestellte Probenverteilung. Hinsichtlich der Differenzierung von Säuglingsnahrungsmitteln in Anfangs- und Folgenahrungen existieren jedoch international verschiedene Definitionen (2.3). Der Einteilung in Tabelle 12 liegen die auf europäischer Ebene geltenden Definitionen zugrunde (EG-Richtlinie 91/321/EWG).

Tabelle 12: Übersicht über die untersuchten Säuglingsfertignahrungsmittel - aufgeschlüsselt in Anfangs- und Folgenahrung, Beikost und diätetische Lebensmittel sowie die jeweils untersuchte Probenanzahl

	Probenanzahl n
Anfangsnahrung	38
Folgenahrung	38
Beikost	69
Diätetische Lebensmittel	7
Σ	152

103 der 152 untersuchten Säuglingsfertignahrungsmittel enthielten Zutaten aus konventioneller Herstellung. Als „ökologisch“ deklariert waren 49 der Proben. Diese

waren entweder durch das Bio-Siegel (nach EG-Öko-Verordnung) auf der Verpackung gekennzeichnet und/oder enthielten die Bezeichnung „Bio-“ direkt in der Verkehrsbezeichnung.

136 der Proben enthielten Milchbestandteile (laut Zutatenangabe Milchpulver, Magermilchpulver, hydrolisiertes oder entmineralisiertes Molkenpulver, hydrolisiertes Molkenprotein oder Lactose). 16 der Proben waren als „milchfrei“ deklariert.

Probiotika enthielten 18 der 152 untersuchten Säuglingsfertignahrungen, als „prebiotisch“ waren 12 Proben ausgezeichnet.

Bei der Auswahl der Proben wurden Produkte aller auf dem Markt befindlichen Hersteller berücksichtigt. Zudem wurde das Produktspektrum (Anfangs- und Folgemilch, hypoallergene Anfangs- und Folgenahrung, Milchbrei, Getreidebrei und diätetische Nahrung) eines jeden Herstellers im Wesentlichen abgedeckt. Da die verschiedenen Hersteller ein unterschiedlich vielfältiges Produktspektrum aufwiesen, wurden die Waren einiger Hersteller in größerer Auswahl in die Untersuchungen einbezogen. Mit welcher Probenanzahl die verschiedenen Hersteller in der Probengesamtheit vertreten waren, zeigt Abbildung 1.

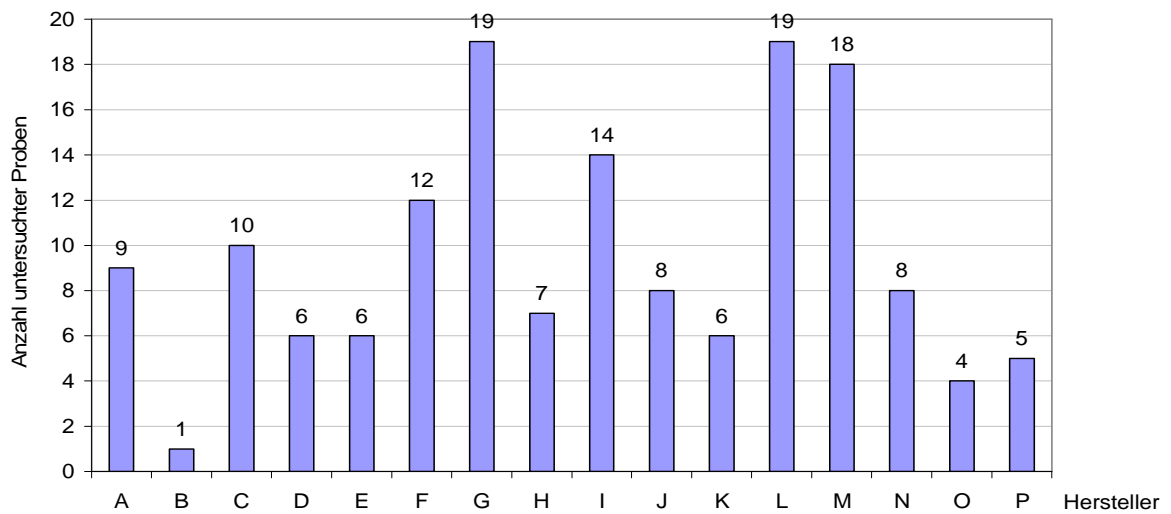


Abbildung 1: Anzahl untersuchter Proben je Hersteller

3.1.2 Anreicherungsmedien, Nährmedien, Reagenzien und Biochemika des mikrobiologischen Nachweises von *Enterobacteriaceae*

Agar-Agar	Merck, Darmstadt, Deutschland, 1.01614.1000
api [®] 20E	bioMérieux, Marcy l’Etoile, Frankreich, 20100
api NaCl 0,85 % Medium, 5 ml	bioMérieux, 20230
James Indol	bioMérieux, 70542
TDA	bioMérieux, 70402
VP 1 + VP 2	bioMérieux, 70422
Bactident Oxidase Teststäbchen	Merck, 1.13300.0001
BBL [®] Enterotube [™] II	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland, 273176
Brillantgrün-Phenolrot-Lactose- Saccharose-Agar, modifiziert, (BPLS-Agar)	Merck, 1.10747.0500
Buffered Peptone Water (BPW)	BioRad, Marnes-La-Coquette, Frankreich, 64684
Caseinpepton-Sojamehlpepton-Agar (CASO)	Merck, 1.05458.0500

<i>Enterobacter-Sakazakii</i> -Chromogen-Agar, (DFI Formulierung)	Oxoid, Basingstoke, England, CM 1055
Diatabs™ Urease	Rosco Diagnostica, Taastrup, Dänemark, 57511
Diatabs™ Adonitol	Viva Diagnostika, Köln, 52011
<i>Enterobacteriaceae</i> Enrichment Broth (EEB)	BioRad, 3564794
Glucose-Agar	Pepton aus Casein: 10,00 g Glucose: 5,00 g Bromkresolpurpur: 0,04 g Agar-Agar: 12,00 g
GRAM-color Lösung 1: Kristallviolettlösung	Merck, 1.11885./1
Lösung 2: LUGOLS Lösung	Merck, 1.11885./2
Lösung 3: Entfärbelösung	Merck, 1.11885./3
Lösung 5: Safraninlösung	Merck, 1.11885./5
Hirn-Herz-Bouillon (Brain Heart Infusion)	Merck, 1.10493.0500
Kälberserum	elocin-lab GmbH, Mülheim, Deutschland, 10400500
Kaliumhydroxid-Plätzchen	VWR, 1.05033.0500
KOVÁCS Indolreagenz	VWR, 1.09293.0100
Natriumchlorid-Lösung	Merck, 1.06404.1000
Methylrot-Voges-Proskauer-Bouillon	Merck, 1.05712.0500
1-Naphtol	VWR, 1.06223.0050
Paraffin	Merck, 1.07150.1000
Plate-Count-Agar (Caseinpepton-Glucose- Hefeextrakt-Agar)	Merck, 1.05463.0500
Salmonella-Anreicherungsbouillon nach RAPPAPORT und VASSILIADIS (RV-Bouillon)	Merck, 1.07700.0500
Ringerlösung	Oxoid, BR 52
Selenite Cystine Broth Base (SC) mit Natrium biselenite	Oxoid, CM 699 Oxoid, EEC 231-966-3
SIM-Nährboden	Merck, 1.05470.0500
Tween 80-Agar	40 g Standard II Nähragar, Merck, 1.07883.0500; 10 ml CaCl (10%); 10 ml Tween®80, Merck, 8.17061.1000

Verdünnungslösung (für drop-plating)	1 l Ringerlösung + 0,75 g Agar-Agar
Violet Red Bile Dextrose Agar (VRBG-Agar)	BioRad, 3564584
Xylose-Lysin-Desoxycholat-Agar (XLD-Agar)	Merck, 1.05287.0500

3.1.3 Chemikalien, Biochemika, Primer, Lösungen und Puffer des molekularbiologischen Nachweises von *E. sakazakii*

Biozym LE Agarose (Standard-Agarose)	Biozym, Hessisch-Oldendorf, Deutschland, 840004
DNeasy [®] Tissue Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland, 69506
dNTP-Set (10 mM)	MBI Fermentas, St. Leon-Roth, Deutschland, R0181
Eisessig, 100 %	Merck, 1.00056.2500
Ethidiumbromid-Lösung 10 mg/ml	Sigma, Taufkirchen, Deutschland, E1510
Gene Ruler [™] 100bp DNA Ladder, (0,5 mg DNA/ml)	MBI Fermentas, SM 0241
Lysozym	Sigma, St. Louis, USA, L-6876
Loading Dye Solution (6fach, orange)	MBI Fermentas, R 0631
Magnesiumchlorid (25mM)	Promega, Madison Wi USA, A 351 H 17039725
Primer Saka 1a	MWG, Ebersberg, Deutschland
Primer Saka 2b	MWG
Proteinase K	Qiagen, 1014025
Reaktionspuffer (Thermophilic DNA Polymerase Buffer, 10fach)	Promega, M 190 G 17039815
<i>Taq</i> -DNA-Polymerase (5U/ μ l)	Promega, M 186 E 17549313
TE-Puffer	Tris-HCl: 10 mmol/l EDTA: 1 mmol/l pH: 8,0
TAE-Puffer, 50fach	Tris-HCl: 242 g Eisessig (99%): 57,1 ml EDTA (0,5 mol/l): 100 ml pH: 8,0

3.1.4 Materialien zur Lagerung der *Enterobacteriaceae*

Lyophilisate:

Caseinpepton-Sojamehlpepton-Bouillon	Merck, 1.05459.0500
Gläschen: 5ml HS-Flasche, 38,2 x 22mm, klar	VWR, 548-0057
Stopfen: LYO (Ø 13 gris)	Code: 445075
Verschlussringe: Alukappen mit Loch, 20mm	VWR, 548-0058

Stammhaltungssystem Cryobank für Mikroorganismen:

Cryobank™ CRYOG/Y	Mast Diagnostica, Mast Group Ltd., Merseyside, UK, 174197
-------------------	--

3.1.5 Geräte und sonstige Materialien

Aqua destillata	
Abzug Holten LaminAir	Integra Biosciences, Typ Maxisafe 2010 1.2
Agarclav	Integra Biosciences, ID-Nr. 001705
apilab plus (PC-Software)	Biomeriëux
Autoclav Ster Vis	Holzner, Stuttgart, Deutschland
BBL® Enterotube™ II-Codebuch	Becton Dickinson
1 Brutschrank Heraeus B 20	Heraeus, Kendro Laboratory Products, Hanau, Deutschland, 500 423 13
2 Brutschränke Heraeus B 12	Heraeus, 500 42 307
Ethanol (> 99 %)	Merck 100983
Gefriertrocknungsanlage: LYOVAC GT 2	Steris GmbH, Hürth, Deutschland
Gelektrophorese Power Pac 1000	Biorad, 287BR 02663
Gelektrophoresekammer SUB-CELL-GT	Biorad
Gefrierschrank Heraeus HERA freeze (- 86 °C)	Heraeus, Kendro Laboratory Products
Gel-Doc 2000, Geldokumentationssystem	Biorad
Rüttler HT	INFORS AG, Bottmingen, Schweiz
Sony Videoprinter	SONY, Japan, 60762
Thermocycler iCycler	Biorad

Vortex VF 2	Janke & Kunkel, IKA-Labortechnik, Staufen i. Br., Deutschland, 498577
Waage	OHAUS Explorer, Schweiz, E0D120
Wasserbad GFL 1083	Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel, Deutschland
Wasserbad Julabo SW 22	Julabo Labortechnik GmbH, Seelbach, Deutschland
Zentrifuge	Sigma, 202 MK

3.1.6 Bakterien-Referenzstämme

Es wurden die in Tabelle 13 aufgeführten Referenzstämme verwendet:

Tabelle 13: Aufstellung der verwendeten Referenzstämme

Mikroorganismus	Bezeichnung	Herkunft
<i>Enterobacter cloacae</i>	ATCC 13047	Max von Pettenkoffer Institut, München
<i>Enterobacter sakazakii</i>	ATCC 35317	Max von Pettenkoffer Institut, München
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922	Professur für Tierärztliche Nahrungsmittelkunde, JLU Gießen
<i>Klebsiella pneumoniae</i> spp. <i>pneumoniae</i>	DSM 30104	Max von Pettenkoffer Institut, München
<i>Proteus vulgaris</i>	-	eigene Stammsammlung
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	eigene Stammsammlung
<i>Salmonella</i> Typhimurium	ATCC 19585	Institut für Hygiene und Infektions- krankheiten der Tiere, JLU Gießen
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	Professur für Tierärztliche Nahrungsmittelkunde, JLU Gießen

ATCC = American Type Culture Collection; DSM = Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen; JLU = Justus-Liebig-Universität

Die Lagerung der Referenzstämme erfolgte auf CASO-Agar im Kühlschrank bei 4 °C. Die Kulturen wurden monatlich subkultiviert.

DNA des *E. sakazakii*-Referenzstammes ATCC 29544 wurde als Positivkontrolle im Rahmen der PCR verwendet.

3.2 Methoden

3.2.1 Mikrobiologischer Nachweis von *Enterobacteriaceae*

3.2.1.1 Qualitativer Nachweis von *Enterobacteriaceae* (exclusive Salmonellen)

3.2.1.1.1 Untersuchungs- und Identifizierungsverfahren

Der qualitative Nachweis von *Enterobacteriaceae* erfolgte unter Verwendung eines kombinierten Untersuchungsverfahrens, dem die Internationale Standardmethode ISO 21528-1:2004 (Annex A) für den Nachweis von *Enterobacteriaceae* sowie die Methode der US Food and Drug Administration für den Nachweis von *E. sakazakii* aus pulverförmiger Säuglingsnahrung (FDA, 2002) zugrunde lagen.

Für die Isolierung von *E. sakazakii* wurde zur Erhöhung der Spezifität der FDA-Methode zusätzlich das für *E. sakazakii* selektive Nährmedium DFI-Agar eingesetzt. Zur Vermeidung falsch-negativer Befunde durch Unterdrückung des Wachstums einzelner *Enterobacteriaceae*-Spezies in der Selektivanreicherung (EEB) wurde zusätzlich Material aus der nicht-selektiven Voranreicherung (BPW) direkt auf Festnährböden überimpft. Die Bestätigung der kulturell und biochemisch als *E. sakazakii* identifizierten Keime erfolgte mittels Polymerase-Kettenreaktion (3.2.2).

Eine schematische Übersicht des Untersuchungsgangs wird in Abbildung 2 dargestellt.

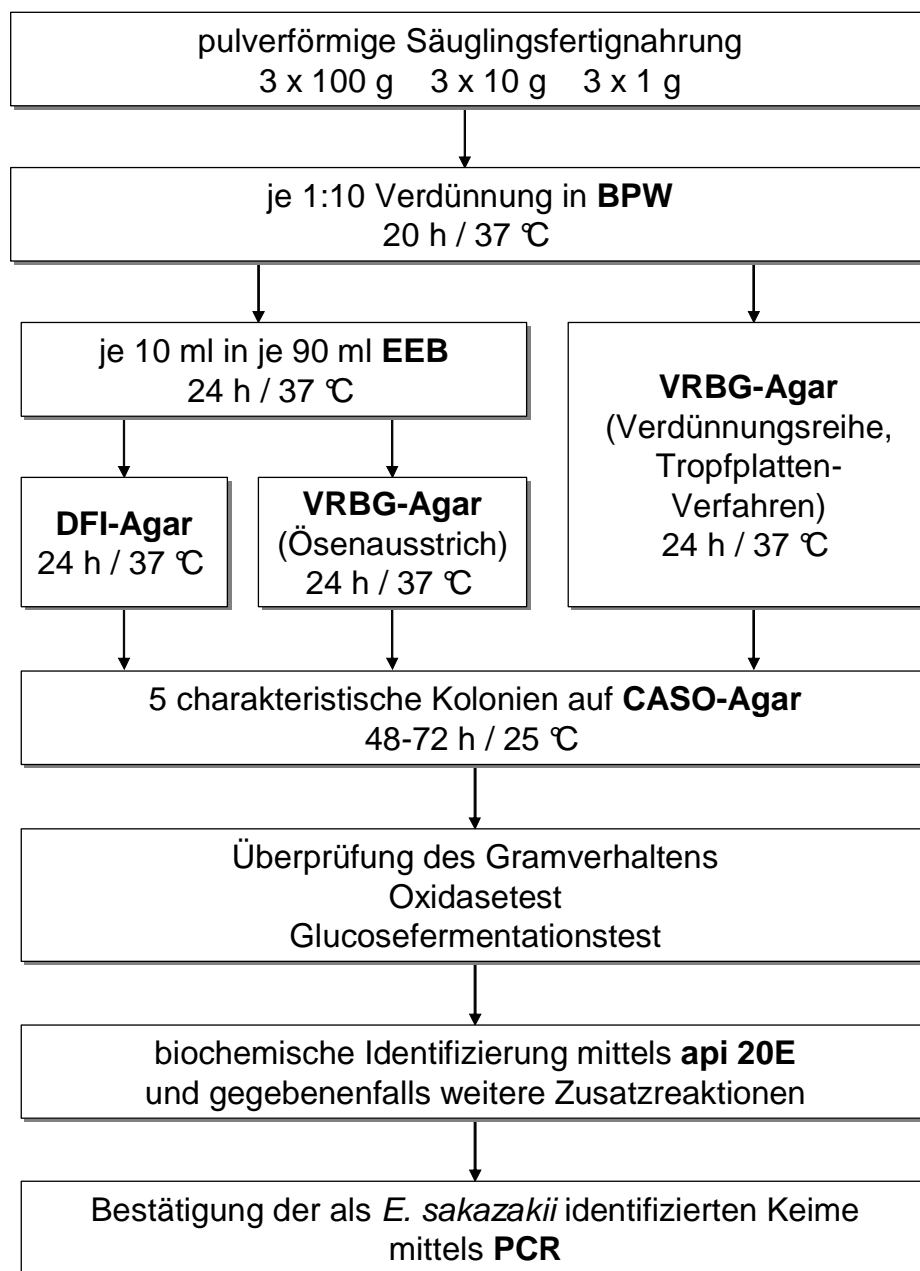


Abbildung 2: Schematische Darstellung des Untersuchungsgangs zum Nachweis von *Enterobacteriaceae* in Säuglingsfertiernahrungsmitteln

BPW	=	Buffered Peptone Water
EEB	=	<i>Enterobacteriaceae</i> Enrichment Broth
VRBG	=	Violet Red Bile Glucose Agar
DFI	=	Druggan-Forsythe-Iversen-Agar
CASO	=	Caseinpepton-Sojamehlpepton-Agar
PCR	=	Polymerase-Kettenreaktion

Nicht-selektive Voranreicherung

Die nicht-selektive Voranreicherung der pulverförmigen Säuglingsnahrung erfolgte in Anlehnung an die Internationale Standardmethode ISO 8261:2001 zur Probenvorbereitung von Milch- und Milchprodukten und an die Methode der FDA für den Nachweis von *E. sakazakii* (FDA, 2002). Zunächst wurden Schere und die zu öffnende Seite des Pulverbeutels mit Ethanol sterilisiert. Nach Eröffnen der Beutel wurden 3 x 100 g, 3 x 10 g und 3 x 1 g Nahrungspulver der zu untersuchenden Probe in 3 x 900 ml, 3 x 90 ml und 3 x 9 ml BPW eingewogen (1:10 Verdünnung), das zuvor auf 45 °C erwärmt worden war. Aufgelöst wurde das Pulver durch das Schütteln von Hand mit einer Amplitude von 30 cm für 7 s (bzw. durch Schütteln bis zur vollständigen Auflösung). Es folgte die Inkubation im Wasserschüttelbad für 20 h bei 37 °C. Diese nicht-selektiven Voranreicherungen dienten als Grundlage für die Entnahme von Probenmaterial für alle weiteren Schritte des Nachweises der *Enterobacteriaceae*, einschließlich der Salmonellen und des quantitativen Nachweises der *Enterobacteriaceae*.

Selektive Anreicherung und Isolierung der *Enterobacteriaceae*

Aus jeder der neun nicht-selektiven Voranreicherungen wurden 10 ml entnommen und zur selektiven *Enterobacteriaceae*-Anreicherung in je 90 ml EEB überführt. Außerdem wurde aus den drei Voranreicherungen mit je 100 g Nahrungspulver-Einwaage je 1 ml entnommen und in je 9 ml NaCl-Lösung überführt. Aus dieser wurde eine 10er-logarithmische Verdünnungsreihe angelegt (bis 10^{-6}) und je Verdünnungsstufe 100 µl mittels Tropfplatten-Verfahren (angelehnt an §35 LMBG, 06.00 19) auf ein Viertel einer VRBG-Agar ausgestrichen. Dies erfolgte im Doppelansatz. Die Inkubation von EEB und VRBG-Agar erfolgte für 24 h bei 37 °C.

Anschließend wurden aus jeder Selektivanreicherung ein fraktionierter Ösenausstrich auf VRBG-Agar (selektives *Enterobacteriaceae*-Festnährmedium) sowie ein Ösenausstrich auf DFI-Agar (selektives chromogenes Festnährmedium für *E. sakazakii*) angefertigt. Die beimpften Platten wurden für 24 h bei 37 °C bebrütet. Als *Enterobacteriaceae*-verdächtig wurden auf VRBG-Agar Kolonien mit folgender Morphologie bewertet: rötliche (pinke, rote oder violette), runde Kolonien von 1-2 mm Durchmesser mit oder ohne Hof. Als *E. sakazakii*-verdächtig auf DFI-Agar wurden blau-grüne Kolonien angesehen.

Jeweils fünf der auf DFI-Agar typischen Kolonien und jeweils fünf der auf VRBG-Agar verdächtigen Kolonien wurden auf CASO-Agar überimpft (sowohl die Keime, die aus BPW als auch diejenigen, die aus EEB auf VRBG-Agar isoliert wurden). Stellten sich koloniemorphologisch auf VRBG-Agar unterschiedliche Keimspezies dar, so wurden von jeder Spezies fünf Kolonien auf CASO-Agar überimpft. Der hemmstoff- und indikatorfreie Universalnährboden CASO-Agar wurde bei 25 °C für 48-72 h bebrütet. Nach dieser Zeit war auch die Bildung von gelbem Pigment durch *E. sakazakii* auf CASO-Agar gut sichtbar.

Die präsumtiven *E. sakazakii*-Isolate (verdächtige Koloniemorphologie auf VRBG-, CASO-, DFI-Agar) wurden auf Tween 80-Agar angezüchtet, um das Vorhandensein der Tween-Esterase zu überprüfen. Dazu wurde Koloniematerial mit einer Öse auf Tween 80-Agar auf einer Linie ausgestrichen und bei 37 °C bebrütet. Ein milchig-trüber Hof um den Impfstrich deutete auf eine positive Tween-Esterase-Reaktion hin.

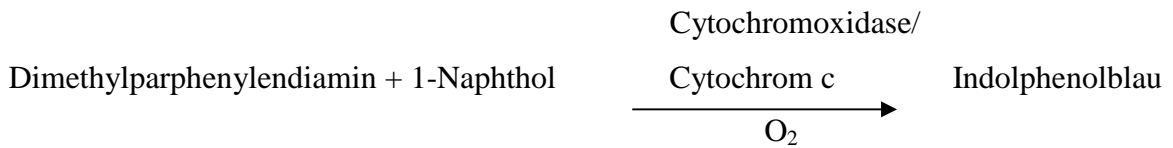
Von CASO-Agar erfolgten dann der Nachweis des Gram-Verhaltens der isolierten Keime, der Oxidase- und Glucose-Fermentations-Test sowie die biochemische Identifizierung der *Enterobacteriaceae* mittels api 20E.

Nachweis des Gram-Verhaltens

Zum Nachweis des Gram-Verhaltens der *Enterobacteriaceae* (Gram-negativ) wurden KOH-Test und/oder eine Gram-Färbung durchgeführt. Das Nachweisprinzip des KOH-Tests basiert auf der Auflösung der bakteriellen Zellwand von Gram-negativen Keimen durch Kalilauge und anschließender Freisetzung des Zellinhalts, welcher als visköser Faden an der Öse haften bleibt. Zur Überprüfung des Gram-Verhaltens wurde von den Kolonien, die mittels api 20E bestimmt werden sollten, Koloniematerial von CASO-Agar entnommen und auf einem Objektträger mittels Öse in einem Tropfen 3 %iger Kalilauge verrieben. War keine eindeutige Schleimfadenbildung zu erkennen, wurde eine Gram-Färbung angefertigt. Dazu wurde Koloniematerial mit 0,9 %iger Natriumchloridlösung auf einem Objektträger verteilt und nach Trocknung und anschließender Hitzefixierung gefärbt (1 min Kristallviolett, 1 min Lugol'sche Lösung, 20-30 Sekunden entfärben in Alkohol, 1 min Safranin). Anschließend wurde das Präparat unter dem Mikroskop beurteilt. Gram-negative Bakterien erscheinen rot, Gram-positive Bakterien blau-violett.

Oxidase-Test

Der Nachweis der bakteriellen Cytochrom-Oxidase erfolgte im Oxidase-Test, welcher auf folgendem Prinzip beruht:



Bei Cytochromoxidase-positiven Keimen (z.B. *Pseudomonas* spp. oder *Aeromonas* spp.) erfolgt die Bildung von Indolphenolblau, welches zu einer Blaufärbung des Reaktionsfeldes auf dem Oxidase-Teststreifen führt. Bei Oxidase-negativen Keimen (*Enterobacteriaceae*) erfolgt keine Farbänderung. Der Oxidase-Test wurde bei allen im api 20E zu differenzierenden Keimen durchgeführt. Als Positivkontrolle diente hierbei *Pseudomas aeruginosa*, als Negativkontrolle *Escherichia coli*.

Glucosefermentation

Enterobacteriaceae können Glucose sowohl oxidativ als auch fermentativ (unter anaeroben Bedingungen) spalten. Die oxidative Glucose-Spaltung der isolierten Bakterien wurde im api 20E getestet. Die fermentative Glucose-Spaltung wurde bei allen im api 20E zu differenzierenden Keimen folgendermaßen überprüft: Nach Stichbeimpfung eines Glucosemedium-enthaltenden Röhrchens, wurde dieses mit Paraffin überschichtet (Erstellung anaerober Bedingungen) und bei 37 °C für 72 h bebrütet. Im positiven Fall kann der Umschlag des Indikators Bromthymolblau durch Säurebildung nach gelb beobachtet werden. Im negativen Fall behält das Glucosemedium seine violette Färbung bei. Als Positivkontrolle diente hierbei *Escherichia coli*, als Negativkontrolle *Pseudomas aeruginosa*.

Biochemische Identifizierung

Die biochemische Identifizierung der *Enterobacteriaceae* erfolgte im api 20E. Das api 20E ist ein standardisiertes System zur Identifizierung von *Enterobacteriaceae* und anderen Gram-negativen Stäbchen anhand von 21 miniaturisierten, biochemischen Reaktionen und einer Datenbasis (Identifizierungs-Software). Mit dem api 20E können folgende bakterielle Enzyme/Reaktionen nachgewiesen werden: β -Galactosidase, Arginin-Dihydrolase, Lysin-Decarboxylase, Ornithin-Decarboxylase, Urease, Tryptophan-Desaminase, Gelatinase, Citratabbau, H₂S-Bildung, Indol-Bildung, Acetoin-Bildung (Voges-Proskauer) und die

Verstoffwechslung der Zucker Glucose, Mannit, Inosit, Sorbit, Rhamnose, Saccharose, Melibiose, Amygdalin und Arabinose. Der separat durchgeführte Oxidase-Test stellt die 21. Identifizierungsreaktion dar. Verwendet wurde dieses Testsystem wie vom Hersteller beschrieben: Mit 1-2 gut isolierten Einzelkolonien eines Isolates von CASO-Agar wurde eine Bakteriensuspension im api-NaCl-Medium hergestellt. Mit dieser Bakteriensuspension wurden die Mikroröhrchen des api 20E-Teststreifens beimpft, welche die dehydrierten Substrate für alle Reaktionen enthalten. Je nach Anforderung wurden die Röhrchen komplett aufgefüllt oder mit Paraffinöl für eine anaerobe Bebrütung luftdicht verschlossen. Nach Inkubation für 24 h bei 37 °C in einer feuchten Kammer, erfolgte die Zugabe spezifischer Reagenzien in die vom Hersteller angegebenen Mikroröhrchen und das Ablesen der Farbreaktionen. Anhand der positiven Reaktionen wurde eine Schlüsselzahl gebildet, mit welcher die Auswertung der Ergebnisse mit der Identifizierungs-Software apilab plus erfolgte.

Stichprobenartig wurde zur biochemischen Bestätigung zusätzlich zum api 20E das Enterotube II-System herangezogen. Das Enterotube II-System ist eine miniaturisierte „Bunte Reihe“ zur Identifizierung von aeroben, fakultativ anaeroben, Gram-negativen, Oxidase-negativen Stäbchenbakterien (*Enterobacteriaceae*). Die in den Kammern des Teströhrchens befindlichen Spezialmedien ermöglichen den gleichzeitigen Nachweis von 15 verschiedenen biochemischen Eigenschaften der Bakterien: Verstoffwechslung der Zucker Glucose (evtl. unter Gasbildung), Lactose, Arabinose, Adonit, Sorbit und Dulcitol, Verstoffwechslung der Aminosäuren Lysin, Ornithin und Phenylalanin, Bildung von H₂S, Verstoffwechslung von Harnstoff, Citratabbau, Indol- und Acetoin-Bildung (Voges-Proskauer-Reaktion). Auch dieses System wurde nach Herstellerangaben verwendet: Mit Hilfe der im Enterotube-System integrierten Impfföse wurde jeweils eine gut isolierte Kolonie von CASO-Agar entnommen und mit der Impfföse in den Kammern des Teströhrchens verteilt. Es folgte die Inkubation für 24 h bei 37 °C. Nach Zugabe spezifischer Reagenzien in die vom Hersteller angegebenen Kammern wurden die Farbreaktionen abgelesen. Anhand der positiven Reaktionen erfolgte die Bildung der fünfstelligen Schlüsselzahl, die zur Bestimmung des Keimes durch Nachschlagen im Enterotube II-Codebuch verwendet wurde.

3.2.1.1.2 Überprüfung des qualitativen Nachweises der *Enterobacteriaceae*

Zur Überprüfung des qualitativen Nachweises der *Enterobacteriaceae* wurden die unter Tabelle 13 aufgeführten Referenzstämme von *E. sakazakii*, *Staphylococcus aureus* und *Escherichia coli* parallel zu den jeweiligen Probenuntersuchungen mitgeführt. Dazu wurden je 9 ml EEB separat mit diesen Bakterienstämmen beimpft und mit den zu untersuchenden Probenansätzen bei 37 °C inkubiert. Aus EEB wurden die Selektivnährmedien VRBG- und DFI-Agar per Ösenausstrich beimpft. Als Positivkontrolle für VRBG-Agar diente dabei *E. sakazakii*, als Negativkontrolle *Staphylococcus aureus*. Als Positivkontrolle für DFI-Agar wurde *E. sakazakii* verwendet, als Negativkontrolle *Escherichia coli*. Weil diese Kontrollen parallel zu den jeweiligen Probenuntersuchungen verliefen, war hiermit sowohl eine Überprüfung der aktuellen Nährmediencharge möglich, als auch eine Kontrolle der Brutschrankfunktionalität.

3.2.1.1.3 Durchführung weiterer biochemischer Reaktionen zur endgültigen Identifizierung der *Enterobacteriaceae*

War die Identifizierung einer Spezies durch das api 20E nicht eindeutig möglich, wurden weitere biochemische Reaktionen des zu testenden Keims geprüft. Als nicht eindeutig eingestuft wurde das api 20E-Ergebnis unter folgenden Bedingungen:

- Ablesen einer Farbreaktion im api 20E nicht eindeutig möglich
- geringe Prozentzahl der taxonomischen Eingruppierung durch das api 20E
- unterschiedliche Ergebnisse bezüglich einer Reaktion im api 20E und Enterotube
- Widerspruch zwischen api-Identifizierung und kultureller Morphologie

Im Laufe der Untersuchungen fiel vor allem die Harnstoff-Reaktion im api 20E bezüglich der *Klebsiella* spp. als häufig problematisch auf. In den meisten Fällen konnte bei dieser gar kein oder maximal ein geringgradiger farblicher Umschlag im api 20E verzeichnet werden (Fehlen bakterieller Urease), sodass das api 20E-Resultat *Klebsiella terrigena* lautete. Wurden diese *Klebsiella* spp. parallel im Enterotube-System getestet, so kam es hier zu einem eindeutigen Farbumschlag bezüglich der Harnstoff-Reaktion (Vorhandensein bakterieller Urease), was zu dem Resultat *Klebsiella pneumoniae* führt. Resultierend aus dieser Problematik bei der Speziesdifferenzierung wurde bei allen *Klebsiella* spp. mit unklarer Harnstoff-Verstoffwechslung diese Reaktion anhand von Urease-Diatabs

wiederholt. Die Durchführung erfolgte nach Herstellerangaben: Nach Anfertigung einer McFarland Nr. 4-Suspension von dem zu testenden Keim in 0,25 ml NaCl-Lösung wurde dieser eine Urease-Diagnostik-Tablette zugefügt und 24 h bei 37 °C bebrütet. Bei Vorhandensein von Urease (positive Reaktion) erfolgte mit Hilfe des Indikators Phenolrot ein Farbumschlag der Suspension nach rot/violett. Als Positivkontrolle wurde *Proteus vulgaris*, als Negativkontrolle *Escherichia coli* eingesetzt.

Eine Übersicht über die insgesamt aus Säuglingsfertiernahrung isolierten *Klebsiella* spp. und deren Ergebnis der Harnstoff-Reaktion in den unterschiedlichen Testsystemen sowie die daraus resultierende Identifizierung sind in Tabelle 14 dargestellt. *Klebsiella* spp. mit positiver Harnstoff-Reaktion wurden als *Klebsiella pneumoniae* identifiziert. Als positive Harnstoff-Reaktion wurde gewertet: eine eindeutig positive Harnstoff-Reaktion im api 20E oder eine positive Harnstoff-Reaktion im Enterotube-System und mittels Diatabs, auch wenn die Harnstoff-Reaktion des entsprechenden Keims im api 20E negativ ausgefallen war.

Tabelle 14: Übersicht über die insgesamt aus Säuglingsfertiernahrung isolierten *Klebsiella* spp. und deren Ergebnis der Harnstoff-Reaktion in den unterschiedlichen Testsystemen sowie deren endgültige Identifizierung

Proben-Nr.	api 20E-Ergebnis	Urease			endgültige Identifizierung
		api 20E	Entero-tube	Diatab	
257	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	+	n. d.	n. d.	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
280	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	+	n. d.	n. d.	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
285	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	+	n. d.	n. d.	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
298	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	+	n. d.	n. d.	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
316	<i>Klebsiella terrigena</i>	-	+	+	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
320	<i>Klebsiella terrigena</i>	-	+	+	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
338	<i>Klebsiella oxytoca</i>	-	n. d.	n. d.	<i>Klebsiella oxytoca</i>
347	<i>Klebsiella terrigena</i>	-	+	+	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
348	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	+	+	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
367	<i>Klebsiella terrigena</i>	-	+	+	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
373	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	+	n. d.	n. d.	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
376	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	+	n. d.	n. d.	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
380	<i>Klebsiella terrigena</i>	-	+	+	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
381	<i>Klebsiella terrigena</i>	-	+	+	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
382	<i>Klebsiella terrigena</i>	-	+	+	<i>Klebsiella pneumoniae</i>

Nr. = Nummer; + = positive Reaktion; - = negative Reaktion; n.d. = nicht durchgeführt

Des Weiteren wurde bei einigen zweifelhaft identifizierten *Enterobacteriaceae* die Beweglichkeit überprüft. Dazu wurde SIM-Agar mit einer frischen Subkultur mit Stichöse beimpft und für 24 h bei 37 °C inkubiert. Als positiv (beweglich) wurden Keime bewertet, die schwärmendes Wachstum um den beimpften Bereich aufwiesen.

Zur Unterscheidung anderer Bakterienspezies war es notwendig, deren Fähigkeit zur Verstoffwechslung von Adonitol zu überprüfen. Die Durchführung erfolgte mit Adonitol-Diatabs nach Herstellerangaben (siehe Urease-Diatabs). Als Positivkontrolle diente *Klebsiella pneumoniae*, als Negativkontrolle *Escherichia coli*.

Zur Unterscheidung anderer *Enterobacteriaceae* wurde die Methylrot-Voges-Proskauer-Bouillon (RM) herangezogen. Mit dieser kann die Fähigkeit von Bakterien nachgewiesen werden, Glucose unter starker Säurebildung zu verwerten, sodass der pH-Wert des Mediums unter pH 4,4 sinkt und dies durch den Indikator Methylrot angezeigt werden kann (oberhalb pH 5,1 gelb, unterhalb pH 4,4 rot). Als Positivkontrolle diente hierbei *Escherichia coli*, als Negativkontrolle *Enterobacter cloacae*.

Des Weiteren wurden durch das api 20E häufiger *Acinetobacter* spp. identifiziert. Diese Keimspezies gehört nicht zur Familie der *Enterobacteriaceae*. Als mögliche Subspezies kamen *Acinetobacter baumannii* und *Acinetobacter calcoaceticus* in Betracht. Zur Unterscheidung wurde deren Wachstumsfähigkeit bei 42 °C auf CASO-Agar getestet. *Acinetobacter baumannii* ist in der Lage bei 42 °C zu wachsen, *Acinetobacter calcoaceticus* hingegen nicht.

3.2.1.1.4 Untersuchungen zur Ermittlung der optimalen Bebrütungsdauer der Voranreicherung sowie zur Ermittlung der optimalen Art des Überimpfens aus der Voranreicherung

Die optimale Bebrütungsdauer der Voranreicherung im Hinblick auf die Detektion aller vorhandenen *Enterobacteriaceae* wurde in Versuchen im Vorfeld der eigentlichen Untersuchungen ermittelt. Darüber hinaus wurde ermittelt, welche Art des Überimpfens aus der Voranreicherung geeignet ist, um möglichst alle vorhandenen *Enterobacteriaceae* zu detektieren und um trotzdem gut isolierte Einzelkolonien darzustellen.

Dazu wurden 3 x 100 g Säuglingsnahrungspulver in BPW eingewogen und bei 37 °C im Wasserschüttelbad bebrütet. Von der 0. h bis zur 8. h erfolgten stündlich Entnahmen von Probenmaterial zur weiteren Untersuchung, eine letzte nach 20 h. Aus der Voranreicherung wurde so innerhalb dieser zeitlichen Abstände VRBG-Agar mit einem fraktionierten Ösenausstrich beimpft sowie jeweils 1 ml mit einer sterilen Pipette entnommen und in 9 ml NaCl-Lösung überführt. Aus dieser wurde eine 10er-logarithmische Verdünnungsreihe angelegt (bis 10^{-6}) und je Verdünnungsstufe 100 µl mittels Tropfplatten-Verfahren (angelehnt an §35 LMBG, 06.00 19) auf ein Viertel einer VRBG-Agar ausgestrichen. Dies erfolgte im Doppelsatz. *Enterobacteriaceae*-verdächtige Kolonien von VRBG-Agar wurden auf CASO-Agar überimpft und mittels Enterotube II identifiziert. Im Rahmen dieser Versuche wurden insgesamt 19 Proben untersucht, von denen sich 10 als kontaminiert mit *Enterobacteriaceae* erwiesen und somit zur Auswertung herangezogen werden konnten.

Nach 20 h Bebrütungsdauer wurden häufiger *Enterobacteriaceae* erfasst als bei kürzeren Bebrütungszeiten. Eine Auswertung bezüglich des Überwucherns von Keimspezies in der Voranreicherung war nicht möglich, da zu wenige der Proben mit unterschiedlichen Keimspezies kontaminiert waren. Somit wurde in den Untersuchungsgang die Bebrütungszeit von 20 h für die Voranreicherung integriert.

Bei Verwendung des Tropfplatten-Verfahrens nach Anlegen einer Verdünnungsreihe wurden häufiger *Enterobacteriaceae* erfasst als bei Verwendung des Ösenausstrichs. Zur Darstellung von gut isolierten Einzelkolonien eigneten sich Ösenausstrich und Tropfplatten-Verfahren nach Anlegen einer Verdünnungsreihe gleichermaßen. Daher wurde die Beimpfung von VRBG-Agar aus der Voranreicherung mittels Tropfplatten-Verfahren nach Anlegen einer Verdünnungsreihe in den Untersuchungsgang integriert.

3.2.1.1.5 Lagerung der aus Säuglingsfertignahrung isolierten *Enterobacteriaceae*

Anfänglich erfolgte die Lagerung der aus Säuglingsfertignahrung isolierten *Enterobacteriaceae* auf Schrägagar (Plate-Count-Agar). Im weiteren Verlauf der Untersuchungen wurden die als *E. sakazakii* identifizierten Isolate im Stammhaltungssystem Cryobank™ für Mikroorganismen aufbewahrt und alle weiteren *Enterobacteriaceae* in gefriergetrocknetem (lyophilisiertem) Zustand. So konnten

E. sakazakii-Isolate beispielsweise bis zur Durchführung der PCR gesammelt werden und andere *Enterobacteriaceae* standen für die Durchführung weiterer, biochemischer Reaktionen jederzeit zur Verfügung.

Die Verwendung des Stammhaltungssystems Cryobank™ zur Langzeitlagerung von Mikroorganismen erfolgte nach Herstellerangaben: Die Kryoröhrchen wurden mit Kolonien einer frischen Reinkultur beimpft und vorsichtig geschüttelt, um den Mikroorganismus im Kryomedium zu verteilen. Danach wurde das Kryoröhrchen einige Minuten stehengelassen, damit der Mikroorganismus an den Kügelchen im Kryoröhrchen haften konnte. Anschließend wurde das Kryomedium mit einer sterilen Pipette abgehoben und das Röhrchen bei -80 °C im Gefrierschrank aufbewahrt. Zur Reaktivierung eines Stammes wurde ein Kügelchen des Kryoröhrchens mit einer sterilen Stichöse entnommen und auf CASO-Agar ausgerollt.

Zur Herstellung der Lyophilisate wurde jeweils eine Kolonie einer frischen Reinkultur in 5 ml CASO-Bouillon überführt und für 24 h bei 37 °C bebrütet. 700 µl dieser inkubierten Bouillon wurden mit 700 µl Kälberserum in ein Glasfläschchen pipettiert und für 24 h bei -80 °C tiefgefroren. Die anschließende Sublimation von Wasser wurde in der Gefriertrocknungsanlage LYOVAC GT durchgeführt. Verschluss wurden die Glasfläschchen mit Gummistopfen und Metallring. Die Lagerung erfolgte trocken und dunkel bei Raumtemperatur. Zur Reaktivierung wurde dem Lyophilisat 1 ml CASO-Bouillon zugegeben und aus dieser Suspension ein Ösenausstrich auf CASO-Agar angelegt.

3.2.1.2 Qualitativer Nachweis von Salmonellen

3.2.1.2.1 Untersuchungs- und Identifizierungsverfahren

Der Nachweis von Salmonellen erfolgte gemäß der Internationalen Standardmethode ISO 6785:2001 für Salmonellen in Milch- und Milchprodukten. Dazu wurden aus den nicht-selektiven Voranreicherungen mit einer Einwaage von 100 g Nahrungspulver (siehe 3.2.1.1.1) je 0,1 ml Kulturmaterial in je 10 ml Magnesium-Malachitgrün-Medium nach Rappaport-Vassiliadis (RV-Bouillon) sowie je 10 ml in je 100 ml Selenit-Cystin-Medium (SC) überführt und bei 41,5 °C bzw. 37 °C bebrütet. Nach 24 h und nach 48 h wurde

jeweils Kulturmaterial auf Brillantgrün-Phenolrot-Laktose-Saccharose-Agar (BPLS-Agar) und Xylose-Lysin-Desoxycholat-Agar (XLD-Agar) mittels Öse ausgestrichen und bei 37 °C für 24 h und 48 h bebrütet. Die Verwendung von BPLS-Agar wird durch die ISO-Norm vorgeschrieben, als zweites, frei wählbares Medium wurde XLD-Agar verwendet. Nach jeder Inkubation wurden die Platten auf das Vorhandensein verdächtiger Salmonellen-Kolonien untersucht.

Stichprobenartig wurden Kolonien von BPLS- und XLD-Agar auf CASO-Agar subkultiviert, mittels Enterotube II identifiziert und mit den Ergebnissen des qualitativen *Enterobacteriaceae*-Nachweises verglichen. Die Untersuchungsschritte sind in Abbildung 3 dargestellt.

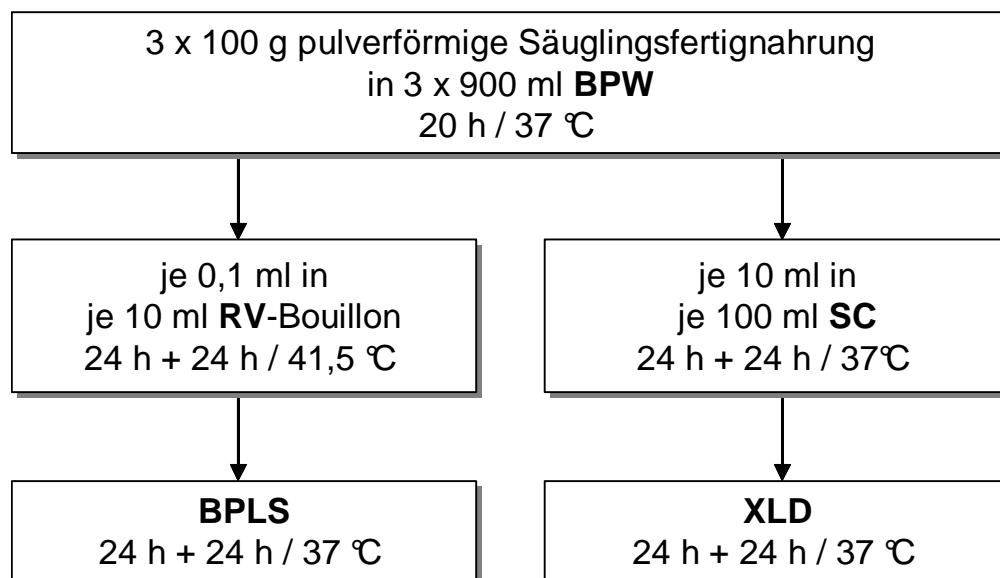


Abbildung 3: Schematische Darstellung des Untersuchungsgangs zum Nachweis von Salmonellen in Säuglingsfertignahrungsmitteln

BPW	=	Buffered Peptone Water
RV-Bouillon	=	Magnesium-Malachitgrün-Medium nach Rappaport-Vassiliadis
SC	=	Selenit-Cystin-Medium
BPLS	=	Brillantgrün-Phenolrot-Laktose-Saccharose-Agar
XLD	=	Xylose-Lysin-Desoxycholat-Agar

3.2.1.2.2 Überprüfung des qualitativen Nachweises von Salmonellen

Zur Überprüfung des Salmonellennachweises wurden bei jedem Probenansatz die in Tabelle 13 genannten Referenzstämme *Salmonella* Typhimurium und *Escherichia coli*

mitgeführt. RV-Bouillon und SC wurden mit diesen Referenzstämmen beimpft und parallel zu den Probenansätzen inkubiert. Aus RV-Bouillon und SC wurde *Salmonella* Typhimurium als Positivkontrolle auf BPLS- und XLD-Agar überimpft, als Negativkontrolle *Escherichia coli*. BPLS- und XLD-Agar wurden ebenfalls parallel zu den Probenansätzen inkubiert und anschließend auf typisches Koloniewachstum hin beurteilt.

3.2.1.2.3 Ermittlung der Nachweisgrenze des Salmonellen-Nachweises

Zur Ermittlung der Nachweisgrenze des Salmonellen-Nachweisverfahrens wurde zunächst die Anwachsrate von *Salmonella* Typhimurium (Referenzstamm Tabelle 13) ermittelt. Dazu wurde eine Kolonie des Referenzstammes in CASO-Bouillon überführt und bei 37 °C bebrütet. Nach 24 h wurden daraus dezimale Verdünnungsreihen (10^0 bis 10^{-9}) in Ringerlösung hergestellt und je Verdünnungsstufe 0,1 ml im Doppelansatz auf Plate-Count-Agar ausgespatelt. Nach Bebrütung für 24 h bei 37 °C wurde die Anzahl der Kolonie bildenden Einheiten (KbE) pro Platte bestimmt. Die Anwachsrate betrug 62 KbE in der Verdünnungsstufe 10^{-8} und 3 KbE in der Verdünnungsstufe 10^{-9} .

Anschließend wurde dieser Ansatz wiederholt und je 25 g Säuglingsnahrungspulver mit je 1 ml der Verdünnungsstufen 10^{-8} bis 10^{-9} beimpft (entspricht einer Beimpfung mit bis zu 10^2 bzw. mit bis zu 10^1 KbE). Es folgten die Inkubation für 24 h bei 37 °C und ein Ösenausstrich auf BPLS- und XLD-Agar. Parallel hierzu wurde wieder die Anwachsrate der verwendeten Verdünnungsstufen bestimmt; sie betrug 54 KbE in der Verdünnungsstufe 10^{-8} und 2 KbE in der Verdünnungsstufe 10^{-9} . Die so ermittelte Nachweisgrenze lag demnach bei 2 KbE/25 g.

3.2.1.3 Quantitativer Nachweis von *Enterobacteriaceae*

Der quantitative Nachweis der *Enterobacteriaceae* wurde anhand des MPN-Verfahrens (Most Probable Number) durchgeführt. Gewählt wurde das in der FDA-Methode für den Nachweis von *E. sakazakii* (FDA, 2002) beschriebene MPN-Verfahren. Dazu wurden das 3-Röhrchen MPN-Verfahren nutzend 3 x 100 g, 3 x 10 g und 3 x 1 g Nahrungspulver in BPW und anschließend in EEB inkubiert und auf VRBG-Agar überimpft (wie unter 3.2.1.1.1 beschrieben). Der quantitative Nachweis der *Enterobacteriaceae* erfolgte somit

aus denselben Probenansätzen, die auch für den qualitativen Nachweis verwendet wurden. Aus der Anzahl der *Enterobacteriaceae*-positiven VRBG-Platten wurde die Stichzahl zur Berechnung der "Most Probable Number" ermittelt und anhand der MPN-Tabelle die Anzahl der *Enterobacteriaceae* pro 100 g Nahrungspulver bestimmt.

3.2.2 Molekularbiologische Bestätigung der *E. sakazakii*-Isolate

Die im api 20E als *E. sakazakii* identifizierten Isolate wurden molekularbiologisch mit einer an der Professur erarbeiteten PCR-Methode auf Basis des 16S rRNA-Gens (HASSAN et al., 2007) untersucht. Des Weiteren wurden mit dieser PCR *Enterobacteriaceae* aus Säuglingsfertignahrung untersucht, deren Koloniemorphologie auf DFI-, CASO- und Tween-Agar *E. sakazakii*-verdächtig war, die durch das api 20E jedoch nicht als *E. sakazakii* identifiziert wurden. Die Durchführung der molekularbiologischen Bestätigung verlief nach folgendem Schema:

3.2.2.1 Extraktion der bakteriellen DNA

Die DNA-Extraktion erfolgte unter Verwendung des kommerziellen DNeasy Tissue-Kits entsprechend den Herstellerangaben: Zunächst wurden frische Kulturen der zu testenden Keime auf CASO-Agar angelegt (Inkubation für 24 h bei 37 °C). Je eine Kolonie wurde zur Zellwandlyse mit je 120 µl TE-Puffer und Lysozym (20 mg pro ml TE-Puffer) versetzt und 1 h bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Nach Zugabe von 15 µl Proteinase K (pro Probe) und 200 µl Lysis-Puffer zur Deproteinisierung erfolgte eine weitere Inkubation im Wasserbad bei 56 °C für 2 h. Zur Inaktivierung der Proteinase K wurde die Suspension für 10 min in kochendes Wasser gestellt. Anschließend wurden die Probenlösungen in die Silica-Säulen des Testkits gefüllt und 1 min bei 10000 Umdrehungen/min zentrifugiert. Während dieses Schrittes erfolgte die selektive Bindung der DNA an die DNeasy-Membran der Silica-Säulen. Zur Entfernung verbliebener Kontaminanten und Enzyminhibitoren folgten zwei Reinigungsschritte: zunächst mit Zugabe von 500 µl Waschpuffer AW 1 und Zentrifugation für 2 min bei 10000 Umdrehungen/min, anschließend mit Zugabe von 500 µl Waschpuffer AW 2 und erneuter Zentrifugation für 2 min bei 13000 Umdrehungen/min (um den Waschpuffer vollständig zu entfernen). Danach erfolgte das Ablösen der DNA von der DNeasy-Membran mit Elutionspuffer (AE). Dazu wurde nach 5 minütigem Stehenlassen der Säulenmatrix mit dem Puffer bei

Raumtemperatur 5 min bei 13000 Umdrehungen/min zentrifugiert. Die DNA-haltigen Eluate wurden direkt in der PCR eingesetzt.

3.2.2.2 Durchführung der Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Zunächst wurde das Reaktionsgemisch (Mastermix) mit der in Tabelle 15 aufgeführten Zusammensetzung hergestellt.

Tabelle 15: Zusammensetzung des Reaktionsgemisches zur Durchführung der PCR

Substanz	Volumen je Testansatz
Aqua bidest.	19,9 μ l
Inkubationspuffer (10 fach)	3,0 μ l
MgCl ₂ (25 mmol/l)	1,8 μ l
dNTP (10 mmol/l) (je Nukleotid)	0,6 μ l
Primer saka 1 a (10 μ mol/l)	1,0 μ l
Primer saka 2 b (10 μ mol/l)	1,0 μ l
Taq-DNA-Polymerase (5 U/ μ l)	0,2 μ l
Gesamt-Volumen pro Probe	27,5 μ l

MgCl₂ = Magnesiumchlorid; dNTP = Desoxynukleotidtriphosphate; Taq = *Thermus aquaticus*; DNA = Desoxyribonukleinsäure

Von diesem Reaktionsgemisch wurden je 27,5 μ l in ein Reaktionsgefäß pipettiert und mit je 2,5 μ l der extrahierten DNA vermischt. Anschließend erfolgte die Amplifizierung in einem PCR-Cycler (Thermocycler iCycler) unter folgenden Reaktionsbedingungen:

30 Zyklen (95 °C, 60 s; 50 °C, 60 s; 72 °C, 90 s).

Die DNA-Amplifikate wurden über Nacht bei 4 °C gelagert und am folgenden Tag gelelektrophoretisch aufgetrennt.

3.2.2.3 Gelelektrophorese und optische Darstellung der Fragmente

Zunächst wurde ein 2 %iges Agarosegel hergestellt. Dazu wurden 3 g Agarosepulver mit 150 ml TAE-Puffer (1 fach) in der Mikrowelle geschmolzen und nach Abkühlung auf ca. 50 °C in eine Gelwanne mit justierten Kämmen gegossen. Das erstarrte Gel wurde in die Gelelektrophoresekammer mit entsprechendem Laufpuffer (1 facher TAE-Puffer) eingelegt. Nach Entfernen der Kämmen wurden 12 µl der jeweiligen DNA-Amplifikate mit je 3 µl Farbstofflösung (Orange Loading Dye Solution) vermischt und in das Agarosegel pipettiert. Des Weiteren wurde ein Molekulargewichtsstandardmarker von 100 Bp zur Größenabschätzung des Amplifikats sowie eine Positiv- (Reaktionsgemisch mit DNA von *E. sakazakii* ATCC 29544) und Negativkontrolle (Reaktionsgemisch ohne DNA) aufpipettiert. Die gelelektrophoretische Auftrennung der Amplifikate erfolgte bei 120 mA. Anschließend wurde das Gel 5 min in Ethidiumbromid-Lösung (5 µg/ml) gefärbt, durch Schwenken in Aqua dest. bei Raumtemperatur 15 min entfärbt und die Banden, die nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennten DNA-Fragmente unter UV-Licht (Wellenlänge $\lambda = 302$ nm) im Auswertungssystem Geldoc 2000 optisch dargestellt und ausgewertet.

4 ERGEBNISSE

4.1 Ergebnisse des mikrobiologischen Nachweises von *Enterobacteriaceae* in Säuglingsfertiernahrung

4.1.1 Ergebnisse des qualitativen Nachweises

4.1.1.1 Vorkommen von *Enterobacteriaceae*

In 45,4 % der 152 untersuchten Säuglingsfertiernahrungsmittel wurden *Enterobacteriaceae* nachgewiesen. Dazu wurde die in Kapitel 3.2.1 beschriebene Methode verwendet, d.h. es wurden insgesamt 333 g Nahrungspulver pro Probe untersucht und bewertet. Die Nachweisgrenze des Verfahrens lag bei 0,30 KbE/100 g.

Die Vorkommenshäufigkeit von *Enterobacteriaceae* in den unterschiedlichen Produktgruppen wird in Tabelle 16 (mit Angabe der untersuchten Probenanzahl n) und Abbildung 4 (Produktgruppen sortiert nach abnehmender Vorkommenshäufigkeit von *Enterobacteriaceae*) dargestellt. Aus Tabelle 16 und Abbildung 4 wird ersichtlich, dass vor allem die Produktgruppe der Milchbreie betroffen war. 69 % der untersuchten Milchbreie waren mit *Enterobacteriaceae* kontaminiert. Es folgten Getreidebreie mit 55 %, hypoallergene Folgenahrung mit 50 % und diätetische Nahrung mit 43 %. Von den untersuchten Anfangs- und Folgemilchen waren 30 bzw. 33 % kontaminiert. Die seltenste Kontamination mit *Enterobacteriaceae* wies die Produktgruppe der hypoallergenen Anfangsnahrung mit 20 % auf (abgesehen von den unter „Sonstige“ zusammengefassten Nahrungen).

Tabelle 16: Vorkommen von *Enterobacteriaceae* in den untersuchten Säuglingsfertiernahrungsmitteln (Probenmenge je 333 g) - aufgeschlüsselt in die unterschiedlichen Produktgruppen

Produktgruppe	untersuchte Proben n	<i>Enterobacteriaceae</i> -positive Proben	
		Anzahl n	in %
Anfangsmilch *	27	8	30
Folgemilch	30	10	33
Hypoallergene Anfangsnahrung	10	2	20
Hypoallergene Folgenahrung	8	4	50
Milchbrei	52	36	69
Getreidebrei	11	6	55
Diätetische Nahrung **	7	3	43
Sonstige ***	7	0	0
Σ	152	69	45

* die Gruppe der Anfangsmilch beinhaltet 22 Anfangsmilchen und 5 Dauermilchen

** Diätetische Nahrung = diätetische Lebensmittel für besondere medizinische Zwecke, die für Säuglinge „von Geburt an“ bestimmt sind

*** unter Sonstige wurden 2 Reisschleime, 1 Reisbrei, 1 Kartoffelbrei, 1 Apfelbrei, 1 Baby Müsli und eine milchfreie Anfangsnahrung zusammengefasst

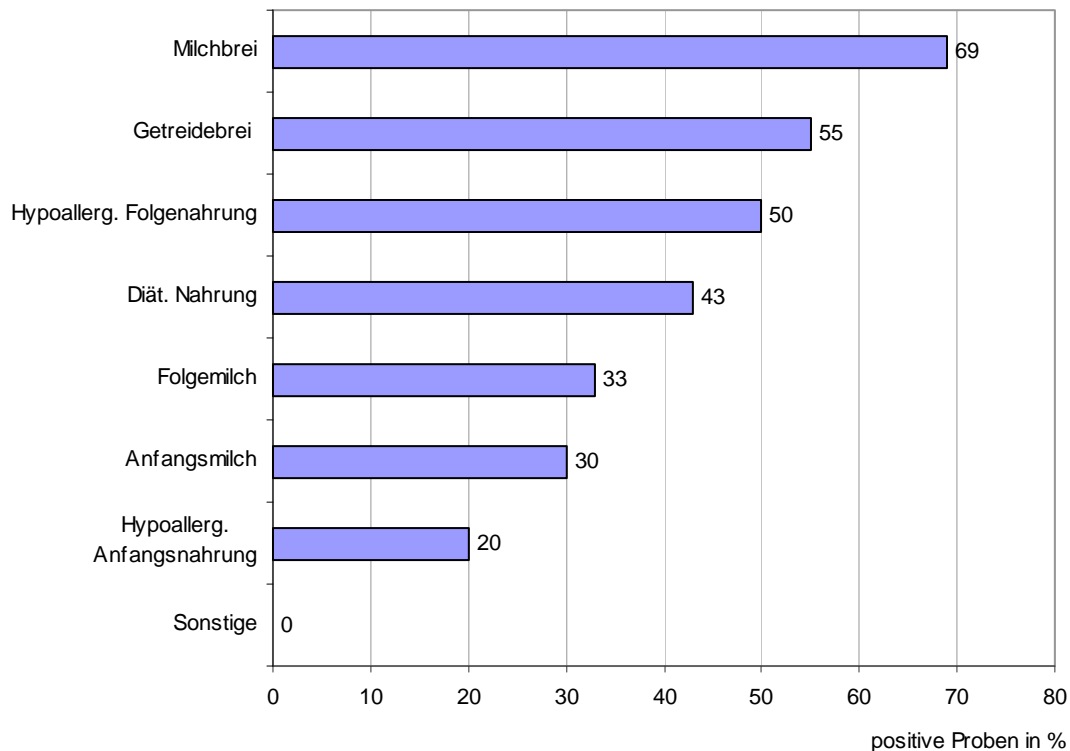


Abbildung 4: Relative Häufigkeit (in %) von *Enterobacteriaceae* in den unterschiedlichen Produktgruppen der untersuchten Säuglingsfertignahrungsmittel (n = 152, Probenmenge je 333 g)

Hypoallerg. = Hypoallergene; Diät. = Diätetische

Wie in Kapitel 3.1.1 beschrieben, wurden Produkte zur Nachuntersuchung erneut eingekauft und untersucht, die eine erkennbar marktdominierende Stellung besaßen. Grundsätzlich wurden auch Produkte, in denen entweder *E. sakazakii* oder eine erhöhte Kontamination mit *Enterobacteriaceae* nachgewiesen worden war, erneut untersucht. Somit ergab sich für die Gesamtheit der Proben (inklusive der nachgekauften Proben, n = 152) eine Kontaminationshäufigkeit von 45,4 %. Die „erstuntersuchten“ Proben (exklusive der nachgekauften Proben, n = 118) wiesen eine Kontaminationshäufigkeit von 43,2 % auf. Es existierten also keine größeren prozentualen Unterschiede in der Vorkommenshäufigkeit von *Enterobacteriaceae* zwischen den insgesamt untersuchten und den erstuntersuchten Proben. Daher wird im Folgenden von der Gesamtheit der untersuchten Proben (n = 152) ausgegangen. Eine vergleichende Darstellung der Ergebnisse der insgesamt untersuchten und der erstuntersuchten Proben erfolgt in Tabelle 17. Eine prozentuale Abweichung von $\geq 5\%$ der Vorkommenshäufigkeit von *Enterobacteriaceae* zwischen insgesamt untersuchten und erstuntersuchten Proben war bei

den Produktgruppen Anfangsmilch, hypoallergene Anfangsnahrung und Milchbrei (Getreide und Keks) zu verzeichnen. Die Vorkommenshäufigkeit von *Enterobacteriaceae* in den insgesamt untersuchten Proben nahm im Vergleich zu der Vorkommenshäufigkeit von *Enterobacteriaceae* in den erstuntersuchten Proben bei den Anfangsmilchen und hypoallergenen Anfangsnahrungen ab, bei der Produktgruppe Milchbrei Getreide und Keks zu.

Des Weiteren wurde in Tabelle 17 eine Aufgliederung der Produktgruppe der Milchbreie je nach Frucht-, Getreide-, Keks- oder sonstigen Zusätzen vorgenommen. Milchbreie mit Frucht- oder Getreidezusätzen waren tendenziell häufiger mit *Enterobacteriaceae* kontaminiert als Milchbreie mit Keks- oder anderen Zusätzen.

Tabelle 17: Vergleichende Darstellung des Vorkommens von *Enterobacteriaceae* der insgesamt untersuchten und der erstuntersuchten Proben (in den unterschiedlichen Produktgruppen)

Produktgruppe	untersuchte Proben n		<i>Enterobacteriaceae</i> -positive Proben			
			Anzahl n		in %	
	1. US	insges.	1. US	insges.	1. US	insges.
Anfangsmilch	20	27	7	8	35,0	29,6
Folgemilch	25	30	8	10	32,0	33,3
Hypoallergene Anfangsnahrung	8	10	2	2	25,0	20,0
Hypoallergene Folgenahrung	6	8	3	4	50,0	50,0
Milchbrei Frucht	18	25	13	17	72,2	68,0
Milchbrei Getreide	12	18	8	14	66,7	77,8
Milchbrei Kekse	5	7	2	4	40,0	57,1
Milchbrei sonstige	2	2	1	1	50,0	50,0
Getreidebrei	10	11	5	6	50,0	54,5
Diät. Nahrung	5	7	2	3	40,0	42,9
Sonstige	7	7	0	0	0	0
Σ	118	152	51	69	43,2	45,4

1. US = erstuntersuchte Proben, d.h. Probenanzahl exklusive der nachgekauften Proben (n = 118)

insges. = insgesamt untersuchte Proben, d.h. Probenanzahl inklusive der nachgekauften Proben (n = 152)

Das Vorkommen von *Enterobacteriaceae* in den untersuchten Säuglingsfertignahrungsmitteln - aufgeschlüsselt je nach empfohlenem Verwendungsalter (entsprechend Herstellerangaben) - wird in Tabelle 18 dargestellt. Nahrungen, die von Geburt an verwendet werden können, waren zu 29 % mit *Enterobacteriaceae* kontaminiert. Nahrungen für Säuglinge, die älter als vier Monate sind, enthielten in ca. 50 % der Proben *Enterobacteriaceae* (in 333 g Probenmenge).

Tabelle 18: Vorkommen von *Enterobacteriaceae* in den untersuchten Säuglingsfertignahrungsmitteln (Probenmenge je 333 g) - aufgeschlüsselt nach dem vom Hersteller empfohlenen Verwendungsalter

empfohlenes Verwendungsalter	untersuchte Proben n	<i>Enterobacteriaceae</i> -positive Proben	
		Anzahl n	in %
von Geburt an	45	13	29
nach dem 4. Monat	72	39	54
> 6 Monate	35	17	49
Σ	152	69	45

Das Vorkommen von *Enterobacteriaceae* in den untersuchten Säuglingsfertignahrungsmitteln - aufgeschlüsselt in Anfangs- und Folgenahrung, Beikost und diätetische Lebensmittel - wird in Tabelle 19 dargestellt. *Enterobacteriaceae* konnten mit 61 % am häufigsten in Beikost nachgewiesen werden; es folgten „diätetische Lebensmittel für besondere medizinische Zwecke“ mit einer Kontaminationshäufigkeit von 43 %, Folgenahrungen mit 37 % und Anfangsnahrungen mit 26 %.

Tabelle 19: Vorkommen von *Enterobacteriaceae* in den untersuchten Säuglingsfertignahrungsmitteln (Probenmenge je 333 g) - aufgeschlüsselt in Anfangs- und Folgenahrung, Beikost und diätetische Lebensmittel

	untersuchte Proben n	<i>Enterobacteriaceae</i> -positive Proben	
		Anzahl n	in %
Anfangsnahrung	38	10	26
Folgenahrung	38	14	37
Beikost	69	42	61
Diätetische Lebensmittel	7	3	43
Σ	152	69	45

Beim Vergleich von Säuglingsfertignahrungsmitteln aus ökologischer und konventioneller Produktionsweise wurde eine häufigere Belastung mit *Enterobacteriaceae* bei den ökologisch hergestellten Produkten festgestellt. 57,1 % der ökologisch hergestellten Säuglingsnahrungen erwiesen sich als kontaminiert mit *Enterobacteriaceae* im Gegensatz zu 39,8 % der konventionell hergestellten (Tabelle 20).

Tabelle 20: Vergleich des Vorkommens von *Enterobacteriaceae* in Säuglingsfertignahrungsmitteln (Probenmenge je 333 g) aus konventioneller und ökologischer Produktionsweise

Herstellung	untersuchte Proben n	<i>Enterobacteriaceae</i> -positive Proben	
		Anzahl n	in %
konventionell	103	41	39,8
ökologisch	49	28	57,1
Σ	152	69	45,4

Ein Vergleich der Vorkommenshäufigkeit von *Enterobacteriaceae* in Produkten der unterschiedlichen Hersteller (bzw. Vertriebsfirmen) kann nicht sinnvoll vorgenommen werden aufgrund von Unterschieden in den untersuchten Probenanzahlen der jeweiligen Hersteller. Von Herstellern, bei denen mehr als 50 % der untersuchten Proben mit

Enterobacteriaceae kontaminiert waren (fünf der 16 Hersteller), wurde jeweils nur eine relativ geringe Probenanzahl untersucht, sodass die hohe Kontaminationshäufigkeit auch ein zufälliges Ergebnis sein kann.

Hinsichtlich der in Verordnung (EG) 2073/2005 vorgeschriebenen Probeneinwaage von 1 x 100 g (10 x 10 g) zur Untersuchung auf *Enterobacteriaceae* als Prozesshygienekriterium, wurden folgende Ergebnisse ermittelt: 83 % (57 von 69) der *Enterobacteriaceae*-positiven Proben waren jeweils nur in 1 x 100 g oder 2 x 100 g Nahrungspulver positiv (Einwaage je 3 x 100 g, 3 x 10 g, 3 x 1 g). Somit wären 83 % der untersuchten Proben bei Untersuchungen nach Verordnung (EG) 2073/2005, bei der eine Probeneinwaage von nur 1 x 100 g vorgeschrieben ist, wahrscheinlich nicht als *Enterobacteriaceae*-positiv detektiert worden und somit nicht weiter auf *E. sakazakii* und Salmonellen untersucht worden.

Eine detaillierte Darstellung der mikrobiologischen Untersuchungsergebnisse (qualitativ und quantitativ) wird im Anhang wiedergegeben.

4.1.1.2 Nachgewiesene *Enterobacteriaceae*-Spezies

Folgende Gattungen von *Enterobacteriaceae* wurden aus den untersuchten Säuglingsfertignahrungsmitteln isoliert (mit abnehmender Häufigkeit): *Enterobacter* spp., *Escherichia* spp., *Klebsiella* spp., *Pantoea* spp., *Serratia* spp., *Leclercia* spp. und *Citrobacter* spp. Salmonellen wurden in keiner der Proben nachgewiesen.

Eine Übersicht über die in den untersuchten Säuglingsfertignahrungsmitteln nachgewiesenen Gattungen von *Enterobacteriaceae* wird in Abbildung 5 dargestellt.

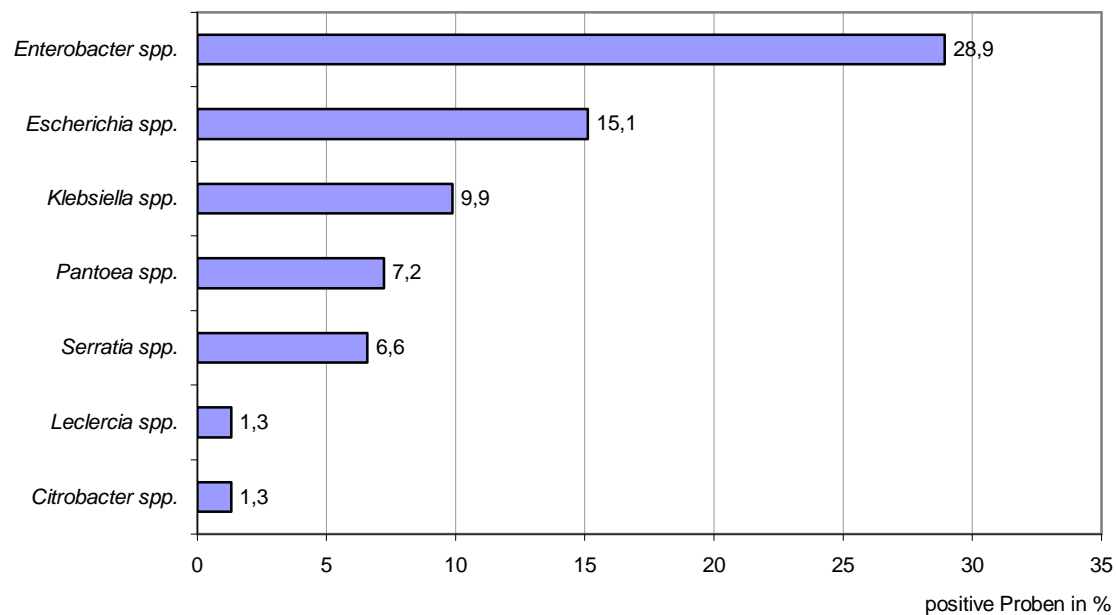


Abbildung 5: Relative Häufigkeit (in %) der nachgewiesenen *Enterobacteriaceae*-Gattungen in den untersuchten Säuglingsfertiernahrungsmitteln (n = 152, Probenmenge je 333 g)

Innerhalb der Gattung *Enterobacter* wurde *Enterobacter cloacae*, *E. sakazakii* und *Enterobacter amnigenus* identifiziert; innerhalb der Gattung *Escherichia*: *Escherichia vulneris*, *Escherichia hermanii* und *Escherichia coli*, innerhalb der Gattung *Klebsiella*: *Klebsiella pneumoniae* und *Klebsiella oxytoca*, innerhalb der Gattung *Pantoea*: *Pantoea* 2, 3 und 4 (dies entspricht der Benennung durch das api 20E-System), innerhalb der Gattung *Serratia*: *Serratia ficaria* und *Serratia rubidaea*, innerhalb der Gattung *Leclercia*: *Leclercia adecarboxylata*, innerhalb der Gattung *Citrobacter*: *Citrobacter youngae* und eine weitere auf Subspezies-Ebene nicht weiter differenzierte *Citrobacter* spp.

Die einzelnen nachgewiesenen *Enterobacteriaceae*-Spezies werden - sortiert nach absteigender Vorkommenshäufigkeit - in Abbildung 6 dargestellt. *Enterobacter cloacae* wurde in 14,5 % (22 von 152) der untersuchten Proben nachgewiesen und stellt somit die am häufigsten nachgewiesene Keimspezies dar. Es folgten mit abnehmender Häufigkeit *E. sakazakii* (13,8 %), *Klebsiella pneumoniae* (9,2 %), *Escherichia vulneris* (8,6 %), *Serratia ficaria* (5,9 %), *Pantoea* spp. 3 (3,9 %), *Escherichia hermanii* (3,9 %), *Pantoea* spp. 4 (2,6 %), *Escherichia coli* (2,6 %), *Pantoea* spp. 2 (2,0 %), *Leclercia adecarboxylata* (1,3 %), *Citrobacter* spp. (0,7 %), *Citrobacter youngae* (0,7 %),

Serratia rubidaea (0,7 %), *Klebsiella oxytoca* (0,7 %) und *Enterobacter amnigenus* (0,7 %).

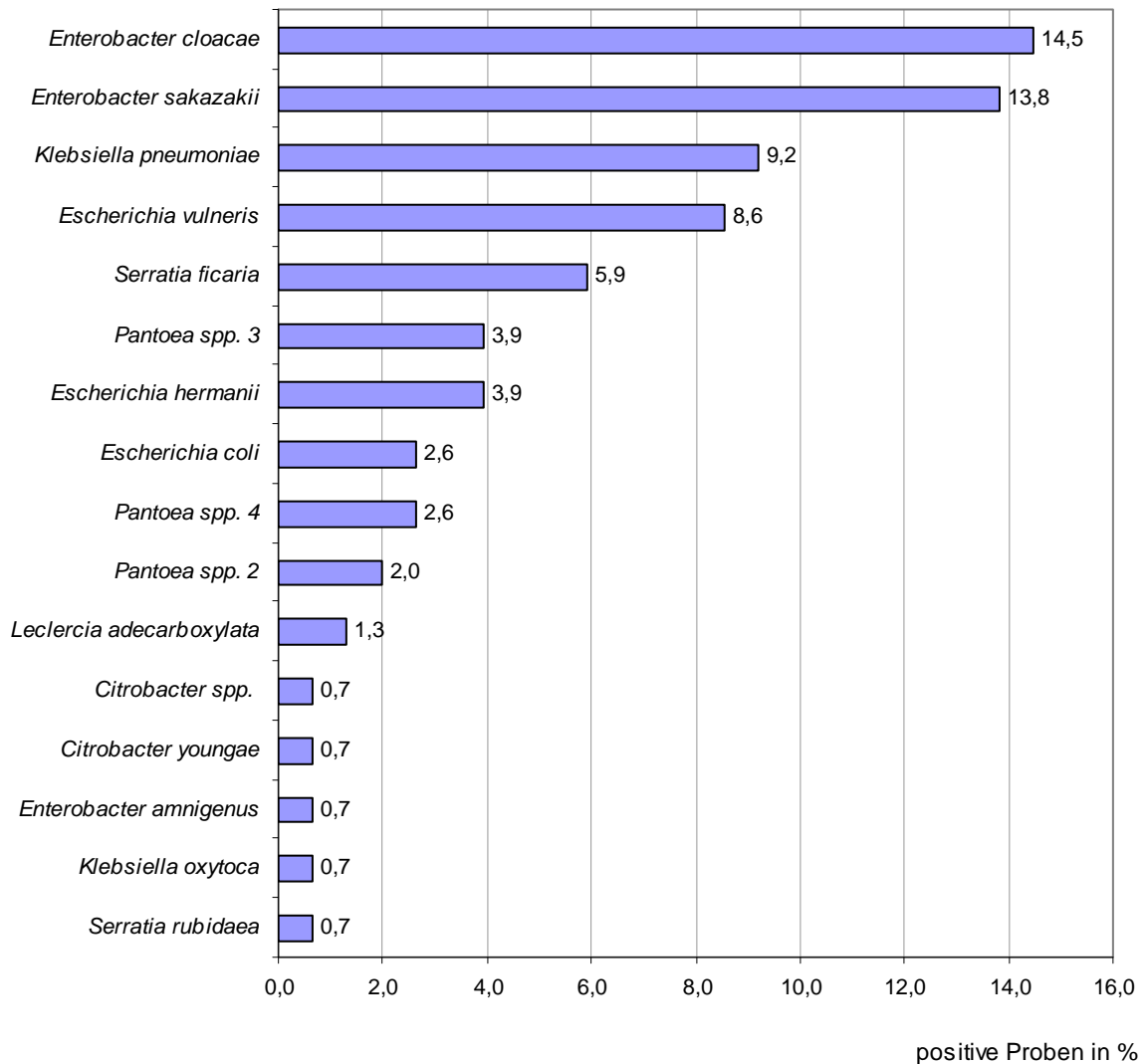


Abbildung 6: Relative Häufigkeit (in %) der nachgewiesenen *Enterobacteriaceae*-Spezies in den untersuchten Säuglingsfertignahrungsmitteln (n = 152, Probenmenge je 333 g)

Aus Gründen einer übersichtlicheren Darstellungsweise werden im Folgenden die einzelnen Spezies der Gattungen *Pantoea*, *Serratia*, *Leclercia* und *Citrobacter* zusammengefasst und unter der Bezeichnung *Pantoea* spp., *Serratia* spp., *Leclercia* spp. und *Citrobacter* spp. genannt. Die einzelnen Spezies der anderen nachgewiesenen Gattungen werden sortiert nach absteigender Vorkommenshäufigkeit auf Gattungsebene dargestellt.

Hinsichtlich der Risikokategorien (bezüglich der Infektionsgefahr durch Mikroorganismen in Säuglingsfertignahrung; FAO/WHO, 2004 und 2006) wurden folgende Ergebnisse ermittelt: Aus Risikokategorie A wurde in den untersuchten Säuglingsfertignahrungsmitteln *E. sakazakii* nachgewiesen. Aus Risikokategorie B wurden *Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli*, *Escherichia vulneris*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Pantoea* spp. und *Serratia* spp. nachgewiesen.

Die Vorkommenshäufigkeit der nachgewiesenen Keimspezies - differenziert nach unterschiedlichen Produktgruppen von Säuglingsfertignahrungsmitteln - wird in Tabelle 21 dargestellt. Unter dem Begriff Anfangsmilch wurde in Tabelle 21 Anfangsmilch und hypoallergene Anfangsnahrung zusammengefasst. Ebenso wurde in den Begriff Folgemilch zusätzlich die hypoallergene Folgenahrung eingeschlossen. In den Produktgruppen Anfangsmilch und Getreidebrei konnten keine dominierend vorkommenden Keimspezies festgestellt werden. In der Produktgruppe Folgemilch war vorwiegend *Enterobacter cloacae* (10 x *Enterobacter cloacae* in 38 untersuchten Folgemilchen = 26 %) vorhanden. Die Produktgruppe der Milchbreie war am häufigsten mit *E. sakazakii* kontaminiert, diätetische Nahrungen mit *Enterobacter cloacae* und *Klebsiella pneumoniae*.

Tabelle 21: Relative Häufigkeit (in %) der nachgewiesenen *Enterobacteriaceae*-Spezies in den untersuchten Säuglingsfertignahrungsmitteln (Probenmenge je 333 g) - aufgeschlüsselt in die unterschiedlichen Produktgruppen (Spezies sortiert nach absteigender Vorkommenshäufigkeit auf Gattungsebene)

Spezies	Anteil (%) positiver Proben in				
	Anfangs- milch (n = 37)	Folge- milch (n = 38)	Milchbrei (n = 52)	Getreidebrei (n = 11)	Diätetische Nahrung (n = 7)
<i>Enterobacter cloacae</i>	8,1	26,3	9,6	18,2	28,6
<i>Enterobacter sakazakii</i>	5,4	5,3	28,8	18,2	0
<i>Enterobacter amnigenus</i>	0	0	0	9,1	0
<i>Escherichia vulneris</i>	2,7	2,6	21,2	0	0
<i>Escherichia hermanii</i>	0	0	7,7	18,2	0
<i>Escherichia coli</i>	2,7	0	3,8	9,1	0
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	5,4	10,5	7,7	18,2	28,6
<i>Klebsiella oxytoca</i>	0	0	1,9	0	0
<i>Pantoea</i> spp.	5,4	7,9	9,6	9,1	0
<i>Serratia</i> spp.	5,4	5,3	11,5	0	0
<i>Leclercia</i> spp.	0	0	0	18,2	0
<i>Citrobacter</i> spp.	0	0	1,9	9,1	0

Eine Übersicht über die nachgewiesenen Keimspezies in Säuglingsfertignahrungsmitteln - aufgeschlüsselt je nach Verwendungsalter - wird in Tabelle 22 dargestellt. Nahrungen, die von Geburt an verwendet werden dürfen, erwiesen sich häufig kontaminiert mit *Enterobacter cloacae* und *Klebsiella pneumoniae*. Nahrungen, die nach dem 4. Monat verwendet werden dürfen, enthielten häufig *E. sakazakii*, *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella pneumoniae* und *Escherichia vulneris*. Nahrungen, die für Säuglinge bestimmt sind, die älter als 6 Monate sind, waren häufig mit *E. sakazakii*, *Enterobacter cloacae* und *Escherichia vulneris* kontaminiert.

Tabelle 22: Relative Häufigkeit (in %) der nachgewiesenen *Enterobacteriaceae*-Spezies in den untersuchten Säuglingsfertiernahrungsmitteln (Probenmenge je 333 g) - aufgeschlüsselt nach vom Hersteller empfohlenen Verwendungsalter (Spezies sortiert nach absteigender Vorkommenshäufigkeit auf Gattungsebene)

	<i>Enterob. cloacae</i>	<i>Enterob. sakazakii</i>	<i>Enterob. amnigenus</i>	<i>Esch. vulneris</i>	<i>Esch. hermannii</i>	<i>Esch. coli</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Klebsiella oxytoca</i>	<i>Pantoea</i> spp.	<i>Serratia</i> spp.	<i>Leclercia</i> spp.	<i>Citrobacter</i> spp.
von Geburt an (n = 45)	11,1	4,4	0,0	2,2	0,0	2,2	8,9	0,0	4,4	4,4	0,0	0,0
nach 4. Monat (n = 72)	16,7	18,1	1,4	11,1	6,9	4,2	11,1	1,4	8,3	9,7	1,4	2,8
> 6 Monate (n = 35)	14,3	17,1	0,0	11,4	2,9	0,0	5,7	0,0	8,6	2,9	2,9	0,0
insgesamt (n=152)	14,5	13,8	0,7	8,6	4,0	2,6	9,2	0,7	7,2	6,6	1,3	1,3

Enterob. = *Enterobacter*; *Esch.* = *Escherichia*

Eine Übersicht über die nachgewiesenen Keimspezies in den untersuchten Säuglingsfertiernahrungsmitteln - aufgeschlüsselt in Anfangs- und Folgenahrung, Beikost und diätetische Lebensmittel - wird in Tabelle 23 dargestellt. In Anfangsnahrung wurde am häufigsten *Enterobacter cloacae* nachgewiesen, in Folgenahrung *Enterobacter cloacae*, in Beikost *E. sakazakii* und in diätetischen Lebensmitteln *Enterobacter cloacae* und *Klebsiella pneumoniae*.

Beim Vergleich von Säuglingsfertiernahrungsmitteln aus ökologischer und konventioneller Produktionsweise wurden nur wenig unterschiedliche Keimspektren festgestellt. Im ökologischen Warenspektrum wurde häufiger *Escherichia vulneris*, *Escherichia hermannii*, *E. sakazakii* und *Serratia* spp. nachgewiesen (> 6 % Differenz der Vorkommenshäufigkeit im Gegensatz zum konventionellen Warenspektrum). *Enterobacter cloacae* wurde häufiger in Produkten aus konventioneller Herstellungsweise nachgewiesen.

Insgesamt wurden Produkte von 16 Herstellern bzw. Vertriebsfirmen (A - P) untersucht. Wie aus Tabelle 24 ersichtlich, wurden in den Produkten eines jeden Herstellers unterschiedliche Keimspezies nachgewiesen, ein gehäuftes Auftreten einer bestimmten Keimspezies bei einem der Hersteller war nicht zu verzeichnen, d.h. es wurden keine herstellerepezifischen Keimspektren ermittelt. Je mehr Proben eines Herstellers untersucht wurden, desto mehr unterschiedliche Keimspezies wurden nachgewiesen.

Eine Mehrfachkontamination mit zwei oder mehr *Enterobacteriaceae*-Spezies wurde in 25 von 69 (36 %) der *Enterobacteriaceae*-positiven Proben festgestellt. Auffällig waren die Untersuchungsergebnisse der Produkte des Herstellers O. In diesen wurde die größte Vielzahl an unterschiedlichen *Enterobacteriaceae*-Spezies nachgewiesen, und dies bei lediglich vier untersuchten Proben.

Tabelle 23: Relative Häufigkeit (in %) der nachgewiesenen *Enterobacteriaceae*-Spezies in den untersuchten Säuglingsfertiernahrungsmitteln (Probenmenge je 333 g) - aufgeschlüsselt in Anfangs- und Folgenahrung, Beikost und diätetische Lebensmittel (Spezies sortiert nach absteigender Vorkommenshäufigkeit auf Gattungsebene)

	<i>Enterob. cloacae</i>	<i>Enterob. sakazakii</i>	<i>Enterob. amnigenus</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Klebsiella oxytoca</i>	<i>Esch. vulneris</i>	<i>Esch. hermanii</i>	<i>Esch. coli</i>	<i>Pantoea</i> spp.	<i>Serratia</i> spp.	<i>Leclercia</i> spp.	<i>Citrobacter</i> spp.
Anfangsnahrung (n = 38)	7,9	5,3	-	5,3	-	2,6	-	2,6	5,3	5,3	-	-
Folgenahrung (n = 38)	26,3	5,3	-	10,5	-	2,6	-	-	7,9	5,3	-	-
Beikost (n = 69)	10,1	24,6	1,4	8,7	1,4	15,9	8,7	4,3	11,6	8,7	2,9	2,9
Diät. Nahrung (n = 7)	28,6	-	-	28,6	-	-	-	-	-	-	-	-

Enterob. = *Enterobacter*; *Esch.* = *Escherichia*; Diät. = Diätetische

Tabelle 24: Nachweis verschiedener *Enterobacteriaceae*-Spezies in Erzeugnissen unterschiedlicher Hersteller

Spezies	Hersteller (Anzahl untersuchter Proben)															
	A (9)	B (1)	C (10)	D (6)	E (6)	F (12)	G (19)	H (7)	I (14)	J (8)	K (6)	L (19)	M (18)	N (8)	O (4)	P (5)
<i>Enterobacter cloacae</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Enterobacter sakazakii</i>	+	+	+		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Enterobacter amnigenus</i>															+	
<i>Escherichia vulneris</i>				+												+
<i>Escherichia hermannii</i>	+							+								+
<i>Escherichia coli</i>									+							+
<i>Klebsiella pneumoniae</i>																+
<i>Klebsiella oxytoca</i>	+		+													+
<i>Pantoea</i> spp.	+	+	+		+											+
<i>Serratia</i> spp.	+				+											+
<i>Leclercia</i> spp.																+
<i>Citrobacter</i> spp.																+

+ = jeweilige Keimspezies nachgewiesen

4.1.2 Ergebnisse des quantitativen Nachweises

Eine Übersicht über die ermittelten Kontaminationshöhen der untersuchten Säuglingsfertignahrungsmittel (n = 152) wird in Abbildung 7 dargestellt. Als *Enterobacteriaceae*-positiv wurden Proben eingestuft, die oberhalb der Nachweisgrenze des MPN-Verfahrens von 0,30 KbE/100 g lagen (45,4 % der untersuchten Proben). Von diesen *Enterobacteriaceae*-positiven Proben enthielten 78 % weniger als 1 KbE/100 g, 15 % zwischen 1 und 5 KbE/100 g und 7 % mehr als 5 KbE/100 g (Abbildung 7 und 8). Die Kontaminationshöhen der untersuchten Säuglingsfertignahrungsmittel waren also zumeist in relativ niedrigen Bereichen angesiedelt. Als *Enterobacteriaceae*-negativ wurden Proben eingestuft, die unterhalb der Nachweisgrenze von 0,30 KbE/100 g lagen (54,6 % der untersuchten Proben).

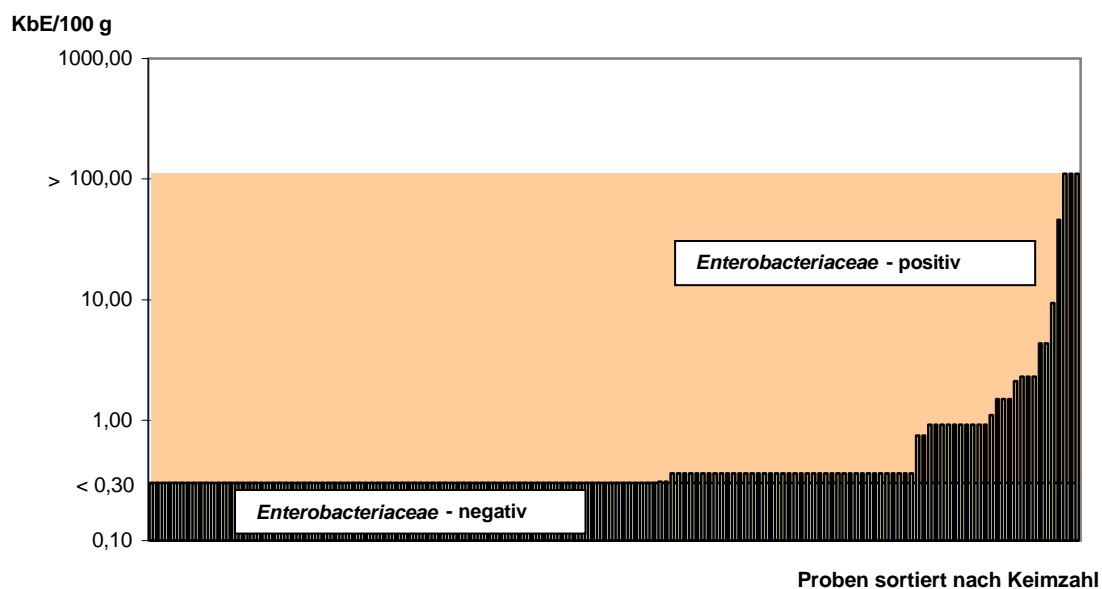


Abbildung 7: Übersicht über die ermittelten Kontaminationshöhen (*Enterobacteriaceae*-positiv: > 0,30 KbE/100 g, *Enterobacteriaceae*-negativ: < 0,30 KbE/100 g) in Säuglingsfertignahrung (n = 152)

Eine differenzierende Betrachtung der Kontaminationshöhen je nach Verwendungsalter der Säuglingsfertignahrungsmittel erfolgt in Abbildung 8. Aufgrund der Vielzahl unterschiedlicher Kontaminationshöhen wurden diese zu einzelnen Gruppen zusammengefasst (< 0,30 KbE/100 g; 0,30 - < 1 KbE/100 g; 1 - < 5 KbE/100 g und

> 5 KbE/100 g). Von den 29 % der *Enterobacteriaceae*-positiven Säuglingsfertignahrungsmittel, die von Geburt an verwendet werden dürfen, enthielten 85 % weniger als 1 KbE/100 g und 15 % zwischen 1 und 5 KbE/100 g. In keinem Säuglingsfertignahrungsmittel, das von Geburt an verwendet werden kann, wurden mehr als 5 KbE/100 g nachgewiesen. Von den 54 % der *Enterobacteriaceae*-positiven Säuglingsfertignahrungsmittel, die nach dem 4. Monat verwendet werden können, enthielten 69 % weniger als 1 KbE/100 g, 21 % zwischen 1 und 5 KbE/100 g und 10 % mehr als 5 KbE/100 g. Von den 49 % der *Enterobacteriaceae*-positiven Säuglingsfertignahrungsmittel, die für Säuglinge mit einem Alter von mehr als sechs Monaten verwendet werden dürfen, enthielten 94 % weniger als 1 KbE/100 g und 6 % mehr als 5 KbE/100 g. Die Kontaminationshöhen von Säuglingsnahrungen, die nach dem 4. Monat verwendet werden können, waren im Vergleich zu den Säuglingsnahrungen anderen Verwendungsalters also am häufigsten in relativ hohen Bereichen angesiedelt.

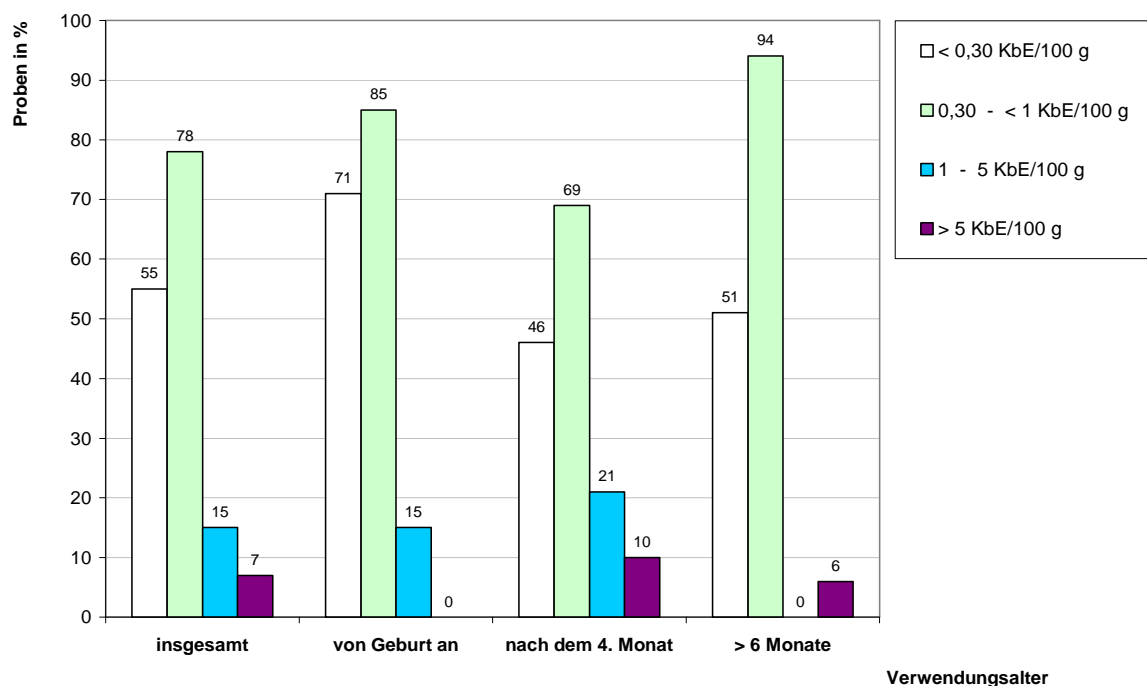


Abbildung 8: Ergebnisse des quantitativen Nachweises von *Enterobacteriaceae* in Säuglingsfertignahrungsmitteln - aufgeschlüsselt je nach Verwendungsalter

Legende:

- KbE/100 g = KbE *Enterobacteriaceae*/100 g Nahrungspulver
- Kontaminationshöhen zu einzelnen Gruppen zusammengefasst:
 - < 0,30 KbE/100 g (= *Enterobacteriaceae*-negativ)
 - 0,30 - < 1 KbE/100 g
 - 1 - 5 KbE/100 g
 - und > 5 KbE/100 g

Die exakten Kontaminationshöhen der mit mehr als 5 KbE/100 g kontaminierten Proben wiesen Keimzahlen von 9,30 KbE/100 g, 46,0 KbE/100 g, 110 KbE/100 g oder mehr als 110 KbE/100 g auf. Bei den Proben, die mit ≥ 46 KbE/100 g kontaminiert waren, handelte es sich um ökologische Produkte desselben Herstellers. Die Untersuchungsergebnisse der mit ≥ 46 KbE/100 g kontaminierten Proben sind in Tabelle 25 dargestellt. Die Kontaminationshöhen resultierten jeweils aus einer Mehrfachkontamination mit unterschiedlichen *Enterobacteriaceae*-Spezies. Zwei der Proben enthielten *E. sakazakii*. Bei Probe 381 und 382 handelt es sich um erneut gekaufte und nachuntersuchte Proben, da diese Produkte bei Erstuntersuchung durch ihre Kontaminationshöhe aufgefallen waren.

Tabelle 25: Detaillierte Untersuchungsergebnisse der quantitativ am höchsten mit *Enterobacteriaceae* kontaminierten Säuglingsfertignahrungsmittel

Proben-Nr.	Art der Probe	weitere Angaben	Verwendungsalter	nachgewiesene <i>Enterobacteriaceae</i>	KbE <i>Enterobacteriaceae</i> /100g
348	Folgemilch	auf Ziegenmilchbasis, ökologisch	nach dem 4. Monat	<i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Serratia ficaria</i>	46,00
381	Folgemilch	auf Ziegenmilchbasis, ökologisch	nach dem 4. Monat	<i>Enterobacter cloacae</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Pantoea</i> spp. 4 <i>Serratia ficaria</i>	> 110
367	Getreidebrei	milchfrei, ökologisch	nach dem 4. Monat	<i>Enterobacter sakazakii</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Leclercia adecarboxylata</i>	> 110
382	Getreidebrei	milchfrei, ökologisch	nach dem 4. Monat	<i>Citrobacter youngae</i> <i>Enterobacter amnigenus</i> <i>Enterobacter sakazakii</i> <i>Escherichia hermanii</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i>	110

4.2 Ergebnisse des Nachweises von *E. sakazakii*

4.2.1 Ergebnisse des mikrobiologischen Nachweises von *E. sakazakii*

Als *E. sakazakii*-positiv bewertet wurden ausschließlich Proben, bei denen sowohl im kulturellen und biochemischen, als auch im molekularbiologischen Nachweis positive Ergebnisse für *E. sakazakii* vorlagen. So wurde *E. sakazakii* in 13,8 % (21 von 152) der untersuchten Säuglingsfertiernahrungsmittel nachgewiesen.

Eine differenzierte Betrachtung des Vorkommens von *E. sakazakii* in den unterschiedlichen Produktgruppen von Säuglingsfertiernahrungsmitteln erfolgt in Tabelle 26. Milchbreie erwiesen sich als die am häufigsten mit *E. sakazakii* kontaminierte Produktgruppe (28,8 %), es folgten die hypoallergenen Folgenahrungen (25 %), Getreidebreie (18,2 %) und Anfangsmilchen (7,4 %). In anderen Produktgruppen wurde *E. sakazakii* nicht nachgewiesen. Hinsichtlich möglicher bakterieller Kontaminationsquellen der Milchbreie sei hier der Zusatz von Frucht bei sechs der *E. sakazakii*-positiven Milchbreie erwähnt, der Zusatz von Getreide bei ebenfalls sechs, der Zusatz von Frucht und Getreide bei einem und der Zusatz von Keksen bei zwei der *E. sakazakii*-positiven Milchbreie.

Tabelle 26: Vorkommen von *E. sakazakii* in den untersuchten Säuglingsfertignahrungsmitteln (Probenmenge je 333 g) - aufgeschlüsselt in die unterschiedlichen Produktgruppen

Produktgruppe	untersuchte Proben n	<i>E. sakazakii</i> -positive Proben	
		Anzahl n	in %
Anfangsmilch *	27	2	7,4
Folgemilch	30	0	0
Hypoallergene Anfangsnahrung	10	0	0
Hypoallergene Folgenahrung	8	2	25
Milchbrei	52	15	28,8
Getreidebrei	11	2	18,2
Diätetische Nahrung **	7	0	0
Sonstige ***	7	0	0
Σ	152	21	13,8

* die Gruppe der Anfangsmilch beinhaltet 22 Anfangsmilchen und 5 Dauermilchen

** Diätetische Nahrung = diätetische Lebensmittel für besondere medizinische Zwecke, die für Säuglinge „von Geburt an“ bestimmt sind

*** unter Sonstige wurden 2 Reisschleime, 1 Reisbrei, 1 Kartoffelbrei, 1 Apfelbrei, 1 Baby Müsli und eine milchfreie Anfangsnahrung zusammengefasst

Das Vorkommen von *E. sakazakii* in den untersuchten Säuglingsfertignahrungsmitteln - aufgeschlüsselt je nach empfohlenem Verwendungsalter (entsprechend Herstellerangaben) - wird in Tabelle 27 dargestellt. Nahrungen, die Säuglingen von Geburt an gegeben werden können, waren in ca. 4 % mit *E. sakazakii* kontaminiert. Nahrungen für Säuglinge, die älter als vier Monate sind, enthielten in knapp 20 % *E. sakazakii*.

Tabelle 27: Vorkommen von *E. sakazakii* in den untersuchten Säuglingsfertignahrungsmitteln (Probenmenge je 333 g) - aufgeschlüsselt nach vom Hersteller empfohlenen Verwendungsalter

empfohlenes Verwendungsalter	untersuchte Proben n	<i>E. sakazakii</i> -positive Proben	
		Anzahl n	in %
von Geburt an	45	2	4,4
nach dem 4. Monat	72	13	18,1
> 6 Monate	35	6	17,1
Σ	152	21	13,8

Das Vorkommen von *E. sakazakii* in den untersuchten Säuglingsfertignahrungsmitteln - aufgeschlüsselt in Anfangs- und Folgenahrung, Beikost und diätetische Lebensmittel - wird in Tabelle 28 dargestellt. *E. sakazakii* konnte mit 24,6 % am häufigsten in Beikost nachgewiesen werden; es folgten Anfangs- und Folgenahrungen mit einer jeweiligen Kontaminationshäufigkeit von 5,3 %. In diätetischen Lebensmitteln wurde *E. sakazakii* nicht nachgewiesen.

Tabelle 28: Vorkommen von *E. sakazakii* in den untersuchten Säuglingsfertignahrungsmitteln (Probenmenge je 333 g) - aufgeschlüsselt in Anfangs- und Folgenahrung, Beikost und diätetische Lebensmittel

	untersuchte Proben n	<i>E. sakazakii</i> -positive Proben	
		Anzahl n	in %
Anfangsnahrung	38	2	5,3
Folgenahrung	38	2	5,3
Beikost	69	17	24,6
Diätetische Lebensmittel	7	0	0
Σ	152	21	13,8

Besonders hervorzuheben sind die beiden mit *E. sakazakii* kontaminierten Säuglingsanfangsnahrungen. Es handelte sich bei diesen um eine Dauermilch aus konventioneller Herstellung (untersucht im Jahr 2005) und eine Anfangsmilchnahrung aus ökologischer Herstellung (untersucht im Jahr 2006). Im Hinblick auf die aktuelle Gesetzeslage (Verordnung (EG) 1441/2007) erfüllten somit zwei der untersuchten Säuglingsanfangsnahrungen die Anforderungen der Verordnung (EG) 1441/2007 (Nichtvorhandensein von *E. sakazakii* in Säuglingsanfangsnahrung) nicht.

Zehn der 21 *E. sakazakii*-positiven Proben waren ausschließlich mit *E. sakazakii* kontaminiert. Elf der Proben wiesen eine Mehrfachkontamination mit *E. sakazakii* und anderen *Enterobacteriaceae* auf. Häufiger trat *E. sakazakii* zusammen mit *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella pneumoniae* und *Escherichia hermannii* auf, am häufigsten jedoch mit *Acinetobacter baumannii*. *Acinetobacter* spp. sind Gram-negative, aerobe Stäbchen und gehören taxonomisch nicht zur Familie der *Enterobacteriaceae*; sind jedoch als nosokomiale Pathogene bekannt. Seit 2006 gehören *Acinetobacter* spp. zur Risikokategorie B (FAO/WHO, 2006).

Die Kontaminationshöhen der ausschließlich mit *E. sakazakii* kontaminierten Proben (n = 10) betragen bei sieben Proben 0,36 KbE/100 g, bei zwei Proben 0,92 KbE/100 g und bei einer Probe 1,50 KbE/100 g. Die Kontaminationshöhen der mit *E. sakazakii* und anderen *Enterobacteriaceae* kontaminierten Proben (n = 11) betragen in neun Proben < 5 KbE/100 g und in zwei Proben ≥ 110 KbE/100 g. Bei den Proben, die mit ≥ 110 KbE/100 g kontaminiert waren, handelte es sich um Proben des Herstellers, der bereits in Tabelle 24 aufgrund der großen *Enterobacteriaceae*-Vielfalt und in Tabelle 25 aufgrund der Kontaminationshöhen erwähnt wird.

Hinsichtlich der nachgekauften und nachuntersuchten Proben erwies sich die Mehrzahl der bei Erstuntersuchung *E. sakazakii*-positiven Proben, bei Nachuntersuchung auf *E. sakazakii* negativ (69 %). Es schien also keine *E. sakazakii*-Kontamination eines Produktes bzw. einer Produktionslinie vorzuliegen, sondern eher eine sporadische Kontamination einzelner Packungen. Um dieses Ergebnis zu verifizieren, müsste jedoch eine größere Probenanzahl untersucht werden.

Ein gehäuftes Vorkommen von *E. sakazakii* bei einem der 16 Hersteller, von denen Säuglingsnahrung untersucht wurde, konnte nicht nachgewiesen werden. *E. sakazakii* wurde in Produkten von elf der 16 Hersteller nachgewiesen.

Koloniemorphologisch zeigten alle endgültig (morphologisch, biochemisch und molekularbiologisch) als *E. sakazakii* identifizierten Keime die Bildung von gelbem Pigment auf CASO-Agar, eine blaugrüne Farbe auf dem chromogenen Medium DFI-Agar und (bis auf zwei Ausnahmen) eine positive Esterase-Reaktion auf Tween 80-Agar.

Hinsichtlich der Überwucherung von *E. sakazakii* in den Anreicherungsmedien wurden folgende Ergebnisse ermittelt: Insgesamt dreimal wurde *E. sakazakii* nur aus der nichtselektiven Voranreicherung (BPW) isoliert, nicht mehr jedoch nach dem Schritt der selektiven *Enterobacteriaceae*-Anreicherung (EEB). Zweimal wurde *E. sakazakii* dabei von *Klebsiella pneumoniae* und einmal von *Enterobacter cloacae* überwuchert. Aus der selektiven *Enterobacteriaceae*-Anreicherung (EEB), nicht jedoch aus der nichtselektiven Voranreicherung (BPW) wurde *E. sakazakii* zweimal isoliert.

4.2.2 Ergebnisse des molekularbiologischen Nachweises von *E. sakazakii*

Aus Säuglingsfertignahrung isolierte Keime, deren mikrobiologische oder biochemische Identifizierung *E. sakazakii* lautete, wurden molekularbiologisch mittels PCR (3.2.2) weiterführend untersucht. Zur Amplifizierung der *E. sakazakii*-spezifischen Genabschnitte wurden die Primer saka 1a und saka 2b nach HASSAN et al. (2007) verwendet. Typische Amplikons des 16S rRNA-Gens verschiedener *E. sakazakii*-Isolate aus Säuglingsnahrung werden in Abbildung 9 dargestellt.

Im Hinblick auf Differenzen zwischen der mikrobiologischen oder biochemischen und der molekularbiologischen Identifizierung wurden folgende Unterschiede festgestellt: Drei der endgültig als *E. sakazakii* identifizierten Keime wurden im api 20E zunächst als *Enterobacter cloacae* identifiziert. Durch die für *E. sakazakii* typische Koloniemorphologie auf CASO- und DFI-Agar, die positive Tween-Esterase-Reaktion und die positive PCR wurden sie jedoch eindeutig als *E. sakazakii* identifiziert. Somit ergab das api 20E-System insgesamt drei falsch negative Ergebnisse hinsichtlich *E. sakazakii*. Falsch

positive Ergebnisse für *E. sakazakii* durch das api 20E wurden dreimal festgestellt. In zwei Fällen wurde *Enterobacter cloacae*, in einem Fall *Enterobacter amnigenus* durch das api 20E zunächst als *E. sakazakii* identifiziert. Die endgültige Identifizierung erfolgte hier durch die untypische Koloniemorphologie auf den oben genannten Medien und die negativen Ergebnisse der PCR.

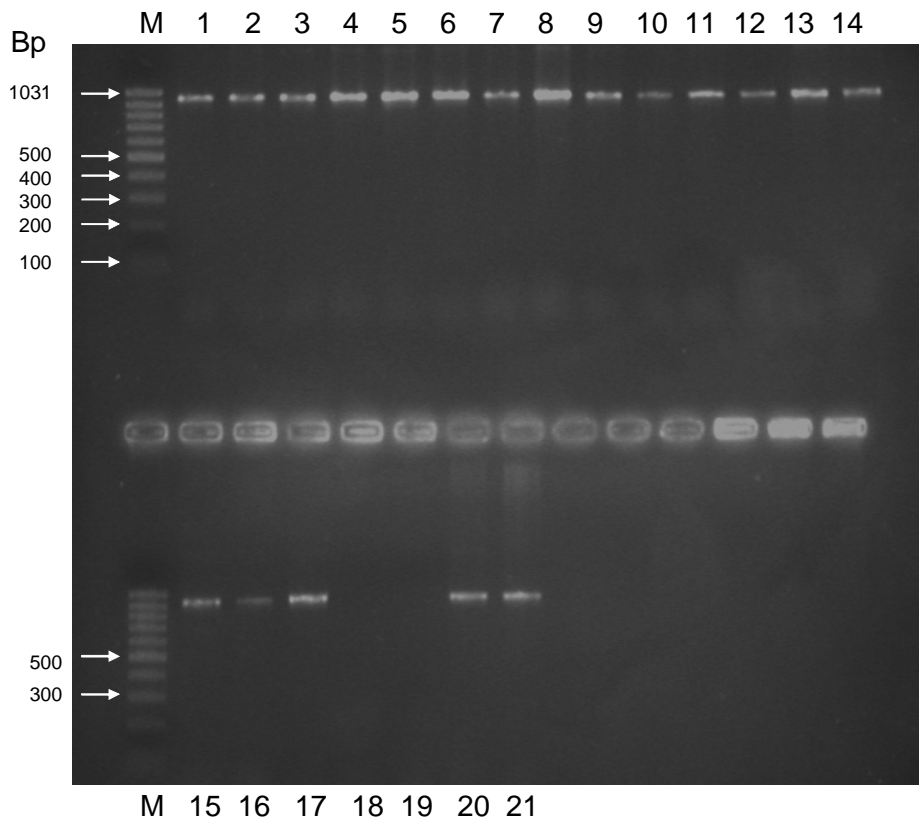


Abbildung 9: Typisches Amplikon (952 Bp) des 16S rRNA-Gens verschiedener *E. sakazakii*-Isolate aus Säuglingsnahrung nach PCR unter Verwendung der Primer Saka-1a und Saka-2b nach HASSAN et al. (2007)

- M = Marker (Gene Ruler™ 100 Bp DNA Ladder)
- 1 - 17 = DNA-Extrakte von biochemisch als *E. sakazakii* identifizierten Isolaten aus Säuglingsfertiernahrungsmitteln
- 18 - 19 = Negativkontrolle (Reaktionsgemisch ohne DNA)
- 20 - 21 = Positivkontrolle (Reaktionsgemisch mit DNA von *E. sakazakii* ATCC 29544)

4.3 Ergebnisse der Untersuchungen zur Ermittlung der optimalen Bebrütungsdauer der Voranreicherung sowie zur Ermittlung der optimalen Art des Überimpfens aus der Voranreicherung

Die Ergebnisse der im Vorfeld der eigentlichen Untersuchungen durchgeführten Versuche zur Ermittlung der optimalen Bebrütungsdauer der Voranreicherung und der optimalen Art des Überimpfens (3.2.1.1.4) ergaben folgendes: Nach 20 h Bebrütungsdauer wurden häufiger *Enterobacteriaceae* erfasst als bei kürzeren Bebrütungszeiten. Nach 8 h Bebrütungsdauer erwiesen sich vier der 19 untersuchten Proben als *Enterobacteriaceae*-positiv, nach 20 h hingegen neun der 19 Proben. Somit wurden bei einer Bebrütungsdauer von 8 h fünf Proben, die mit *Enterobacteriaceae* kontaminiert waren, nicht als *Enterobacteriaceae*-positiv erkannt. In den eigentlichen Untersuchungsang integriert wurde daher die Bebrütungsdauer von 20 h für die Voranreicherung, um alle in Säuglingsfertignahrung vorhandenen *Enterobacteriaceae* erfassen zu können. Eine Auswertung bezüglich des Überwucherns von Keimspezies in der Voranreicherung war nicht möglich, da zu wenige der Proben mit unterschiedlichen Keimspezies kontaminiert waren.

Die Ergebnisse hinsichtlich der optimalen Art des Überimpfens aus der Voranreicherung auf das Festnährmedium VRBG-Agar ergaben folgendes: Sowohl nach Anlegen eines fraktionierten Ösenausstrichs auf VRBG-Agar, als auch nach dem Anlegen einer Verdünnungsreihe mit anschließender Anwendung des Tropfplatten-Verfahrens auf VRBG-Agar ließen sich gut isolierte Einzelkolonien darstellen. Zur Darstellung von Einzelkolonien eigneten sich beide Arten des Überimpfens also gleichermaßen. Nach 20 h Bebrütungsdauer der Voranreicherung bei Verwendung des Tropfplatten-Verfahrens nach Anlegen einer Verdünnungsreihe wurden jedoch häufiger *Enterobacteriaceae* erfasst, als bei Verwendung des Ösenausstrichs. Mittels Ösenausstrich erwiesen sich nur fünf der 19 untersuchten Proben als positiv für *Enterobacteriaceae*. Mittels Verdünnung und Tropfplatten-Verfahren erwiesen sich acht der 19 Proben als positiv. Daher wurde für die folgende, eigentliche Untersuchung der Säuglingsfertignahrung das Tropfplatten-Verfahren nach Anlegen einer Verdünnungsreihe in den Untersuchungsang integriert, um alle in Säuglingsfertignahrung vorhandenen *Enterobacteriaceae* als gut isolierte Einzelkolonien erfassen zu können.

5 DISKUSSION

5.1 Mikrobielle Risiken in Säuglingsfertiernahrung

Säuglingsfertiernahrungsmittel sind keine sterilen Nahrungsmittel, weshalb eine bakterielle Kontamination und damit eine potentielle Gesundheitsgefährdung für die sensible Verbrauchergruppe der Säuglinge nicht ausgeschlossen werden kann. Ein eindeutiger kausaler Zusammenhang zwischen dem Konsum von Säuglingsfertiernahrung und Erkrankungen ist bisher zwar nur für *E. sakazakii* und *Salmonella enterica* beschrieben worden (FAO/WHO, 2004 und 2006). Ein möglicher Kausalzusammenhang besteht aber auch für andere *Enterobacteriaceae* (FAO/WHO, 2004 und 2006). Gemessen am Konsum von Säuglingsfertiernahrungsmitteln ist die bekannt gewordene Zahl der Erkrankungen zwar äußerst gering, sie weisen jedoch meist sehr schwere Krankheitsverläufe mit potentiell tödlichem Ausgang auf. Darüber hinaus ist zu berücksichtigen, dass möglicherweise eine relativ hohe Dunkelziffer milder verlaufender Infektionen existiert.

Gesetzlich vorgeschrieben wird das Nichtvorhandensein von *E. sakazakii* und Salmonellen in getrockneter Säuglingsanfängernahrung und getrockneten diätetischen Lebensmitteln für besondere medizinische Zwecke, die für Säuglinge unter 6 Monaten bestimmt sind und das Nichtvorhandensein von Salmonellen in Folgenahrung (Verordnung (EG) 1441/2007). Nachdem auch in der Vergangenheit bereits ähnliche Regelungen existierten (Verordnung (EG) 2073/2005) ist sicherlich ein sehr großes Datenmaterial zur mikrobiologischen Situation von Säuglingsnahrung erhoben worden, sowohl von den Herstellern als auch von der amtlichen Überwachung. Umso erstaunlicher ist es, dass kaum publizierte Daten zur mikrobiologischen Qualität von kommerziellen Säuglingsnahrungen existieren. Insbesondere lagen zum Zeitpunkt der eigenen Untersuchungen für Deutschland nur sehr spärliche Daten vor. Daher war es das Ziel dieser Arbeit, einen Überblick darüber zu erhalten und somit Daten für eine Bewertung der mikrobiologischen Sicherheit von Säuglingsfertiernahrungsmitteln bereitzustellen.

5.2 Vorkommenshäufigkeit von *Enterobacteriaceae* in Säuglingsfertiernahrung

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten Untersuchungen haben gezeigt, dass *Enterobacteriaceae* - unter diesen auch *E. sakazakii* - in pulverförmigen

Säuglingsfertignahrungsmitteln des deutschen Marktes relativ häufig nachweisbar sind. Die ermittelte Kontaminationshäufigkeit der 152 untersuchten Säuglingsfertignahrungsmittel mit *Enterobacteriaceae* betrug 45,4 %. Sie entspricht somit in etwa den Kontaminationshäufigkeiten, die von Autoren für Säuglingsfertignahrung anderer Länder ermittelt worden sind. So berichten MUYTJENS et al. (1988) von einer Kontaminationshäufigkeit von 52,5 % für Proben aus 35 verschiedenen Ländern; ESTUNINGSIH et al. (2006) von 47,3 % für Proben aus Asien; LEUSCHNER et al. (2004) von 36,2 % für Proben aus verschiedenen Ländern (vorwiegend UK und Australien) und IVERSEN & FORSYTHE (2004) von 28,1 % für Proben aus Europa, Afrika, Asien und USA. Von einer Kontaminationshäufigkeit von lediglich 16,7 % berichtet SANJAQ (2008); von 18,9 % CARNEIRO et al. (2003) für Proben aus Brasilien, wobei hier zu beachten ist, dass SANJAQ (2008) ausschließlich Säuglingsanfangsnahrung und CARNEIRO et al. (2003) ausschließlich Säuglingsnahrung für untergewichtige Neugeborene untersuchten. Die niedrigste Kontaminationshäufigkeit wurde von HEUVELINK et al. (2005) mit 6,0 % für Proben aus den Niederlanden ermittelt. Hierbei ist jedoch auch stets zu berücksichtigen, dass der qualitative Nachweis von der untersuchten Probenmenge abhängt und auch methodisch-experimentelle Aspekte zu Unterschieden beitragen. In der vorliegenden Arbeit wurden stets 333 g Nahrungspulver je Probe untersucht. Dies ist eine vergleichsweise große Probenmenge, da zumeist nur 1 x 100 g untersucht werden und selbst für *E. sakazakii* normalerweise nur 300 g untersucht werden.

Bei den Untersuchungen der vorliegenden Arbeit zeigten sich Unterschiede in der prozentualen Kontaminationshäufigkeit der jeweiligen Säuglingsfertignahrungsmittel mit *Enterobacteriaceae* je nach empfohlenem Verwendungsalter. Nahrung, die für Säuglinge „von Geburt an“ verwendet werden kann, erwies sich in 29 % der Proben kontaminiert, wohingegen Nahrung für Säuglinge „nach dem 4. Monat“ mit 54 % und Nahrung für Säuglinge „ab dem 6. Monat“ mit 49 % wesentlich häufiger kontaminiert waren. Nach den auf europäischer Ebene geltenden Definitionen von Säuglingsnahrung ergab sich für Säuglingsanfangsnahrung eine Kontaminationshäufigkeit von 26 %, für Folgenahrung 37 %, für Beikost 61 % und für Nahrungsmittel für besondere medizinische Zwecke 43 %. Die Tatsache, dass Säuglingsfertignahrung für neugeborene Säuglinge seltener mit *Enterobacteriaceae* kontaminiert war als Nahrung für ältere Säuglinge (ab dem 4. Monat und älter), kann durch die unterschiedliche Zusammensetzung dieser Nahrungsmittel

bedingt sein. Anfangsnahrungen bestehen zum überwiegenden Teil aus Milchpulver, Folgenahrungen und Beikost (z.B. Milchbreie mit Getreide- oder Fruchtzusätzen) dagegen aus zahlreichen, verschiedenen Zutaten. Somit sind bei Folgenahrungen und Beikost durch die komplexere Zusammensetzung wesentlich mehr potentielle Eintragungsquellen für *Enterobacteriaceae* vorhanden. Die geringere Kontaminationshäufigkeit bei Anfangsnahrungen könnte auch darin begründet liegen, dass das erhöhte Infektionsrisiko für Neugeborene bekannt ist, die gesetzlichen Vorgaben strenger sind und damit die Sorgfalt bei der Herstellung größer ist.

Im Vergleich zwischen ökologisch bzw. konventionell hergestellter Säuglingsnahrung erwiesen sich im Rahmen der Untersuchungen ökologische Produkte tendenziell häufiger mit *Enterobacteriaceae* kontaminiert (57,1 % bzw. 39,8 %). Diese Ergebnisse sind jedoch vorsichtig zu bewerten, da jeweils unterschiedliche Produktgruppen der ökologischen bzw. konventionellen Säuglingsnahrungen untersucht wurden und somit ein direkter Vergleich nur bedingt möglich ist.

5.3 Identifizierung des *Enterobacteriaceae*-Keimspektrums in Säuglingsfertignahrung

In den eigenen Untersuchungen wurden 16 verschiedene *Enterobacteriaceae*-Spezies aus 7 verschiedenen Genera in Säuglingsfertignahrung nachgewiesen: *Enterobacter cloacae*, *E. sakazakii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia vulneris*, *Serratia ficaria*, *Pantoea* spp. 3, *Escherichia hermannii*, *Pantoea* spp. 4, *Escherichia coli*, *Pantoea* spp. 2, *Leclercia adecarboxylata*, *Citrobacter* spp., *Citrobacter youngae*, *Serratia rubidaea*, *Klebsiella oxytoca* und *Enterobacter amnigenus* (sortiert nach abnehmender Häufigkeit). Salmonellen wurden in keiner der untersuchten Proben nachgewiesen. Die am häufigsten aus Säuglingsfertignahrung isolierten *Enterobacteriaceae* waren *Enterobacter cloacae* (in 14,5 % der Proben), *E. sakazakii* (13,8 %) und *Klebsiella pneumoniae* (9,2 %).

Betrachtet man die mittels der eigenen Untersuchungen in Säuglingsfertignahrung nachgewiesenen *Enterobacteriaceae* hinsichtlich der Einteilung in Risikokategorien (FAO/WHO, 2004 und 2006), so wurde aus Risikokategorie A *E. sakazakii* nachgewiesen. Zu Risikokategorie A, welche die höchste Risikokategorie darstellt, gehören *E. sakazakii* und *Salmonella enterica*. Für diese Erreger wurde ein eindeutiger kausaler Zusammenhang zwischen dem Konsum von Säuglingsfertignahrung und Erkrankungen nachgewiesen. Ein

möglicher Kausalzusammenhang besteht aber auch für andere *Enterobacteriaceae*, die in Risikokategorie B eingruppiert wurden (FAO/WHO, 2004 und 2006). Aus Risikokategorie B wurden im Rahmen der eigenen Untersuchungen *Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli*, *Escherichia vulneris*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Pantoea* spp. und *Serratia* spp. nachgewiesen. Ein nicht nur möglicher, sondern sehr wahrscheinlicher Kausalzusammenhang muß mittlerweile für die Risikokategorie B-Organismen *Klebsiella pneumoniae* (BÜYÜKYAVUZ et al., 2006) und *Citrobacter freundii* (THURM & GERICKE, 1994) angenommen werden. *Klebsiella pneumoniae* wurde im Rahmen der eigenen Untersuchungen in Säuglingsfertiernahrungsmitteln nachgewiesen, *Citrobacter freundii* hingegen nicht.

Betrachtet man die mittels der eigenen Untersuchungen in Säuglingsfertiernahrung nachgewiesenen *Enterobacteriaceae* hinsichtlich ihrer Fähigkeit, neonatale Erkrankungen auszulösen, so sind die nachgewiesenen *Enterobacteriaceae* zum Großteil bereits in der Literatur als Verursacher neonataler Infektionen beschrieben worden (2.9.2). Als Erreger neonataler Meningitis sind folgende *Enterobacteriaceae* bekannt (2.9.2) und in den im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Säuglingsfertiernahrungen nachgewiesen worden: *E. sakazakii*, *Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli* und *Klebsiella pneumoniae*. Somit wurde ein relativ breites Spektrum von *Enterobacteriaceae* nachgewiesen, die zu Meningitiden führen können, welche häufig mit schwerem Krankheitsverlauf einhergehen und nicht selten auch Spätschäden in der weiteren physischen und psychischen Entwicklung von Säuglingen und Kleinkindern hervorrufen. Besonders kritisch ist zu beurteilen, dass in der untersuchten Säuglingsnahrung, die von Geburt an verwendet werden kann, als häufigste *Enterobacteriaceae*-Spezies *Enterobacter cloacae* und *Klebsiella pneumoniae* nachgewiesen wurden (Tab. 22), die beide potentielle Meningitis-Erreger sind. In Säuglingsnahrung, die ab dem vierten bzw. sechsten Monat verwendet werden kann, wurden am häufigsten *Enterobacter cloacae* und *E. sakazakii* nachgewiesen (Tab. 22), welche ebenfalls zu den Meningitis-Erregern gehören. Des Weiteren sind auch die *Enterobacteriaceae* *Citrobacter freundii*, *Citrobacter koseri*, *Citrobacter diversus* und *Serratia marcescens* als Erreger der neonatalen Meningitis bekannt (2.9.2.1). Diese Erreger konnten jedoch nicht aus der untersuchten Säuglingsfertiernahrung isoliert werden. *Escherichia vulneris* konnte in 8,6 % der Proben detektiert werden und ist bisher nicht als Erreger neonataler Meningitis beschrieben worden. MOHANTY et al. (2005) berichten jedoch von Meningitis durch *Escherichia vulneris* bei einem vier Jahre alten Mädchen.

E. sakazakii, *Enterobacter cloacae* und *Klebsiella pneumoniae* können nicht nur Meningitis, sondern auch Septikämie und nekrotisierende Enterokolitis hervorrufen. Die nekrotisierende Enterokolitis ist aufgrund der Schwere der Erkrankung die bedeutendste Gastrointestinalerkrankung bei Neugeborenen (IVERSEN & FORSYTHE, 2004). *Klebsiella* spp. werden des Weiteren nicht nur als direkte Verursacher von Erkrankungen beschrieben. Eine Kolonisation mit *Klebsiella* spp. kann beispielsweise das Risiko erhöhen, an nekrotisierender Enterokolitis zu erkranken (WESTRA-MEIJER et al., 1983).

Eine Mehrfachkontamination mit zwei oder mehr *Enterobacteriaceae*-Spezies wurde in 36 % der *Enterobacteriaceae*-positiven Proben festgestellt. Besonders häufig wurden Mehrfachkontaminationen bei Produkten eines Herstellers festgestellt. Das Vorkommen einer Vielzahl an unterschiedlichen Mikroorganismen in einem Produkt könnte den hygienischen Status des Produktionsumfeldes des Herstellers oder die Qualität der verwendeten Rohstoffe reflektieren. Zur Überprüfung dieser Annahme wären jedoch weitere Untersuchungen unter Einbeziehung der verwendeten Rohstoffe und des Produktionsumfeldes dieses Herstellers notwendig.

5.3.1 *E. sakazakii*

13,8 % der im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersuchten Säuglingsfertiernahrungsmittel erwiesen sich als kontaminiert mit *E. sakazakii*, der als Erreger von Meningitis, Sepsis und nekrotisierender Enterokolitis bei Neugeborenen und Säuglingen bekannt ist. Ähnliche Ergebnisse wurden auch von Autoren in anderen Ländern und Kontinenten zur prozentualen Vorkommenshäufigkeit von *E. sakazakii* ermittelt (ESTUNINGSIH et al., 2006; LEUSCHNER et al., 2004; MUYTJENS et al., 1988). Höhere Kontaminationshäufigkeiten wurden mit 18,8 % von KRESS et al. (2005), 18,2 % von WITTHUHN et al. (2007) und mit 17,4 % von SHAKER et al. (2007) und ermittelt. Die höchste Kontaminationshäufigkeit wurde mit 22,7 % von der FDA (2003 b) dokumentiert. Geringere Kontaminationshäufigkeiten als die in der vorliegenden Arbeit ermittelten wurden mit 6,7 % von NAZAROWEC-WHITE & FARBER (1997), mit 5,3 % von IVERSEN & FORSYTHE (2004), mit 3 % von SANJAQ (2008), mit 2,1 % von HEUVELINK et al. (2005) und mit 0 % von RESTAINO et al. (2006) festgestellt, wobei letztere insgesamt nur 20 Proben untersucht hatten. Die in bisherigen Untersuchungen festgestellten prozentualen Unterschiede bei der Vorkommenshäufigkeit von *E. sakazakii*

variieren somit zwischen 0 % und 22,7 %. Sie können einerseits durch länderspezifisch unterschiedliche Hygienebedingungen seitens der Säuglingsfertignahrungsherstellung bedingt sein. Zu berücksichtigen bleibt aber auch, dass es hinsichtlich der Spezifität der jeweils angewandten Untersuchungsmethode für *E. sakazakii* Unterschiede gibt.

Die in den vergangenen Jahren weltweit durchgeführten Untersuchungen ergaben eine durchschnittliche Kontaminationshäufigkeit von Säuglingsfertignahrungen mit *E. sakazakii* von 8,6 %. Eine Differenzierung nach Verwendungsalter ist zwar nicht durchgehend möglich, aber es kann davon ausgegangen werden, dass ein nicht unerhebliches Gefährdungspotential existierte. Seit der Einführung spezifischer Vorschriften für *E. sakazakii* in der EU (Verordnung (EG) 2073/2005 und Verordnung (EG) 1441/2007) dürfte sich die Situation in Europa grundsätzlich etwas gebessert haben. Allerdings zeigten die eigenen Untersuchungen, dass *E. sakazakii* nach wie vor ein Problem darstellt.

Ähnlich wie bei der Vorkommenshäufigkeit der *Enterobacteriaceae*, zeigten sich auch bei der Vorkommenshäufigkeit von *E. sakazakii* Unterschiede in der prozentualen Kontaminationshäufigkeit der jeweiligen Säuglingsfertignahrungsmittel je nach empfohlenem Verwendungsalter. Nahrung, die für Säuglinge „von Geburt an“ verwendet werden kann, erwies sich in 4,4 % kontaminiert, wohingegen Nahrung für Säuglinge „nach dem 4. Monat“ mit 18,1 % und Nahrung für Säuglinge „ab dem 6. Monat“ mit 17,1 % wesentlich häufiger kontaminiert waren. Nach den auf europäischer Ebene geltenden Definitionen von Säuglingsnahrung ergab sich eine Kontaminationshäufigkeit von 5,3 % für Säuglingsanfangsnahrung, von 5,3 % für Folgenahrungen, von 24,6 % für Beikost und von 0 % für diätetische Lebensmittel für besondere medizinische Zwecke. Bezogen auf die unterschiedlichen Produktgruppen erwiesen sich Milchbreie mit 28,8 % als die am häufigsten kontaminierte Produktgruppe, gefolgt von der Produktgruppe hypoallergene Folgenahrung (25,0 %), Getreidebrei (18,2 %), und Anfangsmilch (7,4 %). In hypoallergener Anfangsnahrung, Folgemilch und diätetischen Lebensmitteln für besondere medizinische Zwecke wurde *E. sakazakii* nicht nachgewiesen. Zusammenfassend scheinen also Nahrungen für Säuglinge bis zu einem Alter von vier Monaten seltener mit *E. sakazakii* kontaminiert zu sein als Nahrungen für ältere Säuglinge.

Wie die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit sowie einige Rückrufaktionen großer Hersteller in Deutschland im Jahr 2007 zeigen, kommt *E. sakazakii* immer wieder in

geringer Keimzahl in Säuglingsfertignahrungsmitteln des deutschen Marktes vor. Vor diesem Hintergrund ist es fast erstaunlich, dass bisher aus Deutschland nur von einem einzigen Erkrankungsfall durch *E. sakazakii* berichtet wurde (RIES et al., 1994) und dieser nicht mit Säuglingsfertignahrung in Zusammenhang gebracht wurde. Aufgrund der Datenlage und aufgrund von Literaturangaben kann angenommen werden, dass die orale Aufnahme von *E. sakazakii* in geringen Keimzahlen durch gesunde Säuglinge nicht zu dramatischen Erkrankungen führt. Diese Annahme wurde bereits 2004 durch die EFSA formuliert (EFSA, 2004). Entscheidend ist die Handhabung der Säuglingsfertignahrung im Haushalt bzw. in der Klinik, die so gewissenhaft wie möglich erfolgen sollte, sodass auch bei Vorhandensein von *E. sakazakii* bedenkliche Kontaminationshöhen nicht erreicht werden. Die Diskrepanz zwischen dem Vorhandensein von *E. sakazakii* in 13,8 % der Säuglingsfertignahrung des deutschen Marktes einerseits und dem Fehlen von Berichten über *E. sakazakii*-Erkrankungen andererseits könnte aber auch darin begründet liegen, dass ein sicherer Nachweis eines Kausalzusammenhangs zwischen der Erkrankung eines Säuglings, der Aufnahme von Säuglingsfertignahrung und dem Vorhandensein eines bestimmten Erregers in dieser nur sehr schwer und aufwendig durchführbar ist und die Dunkelziffer von *E. sakazakii*-Infektionen in Deutschland somit höher als bisher vermutet liegt.

Eine minimale Infektionsdosis von *E. sakazakii* kann bisher nicht angegeben werden. In der Literatur wird von Ausgangskeimzahlen weniger KbE *E. sakazakii*/100 g Nahrungspulver ausgegangen. Dies bestätigen auch die bei Infektionsausbrüchen ermittelten Kontaminationshöhen der infektiösauslösenden Säuglingsfertignahrungen. IVERSEN & FORSYTHE (2003) stellten ein Rechenexempel auf, welchem eine angenommene Infektionsdosis von 1000 Zellen *E. sakazakii* zu Grunde liegt. Diese Infektionsdosis ist bei einer Ausgangskontamination der pulverförmigen Säuglingsfertignahrung von lediglich 0,36 KbE/100 g bei einer Lagerung der rekonstituierten Nahrung bei 21 °C (Raumtemperatur) bereits nach 17,9 h erreicht. Die im Rahmen der eigenen Untersuchungen ermittelten Kontaminationshöhen von *E. sakazakii* in Säuglingsfertignahrung waren in sehr niedrigen Bereichen angesiedelt (meist < 1 KbE/100 g). Bei korrekter Zubereitung und Verwendung der Nahrung scheint also kaum ein Infektionsrisiko zu bestehen. Durch Fehler bei der Zubereitung oder Aufbewahrung der rekonstituierten Säuglingsnahrung kann es jedoch zu einer gravierenden Keimvermehrung und somit zum Erreichen der Infektionsdosis und einem

nicht unerheblichen Infektionsrisiko kommen. Eine Aufnahme von *E. sakazakii* in höheren Keimzahlen wäre dann prinzipiell nur eine Frage der Zeit. In rekonstituierter Säuglingsmilchnahrung wiesen IVERSEN et al. (2004 b) Generationszeiten für *E. sakazakii* von 21 min bei 37 °C, 1,7 h bei 21 °C und 13,7 h bei 6 °C nach. Aufgrund dieser relativ kurzen Generationszeiten von *E. sakazakii* ist bereits ein 20 minütiges Warmhalten der Nahrung bei 37 °C (z.B. im Fläschchenwärmer oder bei längerer Fütterungsdauer) oder eine knapp zweistündige Lagerung der rekonstituierten Nahrung bei Raumtemperatur von 21 °C (z.B. auf dem Nachttisch) ausreichend zur Verdopplung der anfänglichen Keimzahl. Auch bei Kühlschranktemperaturen (ca. 6 °C) besitzt *E. sakazakii* nicht nur die Fähigkeit des Überlebens, sondern auch die Fähigkeit zur Vermehrung. Da mit Fehlern bei der Handhabung von Säuglingsfertignahrung im Haushalt aufgrund mangelnden Problembewußtseins gerechnet werden muss, ist bei Vorhandensein von *E. sakazakii* - auch in geringen Mengen - ein Infektionsrisiko vorhanden.

Häufig wurde während der eigenen Untersuchungen in *E. sakazakii*-positiven Proben gleichzeitig auch *Acinetobacter baumannii* nachgewiesen. Insgesamt wurde *Acinetobacter baumannii* in 11,8 % (18 von 152) der untersuchten Säuglingsfertignahrungen nachgewiesen. *Acinetobacter baumannii* gehört nicht zur Familie der *Enterobacteriaceae*, ist aber als nosokomiales Pathogen bekannt und seit 2006 in Risikokategorie B (FAO/WHO, 2006) aufgenommen worden. Das gehäufte Vorkommen von *Acinetobacter baumannii* - vor allem das gleichzeitige Vorkommen mit *E. sakazakii* - bedarf einer Klärung durch weitere Forschungsaktivitäten. Ein vermehrtes, gleichzeitiges Vorkommen von *E. sakazakii* mit anderen *Enterobacteriaceae*-Spezies konnte nicht ermittelt werden.

5.3.2 Salmonellen

Salmonellen, die in der Vergangenheit (ROWE et al., 1987; RUIZ et al., 1995; PARK et al., 2004; ESPIÉ et al., 2005) und auch aktuell (BROUARD et al., 2007) zu Infektionsausbrüchen durch Säuglingsfertignahrung geführt haben, wurden im Rahmen der eigenen Untersuchungen in Säuglingsfertignahrungen des deutschen Marktes nicht nachgewiesen. Auch andere Autoren, die Säuglingsfertignahrung anderer Länder auf das Vorkommen von *Enterobacteriaceae* oder Salmonellen in Säuglingsfertignahrung untersuchten, konnten keine Salmonellen nachweisen (MUYTJENS et al., 1988; CARNEIRO et al., 2003; IVERSEN & FORSYTHE, 2004; LEUSCHNER et al., 2004;

HEUVELINK et al., 2005; ESTUNINGSIH et al., 2006). Der Widerspruch zwischen diesen negativen Nachweisen von Salmonellen in Säuglingsnahrung einerseits und dem Vorkommen von Infektionsausbrüchen durch Salmonellen in Säuglingsnahrung andererseits, kann durch die sehr inhomogene Verteilung (Nesterbildung) der Salmonellen im Nahrungspulver und dem damit verbundenen schwierigen Nachweis begründet liegen. Hier ist eventuell auch zu berücksichtigen, dass Lactose-verstoffwechselnde Salmonellen durch einige der zum Salmonellen-Nachweis verwendeten Nährmedien nicht detektiert werden können. Zwar sind Lactose-verstoffwechselnde Salmonellen selten, sie kommen jedoch vor, wie z.B. ein Ausbruch durch Laktose-positive (und -negative) *S. Virchow*-Stämme in Säuglingsfertignahrung 1994 in Spanien zeigte (RUIZ et al., 1995; USERA et al., 1996 & 1998). Salmonellen scheinen generell nur selten in Säuglingsfertignahrung vorzukommen, womit das Risiko einer Salmonellen-Infektion durch Säuglingsfertignahrung als relativ gering einzuschätzen ist. Zu berücksichtigen bleibt jedoch, dass bei Vorhandensein von Salmonellen bereits wenige KbE Salmonellen ausreichen, um zur Infektion zu führen und somit - im Gegensatz zu *E. sakazakii* - ein Infektionsrisiko wahrscheinlich auch ohne zusätzliche Fehler bei der Nahrungszubereitung bestehen kann.

5.4 Quantitativer Nachweis von *Enterobacteriaceae* in Säuglingsfertignahrung

Wie die im Rahmen der vorliegenden Arbeit ermittelten Daten zeigen, ist die quantitative Belastung von Säuglingsfertignahrungen des deutschen Marktes mit *Enterobacteriaceae* in relativ niedrigen Bereichen angesiedelt. 78 % der mit *Enterobacteriaceae* kontaminierten Säuglingsfertignahrungen waren mit weniger als 1 KbE/100 g belastet, 15 % mit 1 - 5 KbE/100 g und lediglich 7 % mit mehr als 5 KbE/100 g. Die höchsten Kontaminationen betragen jedoch ≥ 110 KbE/100 g und wurden in drei der untersuchten Proben ermittelt. Bei diesen Proben handelte es sich um eine Folgemilch und zwei Getreidebreie (mit dem jeweiligen Verwendungsalter „nach dem 4. Monat“). Diese Kontaminationshöhen wurden durch Mehrfachkontamination mit unterschiedlichen *Enterobacteriaceae*-Spezies verursacht, die beiden Getreidebreie enthielten unter anderem *E. sakazakii*. Untersuchte Säuglingsfertignahrung, die für Säuglinge von Geburt an verwendet werden kann, erwies sich in keiner der Proben mit mehr als 5 KbE *Enterobacteriaceae*/100 g kontaminiert.

Die eigenen Ergebnisse des quantitativen Nachweises von *Enterobacteriaceae* können aufgrund mangelnder publizierter Daten über die Situation des deutschen Marktes nur mit

Ergebnissen aus anderen Ländern und Kontinenten verglichen werden. MUYTJENS et al. (1988) wiesen häufig *Enterobacteriaceae*-Kontaminationshöhen von 0,36 KbE/100 g nach, die höchste von diesen Autoren ermittelte Kontaminationshöhe betrug 91,78 KbE *Enterobacter cloacae*/100 g. IVERSEN & FORSYTHE (2004) ermittelten in der Mehrzahl der Proben Kontaminationshöhen von unter 100 KbE *Enterobacteriaceae*/g; nur eine Probe war im Bereich zwischen 100 und 1000 KbE/g belastet. Somit scheint die quantitative Belastung von Säuglingsfertignahrungsmitteln mit *Enterobacteriaceae* generell unter 1 KbE/100 g zu liegen und nur in seltenen Fällen im Bereich 100 KbE/100 g angesiedelt zu sein. Bei korrekter Handhabung der rekonstituierten Nahrung scheint das Infektionsrisiko durch *Enterobacteriaceae* also relativ gering zu sein.

Die Kontaminationshöhe von *E. sakazakii* in den in dieser Arbeit untersuchten Proben lag im Bereich zwischen 0,36 und 1,5 KbE/100 g, wenn *E. sakazakii* als Einzelkontaminant nachgewiesen wurde. Proben, die mit *E. sakazakii* und gleichzeitig mit anderen *Enterobacteriaceae*-Spezies kontaminiert waren, wiesen Kontaminationshöhen von bis zu 110 KbE/100 g auf. Da bisher keine exakte minimale Infektionsdosis für *E. sakazakii* bestimmt werden konnte, beruht die Beurteilung dieser Ergebnisse auf bisherigen Erfahrungen und Rechenexemplen. Aufgrund dieser muß bei den in den eigenen Untersuchungen ermittelten Kontaminationshöhen von der Möglichkeit des Erreichens einer Infektionsdosis ausgegangen werden, vor allem bei längerer Aufbewahrung der rekonstituierten Nahrung.

5.5 Rechtliche Bewertung des Vorkommens von *Enterobacteriaceae* in Säuglingsfertignahrung bezüglich Verordnung (EG) 1441/2007

Durch Verordnung (EG) 2073/2005, geändert durch Verordnung (EG) 1441/2007 wird auf europäischer Ebene das Nichtvorhandensein von *E. sakazakii* und Salmonellen in „getrockneter Säuglingsanfangsnahrung und getrockneten diätetischen Lebensmitteln für besondere medizinische Zwecke, die für Säuglinge unter 6 Monaten bestimmt sind“ und das Nichtvorhandensein von Salmonellen in Folgenahrung vorgeschrieben. Im Rahmen der eigenen Untersuchungen wurde *E. sakazakii* in 5,3 % der untersuchten Säuglingsanfangsnahrungen (2 von 38) nachgewiesen. In den untersuchten diätetischen Lebensmitteln (n = 7) konnte *E. sakazakii* nicht nachgewiesen werden. Salmonellen wurden in keiner der Proben detektiert. Im Hinblick auf die aktuelle Gesetzeslage

entsprachen somit zwei der untersuchten Proben den derzeit gültigen gesetzlichen Anforderungen nach Verordnung (EG) 1441/2007 nicht.

Die gesetzliche Forderung des Nichtvorhandenseins von *E. sakazakii* und Salmonellen in Säuglingsanfangsnahrung erscheint sinnvoll, da gerade Neugeborene, die diese Nahrung konsumieren können, als Risikogruppe für Infektionen mit *E. sakazakii* bekannt sind und sogar Frühgeborene und immungeschwächte Säuglinge, die zu den Höchststrisikogruppen gehören, mit Säuglingsanfangsnahrung ernährt werden können. Hinterfragenswert erscheint hingegen das gesetzlich tolerierte Vorhandensein von *E. sakazakii* in Nahrungen für Säuglinge ab dem 4. Monat bzw. ab dem 6. Monat. Im Rahmen der vorliegenden Untersuchungen wurde *E. sakazakii* in 18,1 % der Säuglingsfertignahrungen nachgewiesen, die nach dem 4. Monat verwendet und in 17,1 % der Säuglingsfertignahrungen nachgewiesen, die nach dem 6. Monat verwendet werden können. Zwar zeigen die bisherigen Daten aus der Literatur, dass *E. sakazakii*-Erkrankungen meist bei Säuglingen mit einem Lebensalter von unter zwei Monaten auftreten (Tabelle 2 und 3), bisher kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass *E. sakazakii*, der auch beim erwachsenen Menschen Infektionen auslösen kann, nicht auch in Nahrung für Säuglinge ab dem 4. bzw. ab dem 6. Monat eine potentielle Infektionsgefahr darstellt. Ob das Immunsystem eines Säuglings zwischen dem Zeitraum des Konsums von Anfangsnahrung und dem des Konsums von „Nahrung nach dem 4. bzw. 6. Lebensmonat“ einen derart großen Entwicklungsschritt in Richtung einer größeren Immunkompetenz durchläuft, sodass der Säugling die orale Aufnahme von *E. sakazakii* ohne Infektion übersteht, erscheint jedenfalls fraglich. NORIEGA et al. (1990) berichten beispielsweise von einem sechs Monate alten Säugling, der durch Aufnahme kontaminierter Säuglingsfertignahrung an *E. sakazakii*-Bakteriämie erkrankte. Inwieweit *E. sakazakii* demnach gesetzlich in Nahrung für Säuglinge ab dem 4. bzw. 6. Monat toleriert werden kann, sollte risikoanalytisch erneut bewertet werden.

Durch Verordnung (EG) 2073/2005 erfolgte die Untersuchung auf *Enterobacteriaceae* als Prozesshygienekriterium. Erst beim Nachweis von *Enterobacteriaceae* musste die Untersuchung auf *E. sakazakii* und Salmonellen folgen. *Enterobacteriaceae* wurden damit quasi als Indikator herangezogen. Die Sinnhaftigkeit dieser Vorschrift im Hinblick auf die Lebensmittelsicherheit war allerdings zweifelhaft, da zwischen dem Nachweis von *Enterobacteriaceae* einerseits und dem von Salmonellen bzw. *E. sakazakii* andererseits praktisch kein Zusammenhang besteht (EFSA, 2007; SANJAQ, 2008). In Verordnung

(EG) 1441/2007 wird daher die Paralleluntersuchung auf *Enterobacteriaceae* und *E. sakazakii* (als Prozesshygienekriterium) vorgeschrieben. Die Untersuchung auf *E. sakazakii* und Salmonellen wurde zum unabhängigen Lebensmittelsicherheitskriterium. Auch im Rahmen der eigenen Untersuchungen konnte festgestellt werden, dass die Abwesenheit von *Enterobacteriaceae* in 10 x 10 g Säuglingsnahrungspulver (Probenmenge, welche durch Verordnung (EG) 2073/2005 vorgeschrieben wurde) keine Aussage über die Anwesenheit von *E. sakazakii* in 30 x 10 g zulässt. 83 % der *Enterobacteriaceae*-positiven Proben waren jeweils nur in 1 x 100 g oder 2 x 100 g Nahrungspulver positiv (Einwaage je 3 x 100 g, 3 x 10 g, 3 x 1 g). Somit wären 83 % der untersuchten Proben bei Untersuchungen nach Verordnung (EG) 2073/2005, bei der eine Probeneinwaage von nur 1 x 100 g vorgeschrieben wurde, wahrscheinlich nicht als *Enterobacteriaceae*-positiv detektiert worden und somit nicht weiter auf *E. sakazakii* und Salmonellen untersucht worden. Aufgrund dieses Sachverhaltes erscheinen die Änderungen durch Verordnung (EG) 1441/2007 wichtig und sinnvoll, d.h. die Untersuchung auf *Enterobacteriaceae* und *E. sakazakii* parallel verlaufen zu lassen. Inwieweit dies auch in Bezug auf Salmonellen sinnvoll ist, konnte durch die eigenen Untersuchungen nicht ermittelt werden. Aufgrund der extremen Seltenheit positiver Salmonellen-Befunde selbst im Zusammenhang mit Erkrankungsfällen scheint hier auch mit 750 g Probenmenge keine substantielle Verbesserung der Lebensmittelsicherheitskriterien erreichbar zu sein.

5.6 Risikobewertung zum Vorkommen von *Enterobacteriaceae* in Säuglingsfertiernahrung

Grundlage für die Bewertung mikrobieller Risiken in Lebensmitteln ist immer der aktuelle wissenschaftliche Kenntnisstand. Die Abschätzung des gesundheitlichen Risikos, das von einem Erreger ausgeht, ist daher ein dynamischer Prozess, der fortwährend im Fluss ist. So sind momentan *E. sakazakii* und Salmonellen als Risiko in Säuglingsfertiernahrung anzusehen, da für diese Erreger bereits ein eindeutiger Kausalzusammenhang zwischen Erkrankungen und dem Konsum von Säuglingsfertiernahrung nachgewiesen worden ist (FAO/WHO, 2004). Wie in Kapitel 2.9.2 beschrieben, sind jedoch noch weitere *Enterobacteriaceae*-Spezies für Neugeborene und Säuglinge fakultativ pathogen und wie in den eigenen Untersuchungen ermittelt, in Säuglingsfertiernahrung vorhanden. Säuglingsfertiernahrung stellt also eine potentielle Quelle neonataler Kolonisation und

Infektion mit fakultativ pathogenen *Enterobacteriaceae* dar und somit ein potentielles Risiko für empfindliche Säuglinge. Welche Spezies zukünftig möglicherweise an Relevanz gewinnen wird, ist schwer abzuschätzen. Nicht zu unterschätzen scheint jedenfalls das Risiko durch *Klebsiella pneumoniae* und *Citrobacter freundii* zu sein. *Klebsiella pneumoniae* wurde in 9,2 % der im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Säuglingsfertignahrungen nachgewiesen und bereits mit Infektionsausbrüchen bei Säuglingen durch Säuglingsfertignahrung assoziiert (BÜYÜKYAVUZ et al., 2006). *Citrobacter freundii* wurde im Rahmen der eigenen Untersuchungen nicht nachgewiesen, wird jedoch ebenfalls bereits mit Infektionen durch Säuglingsfertignahrung assoziiert (THURM & GERICKE, 1994).

Da die Häufigkeit lebensmittelbedingter, gastrointestinaler oder sogar systemischer Erkrankungen bei Säuglingen nicht systematisch erfasst wird, ist sie in ihrer Dimension *de facto* unbekannt, d.h. Infektionskrankheiten durch Säuglingsnahrungsmittel könnten auch in Deutschland eventuell wesentlich häufiger sein als bisher angenommen. Gerade auch neonatale Diarrhoen bleiben häufig ätiologisch ungeklärt, sodass die Beteiligung Lebensmittel-assoziiertes Infektionen und die Beteiligung der *Enterobacteriaceae* unklar bleibt, was auch die Risikoeinschätzung der *Enterobacteriaceae* schwierig macht.

Bei einer Vorkommenshäufigkeit von *Enterobacteriaceae* in nahezu 50 % der Säuglingsfertignahrungsmittel, stellt sich die Frage nach der Inzidenz von Infektionen bei fertignahrungsernährten Säuglingen im Gegensatz zu ausschließlich gestillten Säuglingen. Nach Untersuchungen von HYLANDER et. al. (1998) bei VLBW (very low birth weight)-Neugeborenen lag die allgemeine Infektions-Inzidenz bei „flaschenernährten“ Säuglingen bei 47,2 % verglichen mit einer Inzidenz bei „gestillten“ Säuglingen von 29,3 %. Untersuchungen von LUCAS & COLE (1990) hinsichtlich der nekrotisierenden Enterokolitis bei Säuglingen ergaben, dass die nekrotisierende Enterokolitis zehnmal häufiger auftritt bei Säuglingen, die mit pulverförmiger Milch ernährt werden im Gegensatz zu gestillten Säuglingen. *Enterobacteriaceae*, die mit der Säuglingsfertignahrung aufgenommen werden sind maßgeblich an der Entwicklung der intestinalen Flora beteiligt, welche je nach Zusammensetzung mehr oder weniger empfänglich für Infektionen ist. *Enterobacteriaceae* sind somit nicht unbedingt auf direktem Weg krankheitsauslösend, können jedoch Vorboten für Infektionen sein.

Im Gegensatz zu anderen Lebensmitteln existiert im Säuglingsnahrungs-Sektor eine deutliche Marktdominanz einiger weniger Hersteller. Dies bedeutet, dass das Infektionsrisiko deutscher Säuglinge, die nicht gestillt werden können, in engem Zusammenhang mit der Hygienepraxis dieser Säuglingsfertignahrungs-Hersteller steht. In der vorliegenden Arbeit konnten allerdings keine herstellerepezifischen Keimspektren festgestellt werden.

Eine abschließende Risikobewertung ist mit den derzeitig vorhandenen Daten aus der Literatur und den eigenen Untersuchungen nicht durchführbar. Aus den Daten wird jedoch ersichtlich, dass Säuglingsfertignahrung teilweise mit fakultativ pathogenen *Enterobacteriaceae* belastet ist und somit ein Infektionsrisiko gegeben ist. Das Ziel einer Keimfreiheit in Säuglingsfertignahrung ist wegen der erforderlichen Schonung der Nährstoffe nicht erreichbar. Der Eintrag dieser Keime in Säuglingsfertignahrungsmittel sollte seitens der Hersteller wegen der potentiellen Pathogenität von *Enterobacteriaceae* so weit wie möglich reduziert werden, nicht nur im Hinblick auf das rechtlich noch zulässige Maß. Um dieses Ziel zu erreichen, sollten Säuglingsfertignahrung-Hersteller darauf bedacht sein, den Eintrag von *Enterobacteriaceae* ins Betriebsumfeld und somit ins Endprodukt zu reduzieren unter anderem durch eine intensive Kontrolle der mikrobiologischen Qualität der verwendeten Rohstoffe, strenge Hygiene, und der Vermeidung des Eindringens von Feuchtigkeit (Trennung von Naß- und Trockenverfahren, Reinigungs- und Kondensationswasser reduzieren) und durch Zutrittskontrolle des Personals (EFSA, 2004; SANJAQ, 2008).

Zusätzlich ist eine Information der Verbraucher über die Problematik und den richtigen Umgang mit Säuglingsfertignahrung notwendig. Empfehlungen zum Umgang mit Säuglingsfertignahrung in Klinik oder Verbraucherhaushalt wurden bereits von den einschlägigen Gesundheits- bzw. Ernährungsorganisationen herausgegeben (FAO/WHO, 2004; ESPGHAN, 2004; DGKJ, 2004). Diese Empfehlungen werden in Kapitel 2.5 wiedergegeben. Bei korrekter Zubereitung der Säuglingsfertignahrung nach diesen Empfehlungen ist das Infektionsrisiko durch Säuglingsfertignahrung als sehr gering einzustufen. Die Mehrheit der Verbraucher ist über die Veröffentlichung dieser Empfehlungen jedoch zumeist nicht informiert und hält sich insofern lediglich an die Zubereitungsempfehlungen und Hinweise, die direkt auf den Säuglingsnahrungspackungen aufgedruckt sind. FAO/WHO (2006) empfehlen den Aufdruck folgender

Hinweise: a) Instruktionen zur Zubereitung und b) Warnung vor Gesundheitsgefahren bei inadeguater Zubereitung. Dieser Aufdruck wird ebenfalls durch das „International Code of Marketing of Breast milk Substitutes“ empfohlen. Die derzeit auf dem deutschen Markt erwerbbaaren Säuglingsfertignahrungsmittel enthalten meist folgende Aufschriften: „Nahrung vor jeder Mahlzeit frisch zubereiten und sofort füttern“ und „Nahrungsreste nicht wiederverwenden“. Hiermit wird dem Verbraucher der Grund dieser Anweisungen nicht genannt, woraus eine Unterschätzung der Gefahr resultieren kann. Ein Aufdruck mit folgendem Inhalt könnte den Verbraucher detaillierter aufklären und so zu einem gewissenhafteren Umgang anleiten: „unsachgemäße Zubereitung kann zu gesundheitlichen Beeinträchtigungen durch Wachstum unerwünschter Keime führen“. Die derzeit auf dem deutschen Markt erwerbbaaren Säuglingsfertignahrungsmittel einiger Hersteller sind bereits mit dieser Aufschrift versehen. Eine Verpflichtung für alle Hersteller sollte überdacht werden. Die Aufschrift könnte dahingehend konkretisiert werden, dass die unsachgemäße Handhabung sich vor allem auf eine lange Aufbewahrungszeit des rekonstituierten Produkts bezieht. So könnte die Sorgsamkeit im Umgang mit Säuglingsfertignahrung in der Bevölkerung erhöht werden, ohne Angst hervorzurufen und die Akzeptanz der Produktgruppe zu reduzieren.

Zukünftige Forschungsvorhaben sind notwendig hinsichtlich der weltweiten qualitativen und quantitativen Vorkommenhäufigkeit von *Enterobacteriaceae* in Säuglingsfertignahrung, der ätiologischen Aufklärung neonataler Diarrhoen und Erkrankungen, der minimalen Infektionsdosis von *E. sakazakii* und anderer *Enterobacteriaceae* sowie deren Pathogenitätsfaktoren.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Getrocknete Säuglingsfertignahrungsmittel können eine mikrobielle Kontamination aufweisen, weshalb eine potentielle Gesundheitsgefährdung für die sensible Verbrauchergruppe der Säuglinge nicht ausgeschlossen werden kann. Ein eindeutiger kausaler Zusammenhang zwischen dem Konsum von Säuglingsfertignahrung und Erkrankungen ist bisher für die *Enterobacteriaceae*-Spezies *E. sakazakii* und *Salmonella enterica* beschrieben worden. Ein möglicher Kausalzusammenhang wird aber auch für andere *Enterobacteriaceae* angenommen. Veröffentlichte Daten über das qualitative und quantitative Vorkommen von *Enterobacteriaceae* in Säuglingsfertignahrungsmitteln liegen in Deutschland bisher kaum vor, sodass es Ziel dieser Arbeit war, einen Überblick darüber zu erhalten und somit Daten für eine aktuelle Bewertung der mikrobiologischen Sicherheit von Säuglingsfertignahrungsmitteln bereitzustellen.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden in den Jahren 2005 und 2006 insgesamt 152 getrocknete Säuglings- und Kleinkinderfertignahrungsmittel des deutschen Marktes auf das qualitative und quantitative Vorkommen von *Enterobacteriaceae* untersucht. Zu den untersuchten Säuglingsfertignahrungsmitteln gehörten Säuglingsanfangsnahrungen (vorgesehener Verzehr von Geburt an), Folgenahrungen (Verzehr ab einem Lebensalter von > 4 Monaten), Beikost (Verzehr nach dem 4. Monat) und diätetische Lebensmittel für besondere medizinische Zwecke (Verzehr von Geburt an). Der Nachweis erfolgte unter Verwendung eines kombinierten Untersuchungsverfahrens, dem die Internationale Standardmethode (ISO) 21528-1:2004 für den Nachweis von *Enterobacteriaceae*, die Internationale Standardmethode (ISO) 6785:2001 für den Nachweis von Salmonellen, sowie die Methode der US Food and Drug Administration für den Nachweis von *E. sakazakii* zugrunde lagen. Für den Nachweis von *E. sakazakii* wurde zusätzlich ein chromogenes Selektivnährmedium eingesetzt. Die Bestätigung der kulturell und biochemisch als *E. sakazakii* identifizierten Keime erfolgte mittels Polymerase-Kettenreaktion.

Enterobacteriaceae wurden in 45,4 % (69 von 152 Proben) der untersuchten Säuglingsfertignahrungsmittel nachgewiesen. Säuglingsanfangsnahrung erwies sich dabei zu 26 % (10 von 38) kontaminiert, Folgenahrung zu 37 % (14 von 38), Beikost zu 61 %

(42 von 69) und diätetische Lebensmittel für besondere medizinische Zwecke zu 43 % (3 von 7).

Eine Monokontamination mit einer *Enterobacteriaceae*-Spezies konnte in 44 der 69 (64 %) *Enterobacteriaceae*-positiven Proben festgestellt werden, eine Mehrfachkontamination mit zwei oder mehr *Enterobacteriaceae*-Spezies in 25 der 69 (36 %) *Enterobacteriaceae*-positiven Proben.

Am häufigsten wurden die Keimspezies *Enterobacter cloacae* (in 14,5 % der untersuchten Proben), *E. sakazakii* (13,8 %) und *Klebsiella pneumoniae* (9,2 %) nachgewiesen. Es folgten mit abnehmender Häufigkeit *Escherichia vulneris* (8,6 %), *Serratia ficaria* (5,9 %), *Escherichia hermannii* (3,9 %), *Pantoea* spp. 3 (3,9 %), *Escherichia coli* (2,6 %), *Pantoea* spp. 4 (2,6 %), *Pantoea* spp. 2 (2,0 %), *Leclercia adecarboxylata* (1,3 %), *Citrobacter youngae* (0,7 %), *Citrobacter* spp. (0,7 %), *Enterobacter amnigenus* (0,7 %), *Klebsiella oxytoca* (0,7 %) und *Serratia rubidaea* (0,7 %).

Salmonellen konnten in keiner der Proben nachgewiesen werden.

Neben *Enterobacteriaceae* wurde in einer Reihe von Proben das Gram-negative Bakterium *Acinetobacter baumannii* detektiert, welches als nosokomiales Pathogen bekannt ist.

Die Vorkommenshäufigkeit von *E. sakazakii* in den insgesamt untersuchten Säuglingsfertignahrungsmitteln betrug 13,8 % (21 von 152). Die untersuchten Säuglingsanfangsnahrungen waren zu 5,3 % (2 von 38) mit *E. sakazakii* kontaminiert, Folgenahrungen zu 5,3 % (2 von 38), Beikost zu 24,6 % (17 von 69) und diätetische Lebensmittel für besondere medizinische Zwecke zu 0 % (0 von 7). Die aktuellen, gesetzlichen Anforderungen hinsichtlich *E. sakazakii* (Nichtvorhandensein von *E. sakazakii* in getrockneter Säuglingsanfangsnahrung und getrockneten diätetischen Lebensmittel für besondere medizinische Zwecke, die für Säuglinge unter 6 Monaten bestimmt sind) nach Verordnung (EG) 2073/2005 bzw. Verordnung (EG) 1441/2007 wurden somit von 5,3 % der untersuchten Säuglingsanfangsnahrungen nicht erfüllt.

Die quantitative Belastung von Säuglingsfertignahrungsmitteln mit *Enterobacteriaceae* war in relativ niedrigen Keimzahlbereichen angesiedelt. 78 % der *Enterobacteriaceae*-

positiven Proben waren mit weniger als 1 KbE/100 g kontaminiert, 15 % zwischen 1 und 5 KbE/100 g und 7 % mit mehr als 5 KbE/100 g. Drei der mit > 5 KbE/100 g kontaminierten Proben enthielten jedoch ≥ 110 KbE/100 g, zwei dieser Proben sogar *E. sakazakii*.

Wie die im Rahmen der vorliegenden Arbeit ermittelten Ergebnisse zeigen, sind *Enterobacteriaceae* - unter diesen auch *E. sakazakii* - in getrockneten Säuglingsfertiernahrungsmitteln des deutschen Marktes relativ häufig vorhanden, allerdings meist in sehr niedrigen Keimzahlen. Gemessen am Konsum von Säuglingsfertiernahrungsmitteln ist die Zahl der beschriebenen Erkrankungsfälle von Säuglingen gering. Das Infektionsrisiko für Säuglinge durch Säuglingsfertiernahrungsmittel kann sich jedoch durch Fehler bei der Zubereitung bzw. bei der Handhabung des rekonstituierten Produktes, im Sinne einer Keimanreicherung, erhöhen.

7 SUMMARY

Powdered infant formulae (PIF) may be contaminated with bacteria. Therefore a potential health risk for infants can not be excluded. Clear evidence of causality between the consumption of PIF and infectious diseases in infants has been presented for two *Enterobacteriaceae* species, *Enterobacter sakazakii* (*E. sakazakii*) and *Salmonella enterica*. For other *Enterobacteriaceae* the causality seems to be plausible but has not yet been demonstrated. There is a lack of published data concerning the qualitative and quantitative incidence of *Enterobacteriaceae* in PIF as present on the market in Germany. Therefore it was the objective of this study to obtain such data by a thorough survey of such products and microbiological analysis of major parameters connected to the safety of PIF.

In 2005 and 2006, a total of 152 samples of PIF from the German market were analyzed qualitatively and quantitatively for *Enterobacteriaceae*. Sampling included products suitable to feed infants from birth on, follow-on formulae (> 4 months of age), complementary food (> 4 months of age) and dietetic products for special clinical purposes (from birth on). The analytical methods used combined International Standard (ISO) Method 21528-1:2004 for *Enterobacteriaceae*, ISO Method 6785:2001 for *Salmonella*, and the method of the US Food and Drug Administration for *E. sakazakii*. In addition, a selective chromogenic agar was used for the detection of *E. sakazakii*, as well as a polymerase chain reaction method for the species confirmation of *E. sakazakii*.

45,4 % (69 of 152) of all analyzed samples of PIF were contaminated with *Enterobacteriaceae*. The frequency of positive samples was 26 % (10 of 38) for PIF from birth on, 37 % (14 of 38) for follow-on formulae, 61 % (42 of 69) for complementary food, and 43 % (3 of 7) in the case of dietetic food for special clinical purposes.

A contamination with only one species of *Enterobacteriaceae* was found in 44 of the 69 (64 %) *Enterobacteriaceae*-positive samples, while a contamination with two or more different species of *Enterobacteriaceae* was found in 25 positive samples.

The most frequently found species of *Enterobacteriaceae* were *Enterobacter cloacae* (in 14,5 % of all samples), *E. sakazakii* (13,8 %) and *Klebsiella pneumoniae* (9,2 %), followed by *Escherichia vulneris* (8,6 %), *Serratia ficaria* (5,9 %), *Escherichia hermanii* (3,9 %), *Pantoea* spp. 3 (3,9 %), *Escherichia coli* (2,6 %), *Pantoea* spp. 4 (2,6 %), *Pantoea* spp. 2 (2,0 %), *Leclercia adecarboxylata* (1,3 %), *Citrobacter youngae* (0,7 %), *Citrobacter* spp. (0,7 %), *Enterobacter amnigenus* (0,7 %), *Klebsiella oxytoca* (0,7 %) and *Serratia rubidaea* (0,7 %).

Salmonella were not detected.

Besides *Enterobacteriaceae*, the gram-negative bacterium *Acinetobacter baumannii* which is a known nosocomial pathogen was detected several times.

E. sakazakii was detected in 13,8 % (21 of 152) of the analyzed samples of PIF. The frequency of positive samples was 5,3 % (2 of 38) for PIF from birth on, 5,3 % (2 of 38) for follow-on formulae, 24,6 % (17 of 69) for complementary food and 0 % (0 of 7) in the case of dietetic food for special clinical purposes. With regard to *E. sakazakii* the current law demands the absence of *E. sakazakii* in PIF and dietetic food for infants under six months of life (order (EG) 2073/2005 and order (EG) 1441/2007). Therefore 5,3 % of the analyzed PIF did not comply with legal requirements with regard to *E. sakazakii*.

The quantitative levels of *Enterobacteriaceae* in PIF were relatively low. 78 % of the *Enterobacteriaceae*-positive samples were contaminated with less than 1 cfu/100 g, 15 % between 1 and 5 cfu/100 g and 7 % with more than 5 cfu/100 g. Three of the latter group were contaminated at ≥ 110 cfu/100 g, two of them even contained *E. sakazakii*.

The results of this study show that PIF from the German market is frequently contaminated with *Enterobacteriaceae* - including *E. sakazakii* - however at low levels. In relation to the consumption frequency of PIF, the frequency of infectious diseases in infants is low. The risk of infection may increase in case of additional mistakes during preparation and handling of the reconstituted product.

8 LITERATURVERZEICHNIS

ADAMSON, D.H. und J.R. ROGERS (1981):

Enterobacter sakazakii meningitis with sepsis

Clin. Microbiol. Newsl. **3**, 19-20

ALDOVÁ, E., O. HAUSNER und R. POSTUPA (1983):

Tween-esterase activity in *Enterobacter sakazakii*

Zbl. Bakt. Hyg. [A] **256**, 103-108

ALLER, S.C. und M.J. CHUSID (2002):

Citrobacter koseri pneumonia and meningitis in an infant

J. Infect. **45**, 65-67

ARREDONDO-GARCÍA, J.L., R. DÍAZ-RAMOS, F. SOLÓRZANO-SANTOS, I.E. SOSA-GONZÁLEZ und M. BELTRÁN-ZÚÑIGA (1992):

Neonatal septicaemia due to *K. pneumoniae*. Septicaemia due to *Klebsiella pneumoniae* in newborn infants. Nosocomial outbreak in an intensive care unit

Rev. Latinoam. Microbiol. **34**, 11-16

ARSENI, A., E. MALAMOU-LADAS, C. KOUTSIA, M. XANTHOU und E. TRIKKA (1987):

Outbreak of colonization of neonates with *Enterobacter sakazakii*

J. Hosp. Infect. **9**, 143-150

AWSARE, S.V. und M. LILLO (1991):

A case report of *Escherichia vulneris* urosepsis

Rev. Infect. Dis. **13**, 1247-1248

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

Enterobacter sakazakii infection in the newborn

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

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

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

Pediatrics **25**, 65-70

BIERING, G., S. KARLSSON, N.C. CLARK, K.E. JÓNSDÓTTIR, P. LÚDVÍGSSON und O. STEINGRÍMSSON (1989):

Three cases of neonatal meningitis caused by *Enterobacter sakazakii* in powdered milk

J. Clin. Microbiol. **27**, 2054-2056

BLOCK, C., O. PELEG, N. MINSTER, B. BAR-OZ, A. SIMHON, I. ARAD und M. SHAPIRO (2002):

Cluster of neonatal infections in Jerusalem due to unusual biochemical variant of *Enterobacter sakazakii*

Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. **21**, 613-616

- BONACORSI, S. und E. BINGEN (2005):
Molecular epidemiology of *Escherichia coli* causing neonatal meningitis
Int. J. Med. Microbiol. **295**, 373-381
- BONADIO, W.A., D. MARGOLIS und M. TOVAR (1991):
Enterobacter cloacae bacteremia in children: a review of 30 cases in 12 years
Clin. Pediatr. **30**, 310-313
- BORNEMANN, R., D.M. ZERR, J. HEATH, J. KOEHLER, M. GRANDJEAN,
R. PALLIPAMU und J. DUCHIN (2002):
An outbreak of *Salmonella* serotype Saintpaul in a children's hospital
Infect. Control Hosp. Epidemiol. **23**, 671-676
- BOWEN, A.B. und C.R. BRADEN (2006):
Invasive *Enterobacter sakazakii* disease in infants
Emerging Infect. Dis. **12**, 1185-1189
- BRÄUNIG, J. und E. BARTELT (2004):
Hygieneprobleme bei der Ernährung von Säuglingen und Kleinkindern aus
lebensmittelhygienischer Sicht am Beispiel von Milchpulver und Tee
http://www.bfr.bund.de/cm/232/hygieneprobleme_bei_der_ernaehrung_von_saeuglingen_und_kleinkindern_aus_lebensmittelhygienischer_sicht_am_beispiel_von_milchpulver_und_tee.pdf (Stand 02.12.2008)
- BREEUWER, P., A. LARDEAU, M. PETERZ und H.M. JOOSTEN (2003):
Desiccation and heat tolerance of *Enterobacter sakazakii*
J. Appl. Microbiol. **95**, 967-973
- BRENNER, D.J., A.C. MCWHORTER, J.K. LEETE KNUTSON und
A.G. STEIGERWALT (1982):
Escherichia vulneris: a new species of *Enterobacteriaceae* associated with human wounds
J. Clin. Microbiol. **15**, 1133-1140
- BRENNER, D.J. und J.J. FARMER III (2005):
Family I. *Enterobacteriaceae*
In: Brenner, D.J., N.R. Krieg und J.T. Staley (Hrsg.): *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Volume Two: The Protobacteria Part B: The Gammaproteobacteria*
Springer, New York, USA
- BROUARD, C., E. ESPIÉ, F.-X. WEILL, A. KÉROUANTON, A. BRISABOIS,
A.-M. FORGUE, V. VAILLANT und H. DE VALK (2007):
Two consecutive large outbreaks of *Salmonella enterica* Serotype Agona infections in
infants linked to the consumption of powdered infant formula
Pediatr. Infect. Dis. J. **26**, 148-152
- BÜLTE, M. (2004):
Enterovirulente *Escherichia coli* (EVEC)
In: Sinell, H.-J. (Hrsg.): *Einführung in die Lebensmittelhygiene*
4. Auflage, Parey Verlag, Stuttgart, Deutschland, S. 33-37

BÜYÜKYAVUZ, B.I., A.K. ADILOGLU, S. ONAL, S.E. CUBUKCU und H. CETIN (2006):

Finding the sources of septicemia at a neonatal intensive care unit: newborns and infants can be contaminated while being fed.

Jpn. J. Infect. Dis. **59**, 213-215

BURDETTE, J., H. und C. SANTOS (2000):

Enterobacter sakazakii brain abscess in the neonate: the importance of neuroradiologic imaging

Pediatr. Radiol. **30**, 33-34

CARNEIRO L.A., A.P. SILVA, V.L. MERQUIOR und M.L. QUEIROZ (2003):

Antimicrobial resistance in gram-negative bacilli isolated from infant formulas

FEMS Microbiol. Lett. **228**, 175-179

CASOLARI, C., M. PECORARI, G. FABIO, S. CATTANI, C. VENTURELLI, L. PICCININI, M.G. TAMASSIA, W. GENNARI, A.M.T. SABBATINI, G. LEPORATI, P. MARCHEGIANO, F. RUMPIANESI und F. FERRARI (2005):

A simultaneous outbreak of *Serratia marcescens* and *Klebsiella pneumoniae* in a neonatal intensiv care unit

J. Hosp. Infect. **61**, 312-320

CDC, Centers for Disease Control and Prevention (1993):

Salmonella serotype Tennessee in powdered milk products and infant formula – Canada and United States, 1993

MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep. **42**, 516-517

CDC, Centers for Disease Control and Prevention (2002):

Enterobacter sakazakii infections associated with the use of powdered infant formula – Tennessee, 2001

MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep. **51**, 298-300

CDC, Centers for Disease Control and Prevention (2004):

FoodNet Annual Report, 2002

www.cdc.gov/foodnet/annual/2002/2002AnnualReport_tables&graphs.pdf

(Stand 02.12.2008)

CDC, Centers for Disease Control and Prevention, unpublished data

aus: FAO/WHO (2006):

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

<http://www.who.int/foodsafety/publications/micro/mra10/en/> (Stand 02.12.2008)

CHAUDHURY, A., G. NATH, A. TIKOO und S.C. SANYAL (1999):

Enteropathogenicity and antimicrobial susceptibility of new *Escherichia* spp.

J. Diarrhoeal Dis. Res. **17**, 85-87

CLARK, N.C., B.C. HILL, C.M. O'HARA, O. STEINGRIMSSON und R.C. COOKSEY (1990):

Epidemiologic typing of *Enterobacter sakazakii* in two neonatal nosocomial outbreaks
Diagn. Microbiol. Infect. Dis. **13**, 467-472

CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION, CAC/RCP 21-1979:

Recommended international code of hygienic practice for foods for infants and children
http://www.codexalimentarius.net/web/standard_list.jsp (Stand 02.12.2008)

CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION, CODEX STAN 156-1987:

Codex Standard for follow-up formula
http://www.codexalimentarius.net/web/standard_list.jsp (Stand 02.12.2008)

COIGNARD, B. und V. VAILLANT (2006):

Infections à *Enterobacter sakazakii* associées à la consommation d'une préparation en poudre pour nourrissons. France, octobre à décembre 2004. Rapport d'investigation
Institut de Veille Sanitaire, Saint-Maurice, Frankreich, 2006
http://www.invs.sante.fr/publications/2006/infections_e_sakazakii/infections_e_sakazakii.pdf (Stand 02.12.2008)

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

Infections sévères à *Enterobacter sakazakii* chez des nouveau-nés ayant consommé une préparation en poudre pour nourrissons, France, octobre-décembre 2004
BEH No. **2-3**, 10-13

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

Postsurgical osteomyelitis caused by *Enterobacter sakazakii* in a healthy young man
J. Chemother. **19**, 94-96

DAVID, M.D., T.M.A. WELLER, P. LAMBERT und A.P. FRAISE (2006):

An outbreak of *Serratia marcescens* on the neonatal unit: a tale of two clones
J. Hosp. Infect. **63**, 27-33

DE CHAMPS, C., S. LE SEAUX, J.J. DUBOST, S. BOISGARD, B. SAUVEZIE und J. SIROT (2000):

Isolation of *Pantoea agglomerans* in two cases of septic monoarthritis after plant thorn and wood splinter injuries
J. Clin. Microbiol. **38**, 460-461

DERZELLE, S. und F. DILASSER (2006):

A robotic DNA purification protocol and real-time PCR for the detection of *Enterobacter sakazakii* in powdered infant formulae
BMC Microbiol. **6**:100

DGKJ, Deutsche Gesellschaft für Kinderheilkunde und Jugendmedizin (2004):

Hinweise zur Zubereitung und Handhabung von Säuglingsnahrungen
www.dgkj.de/453.98.html (Stand 02.12.2008)

DONOWITZ, L.G., F.J. MARIK, K.A. FISHER und R.P. WENZEL (1981):
Contaminated breast milk: A source of *Klebsiella* bacteremia in a newborn intensive care unit
Rev. Infect. Dis. **3**, 716-720

DRANCOURT, M., C. BOLLET, A. CARTA und P. ROUSSELIER (2001):
Phylogenetic analysis of *Klebsiella* species delineate *Klebsiella* and *Raoultella* gen. nov., with description of *Raoultella ornithinolytica* comb. nov., *Raoultella terrigena* comb. nov. and *Raoultella planticola* comb. nov.
Int. J. Syst. Evol. Microbiol. **51**, 925-932

EDELSON-MAMMEL, S.G. und R.L. BUCHANAN (2004):
Thermal inactivation of *Enterobacter sakazakii* in rehydrated infant formula
J. Food Protect. **67**, 60-63

EFSA, European Food Safety Authority (2004):
Opinion of the scientific panel on biological hazards on a request from the Commission related to the microbiological risks in baby formulae and follow-on formulae
The EFSA Journal **113**, 1-35

EFSA, European Food Safety Authority (2007):
Scientific opinion of BIOHAZ panel on the request from the Commission for review of the opinion on microbiological risks in infant formulae and follow-on formulae with regard to *Enterobacteriaceae* as indicators
The EFSA Journal **444**, 1-14

EG-RICHTLINIE 1999/21/EG DER KOMMISSION vom 25. März 1999 über diätetische Lebensmittel für besondere medizinische Zwecke
Amtsblatt der Europäischen Gemeinschaften, **L 91**, 29-36

EG-RICHTLINIE 2006/125/EG DER KOMMISSION vom 5. Dezember 2006 über Getreidebeikost und andere Beikost für Säuglinge und Kleinkinder
Amtsblatt der Europäischen Gemeinschaften, **L 339**, 16-35

EMERY, C.L. und L.A. WEYMOUTH (1997):
Detection and clinical significance of extended-spectrum beta-lactamases in a tertiary-care medical center
J. Clin. Microbiol. **35**, 2061-2067

ESPGHAN, European Society of Paediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition (2004):
Preparation and handling of powdered infant formula: A commentary by the ESPGHAN Committee of Nutrition
J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr. **39**, 320-322

ESPIÉ, E., F.-X. WEILL, C. BROUARD, I. CAPEK, G. DELMAS, A.M. FORGUES, F. GRIMONT und H. DE VALK (2005):
Nationwide outbreak of *Salmonella enterica* serotype agona infections in infants in France, linked to infant milk formula, investigations ongoing
Euro. Surveill. **10**, 54

ESTUNINGSIH, S., C. KRESS, A.A. HASSAN, Ö. AKINEDEN, E. SCHNEIDER und E. USLEBER (2006):

Enterobacteriaceae in dehydrated powdered infant formula manufactured in Indonesia and Malaysia

J. Food Prot. **69**, 3013-3017

FANG, C.T., S.-Y. LAI, W.-C. YI, P.-R. HSUEH, K.-L. LIU und S.-C. CHANG (2007):

Klebsiella pneumoniae genotype K1: an emerging pathogen that causes septic ocular or central nervous system complications from pyogenic liver abscess

Clin. Infect. Dis. **45**, 284–293

FAO/WHO (2004):

Enterobacter sakazakii and other microorganisms in powdered infant formula: meeting report, Microbiological Risk Assessment Series 6

<http://www.who.int/foodsafety/publications/micro/mra6/en/> (Stand 02.12.2008)

FAO/WHO (2006):

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

<http://www.who.int/foodsafety/publications/micro/mra10/en/> (Stand 02.12.2008)

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

Enterobacter sakazakii: a new species of “*Enterobacteriaceae*” isolated from clinical specimens

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

FDA, Food and Drug Administration (2002):

Isolation and enumeration of *Enterobacter sakazakii* from dehydrated powdered infant formula

<http://vm.cfsan.fda.gov/~comm/mmesakaz.html> (Stand 02.12.2008)

FDA, Food and Drug Administration (2003 a):

Contaminants and natural toxicants subcommittee meeting.

Enterobacter sakazakii contamination in powdered infant formula. Draft charge and questions.

www.fda.gov/OHRMS/DOCKETS/AC/03/minutes/3939m1_summary%20Minutes.doc (Stand 02.12.2008)

FDA, Food and Drug Administration (2003 b):

FDA field survey of powdered formula manufacturing

http://www.fda.gov/ohrms/dockets/ac/03/slides/3939s1_Zink.ppt (Stand 02.12.2008)

FINNSTRÖM, O., B. ISAKSSON, S. HAEGGMAN und L.G. BURMAN (1998):

Control of an outbreak of a highly beta-lactam-resistant *Enterobacter cloacae* strain in a neonatal special care unit

Acta Paediatr. **87**, 1070-1074

- FLATAUER, F.E. und M.A. KHAN (1978):
Septic arthritis caused by *Enterobacter agglomerans*
Arch. Intern. Med. **138**, 788
- FLEISCH, F., U. ZIMMERMANN-BAER, R. ZBINDEN, G. BISCHOFF,
R. ARLETTAZ, K. WALDVOGEL, D. NADAL und C. RUEF (2002):
Three consecutive outbreaks of *Serratia marcescens* in a neonatal intensive care unit
CID **34**, 767-773
- FLORES, C., I. MAGUILNIK, E. HADLICH und L.Z. GOLDANI (2003):
Microbiology of choledochal bile in patients with choledocholithiasis admitted to a tertiary
hospital
J. Gastroenterol. Hepatol. **18**, 333-336
- FORSYTH, J.R.L., N.M. BENNETT, S. HOGBEN, E.M.S. HUTCHINSON, G. ROUCH,
A. TAN und J. TAPLIN (2003):
The year of the *salmonella* seekers – 1977
Aust. New Zealand J. Public Health **27**, 385-389
- FRIEDEMANN, M. (2007):
Enterobacter sakazakii in food and beverages (other than infant formula and milk powder)
Int. J. Food Microbiol. **116**, 1-10
- GAKUYA, F.M., M.N. KYULE, P.B. GATHURA und S. KARIUKI (2001):
Antimicrobial resistance of bacterial organisms isolated from rats
East Afr. Med. J. **78**, 646-649
- GALLAGHER, P.G. und W.S. BALL (1991):
Cerebral infarctions due to CNS infection with *Enterobacter sakazakii*
Pediatr. Radiol. **21**, 135-136
- GRAHAM, D.R., R.L. ANDERSON, F.E. ARIEL, N.J. EHRENKRANZ, B. ROWE,
H.R. BOER und R.E. DIXON (1981):
Epidemic nosocomial meningitis due to *Citrobacter diversus* in neonates
J. Infect. Dis. **144**, 203-209
- GUILLAUME-GENTIL, O., V. SONNARD, M.C. KANDHAI, J.D. MARUGG und
H. JOSTEN (2005):
A simple and rapid cultural method for detection of *Enterobacter sakazakii* in
environmental samples
J. Food Prot. **68**, 64-69
- GUPTA, A., P. DELLA-LATTA, B. TODD, P. SAN GABRIEL, J. HAAS, F. WU,
D. RUBENSTEIN und L. SAIMAN (2004):
Outbreak of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* in a
neonatal intensive care unit linked to artificial nails
Infect. Control Hosp. Epidemiol. **25**, 210-215

HABSAH, H., M. ZEEHAIDA, H. VAN ROSTENBERGHE, R. NORAIDA, W.I. WAN PAUZI, I. FATIMAH, A.R. ROSLIZA, N.Y.N. SHARIMAH und H. MAIMUNAH (2005):

An outbreak of *Pantoea* spp. in a neonatal intensive care unit secondary to contaminated parenteral nutrition

J. Hosp. Infect. **61**, 213-218

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

Isolation of *Enterobacter sakazakii* from midgut of stomoxys calcitrans

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

HARBARTH, S., P. SUDRE, S. DHARAN, M. CADENAS und D. PITTET (1999):

Outbreak of *Enterobacter cloacae* related to understaffing, overcrowding, and poor hygiene practices

Infect. Control Hosp. Epidemiol. **20**, 598-603

HASSAN, A.A., Ö. AKINEDEN, C. KRESS, S. ESTUNINGSIH, E. SCHNEIDER und E. USLEBER (2007):

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

Int. J. Food Microbiol. **116**, 214-220

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

Enterobacter sakazakii bacteremia in an adult

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

HEUVELINK, A.E., M. AHMED, F.D. KODDE, J.T.M. ZWARTKRUIS-NAHUIS und E. DE BOER (2001):

Enterobacter sakazakii in melkpoeder

Keuringsdienst van Waren Oost, Projektnummer: OT 0110

HEUVELINK, A.E., C. VAN HEERWAARDEN, J.T.M. ZWARTKRUIS-NAHUIS und E. DE BOER (2005):

Handhavingsactie *Enterobacter sakazakii* in zuigelingenvoeding 2004

Keuringsdienst van Waren Oost, Projektnummer OT 04 H 005 13

HILL, H.R., C.E. HUNT und J.M. MATSEN (1974):

Nosocomial colonization with *Klebsiella*, type 26, in a neonatal intensive-care unit associated with an outbreak of sepsis, meningitis, and necrotizing enterocolitis

J. Pediatr. **85**, 415-419

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

In: Hensyl, W.R. (Hrsg.): Bergey's Manual of Determinative Bacteriology

9. Auflage, Williams & Wilkins, Baltimore, Maryland, USA

HORII, T., Y. SUZUKI, T. KIMURA, T. KANNO und M. MAEKAWA (2001):

Intravenous catheter-related septic shock caused by *Staphylococcus sciuri* and *Escherichia vulneris*

Scand. J. Infect. Dis. **33**, 930-932

HYLANDER, M.A., D.M. STROBINO und R. DHANIREDDY (1998):
Human milk feedings and infection among very low birth weights infants
Pediatrics **102** (3), e38

IBFAN (2002):

Wie sicher ist Fertignahrung für Säuglinge? Pressemitteilung zum Tod eines einwöchigen,
mit Fertignahrung ernährten Säuglings in Belgien
<http://www.ibfan.org/german/news/press/press10may02-de.html> (Stand 02.12.2008)

ICMSF, International Commission for Microbiological Specifications for Foods (2002):
Microorganisms in food 7: Microbiological testing in food safety management
Kluwer Academic/Plenum Publishers

ISO (2004), International Standard Organisation 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
International Standard Organisation, Genf, Schweiz

ISO (2001), International Standard Organisation 6785:2001:

Milk and milk products - detection of *Salmonella* spp.
International Standard Organisation, Genf, Schweiz

ISO (2001), International Standard Organisation 8261:2001:

Milk and milk products - general guidance for the preparation of test samples, initial
suspensions and decimal dilutions for microbiological examination
International Standard Organisation, Genf, Schweiz

ISO/TS 22964:2006(E), IDF/RM 210:2006(E):

Milk and milk products - detection of *Enterobacter sakazakii*
International Standard Organisation, Genf, Schweiz

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

Risk profile of *Enterobacter sakazakii*, an emergent pathogen associated with infant milk
formula
Trends in Food Science & Technology **14**, 443-454

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

Isolation of *Enterobacter sakazakii* and other *Enterobacteriaceae* from powdered infant
formula milk and related products
Food Microbiol. **21**, 771-777

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

A selective differential medium for *Enterobacter sakazakii*, a preliminary study
Int. J. Food Microbiol. **96**, 133-139

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

The growth profile, thermotolerance and biofilm formation of *Enterobacter sakazakii*
grown in infant formula milk
Lett. Appl. Microbiol. **38**, 378-382

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

Comparison of media for the isolation of *Enterobacter sakazakii*
Appl. Environ. Microbiol. **73**, 48-52

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

The taxonomy of *Enterobacter sakazakii*: proposal of a new genus *Cronobacter* gen. nov. and descriptions of *Cronobacter sakazakii* comb. nov. *Cronobacter sakazakii* subsp. *sakazakii*, comb. nov., *Cronobacter sakazakii* subsp. *malonaticus* subsp. nov., *Cronobacter turicensis* sp. nov., *Cronobacter muytjensii* sp. nov., *Cronobacter dublinensis* sp. nov. and *Cronobacter* genomospecies I
BMC Evol. Biol. **7**:64

JANDA, J.M. und S.L. ABBOTT (2006):

The genus *Hafnia*: from soup to nuts
Clin. Microbiol. Rev. **19**, 12-28

JIMENEZ, E.B. und C. GIMENEZ (1982):

Septic shock due to *Enterobacter sakazakii*
Clin. Microbiol. Newsl. **4**, 30

JØKER, R.N., T. NØRHOLM und K.E. SIBONI (1965):

A case of neonatal meningitis caused by a yellow *Enterobacter*
Dan. Med. Bull. **12**, 128-130

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

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

KERSTING, M., U. ALEXY, W. SICHERT-HELLERT, F. MANZ und G. SCHÖCH
(1998):

Measured consumption of commercial infant food products in german infants: results from the DONALD study
Lippincott Williams & Wilkins, Inc. **27**, 547-552

KIDA, Y., H. INOUE, T. SHIMIZU und K. KUWANO (2007):

Serratia marcescens serralyisin induces inflammatory responses through protease-activated receptor
Infect. Immun. **75**, 164-174

KIM, K.-P., J. KLUMPP und M.J. LOESSNER (2007):

Enterobacter sakazakii bacteriophages can prevent bacterial growth in reconstituted infant formula
Int. J. Food Microbiol. **115**, 195-203

KLEER, J. (2004):

Salmonella

In: Sinell, H.-J. (Hrsg.): Einführung in die Lebensmittelhygiene
4. Auflage, Parey Verlag, Stuttgart, Deutschland, S. 19-33

KLEIMAN, M.B., S.D. ALLEN, P. NEAL und J. REYNOLDS (1981):
Meningoencephalitis and compartmentalization of the cerebral ventricles caused by
Enterobacter sakazakii
J. Clin. Microbiol. **14**, 352-354

KLINE, M.W. und S.L. KAPLAN (1987):
Citrobacter diversus and neonatal brain abscess
Pediatr. Neurol. **3**, 178-180

KRATZ, A., D. GREENBERG, Y. BARKI, E. COHEN und M. LIFSHITZ (2003):
Pantoea agglomerans as a cause of septic arthritis after palm tree thorn injury; case report
and literature review
Arch. Dis. Child. **88**, 542-544

KRESS, C., A.A. HASSAN, Ö. AKINEDEN, E. SCHNEIDER, S. ESTUNINGSIH,
H. BECKER und E. USLEBER (2005):
Enterobacter sakazakii in Trockenerzeugnissen auf Milchbasis
46. Arbeitstagung des Arbeitsgebietes Lebensmittelhygiene der Deutschen
Veterinärmedizinischen Gesellschaft (27.-30. September 2005 in Garmisch-Partenkirchen),
Tagungsbericht

KUBOYAMA, R.H., H.B. DE OLIVEIRA und M.L. MORETTI-BRANCHINI (2003):
Molecular epidemiology of systemic infection caused by *Enterobacter cloacae* in a high-
risk neonatal intensive care unit
Infect. Control Hosp. Epidemiol. **24**, 490-494

KUZINA, L.V., J.J. PELOQUIN, D.C. VACEK und T.A. MILLER (2001):
Isolation and identification of bacteria associated with adult laboratory Mexican fruit flies,
Anastrepha ludens (Diptera: Tephritidae)
Curr. Microbiol. **42**, 290-294

LAI, K.K. (2001):
Enterobacter sakazakii infections among neonates, infants, children, and adults
Medicine **80**, 113-122

LAPORTE C., M.C. DEMACHY und C. THEVENIN-LEMOINE (2002):
Tibial osteitis caused by *Pantoea agglomerans* after open grade IIIB tibial shaft fracture
Rev. Chir. Orthop. Reparatrice Appar. Mot. **88**, 625-627

LAWLOR, M.S., C. O'CONNOR und V.L. MILLER (2007):
Yersiniabactin is a virulence factor for *Klebsiella pneumoniae* during pulmonary infection
Infect. Immun. **75**, 1463-1472

LECOUR, H., A. SEARA, J. CORDEIRO und M. MIRANDA (1989):
Treatment of childhood bacterial meningitis
Infection **17**, 343-346

- LEHMACHER, A. und M. FIEGEN (2005):
Nachweis, Typisierung und rechtliche Beurteilung von *Enterobacter sakazakii* in Säuglingsnahrung
Abstract 7. Fachsymposium Lebensmittelmikrobiologie der VAAM-Fachgruppe Lebensmittelmikrobiologie in Zusammenarbeit mit der Fachgruppe der DGHM, 6.-8. April, Seeon, Deutschland
- LEHNER, A., T. TASARA und R. STEPHAN (2004):
16S rRNA gene based analysis of *Enterobacter sakazakii* strains from different sources and development of a PCR assay for identification
BMC Microbiol. **4**, 43
- LEHNER, A.K. RIEDEL, L. EBERL P. BREEUWER, B. DIEP und R. STEPHAN (2005):
Biofilm formation, extracellular polysaccharide production, and cell-to-cell signaling in various *Enterobacter sakazakii* strains: aspects promoting environmental persistence
J. Food Prot. **68**, 2287-2294
- LEHNER, A., K. RIEDEL, T. RATTEI, A. RUEPP, D. FRISHMAN, P. BREEUWER, B. DIEP, L. EBERL und R. STEPHAN (2006):
Molecular characterization of the α -glucosidase activity in *Enterobacter sakazakii* reveals the presence of a putative gene cluster for palatinose metabolism
Syst. Appl. Microbiol. **29**, 609-625
- LEUSCHNER, R.G.K., F. BAIRD, B. DONALD und L.J. COX (2004):
A medium for the presumptive detection of *Enterobacter sakazakii* in infant formula
Food Microbiol. **21**, 527 -533
- LEVINE, W.N. und M.J. GOLDBERG (1994):
Escherichia vulneris osteomyelitis of the tibia caused by a wooden foreign body
Orthop. Rev. **23**, 262-265
- LEWIS, D.A., P.M. HAWKEY, J.A. WATTS, D.C. SPELLER, R.J. PRIMAVESI, P.J. FLEMING und T.L. PITT (1983):
Infection with netilmicin resistant *Serratia marcescens* in a special care baby unit
Br. Med. J. **287**, 1701-1705
- LIU, S.-C., H.-S. LEU, M.-Y. YEN, P.-I. LEE und M.-C. CHOU (2002):
Study of an outbreak of *Enterobacter cloacae* sepsis in a neonatal intensive care unit: The application of epidemiologic chromosome profiling by pulsed-field gelelectrophoresis
AJIC **30**, 381-385
- LIU Y., Q. GAO, X. ZHANG, Y. HOU, J. YANG und X. HUANG. (2006):
PCR and oligonucleotide array for detection of *Enterobacter sakazakii* in infant formula
Mol. Cell. Probes **20**, 11-7
- LLANOS, A.R., M.E. MOSS, M.C. PINZÒN, T. DYE, R.A. SINKIN und J.W. KENDIG (2002):
Epidemiology of neonatal necrotising enterocolitis: a population-based study
Paediatr. Perinat. Epidemiol. **16**, 342-349

- LUCAS, A. und T.J. COLE (1990):
Breast milk and neonatal necrotising enterocolitis
Lancet **336**, 1519-1523
- MALORNY, B. und M. WAGNER (2005):
Detection of *Enterobacter sakazakii* strains by real-time PCR
J. Food Prot. **68**, 1623-1627
- MANGE, J.-P., R. STEPHAN, N. BOREL, P. WILD, K.S. KIM, A. POSPISCHIL und
A. LEHNER (2006):
Adhesive properties of *Enterobacter sakazakii* to human epithelial and brain microvascular
endothelial cells
BMC Microbiol. **6**:58
- MCCORMACK, R.C. und C.M. KUNIN (1966):
Control of a single source nursery epidemic due to *Serratia marcescens*
Pediatrics **37**, 750-755
- MESSERSCHMIDT, A., D. PRAYER, M. OLISCHAR, A. POLLAK und
R. BIRNBACHER (2004):
Brain abscesses after *Serratia marcescens* infection on a neonatal intensive care unit:
differences on serial imaging
Neuroradiology **46**, 148-152
- MIHATSCH, W.A., A.R. FRANZ und F. POHLANDT (2002):
Frühzeitige enterale Ernährung bei sehr kleinen Frühgeborenen ist nicht mit
nekrotisierender Enterokolitis assoziiert
Monatsschr. Kinderheilkd. **150**, 724-733
- MINISTRY OF HEALTH, New Zealand (2005):
Inquiry into actions of sector agencies in relation to contamination of infant formula with
Enterobacter sakazakii
www.moh.govt.nz/moh.nsf/0/526cb4a064b49a31cc257042007c4ef3?OpenDocument
(Stand 02.12.2008)
- MOHANTY, S., S.P. CHANDRA, B. DHAWAN, A. KAPIL und B.K. DAS (2005):
Meningitis due to *Escherichia vulneris*
Neurol. India **53**, 122-123
- MONROE, P.W. und W.L. TIFT (1979):
Bacteremia associated with *Enterobacter sakazakii* (yellow-pigmented *Enterobacter*
cloacae)
J. Clin. Microbiol. **10**, 850-851
- MRAMBA, F., A.B. BROCE und L. ZUREK (2007):
Vector competence of stable flies, *Stomoxys calcitrans* L. (Diptera: Muscidae), for
Enterobacter sakazakii
J. Vector Ecol. **32**, 134-139

MULLANE N.R., D. DRUDY, P. WHYTE, M. O'MAHONY, A.G.M. SCANNELL, P.G. WALL und S. FANNING (2006):

Enterobacter sakazakii: biological properties and significance in dried infant milk formula (IMF) powder

Int. J. Dairy Technol. **59**, 102-111

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

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

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

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

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

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

NAIR, M.K., J. JOY und K.S. VENKITANARAYANAN (2004):

Inactivation of *Enterobacter sakazakii* in reconstituted infant formula by monocaprylin

J. Food Prot. **67**, 2815-2819

NAQVI, S.H., M.A. MAXWELL und L.M. DUNKLE (1985):

Cefotaxime therapy of neonatal gram-negative bacillary meningitis

Pediatr. Infect. Dis. **4**, 449-502

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

Incidence, survival, and growth of *Enterobacter sakazakii* in infant formula

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

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

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

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

NAZAROWEC-WHITE, M., R.C. MCKELLAR und P. PIYASENA (1999):

Predictive modelling of *Enterobacter sakazakii* inactivation in bovine milk during high-temperature short-time pasteurization

Food Res. Intern. **32**, 375-379

NORIEGA, F.R., K.L. KOTLOFF, M.A. MARTIN und R.S. SCHWALBE (1990):

Nosocomial bacteremia caused by *Enterobacter sakazakii* and *Leuconostoc mesenteroides* resulting from extrinsic contamination of infant formula

Pediatr. Infect. Dis. J. **9**, 447-449

OH, S.W. und D.H. KANG (2004):

Fluorogenic selective and differential medium for isolation of *Enterobacter sakazakii*

Appl. Environ. Microbiol. **70**, 5692-5694

OKADA, T., E. YOKOTA und I. MATSUMOTO (2002):

Community acquired sepsis by *Serratia rubidaea*

Kansenshogaku Zasshi **76**, 109-112

OLEGINSKI, T.P., D.C. BUSH und T.M. HARRINGTON (1991):
Plant thorn synovitis: an uncommon cause of monoarthritis
Semin. Arthritis Rheum. **21**, 40-46

ONGRÁDI, J. (2002):
Vaginal infection by *Enterobacter sakazakii*
Sex. Transm. Infect. **78**, 467-467

OSAILI, T.M., R.R. SHAKER, A.S. ABU AL-HASAN, M.M. AYYASH und
E.M. MARTIN (2007):
Inactivation of *Enterobacter sakazakii* in infant milk formula by gamma irradiation:
determination of D₁₀-value
J. Food Sci. **72**, M85-M88

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

PARK, J.-K., W.-S. SEOK, B.J. CHOI, H.M. KIM, B.K. LIM, S.-S. YOON, S. KIM, Y.-
S. KIM und J.Y. PARK (2004):
Salmonella enterica Serovar London infections associated with consumption of infant
formula
Yonsei Med. J. **45**, 43-48

PATON, A.W. und J.C. PATON (1996):
Enterobacter cloacae producing a Shiga-like toxin
II-related cytotoxin associated with a case of hemolytic-uremic syndrome
J. Clin. Microbiol. **34**, 463-465

PÉREZ, B.A., B.F. COLOMER, D.C. COTALLO und J.B.L. SASTRE (2004):
Sepsis nosocomial por *Hafnia alvei* en una unidad de cuidados intensivos neonatales
An. Pediatr. (Barc.) **60**, 271-273

PIEN, F.D., S. SHRUM, J.M. SWENSON, B.C. HILL, C. THORNSBERRY und
J.J. FARMER III (1985):
Colonization of human wounds by *Escherichia vulneris* and *Escherichia hermannii*
J. Clin. Microbiol. **22**, 283-285

PÖHN, H.-P. (1982):
Salmonellose-Überwachung beim Menschen in der Bundesrepublik Deutschland.
Jahresberichte 1978-1980 des Zentralen Überwachungsprogramms für Salmonellosen des
Bundesgesundheitsamtes
SozEp-Berichte Nr. 3/1982

PRASAD, G.A., P.G. JONES, J. MICHAELS, J.S. GARLAND und C.R. SHIVPURI
(2001):
Outbreak of *Serratia marcescens* infection in a neonatal intensive care unit
Infect. Control Hosp. Epidemiol. **22**, 303-305

PRIBYL, C., R. SALZER, J. BESKIN, R.J. HADDAD, B. POLLOCK, R. BEVILLE, B. HOLMES und W.J. MOGABGAB (1985):

Aztreonam in the treatment of serious orthopedic infections
Am. J. Med. **78**, 51-56

PSCHYREMBEL (1998):

Klinisches Wörterbuch
258. Auflage, de Gruyter, Berlin, Deutschland

RAE, C.E., A. FAZIO und J.P. ROSALES (1991):

Successful treatment of neonatal *Citrobacter freundii* meningitis with ceftriaxone
DICP **25**, 27-29

RAGHAV. M. und P.K. AGGARWAL (2007):

Purification and characterization of *Enterobacter sakazakii* enterotoxin
Can. J. Microbiol. **53**, 750-755

REINA, J., F. PARRAS, S. GIL, F. SALVA und P. ALOMAR (1989):

Human infections caused by *Enterobacter sakazakii*. Microbiologic considerations
Enferm. Infecc. Microbiol. Clin. **7**, 147-150

RESTAINO, L., E.W. FRAMPTON, W.C. LIONBERG und R.J. BECKER (2006):

A chromogenic plating medium for the isolation and identification of *Enterobacter sakazakii* from foods, food ingredients, and environmental sources
J. Food Prot. **69**, 315-322

RIES, M., D. HARMS und J. SCHARF (1994):

Multiple cerebrale Infarzierungen mit resultierender multizystischer Encephalomalazie bei einem Frühgeborenen mit *Enterobacter sakazakii*-Meningitis
Klin. Padiatr. **206**, 184-186

ROBERT KOCH INSTITUT, Berlin (2007):

Infektionsepidemiologisches Jahrbuch meldepflichtiger Krankheiten für 2007
http://www.rki.de/cln_091/nn_504488/DE/Content/Infekt/Jahrbuch/jahrbuch__node.html?__nnn=true

RÖMERMANN, A., C. BÜRK, H. BECKER und E. MÄRTLBAUER (2003):

Nachweis von *Enterobacter sakazakii* in Säuglingsnahrung mittels PCR
In: 44. Tagung des Arbeitsgebietes Lebensmittelhygiene der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft e.V. (DVG), Garmisch-Partenkirchen, Tagungsbericht, S. 417-421

ROWE, B., N.T. BEGG, D.N. HUTCHINSON, H.C. DAWKINS, R.J. GILBERT, M. JACOB, B.H. HALES, F.A. RAE und M. JEPSON (1987):

Salmonella Ealing infections associated with consumption of infant dried milk
Lancet **2** (8564), 900-903

- RUIZ, J., M.L. NÚÑEZ, M.A. SEMPERE, J. DÍAZ und J. GÓMEZ (1995):
Systemic infections in three infants due to a lactose-fermenting strain of *Salmonella* Virchow
Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. **14**, 454-456
- RUSHDY, A.A., J.M. STUART, L.R. WARD, J. BRUCE, E.J. THRELFALL, P. PUNIA und J.R. BAILEY (1998):
National outbreak of *Salmonella* senftenberg associated with infant food
Epidemiol. Infect. **120**, 125-128
- SANDERS, W.E. und C.C. SANDERS (1997):
Enterobacter spp.: Pathogens poised to flourish at the turn of the century
Clin. Microbiol. Rev. **10**, 220-241
- SANJAQ, S. (2008):
Enterobacter sakazakii - Risikoprofil und Untersuchungen zum Nachweis in Säuglingsnahrungen
Diss. oec. troph. Gießen
WB Lauferweiler Verlag, Gießen, Deutschland
- SCHMIDT, H., M. MONTAG, J. BOCKEMUHL, 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
- SCVPH, Scientific Committee on Veterinary Measures relating to Public Health (2003):
Opinion relating to Public Health on *Salmonellae* in foodstuffs
http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scv/out66_en.pdf (Stand 02.12.2008)
- SEDAGHATIAN, M., P. RAMACHANDRAN und N. RASHID (2004):
Diffuse pneumocephalus caused by neonatal *Enterobacter cloacae* meningitis
Arch. Dis. Child. Fetal Neonatal Ed. **89**, F 324
- SEE, K. C., H.A. THAN und T. TANG (2007):
Enterobacter sakazakii bacteraemia with multiple splenic abscesses in a 75-year-old woman: a case report
Age and Ageing **36**, 595-596
- SELENIC, D., D.R. DODSON, B. JENSEN, M.J. ARDUINO, A. PANLILIO und L.K. ARCHIBALD (2003):
Enterobacter cloacae bloodstream infections in pediatric patients traced to a hospital pharmacy
Am. J. Health Syst. Pharm. **60**, 1440-1446
- SENANAYAKE, S.N., A. JADEER, G.S. TALAULIKAR und J. ROY (2006):
First reported case of dialysis-related peritonitis due to *Escherichia vulneris*
J. Clin. Microbiol. **44**, 4283-4284

SEO, K.H. und R.E. BRACKETT (2005):

Rapid, specific detection of *Enterobacter sakazakii* in infant formula using a real time PCR assay

J. Food Prot. **68**, 59-63

SHAKER, R., T. OSAILI, W. AL-OMARY, Z. JARADAT und M. AL-ZUBY (2007):

Isolation of *Enterobacter sakazakii* and other *Enterobacter* sp. from food and food production environments

Food Control **18**, 1241-1245

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

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

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

SINGH, B.R., Y. SINGH und A.K. TIWARI (1997):

Characterisation of virulence factors of *Serratia* strains isolated from foods

Int. J. Food Microbiol. **34**, 259-266

SMITH, P.J., D.S.K. BROOKFIELD, D.A. SHAW und J. GRAY (1984):

An outbreak of *Serratia marcescens* infection in a neonatal unit

Lancet **I**, 151-153

SONG, K.Y., K.H. SEO, G. THAMMASUVIMOL und R. BRACKETT (2005):

Development of selective media for detection *Enterobacter sakazakii* by using ferrioxamine E and alpha-glucosidase substrates

FDA Science Forum Poster Abstract: J-37

<http://www.cfsan.fda.gov/~frf/forum05/J-37.htm> (Stand 02.12.2008)

SPAULDING, A.C. und A.L. ROTHMAN (1996):

Escherichia vulneris as a cause of intravenous catheter-related bacteremia

Clin. Infect. Dis. **22**, 728-729

STAPPBERGER, K., S. WALTER, M.C. CLAROS, F.B. SPENCKER, W. KIESS, A.C. RODLOFF und C. VOGTMANN (2002):

Nosocomial neonatal outbreak of *Serratia marcescens* – analysis of pathogens by pulsed field gel electrophoresis and polymerase chain reaction

Infection **30**, 277-281

STRAUSSBERG, R., L. HAREL und J. AMIR (2001):

Long-term outcome of neonatal *Citrobacter koseri* (*diversus*) meningitis treated with imipenem/meropenem und surgical drainage

Infection **29**, 280-282

STRÖMQVIST, B., E. EDLUND und L. LIDGREN (1985):

A case of blackthorn synovitis

Acta Orthop. Scand. **56**, 342-343

- TEKKÖK, I.H., S.S. BAEESA, M.J. HIGGINS und E.C.G. VENTUREYRA (1996):
Abscedation of posterior fossa dermoid cysts
Child's Nerv. Syst. **12**, 318-322
- THRELFALL, E.J., L.R. WARD, M.D. HAMPTON, A.M. RIDLEY, B. ROWE,
D. ROBERTS, R.J. GILBERT, P. VAN SOMEREN, P.G. WALL und P. GRIMONT
(1998):
Molecular fingerprinting defines a strain of *Salmonella enterica* serotype Anatum
responsible for an international outbreak associated with formula-dried milk
Epidemiol. Infect. **121**, 289-293
- THURM, V. und B. GERICKE (1994):
Identification of infant food as a vehicle in a nosocomial outbreak of *Citrobacter freundii*:
epidemiological subtyping by allozyme, whole-cell protein and antibiotic resistance
J. Appl. Bacteriol. **76**, 553-558
- TINDALL, B.J., P.A.D. GRIMONT, G.M. GARRITY und J.P. EUZÉBY (2005):
Nomenclature and taxonomy of the genus *Salmonella*
Int. J. Syst. Evol. Microbiol. **55**, 521-524
- TOWNSEND, S., J.C. BARRON, C. LOC-CARRILLO und S. FORSYTHE (2007):
The presence of endotoxin in powdered infant formula milk and the influence of endotoxin
and *Enterobacter sakazakii* on bacterial translocation in the infant rat
Food Microbiol. **24**, 67-74
- TRESOLDI, A.T., M.C. PADOVEZE, P. TRABASSO, J.F.S. VEIGA, S.T.M. MARBA,
A. VON NOWAKONSKI und M.L.M. BRANCHINI (2000):
Enterobacter cloacae sepsis outbreak in a newborn unit caused by contaminated total
parenteral nutrition solution
Am. J. Infect. Control **28**, 258-261
- URMENYI, A.M. und A.W. FRANKLIN (1961):
Neonatal death from pigmented coliform infection
Lancet **1**, 313-315
- URSUA, P.R., M.J. UNZAGA, P. MELERO, I. ITURBURU, C. EZPELETA und
R. CISTERNA (1996):
Serratia rubidaea as an invasive pathogen
J. Clin. Microbiol. **34**, 216-217
- USERA, M.A., A. ECHEITA, A. ALADUEÑA, M.C. BLANCO, R. REYMUNDO,
M.I. PRIETO, O. TELLO, R. CANO, D. HERRERA und F. MARTINEZ-NAVARRO
(1996):
Interregional foodborne salmonellosis outbreak due to powdered infant formula
contaminated with lactose-fermenting *Salmonella* Virchow
Eur. J. Epidemiol. **12**, 377-381

USERA, M.A., A. RODRIGUEZ, A. ECHEITA und R. CANO (1998):

Multiple analysis of a foodborne outbreak caused by infant formula contaminated by an atypical *Salmonella* Virchow strain

Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. **17**, 551-555

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

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

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

VAN DIJK, Y., E.M. BIK, S. HOCHSTENBACH-VERNOOIJ, G.J. v. d. VLIST, P.H.M. SAVELKOUL, J.A. KAAAN und R.J.A. DIEPERSLOOT (2002):

Management of an outbreak of *Enterobacter cloacae* in a neonatal unit using simple preventive measures

J. Hosp. Infect. **51**, 21-26

VAN NIEROP, W.H., A.G. DUSE, R.G. STEWART, Y.R. BILGERI und H.J. KOORNHOF (1998):

Molecular epidemiology of an outbreak of *Enterobacter cloacae* in the neonatal intensive care unit of a provincial hospital in Gauteng, South Africa

J. Clin. Microbiol. **36**, 3085-3087

VAN OGTROP, M.L., D. VAN ZOEREN-GROBBEN, E.M.A. VERBAKEL-SALOMONS und C.P.A. VAN BOVEN (1997):

Serratia marcescens infections in neonatal departments: description of an outbreak and review of the literature

J. Hosp. Infect. **36**, 95-103

VAN ROSTENBERGHE, H., R. NORAIDA, W.I. WAN PAUZI, H. HABSAH, M. ZEEHAIDA, A.R. ROSLIZA, I. FATIMAH, N.Y. NIK SHARIMAH und H. MAIMUNAH(2006):

The clinical picture of neonatal infection with *Pantoea* species

Jpn. J. Infect. Dis. **59**, 120-121

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

Amtsblatt der Europäischen Union, **L 338**, 1-26

VERORDUNG (EG) Nr. 1441/2007 DER KOMMISSION vom 5. Dezember 2007 zur Änderung der Verordnung 2073/2005 über mikrobiologische Kriterien für Lebensmittel

Amtsblatt der Europäischen Union, **L 322**, 12-27

WEISS, C., B. BECKER und W. HOLZAPFEL (2005):

Application and acceptability of three commercial systems for detection of in ready-to-eat vegetable salads

Arch. Lebensmittelhyg. **56**, 34-38

WESTRA-MEIJER, C.M., J.E. DEGENER, G. DZOLJIC-DANILOVIC, M.F. MICHEL und J.W. METTAU (1983):

Quantitative study of the aerobic and anaerobic faecal flora in neonatal necrotising enterocolitis

Arch. Dis. Child. **58**, 523-528

WILLIS, J. und J.E. ROBINSON (1988):

Enterobacter sakazakii meningitis in neonates

Pediatr. Infect. Dis. J. **7**, 196-199

WITTHUHN, R.C., F. KEMP und T.J. BRITZ (2007):

Isolation and PCR detection of *Enterobacter sakazakii* in South African food products, specifically infant formula milks

World J. Microbiol. Biotechnol. **23**, 151-157

YU, W.-L., H.-S. CHENG, H.-C. LIN, C.-T. PENG und C.-H. TSAI (2000):

Outbreak investigation of nosocomial *Enterobacter cloacae* bacteraemia in a neonatal intensive care unit

Scand. J. Infect. Dis. **32**, 293-298

ZAIDI, M., J. SIFUENTES, M. BOBADILLA, D. MONCADA und S. PONCE DE LEÓN (1989):

Epidemic of *Serratia marcescens* bacteremia and meningitis in a neonatal unit in Mexico City

Infect. Control Hosp. Epidemiol. **10**, 14-20

9 ANHANG

Her- stel- ler	Pro- ben- Nr.	Art der Probe	weitere Angaben	Verwen- dungsalter	nachgewiesene <i>Enterobacteriaceae</i>	KbE/ 100g
A	339	Milchbrei	mit Frucht, ökologisch	nach 4. Monat	-	u.N.
A	338	Milchbrei	mit Getreide, ökologisch	nach 4. Monat	<i>Enterobacter sakazakii</i> <i>Escherichia hermanii</i> <i>Klebsiella oxytoca</i> <i>Serratia ficaria</i>	2,10
A	359	Milchbrei	mit Getreide, ökologisch	nach 4. Monat	<i>Enterobacter cloacae</i> <i>Enterobacter sakazakii</i>	0,92
A	372	Milchbrei	mit Getreide, ökologisch	nach 4. Monat	<i>Enterobacter sakazakii</i>	0,36
A	340	Getreidebrei	milchfrei, ökologisch	nach 4. Monat	-	u.N.
A	362	Getreidebrei	milchfrei, ökologisch	nach 4. Monat	<i>Pantoea</i> spp. 2 <i>Pantoea</i> spp. 4	1,50
A	341	Reisbrei	milchfrei, ökologisch	nach 4. Monat	-	u.N.
A	349	Reisbrei	mit Frucht, milchfrei, ökologisch	nach dem 4. Monat	-	u.N.
A	342	Getreide- erzeugnis	mit Frucht, milchfrei, ökologisch	nach 4. Monat	-	u.N.
B	242	Anfangs- milch	-	von Geburt an	-	u.N.
C	258	Dauermilch	-	von Geburt an	<i>Enterobacter sakazakii</i>	0,36

Hersteller	Proben-Nr.	Art der Probe	weitere Angaben	Verwendungsalter	nachgewiesene <i>Enterobacteriaceae</i>	KbE/100g
C	318	Dauermilch	-	von Geburt an	-	u.N.
C	259	Folgemilch	-	nach dem 4. Monat	-	u.N.
C	260	Folgemilch	-	ab dem 8. Monat	-	u.N.
C	262	Milchbrei	mit Frucht	nach dem 4. Monat	<i>Enterobacter sakazakii</i>	0,92
C	264	Milchbrei	mit Frucht	nach dem 4. Monat	<i>Enterobacter sakazakii</i>	0,36
C	316	Milchbrei	mit Frucht	nach dem 4. Monat	<i>Enterobacter cloacae</i> <i>Klebsiella pneumoniae pn.</i>	2,30
C	317	Milchbrei	mit Frucht	nach dem 4. Monat	-	u.N.
C	261	Milchbrei	mit Getreide	nach dem 4. Monat	<i>Pantoea</i> spp. 3 <i>Pantoea</i> spp. 4	2,30
C	263	Milchbrei	mit Keks	ab dem 6. Monat	-	u.N.
D	363	Dauermilch	-	von Geburt an	-	u.N.
D	364	Folgemilch	-	nach dem 4. Monat	-	u.N.
D	365	Folgemilch	mit Frucht	ab dem 8. Monat	<i>Enterobacter cloacae</i> <i>Pantoea</i> spp. 2	0,36
D	355	Milchbrei	mit Frucht	nach dem 4. Monat	-	u.N.

Her- stel- ler	Pro- ben- Nr.	Art der Probe	weitere Angaben	Verwen- dungsalter	nachgewiesene <i>Enterobacteriaceae</i>	KbE/ 100g
D	354	Milchbrei	mit Getreide	nach dem 4. Monat	-	u.N.
D	356	Milchbrei	mit Keks	ab dem 6. Monat	-	u.N.
E	290	Folgemilch	ökologisch	nach dem 4. Monat	<i>Pantoea</i> spp. 3	0,36
E	291	Folgemilch	ökologisch	ab dem 8. Monat	-	u.N.
E	286	Milchbrei	mit Frucht, ökologisch	nach dem 4. Monat	<i>Escherichia vulneris</i>	0,36
E	288	Milchbrei	mit Frucht, ökologisch	ab dem 6. Monat	<i>Serratia ficaria</i>	0,36
E	287	Milchbrei	mit Getreide, ökologisch	nach dem 4. Monat	<i>Pantoea</i> spp. 3	0,36
E	289	Milchbrei	mit Keks, ökologisch	ab dem 6. Monat	<i>Escherichia vulneris</i>	0,36
F	241	Anfangs- milch	-	von Geburt an	<i>Serratia rubidaea</i>	0,30
F	302	Anfangs- milch	-	von Geburt an	-	u.N.
F	373	Folgemilch	-	nach dem 4. Monat	<i>Enterobacter cloacae</i> <i>Klebsiella pneumoniae pn.</i>	0,92
F	374	Folgemilch	-	ab 8. Monat bis ins Kinder- gartenalter	-	u.N.
F	275	Milchbrei	mit Frucht	nach dem 4. Monat	<i>Enterobacter sakazakii</i>	0,36

Her- stel- ler	Pro- ben- Nr.	Art der Probe	weitere Angaben	Verwen- dungsalter	nachgewiesene <i>Enterobacteriaceae</i>	KbE/ 100g
F	366	Milchbrei	mit Frucht	nach dem 4. Monat	<i>Pantoea</i> spp. 3	0,36
F	343	Milchbrei	mit Frucht und Getreide	ab 6. Monat bis ins Kleinkind- alter	-	u.N.
F	234	Milchbrei	mit Getreide	ab dem 6. Monat	-	u.N.
F	232	Milchbrei	mit Keks	ab dem 6. Monat	<i>Enterobacter sakazakii</i>	0,36
F	276	Milchbrei	mit Keks	ab dem 6. Monat	<i>Enterobacter cloacae</i>	0,36
F	277	Milchbrei	mit Keks	ab dem 6. Monat	<i>Enterobacter sakazakii</i>	0,92
F	274	Getreidebrei	mit Frucht, milchfrei	nach dem 4. Monat	<i>Enterobacter cloacae</i>	0,36
G	240	Anfangs- milch	ökologisch	von Geburt an	<i>Pantoea</i> spp. 3	0,36
G	270	Anfangs- milch	ökologisch	von Geburt an	-	u.N.
G	303	Anfangs- milch	ökologisch	von Geburt an	-	u.N.
G	304	Anfangs- milch	ökologisch	von Geburt an	-	u.N.
G	325	Anfangs- milch	probiotisch	von Geburt an	<i>Enterobacter cloacae</i> <i>Serratia ficaria</i>	0,36
G	353	Folgemilch	probiotisch	nach dem 4. Monat	-	u.N.

Her- stel- ler	Pro- ben- Nr.	Art der Probe	weitere Angaben	Verwen- dungsalter	nachgewiesene <i>Enterobacteriaceae</i>	KbE/ 100g
G	285	Anfangs- nahrung	hypoallergen	von Geburt an	<i>Klebsiella pneumoniae pn.</i>	0,36
G	350	Anfangs- nahrung	hypoallergen	von Geburt an	-	u.N.
G	351	Anfangs- nahrung	hypoallergen	von Geburt an	-	u.N.
G	271	Folge- nahrung	hypoallergen, probiotisch	nach dem 4. Monat	<i>Enterobacter cloacae</i> <i>Enterobacter sakazakii</i>	0,92
G	305	Folge- nahrung	hypoallergen, probiotisch	nach dem 4. Monat	<i>Enterobacter cloacae</i>	0,36
G	231	Milchbrei	mit Frucht, ökologisch	ab dem 6. Monat	<i>Escherichia vulneris</i>	0,36
G	273	Milchbrei	mit Frucht, ökologisch	nach dem 4. Monat	<i>Escherichia vulneris</i>	0,36
G	352	Milchbrei	mit Frucht und Getreide, ökologisch	nach dem 4. Monat	-	u.N.
G	272	Milchbrei	mit Getreide, ökologisch	nach dem 4. Monat	<i>Escherichia vulneris</i>	0,36
G	306	Milchbrei	mit Getreide, ökologisch	nach dem 4. Monat	<i>Escherichia coli</i>	0,36
G	321	Milchbrei	mit Getreide, ökologisch	nach dem 4. Monat	<i>Enterobacter sakazakii</i> <i>Serratia ficaria</i>	0,36
G	360	Milchbrei	mit Getreide, probiotisch	nach dem 4. Monat	-	u.N.
G	361	Milchbrei	mit Getreide, ökologisch	ab 6. Monat	<i>Escherichia hermanii</i> <i>Enterobacter sakazakii</i>	0,36

Her- stel- ler	Pro- ben- Nr.	Art der Probe	weitere Angaben	Verwen- dungsalter	nachgewiesene <i>Enterobacteriaceae</i>	KbE/ 100g
H	235	Anfangs- milch	ökologisch	ab der 1. Flasche	-	u.N.
H	230	Folgemilch	ökologisch	nach dem 4. Monat	-	u.N.
H	236	Folgemilch	auf Ziegen- milchbasis, ökologisch	nach dem 4. Monat	<i>Enterobacter cloacae</i>	0,36
H	344	Milchbrei	mit Getreide, ökologisch	nach dem 4. Monat	<i>Serratia ficaria</i>	0,36
H	358	Getreidebrei	milchfrei, ökologisch	nach dem 4. Monat	<i>Enterobacter cloacae</i> <i>Escherichia hermanii</i>	0,92
H	371	Getreidebrei	milchfrei, ökologisch	nach dem 4. Monat	-	u.N.
H	357	Reisbrei	milchfrei, ökologisch	nach dem 4. Monat	-	u.N.
I	267	Anfangs- milch	-	von Geburt an	<i>Escherichia vulneris</i>	0,36
I	293	Anfangs- milch	-	von Geburt an	<i>Enterobacter cloacae</i>	2,30
I	313	Dauermilch	-	von Geburt an	-	u.N.
I	228	Folgemilch	mit Frucht	nach dem 4. Monat	-	u.N.
I	266	Folgemilch	mit Frucht, prebiotisch	ab dem 8. Monat	<i>Enterobacter cloacae</i>	0,92
I	347	Folgemilch	prebiotisch	nach dem 4. Monat bis ins Klein- kindalter	<i>Klebsiella pneumoniae pn.</i>	0,36

Her- stel- ler	Pro- ben- Nr.	Art der Probe	weitere Angaben	Verwen- dungsalter	nachgewiesene <i>Enterobacteriaceae</i>	KbE/ 100g
I	238	Milchbrei	mit Frucht	ab dem 6. Monat	<i>Enterobacter sakazakii</i>	0,36
I	265	Milchbrei	mit Frucht	nach dem 4. Monat	-	u.N.
I	346	Milchbrei	mit Frucht	ab dem 6. Monat	-	u.N.
I	369	Milchbrei	mit Frucht	nach dem 4. Monat	<i>Escherichia coli</i>	0,36
I	314	diätetisches Lebensmittel für bes. med. Zwecke	bei Durchfall, mit Frucht, prebiotisch	für Säuglinge (ab 12.h), Kinder und Erwachsene	<i>Enterobacter cloacae</i>	0,74
I	320	diätetisches Lebensmittel für bes. med. Zwecke	bei Durchfall, mit Frucht, prebiotisch	für Säuglinge (ab 12.h), Kinder und Erwachsene	<i>Enterobacter cloacae</i> <i>Klebsiella pneumoniae pn.</i>	4,30
I	368	diätetisches Lebensmittel für bes. med. Zwecke	milchfrei	von Geburt an	-	u.N.
I	345	Apfelbrei	milchfrei	nach dem 4. Monat bis ins Klein- kindalter	-	u.N.
J	249	Dauermilch	-	von Geburt an	-	u.N.
J	239	Folgemilch	-	nach dem 4. Monat	-	u.N.
J	292	Folgemilch	-	nach dem 4. Monat	-	u.N.

Hersteller	Proben-Nr.	Art der Probe	weitere Angaben	Verwendungsalter	nachgewiesene <i>Enterobacteriaceae</i>	KbE/100g
J	250	Folgemilch	-	ab dem 8. Monat	<i>Enterobacter cloacae</i>	0,36
J	283	Folgemilch	-	ab dem 8. Monat	-	u.N.
J	284	Folgemilch	-	ab dem 8. Monat	<i>Enterobacter cloacae</i>	0,36
J	370	Milchbrei	mit Frucht	nach dem 4. Monat	<i>Enterobacter sakazakii</i> <i>Escherichia vulneris</i>	0,92
J	380	Milchbrei	mit Frucht	nach dem 4. Monat	<i>Citrobacter spp.</i> <i>Escherichia vulneris</i> <i>Klebsiella pneumoniae pn.</i>	0,74
K	328	Anfangsmilch	-	von der 1. Flasche an	-	u.N.
K	335	Anfangsmilch	-	von Geburt an	-	u.N.
K	336	Folgemilch	-	nach dem 4. Monat	-	u.N.
K	337	Folgemilch	mit Frucht	ab 8. Monat bis ins Kleinkindalter	-	u.N.
K	326	Anfangsnahrung	hypoallergen	von der 1. Flasche an	-	u.N.
K	334	Folgenahrung	hypoallergen	nach dem 4. Monat	-	u.N.
L	301	Anfangsmilch	prebiotisch	von Geburt an	<i>Pantoea spp. 4</i>	0,36
L	312	Anfangsmilch	prebiotisch	von Geburt an	-	u.N.

Her- stel- ler	Pro- ben- Nr.	Art der Probe	weitere Angaben	Verwen- dungsalter	nachgewiesene <i>Enterobacteriaceae</i>	KbE/ 100g
L	329	Anfangs- milch	prebiotisch	von Geburt an	-	u.N.
L	331	Folgemilch	prebiotisch	nach dem 4. Monat	-	u.N.
L	332	Folgemilch	prebiotisch	ab dem 8. Monat	-	u.N.
L	256	Anfangs- nahrung	hypoallergen, prebiotisch	von Geburt an	-	u.N.
L	327	Anfangs- nahrung	hypoallergen, prebiotisch	von Geburt an	-	u.N.
L	281	Folge- nahrung	hypoallergen, prebiotisch	nach dem 4. Monat	-	u.N.
L	299	Milchbrei	mit Frucht und Getreide	nach dem 4. Monat	<i>Enterobacter cloacae</i> <i>Enterobacter sakazakii</i> <i>Escherichia hermanii</i> <i>Serratia ficaria</i>	4,30
L	280	Milchbrei	mit Getreide	ab dem 10. Monat	<i>Enterobacter sakazakii</i> <i>Escherichia vulneris</i> <i>Klebsiella pneumoniae pn.</i>	0,92
L	298	Milchbrei	mit Getreide	ab dem 10.Monat	<i>Escherichia vulneris</i> <i>Klebsiella pneumoniae pn.</i> <i>Pantoea spp. 3</i>	9,30
L	282	Milchbrei	hypoallergen	nach dem 4. Monat	-	u.N.
L	237	Getreidebrei	mit Milch	ab dem 6. Monat bis ins Klein- kindalter	-	u.N.
L	278	Getreidebrei	mit Milch	ab dem 8. Monat	-	u.N.

Hersteller	Proben-Nr.	Art der Probe	weitere Angaben	Verwendungsalter	nachgewiesene <i>Enterobacteriaceae</i>	KbE/100g
L	279	Getreidebrei	milchfrei ökologisch	ab dem 6. Monat	<i>Leclercia adecarboxylata</i>	0,36
L	257	diätetisches Lebensmittel für bes. med. Zwecke	bei Aufstoßen und Spucken	ab dem 1. Fläschchen, für Säuglinge	<i>Klebsiella pneumoniae pn.</i>	0,36
L	311	diätetisches Lebensmittel für bes. med. Zwecke	bei Aufstoßen und Spucken	ab dem 1. Fläschchen, für Säuglinge	-	u.N.
L	330	diätetisches Lebensmittel f. bes. med. Zwecke	bei Durchfall, mit Gemüse	von Geburt an, für Säuglinge und Kleinkinder	-	u.N.
L	300	Kartoffelbrei	mit Milch und Gemüse	ab dem 6. Monat	-	u.N.
M	252	Anfangsmilch	-	von Geburt an	-	u.N.
M	253	Anfangsmilch	-	von Geburt an	-	u.N.
M	268	Anfangsmilch	probiotisch	von Geburt an	-	u.N.
M	315	Anfangsmilch	probiotisch	vom 1. Fläschchen an	-	u.N.
M	324	Folgemilch	probiotisch	nach dem 4. Monat	-	u.N.
M	333	Folgemilch	probiotisch	nach dem 4. Monat	-	u.N.
M	254	Anfangsnahrung	hypoallergen	von Geburt an	-	u.N.

Her- stel- ler	Pro- ben- Nr.	Art der Probe	weitere Angaben	Verwen- dungsalter	nachgewiesene <i>Enterobacteriaceae</i>	KbE/ 100g
M	294	Anfangs- nahrung	hypoallergen, probiotisch	vom 1. Fläschchen an	<i>Escherichia coli</i>	0,30
M	309	Anfangs- nahrung	hypoallergen, probiotisch	vom 1. Fläschchen an	-	u.N.
M	322	Anfangs- nahrung	hypoallergen, probiotisch	von Geburt an	-	u.N.
M	255	Folge- nahrung	hypoallergen	nach dem 4. Monat	<i>Enterobacter sakazakii</i>	1,50
M	310	Folge- nahrung	hypoallergen	nach dem 4. Monat	-	u.N.
M	323	Folge- nahrung	hypoallergen, probiotisch	nach dem 4. Monat	-	u.N.
M	297	Milchbrei	mit Getreide	nach dem 4. Monat	<i>Enterobacter cloacae</i>	0,36
M	319	Milchbrei	mit Getreide	nach dem 4. Monat	<i>Escherichia hermanii</i> <i>Serratia ficaria</i>	0,36
M	296	Milchbrei	mit sonst. Zusätzen	ab 8. Monat	<i>Pantoea</i> spp. 2	0,36
M	295	Getreidebrei	mit Honig, milchfrei	nach dem 4. Monat	-	u.N.
M	269	diätetisches Lebensmittel f. bes. med. Zwecke	bei Blähungen und Durchfall	von Geburt an	-	u.N.
N	243	Folgemilch	ökologisch	nach dem 4. Monat	-	u.N.

Hersteller	Proben-Nr.	Art der Probe	weitere Angaben	Verwendungsalter	nachgewiesene <i>Enterobacteriaceae</i>	KbE/100g
N	244	Folgemilch	ökologisch	ab dem 8. Monat	-	u.N.
N	248	Milchbrei	mit Frucht, ökologisch	nach dem 4. Monat	<i>Escherichia vulneris</i>	1,10
N	308	Milchbrei	mit Frucht, ökologisch	nach dem 4. Monat	<i>Escherichia vulneris</i>	0,36
N	246	Milchbrei	mit Frucht, ökologisch	ab 6. Monat	<i>Enterobacter sakazakii</i>	0,36
N	307	Milchbrei	mit Frucht, ökologisch	ab dem 6. Monat	-	u.N.
N	245	Milchbrei	mit Getreide, ökologisch	nach dem 4. Monat	-	u.N.
N	247	Milchbrei	mit Keks, ökologisch	ab 6. Monat	-	u.N.
O	348	Folgemilch	auf Ziegenmilchbasis, ökologisch	nach dem 4. Monat	<i>Klebsiella pneumoniae pn.</i> <i>Serratia ficaria</i>	46,00
O	381	Folgemilch	auf Ziegenmilchbasis, ökologisch	nach dem 4. Monat	<i>Enterobacter cloacae</i> <i>Klebsiella pneumoniae pn.</i> <i>Pantoea spp. 4</i> <i>Serratia ficaria</i>	>110
O	367	Getreidebrei	milchfrei, ökologisch	nach dem 4. Monat	<i>Enterobacter sakazakii</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Klebsiella pneumoniae pn.</i> <i>Leclercia adecarboxylata</i>	> 110
O	382	Getreidebrei	milchfrei, ökologisch	nach dem 4. Monat	<i>Citrobacter youngae</i> <i>Enterobacter amnigenus</i> <i>Enterobacter sakazakii</i> <i>Escherichia hermanii</i> <i>Klebsiella pneumoniae pn.</i> .	110

Her- stel- ler	Pro- ben- Nr.	Art der Probe	weitere Angaben	Verwen- dungsalter	nachgewiesene <i>Enterobacteriaceae</i>	KbE/ 100g
P	376	Anfangs- milch	ökologisch, probiotisch	von Geburt an	<i>Enterobacter cloacae</i> <i>Enterobacter sakazakii</i> <i>Klebsiella pneumoniae pn.</i>	0,92
P	379	Anfangs- milch	ökologisch, probiotisch	von Geburt an	-	u.N.
P	378	Folgemilch	mit Frucht, ökologisch, probiotisch	nach dem 8. Monat	-	u.N.
P	375	Anfangs- nahrung	milchfrei, probiotisch	von Geburt an	-	u.N.
P	377	Folge- nahrung	hypoallergen, probiotisch	nach dem 4. Monat	<i>Enterobacter cloacae</i> <i>Escherichia vulneris</i>	1,50

u.N. = unterhalb der Nachweisgrenze (Nachweisgrenze lag bei 0,30 KbE/100 g)

für bes. med. Zwecke = für besondere medizinische Zwecke

sonst. = sonstige

Klebsiella pneumoniae pn. = *Klebsiella pneumoniae pneumoniae*

DANKSAGUNG

Allen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, möchte ich an dieser Stelle danken.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Dr. habil. Ewald Usleber für die Überlassung des interessanten Themas, die freundliche Betreuung und Hilfe bei der Anfertigung dieser Arbeit, das entgegengebrachte Vertrauen und die sorgfältige Durchsicht des Manuskripts.

Allen Mitarbeitern des Institutes für Tierärztliche Nahrungsmittelkunde, Professur für Milchwissenschaften, der Justus-Liebig-Universität Gießen möchte ich für ihre Hilfsbereitschaft und ihr freundliches Entgegenkommen danken. Ein herzliches Dankeschön vor allem an Cornelia Eichmann und Diana Klotz, die mit zahlreichen guten Einfällen und Tatkraft besonders das Gelingen des experimentellen Teils ermöglichten. Mein Dank gilt auch Claudia Kress, die mir während der Einarbeitungszeit mit wertvollen Anregungen und Ratschlägen zur Seite stand.

Vor allem möchte ich meinem Partner, meinen Freunden und meiner Familie danken, die mich während der gesamten Anfertigung der Dissertation aufmunternd unterstützten und Anteil nahmen, mir die Welt des Computers näher brachten, mich finanziell unterstützten, Korrektur lasen und mich durch gemeinsames Zeitverbringen abseits der Veterinärmedizin immer wieder mit neuem Elan an der Dissertation weiterarbeiten ließen. Dank an Tom, Heidi, Mirjam, Conny, Cornelia und Christina, Dank an meine Eltern Dr. Hans-Georg Kurz und Dr. Elke Kurz, meine Oma Maria Uebis und meine Brüder Lothar, Rüdiger und Volker Kurz.

EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

Ich habe die vorgelegte Dissertation selbstständig 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.

édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFENBERGRING 15
D-35396 GIESSEN

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

ISBN 3-8359-5416-4

