Aus dem Institut für Lebensmittelhygiene
der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig
und
dem Institut für Sicherheit und Qualität bei Milch und Fisch
des Max Rubner Instituts
Bundesforschungsinstitut für Ernährung und Lebensmittel
am Standort Kiel

Vorkommen und Bedeutung von *Enterobacter sakazakii* in einem Milchtrocknungsbetrieb - Betriebsepidemiologie und Prozesssicherheit -

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doctor medicinae veterinariae (Dr. med. vet.)
durch die Veterinärmedizinische Fakultät
der Universität Leipzig

eingereicht von
Cécile Jacobs
aus Luxemburg

Leipzig, 2010

Mit Genehmigung der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig

Dekan: Prof. Dr. Arwid Daugschies
Betreuer: PD Dr. Peggy Braun

Gutachter: PD Dr. Peggy Braun, Institut für Lebensmittelhygiene der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig
Prof. Dr. Walther Heeschen, Kiel

Tag der Verteidigung: 27. Oktober 2009

meinen Eltern gewidmet

INHALT

Abkürzungsverzeichnis VI
Tabellenverzeichnis VIII
Abbildungsverzeichnis X

1 EINLEITUNG 1

2 LITERATUR 2
2.1 Taxonomie und biologische Eigenschaften von *Enterobacter* (*E.*) *sakazakii* 2
2.1.1 Taxonomie 2
2.1.2 Morphologie und kulturelle Eigenschaften 3
2.1.2.1 Morphologische Eigenschaften 3
2.1.2.2 Kulturelle Eigenschaften 3
2.1.3 Biologische Eigenschaften 6
2.1.3.1 Hitzeresistenz 6
2.1.3.2 Toleranz gegenüber Austrocknung 7
2.1.3.3 Osmotische Toleranz 8
2.1.3.4 Biofilmbildung 9
2.1.3.5 Drucktoleranz 10
2.1.3.6 Säurefestigkeit 10
2.1.3.7 Antibiotikaresistenz 11
2.1.4 Biochemische Eigenschaften 11
2.1.5 Enzymatische Eigenschaften 11
2.1.6 Virulenzfaktoren und Pathogenität 12
2.1.6.1 Virulenzfaktoren 12
2.1.6.2 Pathogenität/Virulenz 13
2.2 Nachweis- und Typisierungsmethoden 13
2.2.1 Kulturelle Nachweismethoden von *E. sakazakii* 13
2.2.1.1 Isolierung aus Milchpulver 14
2.2.1.2 Isolierung aus Umfeldproben 17
2.2.2 Identifizierung mit biochemischen Testsystemen 18
2.2.3 Molekularbiologische Identifizierung 18
2.2.3.1 Identifizierung von *E. sakazakii* mittels PCR 18
2.2.3.2 Molekularbiologische Typisierung 18
2.3 Bedeutung von *E. sakazakii* für die menschliche Gesundheit 19
2.3.1 Reservoir 19
2.3.2 Vorkommen 20
2.3.3 Infektionsweg 20

2.3.4 Klinik beim Säugling 21
2.3.5 Klinik bei Patienten über einem Jahr 21
2.4 Milchpulverherstellung 22
2.4.1 Definition: Dauermilcherzeugnisse 22
2.4.2 Produktionsablauf: Milchpulver und Kontaminationswege in der Produktion 23
2.4.2.1 Anlieferung und Pasteurisation 24
2.4.2.2 Eindampfer, Konzentratbehälter, Zwischenlagerung 25
2.4.2.3 Trocknungsverfahren 25
2.4.2.4 Kontaminationen nach der Trocknung 29
2.4.2.5 Endprodukt 29
2.4.3 Kontaminationen aus dem Produktionsumfeld 30
2.5 Risikoerörterung und Qualitätssicherung 31
2.5.1 Risikoerörterung 31
2.5.2 Risikominimierung durch Qualitätssicherung bei der Produktion 32
2.5.2.1 Umfeldmonitoring 32
2.5.2.2 Zonenkonzept 33
2.5.2.3 Reinigungskonzept 33
2.5.3 Maßnahmen zur Risikominimierung beim Verbraucher bzw. Betreuungspersonen 34
2.6 Lebensmittelhygienisch relevante Rechtsgrundlagen 36
2.6.1 Milchpulver 36
2.6.2 Lebensmittelsicherheitskriterium für Milchpulver und diätetische Produkte 37

3 MATERIAL UND METHODEN 39
3.1 Material 39
3.1.1 Beschreibung des untersuchten Milchpulverwerks 39
3.1.1.1 Milchpulverherstellung 39
3.1.1.2 Qualitäts- und Prozesssicherheit 41
3.2.1 Bakterienstämme 42
3.2.1.1 Isolate von *E. sakazakii* 42
3.2.1.2 Referenzstämme 43
3.2.2 Probenmaterial 43
3.2.2.1 Mikrobiologische Trendanalyse (MTA) 43
3.2.2.2 Filterpulver (Fipu) 44
3.2.2.3 Flächenproben (Q) 44
3.2.2.4 Walzenvollmilchpulver (WVP) 44
3.2.2.5 Staubsaugerpulver (Staub.) 45

3.3 Methoden 45
3.3.1 Isolierung von *E. sakazakii* 45
3.3.1.1 Flächenproben 45
3.3.1.2 MTA-Proben 46
3.3.1.3 Pulverproben 46
3.3.2 Lagerung der gewonnenen Isolate 47
3.3.3 Phänotypische Charakterisierung 47
3.3.3.1 Koloniemorphologie 47
3.3.3.2 Biochemische Typisierung mit dem API 20 E-Testsystem 47
3.3.4 Molekularbiologischer Nachweis und Typisierung 47
3.3.4.1 Polymerase Kettenreaktion 47
3.3.4.2 Pulsfeld-Gelelektrophorese 49

4 ERGEBNISSE 52
4.1 Kultureller Nachweis von *E. sakazakii* 52
4.1.1 Vorkommen und Verbreitung von *E. sakazakii* im Milchtrocknungsbereich 52
4.1.2 *Enterobacteriaceae*-Umfeldmonitoring 57
4.2 Phänotypische Charakterisierung 61
4.2.1 Koloniemorphologie 61
4.2.1.1 Blutagar 61
4.2.1.2 TSA- und TSA-α-MUG-Agar 61
4.2.1.3 MTA 2/696 und Q 41/376 62
4.2.2 Testkit API 20 E 63
4.2.3 Reaktionsmuster 64
4.3 Molekularbiologische Identifizierung und Typisierung 65
4.3.1 Polymerase-Kettenreaktion 65
4.3.2 Pulsfeld-Gelelektrophorese 66

5 DISKUSSION 72
5.1 Phänotypische Charakterisierung und kultureller Nachweis 72
5.1.1 Koloniemorphologie 72
5.1.1.1 VRBD-Agar 72
5.1.1.2 Blut-, TSA- und TSA-α-MUG-Agar 72
5.1.1.3 Pigmentbildung 73
5.1.1.4 Fluoreszenz 74
5.1.2 Kulturelle Nachweismethoden 74
5.1.3 Bestätigung des kulturellen Nachweises durch biochemische Testkits 77

5.2 Molekularbiologischer Nachweis und Typisierungsmethoden 79
5.2.1 Molekularbiologische Identifizierung 79
5.2.2 Molekularbiologische Typisierung 79
5.2.2.1 Walzentrocknung 80
5.2.2.2 Sprühtrocknung 80
5.3 Qualitäts- und Prozesssicherheit 82
5.3.1 Allgemeine Maßnahmen zur mikrobiellen Qualitätssicherung 82
5.3.2 Kontamination während des Herstellungsprozesses 85
5.3.2.1 Sprühtrocknung 86
5.3.2.2 Walzentrocknung 87
5.3.3 Kontamination aus dem Produktionsumfeld 89
5.4 Schlussbetrachtung 92
5.4.1 Allgemeine Maßnahmen 92
5.4.2 Maßnahmen im Bereich der Sprühtrocknung 92

6 ZUSAMMENFASSUNG 93

7 SUMMARY 95

8 LITERATURVERZEICHNIS 97
8.1 Quellen im World wide web 115

Anhang A Literatur 116

Anhang B Material und Methoden 123
B.1 Auflistung der verwendeten Nährmedien, Reagenzien und Geräte 127
B.1.1 Nährmedien 127
B.1.2 Reagenzien 127
B.1.2.1 Bakteriologie 127
B.1.2.2 API 20 E 127
B.1.2.3 Molekularbiologie 128
B.1.3 Geräte und Verbrauchsmaterial 129
B.1.3.1 Bakteriologie 130
B.1.3.2 Molekularbiologie 130
B.2 Vierfelder-χ^2-Test (Vierfelder-Chi-Quadrat-Test) 131

B.3 Pulsfeld-Gelelektrophorese (PFGE) 132

B.3.1 Puffer und Lösungen 132

B.3.1.1 Puffer 132

B.3.1.2 Lösungen 135

B.3.2.2 Gele 136

B.3.3 Stammlösungen 136

B.3.3.1 0,5 M EDTA-Stammlösung 136

B.3.2 Agarose und Gele 137

B.3.2.1 Agarose 137

B.3.3.2 5 M NaCl-Stammlösung 138

B.3.3.3 5 N NaOH-Stammlösung 138

B.3.3.4 Stopping-Gebrauchslösung 138

B.3.3.5 1 M TRIS-HCl-Stammlösung 139

B.3.4 Bäder 139

B.3.4.1 Färbebad 139

B.3.4.2 Entfärbebad 140

Anhang C Photographien 142

DANKSAGUNG 152

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

α-MUG	4-Methylumbelliferyl-α-D-Glucopyranosid
A. bidest., dest.	Aqua bidestillata, Aqua destillata
API 20 E	Analytic Profile Index 20 *Enterobacteriaceae*
API ID 32 E	Analytic Profile Index Identification 32 *Enterobacteriaceae*
API ZYM	Analytic Profile Index Enzyme
ATCC	American Type Culture Collection
a_w-Wert	Wasseraktivität
BHI	Brain Heart Infusion, Hirn-Herz-Glucose-Bouillon
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DNA	Deoxyribonucleic acid, Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DSMZ	Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
D-Wert	dezimale Reduktionszeit
E.	*Enterobacter*
EDTA	Ethylendiamintetraacetat, Ethylendiamintetraessigsäure
Fipu	Filterpulver
HACCP	Hazard Analysis Critical Control Point
mLST	modifizierte Laurylsulfat-Tryptose-Bouillon nach GUILLAUME-GENTIL et al. (2005) mit 0,5 M NaCl + 10 mg/l Vancomycin-Zusatz
MTA	Mikrobiologische Trendanalyse
PCR	Polymerase Chain Reaction, Polymerase-Kettenreaktion
PFGE	Pulsed Field Gel Electrophoresis, Pulsfeld-Gelelektrophorese
Q	quantitativ, Fläche, Umfeldproben
rRNA	Ribosomal Ribonucleic Acid, ribosomale Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Real Time PCR
SN	Säuglingsnahrung
Spe (Bcu) I	Restriktionsenzym, hergestellt von *Bacillus coagulans*
Staub.	Staubsauger
T1, 2	Sprühturm 1 und 2
TBE-Puffer	TRIS-Borat-EDTA-Puffer
TE-Puffer	TRIS-EDTA-Puffer

TRIS	Trishydroxymethylaminomethan
TSA	Trypton-Soja-Agar
TSB	Trypton-Soja-Bouillon
Vero-Zelllinie	Zelllinie, gewonnen aus der Niere von afrikanischen grünen Meerkatzen
VRBD	Violet Red Bile Dextrose Agar acc. to MOSSEL (1985)
	Kristallviolett-Neutralrot-Galle-Glucose-Agar nach MOSSEL (1985)
Walze	Walzentrocknung
WVP	Walzenvollmilchpulver
Xba I	Restriktionsenzym, hergestellt von *Xanthomonas badrii*
Y-1 Zelllinie	Zelllinie, gewonnen aus der Nebenniere von Mäusen
ZSN	zubereitete Säuglingsnahrung
z-Wert	dezimale Reduktionstemperatur

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 2.1 Generationszeit von *Enterobacter* (*E.*) *sakazakii* in Kindermüslis 5
Tabelle 2.2 Mikrobiologische Kriterien für Säuglingsnahrung 36
Tabelle 2.3 Mikrobiologische Kriterien nach § 14 der Diätverordnung 37
Tabelle 2.4 Lebensmittelsicherheits- und Prozesshygienekriterien nach VO (EG) Nr. 2073/2005 in Verbindung mit VO (EG) Nr. 1441/2007 38
Tabelle 3.1 Werkseigene mikrobiologische Qualitätskriterien für Filterpulver 40
Tabelle 3.2 PCR-Mastermix für n Proben 48
Tabelle 3.3 PCR-Temperatur-Zeit-Profil 48
Tabelle 3.4 PCR-Pipettierschema 49
Tabelle 3.5 PFGE-Laufbedingungen 51
Tabelle 4.1 Übersicht der *E. sakazakii*-Isolate, geordnet nach Produktionsbereich 52
Tabelle 4.2 Übersicht der *E. sakazakii*-Isolate, geordnet nach Probenart 53
Tabelle 4.3 Übersicht der *E. sakazakii*-Isolate aus Staubsaugerproben 54
Tabelle 4.4 Übersicht der *E. sakazakii-Isolate* aus definierten Flächenabstrichen 54
Tabelle 4.5 Positiver *E. sakazakii*-Nachweis aus Filterpulverproben der Türme T1 u. T2 .55
Tabelle 4.6 Übersicht der genommenen und eingesandten MTA-Proben 55
Tabelle 4.7 Einfluss der Filterpulver-Rückführung auf die Qualität des Milchpulvers 57
Tabelle 4.8 *Enterobacteriaceae*-Keimzahl von definierten Flächenproben 58
Tabelle 4.9 Vergleich zwischen Enterobakterien-Keimzahl und *E. sakazakii*-Nachweis ..58
Tabelle 4.10 Vierfeldertest 60
Tabelle 4.11 Einteilung und Verteilung der *E. sakazakii*-Isolate nach Morphologietypen ..62
Tabelle 4.12 Kriterien zur Koloniebeschreibung 62
Tabelle 4.13 API 20 E-Ergebnisse der 145 Isolate des untersuchten Werks 63
Tabelle 4.14 Biochemisches Profil der 145 *E. sakazakii*-Isolate 64
Tabelle 4.15 Anzahl und Verteilung der Klone im Milchtrocknungswerk 66
Tabelle A.1 Biochemische Eigenschaften von *E. sakazakii* 97
Tabelle A.2 *E. sakazakii*-Isolate 98
Tabelle A.3 Erkrankungsfälle, ausgelöst durch *E. sakazakii*, bei Patienten < 1 Jahr 100
Tabelle A.4 Erkrankungsfälle, ausgelöst durch *E. sakazakii*, bei Patienten > 1 Jahr 103
Tabelle B.1 Ausgewählte *E. sakazakii*-Isolate der Milchtrocknungswerke 104
Tabelle B.2 Vierfeldertafel nach LORENZ (1992) 112
Tabelle B.3 Äquilibrierungspuffer für n Proben 113
Tabelle B.4 Laufpuffer (0,5x TBE-Puffer + 100 µmol/l Thioureazusatz) 113
Tabelle B.5 Lysispuffer für n Proben 114
Tabelle B.6 0,5x TBE-Puffer 115
Tabelle B.7 0,5x TBE-Puffer mit 100 µmol/l Thioureazusatz 115
Tabelle B.8 TRIS-EDTA-Puffer (TE-Puffer) 115
Tabelle B.9 Proteinase K à 100 µg/ml 116
Tabelle B.10 EDTA-Sarcosine-Proteinase K-(ESP)-Lösung 116
Tabelle B.11 Mutanolysinlösung 116
Tabelle B.12 Pefabloc-Lösung 117

Tabelle B.13 Restriktionslösung für n Proben 117
Tabelle B.14 0,8 %ige Incertagarose für n Proben 117
Tabelle B.15 1 %iges Trägergel 118
Tabelle B.16 0,5 M EDTA-Stammlösung 118
Tabelle B.17 5 M NaCl-Stammlösung 119
Tabelle B.18 5 N NaOH-Stammlösung 119
Tabelle B.19 5 % Bromphenolblau-Lösung 119
Tabelle B.20 15 % Ficoll 400 + Bromphenolblau-Lösung 120
Tabelle B.21 Stopping-Gebrauchslösung 120
Tabelle B.22 1 M TRIS-HCl-Stammlösung 120
Tabelle B.23 PFGE-Färbebad 120
Tabelle C.1 Morphologie von *E. sakazakii*-Isolaten auf Blutagar nach 18-24 h/37 °C ..124
Tabelle C.2 Morphologie von *E. sakazakii*-Isolaten auf TSA-Agar nach 24-48 h/RT ...125
Tabelle C.3 Morphologie von *E. sakazakii*-Isolaten auf TSA-α-MUG-Agar 126
Tabelle C.4 Morphologie von *E. sakazakii*-Isolaten auf VRBD-Agar 18-24 h/37 °C 127
Tabelle C.5 Morphologie von *E. sakazakii*-Isolaten auf VRBD-Agar 24-48 h/30 °C 128
Tabelle C.6 Koloniemorphologie von MTA-Isolat 2/696 129
Tabelle C.7 Koloniemorphologie vom Umfeld-Isolat Q 41/376 130

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 2.1 Isolierung nach vorläufigem ISO-Standard ISO/DTS 22964 14
Abbildung 2.2 Prozessparameter im Vorwege der Milchtrocknung 24
Abbildung 2.3 Prozessabschnitte der Sprühtrocknung 27
Abbildung 2.4 Prozessabschnitte der Walzentrocknung 29
Abbildung 4.1 Verteilung der *E. sakazakii*-Isolate nach Produktionsabschnitt u. Probenart .53
Abbildung 4.2 Verteilung der ans Max Rubner Institut gesandten MTA-Proben 56
Abbildung 4.3 Vergleich zwischen der Enterobakterien-Keimzahl/*E. sakazakii*-Nachweis . .59
Abbildung 4.4 PCR vom 16. 11. 2006 65
Abbildung 4.5 PFGE ausgewählter *E. sakazakii*-Isolate des Milchtrocknungswerks 68
Abbildung 4.6 PFGE ausgewählter Isolate aus dem Bereich der beiden Trocknungstürme . .69
Abbildung 4.7 PFGE ausgewählter Isolate, gewonnen aus MTA- und Filterpulverproben . . .70
Abbildung 4.8 PFGE ausgewählter Isolate aus dem Bereich der Walzentrocknung 71
Abbildung 5.1 Kontaminationskreislauf im Bereich der Walzentrocknung 89
Abbildung B.1 Lageplan des untersuchten Milchtrocknungswerks 122
Abbildung C.1 Photographien allgemeiner Art 123
Abbildung C.2 Photographien aus dem Bereich der Walzentrocknung 131
Abbildung C.3 Photographien aus dem Bereich der Sprühtrocknung 132

1 EINLEITUNG

Die weltweite Produktion und Vermarktung von Milchpulver hat neben einer gesicherten Versorgung mit Milchinhaltsstoffen auch eine volkswirtschaftliche Bedeutung. Die global wachsende Nachfrage an Milchprodukten, vor allem auf den ostasiatischen Märkten, führte im April 2007 zu einer Preisexplosion auf dem Milchsektor.

Durch die Konservierung von Milchbestandteilen handelt es sich um ein vielseitig einsetzbares Produkt. Verwendet wird Milchpulver nicht nur als Frischmilchersatz in Ländern mit unzureichender Infrastruktur und/oder Kühlkapazität, sondern auch zur Bildung von Nahrungsreserven in Krisensituationen. Ein weiteres Einsatzgebiet bildet neben der Lebensmittelproduktion (Backwaren, Fertiggerichte und Fleischwaren) auch die pharmazeutische und kosmetische Industrie.

Im Bereich der Säuglingsnahrung ist Milchpulver Hauptbestandteil und damit Grundlage für Muttermilchersatznahrung und Folgemilch für Säuglinge. Somit werden neben hohen qualitativen auch höchste hygienische Anforderungen an das Ausgangsprodukt Milchpulver gestellt. Seit 1989 wurde auf Milchpulver basierende Säuglingsnahrung in zahlreichen Fällen als Quelle von *Enterobacter* (*E.*) *sakazakii*-Erkrankungen bei Neu- und Frühgeborenen identifiziert. Aus 4,2-14,0 % der weltweiten Milchpulverproduktion (inkl. Säuglingsnahrung) konnte *E. sakazakii* in geringen Mengen (< 1-8 KbE/100 g) isoliert werden. Die Patienten leiden unter Sepsis, nekrotisierender Enterocolitis und Meningitis. Es handelt sich um eine seltene Erkrankung, die gekennzeichnet ist durch eine niedrige Infektionsdosis und hohe Mortalität. Seit 1965 wurde weltweit von insgesamt 48 Fällen bei Patienten unter einem Jahr und von zehn Fällen bei Patienten über einem Jahr berichtet (ANON. 2007a). Durch falsche Handhabung kann es in zubereiteter Säuglingsnahrung innerhalb kurzer Zeit zu hohen Vermehrungsraten von *E. sakazakii* kommen. Im Jahr 2007 wurde in Deutschland mit *E. sakazakii* kontaminierte Säuglingsnahrung von drei namhaften Herstellern aus dem Handel zurückgerufen.

Im Hinblick auf die oben dargestellte Problematik wurden im Rahmen dieser Arbeit Proben aus dem Bereich der Sprüh- und Walzentrocknung eines Milchtrocknungsbetriebes auf das Vorkommen von *E. sakazakii* untersucht, um die Verbreitung des Erregers in dem Betrieb zu ermitteln. Hierzu wurde im Produkt und auf definierten Flächen im Umfeld *E. sakazakii* isoliert, molekularbiologisch identifiziert und typisiert. Ziel war es, anhand der Daten betriebsepidemiologische Aspekte zu erfassen, diese mit der Prozesssicherheit zu verknüpfen, dadurch die Betriebshygiene zu verbessern und *E. sakazakii* bereits im Herstellungsumfeld entscheidend zurückzudrängen.

2 LITERATUR

2.1 Taxonomie und biologische Eigenschaften von *E. sakazakii*

2.1.1 Taxonomie

Genus Enterobacter

Das Genus *Enterobacter* ist benannt nach dem griechischen Wort „enteron“ für Darm. Es sticht durch seine phänotypische und phylogenetische Vielfalt hervor (BRENNER 1981, FARMER III. et al. 1985, MÜLLER et al. 1996). Die Gattung *Enterobacter* gehört zur Gruppe II der Familie der *Enterobacteriaceae* und ist seit 1963 unter dem Genusnamen „*Enterobacter*“ mit dem Referenzstamm *Enterobacter cloacae* anerkannt (BRENNER 1981). Die Gruppe II ist durch eine positive Voges Proskauer- und α-Galactosidase-Reaktion charakterisiert. Im Gegensatz zum Genus *Klebsiella* ist *Enterobacter* beweglich, im Vergleich mit dem Genus *Serratia* zeigt *Enterobacter* eine negative Lipase-, Tween-80-Esterase- und Desoxyribonuklease-(DNase-)Reaktion (BRENNER u. RICHARD 1984). Es handelt sich um ein altes Genus, das erstmals unter dem Namen „Cloaca“ von CASTELLANI u. CHALMERS (1920) definiert wurde. Im Jahre 1923 wurde es von BERGEY et al. (1923) in *Aerobacter* umbenannt. Bedingt durch Schwierigkeiten in der Abgrenzung zwischen *Aerobacter aerogenes* und *Klebsiella pneumoniae* teilte MØLLER (1955) mit Hilfe der Arginin-Reaktion und der Gasproduktion aus Inositol und Glycerol das Genus in zwei Gruppen Cloaca A (Arginin positiv) und B, was 1958 zu einer Neudefinition des Genus *Aerobacter* führte: *Aerobacter aerogenes „Cloaca B*“ und *Aerobacter cloacae „Cloaca A*“ (HORMAECHE u. EDWARDS 1958). 1960 wurde von HORMAECHE u. EDWARDS (1960) der neue Genusname „*Enterobacter*“ vorgeschlagen. Das Genus besteht aus 12 Spezies, unter ihnen befindet sich *Enterobacter sakazakii* (GRIMONT u. GRIMONT 2006).

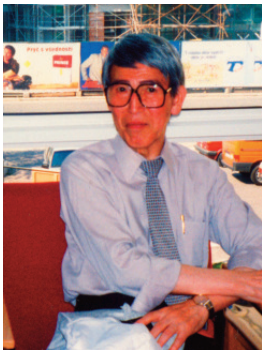
Enterobacter cloacae

E. cloacae ist der Referenzstamm für das Genus *Enterobacter*. Erstmals wurde der Erreger als *Bacterium cloacae* von JORDAN (1890) beschrieben und von CASTELLANI u. CHALMERS (1920) in *Cloaca cloacae* umbenannt. Seit 1923 ist er bekannt als *Aerobacter cloacae*, zugehörig zur Gruppe Cloaca A. 1960 wurde *E. cloacae* zum Referenzstamm des Genus *Enterobacter* erklärt. Bereits damals wurden gelb pigmentierte Stämme als gelb pigmentierter *E. cloacae* beschrieben (GRIMONT u. GRIMONT 2006).

Enterobacter sakazakii

Als 1980 *E. sakazakii* als eigenständige Spezies anerkannt wurde, war der Erreger bereits unter vielen Bezeichnungen wie „Urmenyi und Franklin Bazillus“, „gelber Coliformer“, „gelber *Enterobacter“*, „pigmentierter *Cloaca A* Organismus“ und vor allem als „gelb pigmentierter

E. cloacae" in der Literatur bekannt. Benannt wurde *E. sakazakii* nach dem japanischen Mikrobiologen Dr. med. vet. Riichi Sakazaki (1920-2002)[1] (FARMER III. et al. 1980, GURTLER et al. 2005). *E. sakazakii* lässt sich mit Hilfe der DNA-DNA-Hybridisierung gut von anderen *Enterobacter* spp. abgrenzen. Homologien zwischen 83 und 91 % sind bei *E. sakazakii*-Isolaten beschrieben, der Verwandtschaftsgrad zu *E. cloacae* beträgt 31-54 %, zu *E. gergoviae* 40 %, zu *E. amnigenus* 36 % und zu *E. intermedius* 26 % (FARMER III. et al. 1980, IZARD et al. 1983, LINDH u. URSING 1991). Ein enger Verwandtschaftsgrad besteht ebenfalls zu *Citrobacter* spp.: 48-53 % zu *Citrobacter diversus*, 51 % zu *Citrobacter amalonaticus* und 41 % zum Referenzstamm *Citrobacter freundii* (FARMER III. et al. 1980).



Riichi Sakazaki
1920-2002

Die Spezies *E. sakazakii* weist eine große genetische Vielfalt auf (IVERSEN et al. 2004c). IVERSEN et al. (2007) veranschaulichen nach eingehender molekularbiologischer Typisierung (Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP), Automated Ribotyping, Full Length 16 S rRNA Gene Sequencing, DNA-DNA-Hybridization) die genetische Vielfalt in einer komplexeren Taxonomie und ordnen diese in einem neuen Genus namens *Cronobacter* (*Cr.*) mit den sechs Spezies: *Cr. sakazakii*, *Cr. malonaticus*, *Cr. turcinensis*, *Cr. muytjensii, Cr. dublinensis* und *Cr. genonmospecies* 1. Das neue Taxon wurde 2008 vom International Committee on Systematics of Procaryotes akzeptiert und in die Liste des International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology aufgenommen (http://www.bacterio.net/) (IVERSEN et al. 2008). Für die vorliegende Arbeit wurde die alte Bezeichnung *E. sakazakii* beibehalten. Als Referenzstamm für *E. sakazakii* gilt der DSMZ-Stamm 4485 (ATCC 29544).

2.1.2 Morphologie und kulturelle Eigenschaften

2.1.2.1 Morphologische Eigenschaften

Es handelt sich um ein gramnegatives, 0,6-1,0 x 1,2-3,0 µm großes, nicht sporenbildendes Stäbchen (Anhang C, Abbildung C.1). Seine Beweglichkeit erlangt es durch 4-6 peritrich angeordnete Flagellen (BRENNER 1981, FARMER III. et al. 1980).

2.1.2.2 Kulturelle Eigenschaften

E. sakazakii gehört wie die anderen *Enterobacter* spp. zu den anspruchslosen, mesophil-thermotoleranten Keimen (BRENNER u. RICHARD 1984, MÜLLER et al. 1996, NAZAROWEC-WHITE u. FARBER 1997b). Er wächst unter fakultativ anaeroben Bedingungen sowohl in rekonstituierter Säuglingsnahrung und Folgenahrung, als auch in nicht-selektiven mikrobiologischen Medien

[1] Die Photographie stammt aus dem Privatbesitz der Familie Sakazaki.

(Trypton-Soja-Bouillon (TSB), Hirn-Herz-Glucose-Bouillon (BHI), Simmons-Citrat-Agar), in einem Temperaturbereich von 5,5-47,0 °C mit einem Optimum bei 37-43 °C. Ein Wachstum bei Temperaturen < 4 °C und > 50 °C wurde bisher nicht beobachtet (BREEUWER et al. 2003, FARMER III. et al. 1980, GURTLER u. BEUCHAT 2007b, IVERSEN et al. 2004b, KANDHAI et al. 2006, LIN u. BEUCHAT 2007, NAZAROWEC-WHITE et al. 2003, RICHARDS et al. 2005).

Auf Trypton-Soja-Agar bildet *E. sakazakii* nach 24 h bei 36 °C 2-3 mm große, glatte oder raue, schleimige oder trockene Kolonien (FARMER III. et al. 1980, HAWKINS et al. 1991). Die zwei Ausprägungen der Kolonieformen können ineinander übergehen, raue Kolonien bilden dann eine typische, glatte Oberfläche (NAZAROWEC-WHITE u. FARBER 1997c). In Bouillon kommt es zu einer ausgiebigen Sedimentbildung, bestehend aus Zellklumpen und amorpher Masse (NAZAROWEC-WHITE et al. 2003).

Kulturelles Verhalten in Säuglingsnahrung

Durch seine schnelle Anpassung an veränderte Milieubedingungen zeigt der Erreger in rekonstituierter Säuglingsnahrung kurze Latenzphasen. NAZAROWEC-WHITE u. FARBER (1997b) und KANDHAI et al. (2006) untersuchten das Wachstumsverhalten anhand von zehn bzw. vier (+ ATCC 29544) *E. sakazakii*-Isolaten in rekonstituierter Säuglingsnahrung. KANDHAI et al. (2006) besprühten das Säuglingspulver mit einer Keimsuspension und führten die Messungen erst nach drei- bis zehntägiger Lagerung durch, NAZAROWEC-WHITE u. FARBER (1997b) dagegen beimpften frisch zubereitete Säuglingsnahrung, um anschließend die Untersuchungen durchzuführen. Sie beobachteten Latenzphasen bei 10 °C (mangelhafte Kühlung) von 19-47 h und bei 23 °C von zwei bis drei Stunden. KANDHAI et al. (2006) erzielten bei 10 °C eine Latenzphase mit einer Dauer von bis zu 83,3 h und bei 37 °C von 1,7 h.

NAZAROWEC-WHITE u. FARBER (1997b) sowie KANDHAI et al. (2006) nutzten zur Auswertung die Gompertz-Gleichung bzw. die modifizierte Gompertz-Gleichung nach ZWIETERING et al. (1990) unter Berücksichtigung des Ratkowsky-Modells und der hyperbolischen Gleichung nach ZWIETERING et al. (1991).

RICHARDS et al. (2005) beobachteten anhand von zehn *E. sakazakii*-Isolaten das Wachstumsverhalten des Erregers in Kinderfolgenahrung. Diese Isolate wurden unterschiedlich mit Wasser, Milch und Säuglingsnahrung angerührt und boten bei 30 °C folgende Generationszeiten: Wasser 43 min, Milch 48 min und Säuglingsnahrung 57 min.

E. sakazakii zeigt neben Pseudomonaden, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* und *Candida* spp. in rekonstituierter Säuglingsnahrung höchste Wachstumsraten (KINDLE et al. 1996, RICHARDS et al. 2005). NAZAROWEC-WHITE u. FARBER (1997b) untersuchten anhand von zehn

E. sakazakii-Isolaten die Generationszeiten des Erregers in rekonstituierter Säuglingsnahrung und ermittelten bei 10 °C 4,6 h und bei 23 °C 0,6 h. IVERSEN u. FORSYTHE (2004) erreichten Verdopplungszeiten (n = 12, ATCC 29544) bei 37 °C in nicht-selektiven Medien (Whitley-Impedance-Bouillon, TSB und BHI) von 14-29 min und in rekonstituierter Säuglingsnahrung von 19-21 min. Bei 6 °C und 21 °C verlangsamte sich das Wachstum entsprechend auf 13,7 h bzw. 1,7 h (IVERSEN u. FORSYTHE 2003).

LIN und BEUCHAT (2007) führten zur Ermittlung der Generationszeit des Erregers (n = 10) Untersuchungen mit drei verschiedenen Kindermüslis durch. Die Zubereitung erfolgte jeweils mit sterilem, destilliertem Wasser und Vollmilch (Tabelle 2.1).

Tabelle 2.1 Generationszeit von *E. sakazakii* in Kindermüslis

Zubereitung mit	Bebrütungstemperatur		
	12 °C	21 °C	30 °C
Aqua destillata	2,7-5,1 h	54,2-63,4 min	30,2-33,3 min
Vollmilch	4,9-5,2 h	54,8-62,7 min	30,4-32,0 min

Die Chromogenese, der Prozess der Farbstoffproduktion, vollzieht sich am deutlichsten bei Raumtemperatur (RT) unter aeroben Bedingungen (BAKE et al. 2003). Die Bildung des charakteristischen gelben Pigments ist abhängig von der Bebrütungstemperatur. Die stärkste Ausprägung ist bei 25 °C nach 48 Stunden auf Trypton-Soja-Agar (TSA) oder Nähragar zu beobachten, bei 37 °C ist sie deutlich schwächer ausgeprägt (n = 57) (FARMER III. et al. 1980) (Anhang C, Abbildung C.1). Durch Subkultivierung kann ein Verlust der Pigmentbildung auftreten (BRENNER u. RICHARD 1984). IVERSEN u. FORSYTHE (2007) stellten eine fehlende Gelbfärbung bei zwei Prozent der Isolate (n = 250) fest (BLOCK et al. 2002).

Aus historischen Gründen und aus Mangel an geeigneten chromogenen Nährmedien wurde die Pigmentbildung als Charakteristikum zur Identifizierung von *E. sakazakii* herangezogen. Da die Pigmentausprägung eine ausgeprägte Abhängigkeit von Bebrütungszeit sowie Tageslichtmenge zeigt und eine deutliche Gelbfärbung nicht bei allen Isolaten in Erscheinung tritt, wird in der endgültigen Fassung des ISO-Standardentwurfs 22964 der International Organization for Standardization (ISO) die Pigmentbildung keine Berücksichtigung als charakteristisches Merkmal mehr finden (AFNOR 2006).

Zur Differenzierung von *E. sakazakii*-Stämmen ist der Fluoreszenznachweis gut geeignet (FARMER III. et al. 1985, MUYTJENS et al. 1984). *E. sakazakii* bildet als einzige Spezies unter den *Enterobacter* spp. das Enzym α-Glucosidase, welches in der Lage ist, 4-Methylumbelliferyl-α-D-Glucopyranosid (α-MUG) zu spalten. Durch Zugabe von α-MUG zu einem selektiven oder

nicht-selektiven Medium kann der Abbau von α-MUG nach Einwirkung des Enzyms durch Fluoreszenz unter ultraviolettem (UV) Licht nachgewiesen werden (GURTLER et al. 2005, LEHNER et al. 2006b, LEUSCHER 2004, MANAFI et al. 1991). Die Fluoreszenz ist am deutlichsten nach einer 24stündigen Bebrütung bei 37 °C (OH u. KANG 2004) (Anhang C, Abbildung C.1).

2.1.3 Biologische Eigenschaften

2.1.3.1 Hitzeresistenz

Die Hitzeresistenz von Bakterien unterliegt verschiedenen Einflussfaktoren. Eine günstige Zusammensetzung des Testmediums aus Kohlenhydraten, Fett, Eiweißen und Salzen, mit einem pH-Wert im neutralen Bereich (wie z.B. Milch), fördert die Hitzeresistenz. Außerdem spielen Bebrütungsbedingungen, Keimzahl, Wassergehalt und Alter der Kultur eine entscheidende Rolle bei der Ausprägung der Resistenz (HANSEN u. RIEMANN 1963, MÜLLER et al. 1996). ASAKURA et al. (2007) stellten einen Zusammenhang zwischen der Genexpression des „Translation Initiation Factors“ infB und der Ausprägung der Thermotoleranz bei 30 *E. sakazakii*-Isolaten aus Lebensmitteln und drei Referenzstämmen fest. Dabei wiesen hitzeresistente Isolate einen höheren Gehalt an infB auf als sensitivere Isolate.

BREEUWER et al. (2003) führten ihre Untersuchungen in Phosphatpuffer (pH = 7) mit anschließender Abkühlung in Eiswasser an 22 *E. sakazakii*-Isolaten und 11 *Enterobacteriaceae*-Isolaten durch und erzielten für die Enterobakterien eine dezimale Reduktionszeit (D-Wert) von 0,1-0,9 min bei 58 °C, für *Salmonella* Senftenberg und *Escherichia coli* einen D_{60}-Wert von 2,4 min bzw. 1,2 min. Die dezimale Reduktionstemperatur (z-Wert) belief sich bei *Salmonella* Enteritidis auf 4,3 °C, bei *Escherichia coli* auf 5,3 °C und bei *Salmonella* Typhimurium auf 5,7 °C. Die Untersuchungen zeigten bei *E. sakazakii* einen D_{58}-Wert von 0,4-0,6 min mit einem z-Wert von 3,1-3,6 °C.

EDELSON-MAMMEL u. BUCHANAN (2004) zeigten, dass die Hitzetoleranz bei *E. sakazakii* (neun Isolate und drei Referenzstämme) in rekonstituierter Säuglingsnahrung unterschiedlich ausgeprägt ist. Grundsätzlich lassen sich zwei Phänotypen unterscheiden: Die Hälfte der untersuchten Isolate gehören zum Typ I mit hoher Hitzeresistenz D_{58} > 300 s und die andere Hälfte zum Typ II mit durchschnittlicher Toleranz D_{58} < 50 s, vergleichbar mit anderen *Enterobacteriaceae*. Der z-Wert von 5,6 °C lag innerhalb der berichteten z-Werte (4-6°C) für andere pathogene, nicht sporenbildende, durch Lebensmittel übertragbare Erreger.

IVERSEN et al. (2004b) untersuchten die Hitzeresistenz von 13 *E. sakazakii*-Isolaten und einem Referenzstamm (NCTC 11467) mit und ohne Kapselausprägung, in TSB und rekonstituierter

Säuglingsnahrung. Weder Kapselbildung noch Testmedium hatten einen Einfluss auf die Ausprägung der Hitzeresistenz. Der ermittelte D_{58}-Wert lag in rekonstituiertem Pulver bei 2,2-5,7 s, der z-Wert lag bei 5,7 °C.

BREEUWER et al. (2003), EDELSON-MAMMEL u. BUCHANAN (2004) und IVERSEN et al. (2004b) kamen zu dem Schluss, dass die Hitzeresistenz von *E. sakazakii* mit der Resistenz anderer *Enterobacteriaceae* (*Citrobacter freundii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Serratia rubidae*, *E. agglomerans*, *Salmonella enterica* serovar Typhimurium und Enteritidis) vergleichbar ist. Lediglich *Salmonella enterica* serovar Senftenberg und *Escherichia coli* zeigten eine ausgeprägtere Resistenz (BREEUWER et al. 2003).

NAZAROWEC-WHITE u. FARBER (1997c) hingegen zählten *E. sakazakii* (n = 10) zu den thermotoleranten Enterobakterien mit einem D_{58}-Wert zwischen 3,1 und 5,9 s und einem z-Wert von 5,8 °C.

Eine Keimabtötung von 6-7 log Stufen wird bei thermischen Erhitzungsverfahren wie der Pasteurisation angestrebt und als ausreichend angesehen (ANON. 1990, CORDIER 2006, SPREER 2005). NAZAROWEC-WHITE u. FARBER (1997c) und IVERSEN et al. (2004b) errechneten anhand ihrer Laborwerte eine Keimreduktion von 11 und 21 log Stufen für eine Kurzzeiterhitzung auf 71,7 °C für 15 Sekunden. NAZAROWEC-WHITE et al. (1999) konnte in einer Pilotanlage eine log 5-Reduktion bei 68 °C für 16 s ermittelten. BREEUWER et al. (2003), IVERSEN et al. (2004b), MUYTJENS et al. (1988), MUYTJENS u. KOLLEE (1990), NAZAROWEC-WHITE u. FARBER (1997c) und NAZAROWEC-WHITE et al. (1999) gehen deshalb von einer Rekontamination mit *E. sakazakii* nach der Wärmebehandlung (Trocknung, Abfüllung) aus.

2.1.3.2 Toleranz gegenüber Austrocknung

In einem Vergleich mit 11 *Enterobacteriaceae* spp. zeigten BREEUWER et al. (2003), dass 22 *E. sakazakii*-Isolate, angezüchtet in BHI-Bouillon, in der stationären Wachstumsphase die höchste Resistenz gegenüber Austrocknung aufwiesen. Die Untersuchungen wurden in offen gehaltenen Zellkulturplatten bei 25 °C und einer Luftfeuchtigkeit von 20,7 % durchgeführt. Nach 46 Tagen zeigte sich bei *E. sakazakii* eine Reduktion des Ausgangskeimgehalts von 10^9 KbE/ml um lediglich 1-1,5 log Stufen, bei *Escherichia coli* dagegen um 4 log Stufen. Durch Erhöhung der Temperatur auf 45 °C erhöhte sich die Keimreduktion entsprechend, dennoch zeigte *E. sakazakii* unter den *Enterobacteriaceae* die höchste Toleranz (BREEUWER et al. 2003).

EDELSON-MAMMEL (2005) untersuchte die Resistenz gegenüber Austrocknung anhand von einem klinischen *E. sakazakii*-Isolat in auf Milchpulver basierender Säuglingsnahrung. Nach einer Einlagerungszeit von zwei Jahren bei Raumtemperatur und einer Wasseraktivität (a_w-Wert)

von 0,3 konnte von dem ursprünglichen Keimgehalt von 10^6 KbE/ml noch 300 KbE/ml nachgewiesen werden.

Bei der zwölfmonatigen Beobachtung des Keimverhaltens gegenüber Austrocknung in Säuglingsnahrung auf Milchpulver- (n = 4) und Sojabasis (n = 2) zeigte sich der Erreger (n = 10) über einen weiten a_w-Wert Bereich von 0,2-0,9 und über eine Lagertemperatur von 4-30 °C resistent. Die Absterberate stieg mit Erhöhung des a_w-Werts und der Lagertemperatur an. Die Zusammensetzung des Milchpulvers (Soja) hatte einen geringen (1/10) Effekt, die extrazelluläre Schleimproduktion eines Isolats hatte keine protektive Wirkung gegenüber der Austrocknung (GURTLER u. BEUCHAT 2007a).

Diskutiert wird in diesem Zusammenhang die Schutzfunktion des Disaccharids Trehalose gegenüber Umweltstressoren (Austrocknung, Osmose, Frost und Hitze). Die Trehaloseanhäufung vor allem in der stationären Phase des Keimwachstums kann zu einer Stabilisierung von Proteinen und Phospholipidmembranen führen und dadurch erheblich zum Überleben des Mikroorganismus beitragen (CROWE et al. 1992, KEMPF u. BREMER 1998, LESLIE et al. 1995, POTTS 1994, STRØM u. KAASEN 1993, WELSH et al. 1991). Die Untersuchungen von BREEUWER et al. (2003) deuten in der Tat auf einen Zusammenhang zwischen einer erhöhten Trehalosesynthese und einer gesteigerten Resistenz gegenüber Austrocknung hin. Die 22 *E. sakazakii*-Isolate, die den oben beschriebenen austrocknenden Bedingungen ausgesetzt waren und sich in der stationären Wachstumsphase befanden, wiesen eine fünfmal höhere Trehalosekonzentration auf als die Bakterienzellen, die sich noch in der exponentiellen Phase befanden, oder die stationären ausgetrockneten Wachstumsstadien des gegenüber Austrocknung sensitiveren *Escherichia coli*. Zusätzlich führte ein Trehalosezusatz in einem mit in der exponentiellen Wachstumsphase befindlichen Bakterienzellen beimpften Nährmedium zu einer Steigerung der Lebensfähigkeit der Mikroorganismen nach der Trocknung.

2.1.3.3 Osmotische Toleranz

BREEUWER et al. (2003) verglichen 11 *Enterobacteriaceae* spp. und 22 *E. sakazakii*-Isolate und konnten zeigen, dass neben *E. sakazakii* (n = 1/22) *E. agglomerans* (n = 1/11) die höchste osmotische Toleranz aufwies. Zur Senkung des a_w-Werts auf 0,934 wurden einer BHI-Bouillon 40 % Sorbitol zugesetzt. Nach einer zweimonatigen Lagerung bei 25 °C konnte eine Reduktion um eine log Stufe bei beiden oben genannten Erregern festgestellt werden, bei Salmonellen eine Reduktion um sieben log Stufen. Die Erhöhung des Sorbitolzusatzes auf 75 % führte zu einer Absenkung des a_w-Werts der BHI-Bouillon auf 0,8. Dies führte bei zwei von 22 Isolaten zu einer Reduktion um 3-4 log Stufen innerhalb von zwei Wochen, nach zwei weiteren Wochen war kein

Nachweis mehr möglich. Zwei weitere *E. sakazakii*-Isolate konnten noch nach insgesamt vier Wochen aus der Bouillon isoliert werden. Die Untersuchungen führten im gleichen Zeitraum bei den Enterobakterien (*Citrobacter freundii*, *Salmonella*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Serratia rubidae*) zu einer weitaus höheren Keimzahlabsenkung von über sechs log Stufen. Die osmotische Toleranz besteht jedoch nur in der stationären Wachstumsphase, in der exponentiellen reagiert *E. sakazakii* dagegen sehr sensibel auf osmotischen Stress (BREEUWER et al. 2003).

RAGHAV u. AGGARWAL (2007) untersuchten das Wachstumsverhalten von *E. sakazakii* (n = 31 und ein Referenzstamm) in BHI mit verschiedenen NaCl-Konzentrationen bei 37 °C. Hierbei stellten sie fest, dass sich das Keimwachstum mit Erhöhung des NaCl-Gehalts verlangsamt. Bei einem Salzgehalt von 0,5; 1; 1,5; 3; 5,5 und 10,5 % benötigte der Erreger zum Erreichen des gleichen Absorptionswerts bei 600 nm 45; 49; 64; 142,2; 367 und 1.524 Minuten. *E. sakazakii* ist also in der Lage, selbst bei hohen Salzkonzentrationen bzw. niedrigen a_w-Werten zu wachsen.

2.1.3.4 Biofilmbildung

Biofilme spielen in der Lebensmittelproduktion eine wichtige Rolle, da sie zu einer permanenten mikrobiellen Kontamination des Produkts führen und somit erheblich zum mikrobiellen Verderb und zu Lebensmittelinfektionen beitragen können (COSTERTON et al. 1987, FRANK 2000, KUMAR u. ANAND 1998). Durch die Ausbildung dieser physischen Barriere schützen sich die Mikroorganismen vor Umwelteinflüssen wie z.B. UV-Licht, osmotischem Stress, Hitze, Austrocknung, Säure, Detergentien, Antibiotika, Phagozyten, Antikörper und Bakteriophagen (COSTERTON et al. 1995, O'TOOLE et al. 2000). Die Anheftung von mehrschichtigen, mikrobiellen, polymeren Zellverbänden an spezifische Materialien ist charakteristisch für die Biofilmbildung (HANSLIK et al. 2000). Unterschiedliche Komponenten (Flagellen, Fimbrien, Membranproteine und extrazelluläre Polymere) sind an der Biofilmbildung beteiligt (PRATT u. KOLTER 1998).

E. sakazakii (n = 13, ein Referenzstamm), angezüchtet in rekonstituierter Säuglingsnahrung, haftet gut an Silikon, Latex und Polycarbonat, eine schlechte Haftung besteht dagegen bei Oberflächen aus Edelstahl (IVERSEN et al. 2004b). KIM et al. (2006) untersuchten den Effekt von Umwelteinflüssen (Temperatur) und Nährstoffangebot (TSB, rekonstituierte Säuglingsnahrung) auf die Anheftung und Biofilmbildung von *E. sakazakii* (n = 10) an Edelstahl und Magen-Darm-Sonden. Es konnte gezeigt werden, dass die Temperatur und die Verfügbarkeit von Nährstoffen einen entscheidenden Einfluss auf die Biofilmbildung haben. Bei 25 °C kam es zu einer

Keimanhaftung und Biofilmbildung in rekonstituierter Säuglinsnahrung, bei 12 °C sowie in TSB bei 25 °C dagegen nicht.

LEHNER et al. (2005) untersuchten anhand von 53 *E. sakazakii*-Isolaten und drei Referenzstämmen die Möglichkeit zur Haut- und Flockenbildung auf Flüssigkeiten. In nährstoffreichen Medien kommt es häufig zu einer Biofilmbildung (Haut). Daneben spielen die Zusammensetzung des Mediums und das Oberflächenmaterial eine Rolle. Trotz reichhaltigem Nährstoffangebot beider Medien (Luria-Bertani-Bouillon, BHI), bildete sich in der BHI-Bouillon mehr als doppelt so häufig ein Biofilm aus wie in der Luria-Bertani-Bouillon. Im Vergleich zwischen Glas- (42,8 %) und PVC-Oberflächen wies das Plastikmaterial (58,9 %) die besseren Hafteigenschaften auf.

Durch die extrazelluläre Bildung einer Polysaccharidschicht schützt sich *E. sakazakii* vor physikalischen oder chemischen Desinfektionsmitteln und vor Umwelteinflüssen. Von den 56 untersuchten Isolaten bildeten 24 eine extrazelluläre Polysaccharidschicht aus; dies galt besonders für Isolate, die aus dem Produktionsumfeld und Lebensmitteln gewonnen wurden, klinische Isolate waren dazu nicht in der Lage (LEHNER et al. 2005). Um eine vollständige Wirkungsentfaltung von Desinfektionsmaßnahmen zu garantieren, muss daher eine gründliche Reinigung der Flächen vorgenommen werden (KIM et al. 2007, LEHNER et al. 2005).

2.1.3.5 Drucktoleranz

Die vier untersuchten *E. sakazakii*-Referenzstämme zeigten eine unterschiedliche Ausprägung der Drucktoleranz, dennoch wiesen alle ein vergleichbares Toleranzspektrum wie andere Mitglieder der Familie der *Enterobacteriaceae* auf. Eine gute Keimreduktion von 3-6 log Stufen wird in TSB und rekonstituierter Säuglingsnahrung innerhalb einer Minute bei 600 MPa und 25 °C erreicht. Um genauere Aussagen bezüglich der Ausprägung der Drucktoleranz bzw. Drucksensibilität machen zu können, sind weiterführende Untersuchungen nötig (GONZALEZ et al. 2006).

PINA PEREZ et al. (2007) konnten eine Absenkung um sieben log Stufen in rekonstituierter Säuglingsnahrung bzw. in gepuffertem Peptonwasser zwischen 350 und 400 MPa bei 25 °C innerhalb von 10-15 min feststellen (n = 1).

2.1.3.6 Säurefestigkeit

Die Säurefestigkeit ist bei *E. sakazakii* moderat ausgeprägt. EDELSON-MAMMEL et al. (2006) prüften die Säurestabilität von *E. sakazakii*-Isolaten (n = 12), die sich in der stationären Wachstumsphase befanden, in einer auf pH 3,0 und 3,5 mit Salzsäure (HCl) angesäuerten TSB in einem Zeitraum von fünf Stunden bei 36 °C. Bei einem pH-Wert von 3,5 konnten noch nach

fünf Stunden Bakterien nachgewiesen werden, bei pH 3,0 bis zu zwei Stunden. Einige der Isolate zeigten eine Erhöhung der Säuretoleranz nach primärer Exposition und Adaptation in einem mild sauren Milieu mit einem pH Wert von 5,0-5,2 (TSB mit Glucosezusatz, Ansäuerung durch Glucoseabbau, ähnliche Bedingungen sind nach Zuckerabbau in Milch und Säuglingsnahrung zu erwarten). Ein Zusammenhang zwischen Säure- und Hitzetoleranz konnte nicht nachgewiesen werden.

2.1.3.7 Antibiotikaresistenz

E. sakazakii reagiert in therapeutischen Dosen sensibel auf Aminoglycoside, Penicilline, Cephalosporine der dritten Generation, Tetracycline, Chloramphenicol, Polypeptidantibiotika und Sulfamethoxazol-Trimethoprim-Kombinationen (ADAMSON u. ROGERS 1981, BRENNER 1981, FARMER III. et al. 1980, HAWKINS et al. 1991, JIMENEZ u. GIMENEZ 1982, KLEIMAN et al. 1981, LAI 2001, MUYTJENS et al. 1983, MUYTJENS u. VAN DER ROS-VAN DE REPE 1986, WILLIS u. ROBINSON 1988).

Der Erreger ist in der Lage, β-Lactamase zu bilden, was zu einer Zunahme der Resistenzbildung gegenüber Penicillinen und den ersten beiden Generationen der Cephalosporine führt (ANON. 2007b, EMERY u. WEYMOUTH 1997, FARMER III. et al. 1980, LAI 2001, PITOUT et al. 1997). Über Resistenzbildungen gegenüber Chinolonen berichtete LAI (2001), über das Auftreten von Multiresistenzen ARSENI et al. (1984) und FARMER III. et al. (1980).

2.1.4 Biochemische Eigenschaften

Zur phänotypischen Typisierung werden neben den serologischen vor allem die biochemischen Eigenschaften eines Keims herangezogen (BINGEN et al. 1994, FARMER III. et al. 1985). *E. sakazakii* und *E. cloacae* haben ein ähnliches biochemisches Profil. *E. sakazakii* grenzt sich jedoch durch eine negative Sorbitol-Reaktion und die Pigmentbildung ab (FARMER III. et al. 1977, Anhang A, Tabelle A.1). HEUVELINK et al. (2001) berichteten über Sorbitol-positive Isolate; die Pigmentbildung und das enzymatische Profil sind unter 2.1.2.2 und 2.1.5 beschrieben.

2.1.5 Enzymatische Eigenschaften

Das enzymatische Profil eines Mikroorganismus wird vor allem durch die Bildung bzw. das Fehlen eines Enzyms geprägt, weniger durch die gebildete Menge. Bei der Ermittlung des enzymatischen Profils handelt es sich um eine schnelle Nachweismethode; die Inkubationszeit beträgt bei 36 °C vier Stunden.

E. sakazakii sticht durch die Ausprägung des Enzyms α-Glucosidase und das Fehlen der Phosphoamidase unter den *Enterobacter* spp. hervor. Enzymatisch grenzt sich *E. sakazakii* von *E. cloacae,* neben den oben erwähnten Enzymen, durch die Bildung einer extrazellulären DNase auf Toluidin-O-Blau-Agar bei 36 °C nach sieben Tagen und der Tween-80-Esterase ab (ALDOVA et al. 1983, FARMER III. et al. 1980, KANDHAI et al. 2004b, LEHNER u. STEPHAN 2004). Nach einer Behandlung mit Ultraschallwellen ist mit einem Verlust der enzymatischen Aktivität bei *E. sakazakii* zu rechnen (n = 226) (MUYTJENS et al. 1984).

2.1.6 Virulenzfaktoren und Pathogenität

2.1.6.1 Virulenzfaktoren

Über die Virulenzeigenschaften von *E. sakazakii* ist wenig bekannt. Bei anderen *Enterobacter* spp. spielen Lipopolysaccharide als Endotoxine eine Rolle (BONE 1993). Aufgrund der nahen Verwandtschaft zu *E. cloacae* wird die Bildung von Hämagglutininen, Aerobactinen und Exotoxinen diskutiert (KELLER et al. 1998, LEHNER u. STEPHAN 2004, PAGOTTO et al. 2003). KLINE (1988) nimmt aufgrund enger verwandtschaftlicher Beziehungen zu *Citrobacter* und aufgrund ähnlicher Pathologie bei der Hirnabszessbildung analoge Virulenzfaktoren an (KLINE 1988, WILLIS u. ROBINSON 1988).

Bisher wurden folgende Virulenzfaktoren für *E. sakazakii* beschrieben:

Durch adhäsive Eigenschaften können bakterielle Infektionen ausgelöst bzw. aufrechterhalten werden. Bei Adhäsinen handelt es sich z.B. um Hämagglutinine, die sich auf den Fimbrien der jeweiligen Bakterien befinden. *E. sakazakii* produziert ein Mannose-sensitives Hämagglutinin, welches auf Typ I-Fimbrien (kanalisiert, ∅ 7-8 nm) lokalisiert ist (ADEGBOLA u. OLD 1983).

Eisen ist ein essentieller Bestandteil für bakterielles Wachstum. Um in eisenarmer Umgebung überleben zu können, produzieren *Enterobacteriaceae* geeignete Transportsysteme (Siderophore). Das Eisen wird entweder mit Phenolaten oder Hydroxamaten gebunden, dabei bildet sich Enterocholin oder Aerobactin (PAYNE 1988). *E. sakazakii* nutzt das Eisenvorkommen durch Bildung von Enterocholin (REISSBRODT u. RABSCH 1988).

Bei vier von 18 untersuchten Isolaten konnte eine Enterotoxinbildung festgestellt werden (PAGOTTO et al. 2003). Hierbei handelte es sich in ¾ der Fälle um klinische Isolate, bei ¼ um Isolate aus Lebensmitteln. Ein Enterotoxinbildner zeigte einen zythopathogenen Effekt in den drei untersuchten Zelllinien Y-1, Vero-Zellen und CHO-Zellen (Chinese Hamster Ovary-Cells), der auch nach 20minütigem Aufkochen bestehen blieb. RAGHAV u. AGGARWAL (2007) beobachteten bei zehn von 31 *E. sakazakii*-Isolaten die Bildung von β-Hämolysinen.

2.1.6.2 Pathogenität/Virulenz

PAGOTTO et al. (2003) testeten die Pathogenität von 18 *E. sakazakii*-Isolaten an Mäusen. Es handelte sich um acht Isolate aus Lebensmitteln, neun klinische Isolate und den Referenzstamm ATCC 29544. Vier der 18 Isolate waren in der Lage, Enterotoxine zu bilden. Bei den Enterotoxinbildnern handelte es sich um drei klinische Isolate und ein Isolat aus Lebensmitteln. Alle Isolate, darunter auch die Enterotoxinbildner, wirkten bei einer Dosis von 10^8 KbE/Maus intraperitoneal nach 24-48 h tödlich. Bei zwei Isolaten lag die tödliche Dosis bei 10^4 KbE/Maus.

Bei peroraler Aufnahme konnte nur bei zwei Isolaten (ein klinisches und ein Lebensmittelisolat) eine minimale letale Dosis von 10^5 KbE/Maus ermittelt werden, der Tod trat nach 48-72 h ein. Alle weiteren Isolate, darunter die Enterotoxinbildner, hatten selbst bei Dosen > 10^8 KbE/Maus keinen Effekt.

Die unterschiedliche Ausprägung der Virulenz bei den von PAGOTTO et al. (2003) beschriebenen Isolaten lassen viele mögliche Erklärungen zu. Hierzu gehören die Varianz am Toxinrezeptor, komplexe Regulationssysteme, Toxinverbreitung durch Gentransfer, Verlust von Virulenzfaktoren, Säureresistenz gegenüber der Magensäure (vor allem bei klinischen Stämmen) und die Variabilität der Zytotoxine.

2.2 Nachweis- und Typisierungsmethoden

2.2.1 Kulturelle Nachweismethoden von *E. sakazakii*

Die kulturelle Isolierung des Erregers basiert auf klassischen Anreicherungs- und Selektionsmethoden für *Enterobacteriaceae*. Morphologische Kriterien, Pigmentbildung und Fluoreszenz spielen bei der Ausdifferenzierung des Keims zusätzlich eine entscheidende Rolle. Anschließende biochemische und molekularbiologische Identifizierungsmethoden schließen das kulturelle Ergebnis ab (FDA 2002a, HASSAN et al. 2005, KANDHAI et al. 2004b).

Auf internationaler Ebene bildet der ISO-Standardentwurf ISO/DTS 22964, IDF/DRM 210 der International Organization for Standardization die Grundlage zur Harmonisierung des kulturellen Nachweises von *E. sakazakii* aus Milch und Milchprodukten für Industrie, Überwachungs- und Forschungsorgane und stellt dadurch die internationale Vergleichbarkeit der Resultate der einzelnen Labore sicher (ANON. 2004c) (Abbildung 2.1).

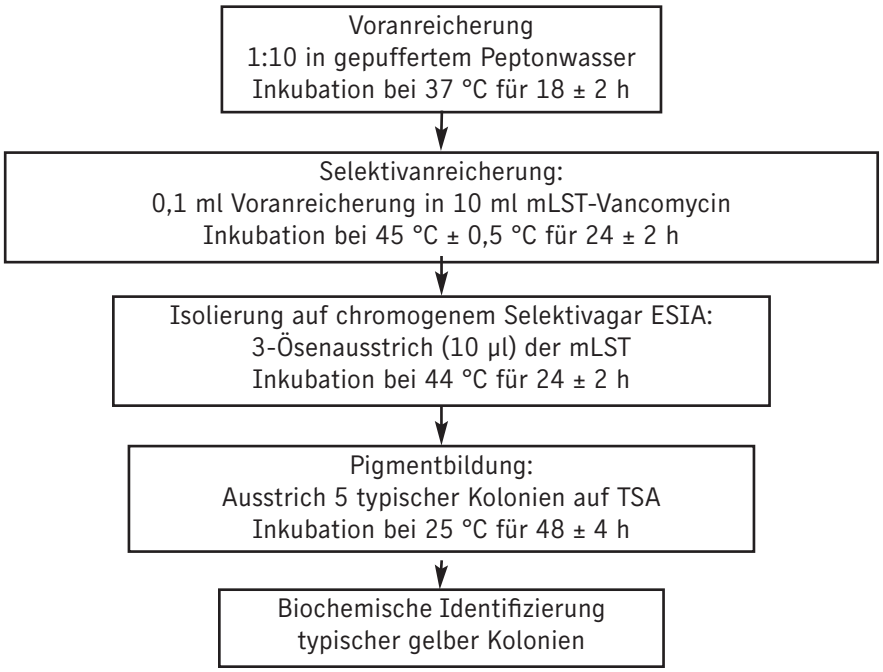


Abbildung 2.1 Isolierung nach vorläufigem ISO-Standard ISO/DTS 22964

2.2.1.1 Isolierung aus Milchpulver

Probenmaterial und Voranreicherung

Nach den Vorgaben der VO (EG) Nr. 2073/2005 in Verbindung mit der VO 1441/2007 über mikrobiologische Kriterien für Lebensmittel und der US Food and Drug Administration (FDA) hat der Hersteller die Abwesenheit von *E. sakazakii* in 300 g Säuglingsnahrung sicherzustellen. Die FDA empfiehlt hierfür eine halb-quantitative Bestimmung nach modifizierter MPN-Methode mit einem dreifachen Ansatz mit je 1, 10 und 100 g (FDA 2002a). Das Ausgangsmaterial wird in einem Verhältnis 1:10 mit A. dest. (FDA 2002a) oder gepuffertem Peptonwasser angesetzt (MUYTJENS et al. 1988, NAZAROWEC-WHITE u. FARBER 1997a, b, c) und für 18-24 h bei 37 °C bebrütet (IVERSEN u. FORSYTHE 2003).

Selektivanreicherung

Zu den klassischen Selektionsmedien für Enterobakterien gehört die *Enterobacteriaceae*-Anreicherungsbouillon (EE) nach MOSSEL (1985). Die FDA (2002a) sowie MUYTJENS et al. (1988), NAZAROWEC-WHITE u. FARBER (1997a, b, c) und IVERSEN u. FORSYTHE (2003) beimpften 90 ml der EE mit 10 ml der Voranreicherung und bebrüteten diese für 18-24 h bei 36 °C (FDA 2002a). HAMMER (2005) konnte anhand eigener Untersuchungen den Inokulationsmodus des vorläufigen ISO-Standards von 0,1 ml in 10 bzw. in 9 ml Laurylsulfat-Tryptose-Bouillon (LST) als ergiebigsten Modus bestätigen.

EL-PRINCE et al. (2007) verglichen drei verschiedene Anreicherungsmodi anhand von Milchpulver- und auf Milchpulver basierenden Produktproben: 1. Voranreicherung in A. dest., Selektivanreicherung in EE und Ausstrich auf VRBL, 2. Voranreicherung in gepuffertem Peptonwasser mit Ausstrich auf VRBL und 3. Ausstrich ohne Anreicherungsschritt auf VRBL. Hierbei konnten sie feststellen, dass ein Anreicherungsschritt zur Isolierung von *E. sakazakii* notwendig ist. Im direkten Vergleich zwischen den drei Anreicherungsmethoden schnitt die zweite Variante am besten ab (1.: 3,33 %, 2.: 10 % und 3.: 0 %).

Zur Hemmung der nicht-coliformen Begleitflora empfehlen die International Dairy Federation (IDF) und die International Organization for Standardization (ISO) sowie GUILLAUME-GENTIL et al. (2005), HAHN (2003) und HAMMER (2005) anstelle der glucosehaltigen EE-Bouillon die für den Coliformen-Nachweis anerkannte laktosehaltige LST (ANON. 2004c). Im Gegensatz zu HAHN (2003) und HAMMER (2005) setzen der ISO-Standard und GUILLAUME-GENTIL et al. (2005) Vancomycin als zusätzlichen Hemmstoff in einer Konzentration von 10 mg/l ein (modifizierte LST). Eine zusätzliche Hemmung der nicht-thermophilen Begleitflora wird durch eine Erhöhung der Inkubationstemperatur von 37 ° auf 45 °C erreicht (ANON. 2004c, GUILLAUME-GENTIL et al. 2005, HAHN 2003).

IVERSEN u. FORSYTHE (2007) verglichen die eigens definierte *E. sakazakii*-Anreicherungsbouillon (ESE) mit der EE-Bouillon, der mLST (0,5 M Natriumchlorid NaCl + 10 mg/l Vancomycin) nach GUILLAUME-GENTIL et al. (2005) und der *E. sakazakii*-Selektivbouillon (ESSB). Nach einer Inkubation von 18-24 h bei 37 °C konnte *E. sakazakii* zu 100 % (n = 177) aus der ESE isoliert werden. Aus mLST, ESSB und EE konnten dagegen zwei bis sechs Prozent der 177 Isolate nicht separiert werden.

Isolierung und Selektion

Die Selektivanreicherung wird entweder mit 10 µl im Dreiösenausstrich (FDA 2002a, ANON. 2004c), 0,1 ml im Oberflächenspatelverfahren (FDA 2002a) oder mit 1 ml im Gussplattenverfahren (MUYTJENS et al. 1988, NAZAROWEC-WHITE u. FARBER, 1997a, b, c) auf das Nährmedium aufgebracht. Zur besseren Betrachtung der Koloniemorphologie ist ein fraktionierter Ausstrich anzuraten (FDA 2002a, ANON. 2004c).

Basierend auf der α-Glucosidase-Aktivität des Mikroorganismus wurden zahlreiche *E. sakazakii*-selektive Nährmedien entwickelt [*Enterobacter sakazakii* Isolation Agar (ESIA) nach ISO/DTS 22964, *E. sakazakii* chromogenic plating medium (ESPM) nach RESTAINO et al. (2006) und Druggan Forsythe Iversen Formulation (DFI) Agar nach IVERSEN et al. (2004a), Oh Kang Medium

(OK Medium) nach OH u. KANG (2004)] und COMPASS (Biokar Diagnostics[2]). Die Auswertung kann nach entsprechender Inkubation und bei typischer Koloniemorphologie einen vorläufigen positiven Befund ergeben, dennoch ist eine zusätzliche Bestätigung auf Basis der Pigmentbildung auf TSA erforderlich (ANON. 2004c).

Auf dem selektiven Nährboden für Enterobakterien, dem Kristallviolett-Neutralrot-Galle-Glucose-Agar (VRBD) nach MOSSEL (1985), bilden sich nach 18-24 h bei 37 °C 2-4 mm große, violett-gelbe Kolonien mit, durch Ausfall der Gallensalze, violettem Präzipitationshof (Anhang C, Abbildung C.1). Typischer Bewuchs führt zu keinem vorläufigen Ergebnis, da es sich nicht um einen *E. sakazakii*-selektiven Nähragar handelt. Zur weiteren Ausdifferenzierung ist eine Überprüfung der Pigmentbildung auf TSA sowie ein Fluoreszenznachweis zur Darstellung der α-Glucosidaseaktivität unabdingbar (GONZALEZ et al. 2006, MUYTJENS et al. 1988, NAZAROWEC-WHITE u. FARBER 1997a, b, c).

DERZELLE et al. (2007) verglichen in ihrer Studie verschiedene *E. sakazakii*-Selektivmedien (ESIA, DFI und COMPASS) mit dem VRBD-Agar. Alle drei *E. sakazakii*-spezifischen Nährmedien ESIA, DFI und COMPASS, haben eine sehr hohe Sensitivität (100 %). Der ESIA-Agar hemmt am erfolgreichsten die Begleitflora und weist eine Spezifität von 83,3 % auf. Der COMPASS-Agar führt in 88 % der Fälle zu einem richtigen vorläufigen positiven Ergebnis. Dagegen zeigt der für alle Enterobakterien spezifische VRBD-Agar eine Sensitivität und Spezifität von lediglich 68,7 % bzw. 45,5% und erbringt somit in nur 47,8 % der Fälle ein vorläufiges positives Ergebnis. DERZELLE et al. (2007) kamen somit zu dem Schluss, dass eine Isolierung von *E. sakazakii* mit Hilfe des VRBD-Agars in Bezug auf die in der LST gewachsene Begleitflora problematisch sein kann. Zu falsch positiven Ergebnissen führten *Pantoea* spp. auf TSA, *E. cloacae* auf ESIA und VRBD, *Pantoea* spp. und *Klebsiella pneumoniae* auf DFI und COMPASS (RESTAINO et al. 2006). Die *E. sakazakii*-typische blau-grüne Färbung auf DFI-Agar trat ebenfalls bei Isolaten der Spezies *Pantoea* spp., *Escherichia vulneris*, *Leclercia adecarboxylata* und *Buttiauxella agrestis* auf (KRESS et al. 2005). Weitere Schritte zur Identifizierung (Biochemie, Molekularbiologie) sind bei Fluoreszenz-positiven gelben und weißen Isolaten durchzuführen.

Bestätigung durch Pigmentbildung und Fluoreszenz

Fünf typische Kolonien werden vom Selektivagar (für *E. sakazakii* oder Enterobakterien) auf TSA zur Bildung des gelben Pigments ausgestrichen und 48-72 h bei Raumtemperatur und Tageslicht bebrütet. Nach negativem Oxidase-Ergebnis werden die gelben Kolonien mittels

[2] Beauvais, Frankreich

biochemischer Testkits nochmals bestätigt (FDA 2002a, ANON. 2004c, GONZALEZ et al. 2006, KANDHAI et al. 2004b, MUYTJENS et al. 1988, NAZAROWEC-WHITE u. FARBER 1997a, b, c).

HAHN (2003) trägt die Selektivanreicherung im Dreiösenausstrich direkt auf TSA oder Nähragar mit oder ohne α-MUG-Zusatz unter Umgehung des Selektivmedium aus und nutzt die Kontrolle der α-Glucosidaseaktivität durch Fluoreszenznachweis mittels UV-Licht bei 366 nm als weiteren Identifizierungsschritt von typisch gelben Kolonien auf TSA. Eine bis fünf Kolonien bildende Einheiten von *Enterobacter sakazakii* können mit Hilfe von kationisch magnetischen Kügelchen aus 500 g Säuglingsnahrung innerhalb von 24 h isoliert werden (MULLANE et al. 2006).

2.2.1.2 Isolierung aus Umfeldproben

GUILLAUME-GENTIL et al. (2005) setzten zur Hemmung coliformer Bakterien der bekannten LST 0,5 M NaCl zu und folgten damit der Aussage von BREEUWER et al. (2003), dass *E. sakazakii* zu den osmotolerantesten Enterobakterien gehört. Zur Unterdrückung der grampositiven Bakterienflora mischten sie der Selektivanreicherung zusätzlich 10 mg/l Vancomycin bei. Der Schritt der Voranreicherung wird übersprungen, die Probe in einem Verhältnis 1:10 in der modifizierten LST angesetzt und bei 45 °C 22-24 h bebrütet. Anschließend wird die Bouillon (10 µl) im Dreiösenausstrich auf TSAB (TSA mit Zusatz von Gallensalzen) ausgestrichen und bei 37 °C und künstlichem weißen Licht über Nacht bebrütet. Das künstliche Licht regt die gelbe Pigmentbildung an und verkürzt die Identifizierung noch einmal um einen Tag. Neben *E. sakazakii* bilden ebenfalls *Pantoea* spp. und *Escherichia vulneris* typische gelbe Kolonien auf TSAB. Zur weiteren Differenzierung ist ein α-Glucosidase-Nachweis und eine biochemische Identifizierung mit dem API 20 E erforderlich.

KANDHAI et al. (2004b) reicherten die Proben ebenfalls in einem 1:10 Verhältnis in gepuffertem Peptonwasser für 18-20 h bei 37 °C an. Zehn Mikroliter der Voranreicherung werden auf den für coliforme Keime selektiven Nährboden Kristallviolett-Neutralrot-Galle-Agar (VRB) nach DAVIS (1951) ausgestrichen und 20-24 h bei 37 °C bebrütet. Typische Kolonien werden auf TSA ausgestrichen und entweder 24 h bei 37 °C oder 48 h bei 25 °C bebrütet. Gelbe, Oxidase-negative Kolonien durchlaufen anschließend einen α-Glucosidasenachweis und eine biochemische Identifizierung.

Da in der vorliegenden Arbeit *E. sakazakii* aus Milchpulver und Umfeldproben isoliert wurde, wurden die oben beschriebenen Publikationen zur Identifizierung berücksichtigt. Abweichungen von den aufgestellten Schemata sind unter Punkt 3.3.1 dargestellt.

2.2.2 Identifizierung mit biochemischen Testsystemen

Das API 20 E-Testsystem wird häufig als Zusatzbestätigung von *E. sakazakii* nach der kulturellen Isolierung eingesetzt (ASAKURA et al. 2007, BIERING et al. 1989, KANDHAI et al. 2004b, MONROE u. TIFT 1979, MUYTJENS et al. 1983, NAZAROWEC-WHITE u. FARBER 1999, SEO u. BRACKETT 2005, SIMMONS et al. 1989). IVERSEN et al. (2004a) berichteten von falsch positiven Resultaten beim API 20 E-Testsystem und HASSAN et al. (2005) in 20,3 % beim API ID 32 E.

2.2.3 Molekularbiologische Identifizierung

2.2.3.1 Identifizierung von *E. sakazakii* mittels PCR

Die Polymerase-Kettenreaktion bietet eine schnelle und sichere molekularbiologische Nachweismethode. Für *E. sakazakii* stehen zahlreiche PCR-Ansätze zur Verfügung. Als kommerzielles Testsystem ist das BAX-System Q 7 mit 100 % Spezifität im Handel erhältlich (HASSAN et al. 2005). Auf der Basis des α-Glucosidase-Gens entwickelten LEHNER et al. (2006a) einen zuverlässigen PCR-Ansatz mit 100 % Spezifität. Der PCR-Ansatz von HASSAN et al. (2005), LEHNER et al. (2004) und WEILI et al. (2006) basiert auf dem Nachweis der 16 S rRNA-Sequenz. Diese Methode bietet neben einer hohen Sensitivität und Spezifität auch die Möglichkeit einer nachfolgenden phylogenetischen Analyse. Der Real Time-PCR-Ansatz von SEO u. BRACKETT (2005) liefert eine schnelle, spezifische Nachweismethode mit einer Sensitivität von 100 KbE/ml aus rekonstituiertem Milchpulver. ASAKURA et al. (2007) konnten mit Hilfe der Genexpression eines Regulatorproteins der 16 S rRNA-Gensequenz eine Möglichkeit zur Identifizierung von thermotoleranten *E. sakazakii* aus Lebensmitteln und Umwelt aufzeigen. Weitere PCR-Ansätze wurden von DERZELLE u. DILASSER (2006), HASSAN et al. (2005), HASSAN et al. (2007), LAU u. ROTTON (2005) und MALORNY u. WAGNER (2005) beschrieben.

2.2.3.2 Molekularbiologische Typisierung

Die Typisierung von Bakterienstämmen einer gemeinsamen Spezies ist bei der Betrachtung von epidemiologischen Zusammenhängen im Bereich von nosokomialen Infektionen und Lebensmittelketten unerlässlich. Im Gegensatz zu phänotypischen Typisierungsmethoden (Serotypisierung, Biotypisierung, Antibiogramm, Lysotypisierung und Typisierung mit Bacteriocinen) weisen molekularbiologische Methoden (Restriction Enzyme Analysis (REA), Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP), Pulsfeld-Gelelektrophorese (PFGE), Multilocus Enzyme Electrophoresis (MEE) und Arbitrarily Primed Polymerase Chain Reaktion (AP-PCR)) eine universelle Anwendbarkeit mit einer sehr hohen Diskriminierung auf (BINGEN et al. 1994, BLANC et al. 1993, DRUDY et al. 2006a, DRUDY et al. 2006b, FANG et al. 1993, HAGENS u.

LOESSNER 2007, JOHN 1989, LIENAU et al. 2007, MASLOW et al. 1993, MULLANE et al. 2007, NÄTHER et al. 2007, OWEN 1989, PFALLER 1991, POPOVIC et al. 1996, SIEGRIST u. BLANC 1995, SINGH et al. 2006, SWAMINATHAN u. MATAR 1993, TOMKINS 1992, VAN BELKUM 1994).

Bei der Pulsfeld-Gelelektrophorese (PFGE) handelt es sich um eine universell anwendbare molekularbiologische Typisierungsmethode mit hoher Reproduzierbarkeit, höchsten Trenneigenschaften, der Möglichkeit zur Standardisierung und weltweiten Vergleichbarkeit (Pulse Net) (DRUDY et al. 2006a, MASLOW et al. 1993). Dadurch ist die PFGE für die molekulare Epidemiolgie im Bereich der Lebensmittel- und Infektionskette mit pathogenen Erregern hervorragend geeignet (DRUDY et al. 2006a). Nachteile bestehen in der Komplexität dieser Methode, der subjektiven Auswertung und der kostspieligen Apparatur (BINGEN et al. 1994, MASLOW et al. 1993, SIEGRIST u. BLANC 1995, SWAMINATHAN u. MATAR 1993). Die Drei-Banden-Regel nach TENOVER et al. (1995) zieht bei der Interpretation der Bandenmuster willkürlich auftretende genetische Veränderungen wie Punktmutationen, Insertion und Deletion des genetischen Materials mit ein und sollte daher durch erfahrene Untersucher vorgenommen werden (BINGEN et al. 1994). Die Auswertung erfolgt mit Hilfe von geeigneten Softwareprogrammen (DUCK et al. 2003, SINGH et al. 2006).

BLOCK et al. (2002), COIGNARD et al. (2006), HIMELRIGHT et al. (2002), NAZAROWEC-WHITE u. FARBER (1999) identifizierten mit Hilfe der PFGE mit *E. sakazakii* kontaminierte Säuglingsnahrung als Ansteckungsquelle bei mehreren klinisch erkrankten Patienten. MULLANE et al. (2008) konnten mit Hilfe der PFGE in einem Milchtrocknungswerk Kontaminations- und Verbreitungswege von *E. sakazakii* aufzeigen und kontaminierte Filteranlagen im Sprühtrockungsbereich als Hauptreservoir des Keims aufdecken.

Neben der PFGE konnten weitere molekularbiologische Typisierungsmethoden kontaminierte Säuglingsnahrung als Infektionsquelle bestätigen: AP-PCR (VAN ACKER et al. 2001), Plasmid Profil-Analyse (CLARK et al. 1990, MUYTJENS u. KOLLEE 1990), chromosomale Restriktions-Endonuklease-Analyse, Ribotypisierung (CLARK et al. 1990) und multilokale Enzym-Analyse (CLARK et al. 1990, SIMMONS et al. 1989).

2.3 Bedeutung von *E. sakazakii* für die menschliche Gesundheit

2.3.1 Reservoir

E. sakazakii ist weltweit verbreitet, dennoch sind keine eindeutigen Angaben über ein Reservoir zu finden (DRUDY et al. 2006b, GRIMONT u. GRIMONT 2006, KANDHAI et al. 2004a). MUYTJENS u. KOLLEE (1990) konnten den Organismus aus Oberflächenwasser, Erdreich, Schmutz, morschem Holz, Vogelmist, Getreide, Haustieren und Rindern nicht isolieren.

LECLERC et al. (2001) bezeichneten den Keim als opportunistisch-pathogenen Darmbewohner. FARMER III. et al. (1985) konnten den Erreger am häufigsten aus Wunden und dem Respirationstrakt gewinnen. Weitere beschriebene Isolierungen aus Lebensmitteln, Küchenutensilien, Körperflüssigkeiten und Gewebeproben von Patienten sind aus Gründen der Übersichtlichkeit in Anhang A, Tabelle A.2 dargestellt.

2.3.2 Vorkommen

Durch *E. sakazakii* ausgelöste Erkrankungsfälle sind sehr selten. Zwischen 1961 und 2008 wurde weltweit von 120 *E. sakazakii*-Fällen berichtet (die Zählung umfasst neben den berichteten *E. sakazakii*-Fällen ab 1980 auch die zuvor beschriebenen Erkrankungsfälle mit dem gelb pigmentierten *E. cloacae;* nicht alle Fälle wurden publiziert) (ANON. 2007a, ANON. 2008b). Eine Infektion mit *E. sakazakii* betrifft alle Altersklassen. Oft handelte es sich dabei um nosokomiale Infektionen (FARMER III. et al. 1985, GALLAGHER 1990). Zu den Risikogruppen gehören jedoch in erster Linie Neugeborene unter einer Woche und Säuglinge unter einem Monat. Als Risikofaktoren gelten Immunsuppression, ein geringes Geburtsgewicht < 2.500 g, Frühgeburten und Komplikationen bei der Geburt (ANON. 2004c, LAI 2001, MUYTJENS et al. 1983, WILLIS u. ROBINSON 1988, VAN ACKER et al. 2001). Die Infektionsrate lag bei Säuglingen unter einem Jahr bei 1:100.000 und bei Risikopatienten mit geringem Geburtsgewicht bei 8,7:100.000 (HIMELRIGHT et al. 2002). STOLL et al. (2004) untersuchten innerhalb eines Zeitraums von drei Jahren Sepsis und Meningitisfälle von 10.660 Neugeborenen mit sehr geringem Geburtsgewicht (401-1.500 g). Untersucht wurden Blut- und Liquorproben der Patienten auf *Enterobacter* spp.; dabei konnte *E. sakazakii* als Ursache in einem Fall von Septikämie festgestellt werden.

2.3.3 Infektionsweg

Der häufigste Infektionsweg bei *Enterobacter*-Septikämien ist der orale (WEISCHER u. KOLMOS 1992). Am Beispiel von Salmonellen zeigten PEGUES et al. (2006), dass fehlende Magensäure sowie die Pufferkapazität der Milch zur erhöhten Infektionsrate bei Neugeborenen beiträgt. Die Magensäure spielt eine entscheidende Rolle bei der Infektionsabwehr über den Verdauungsweg, denn der im Magen herrschende pH-Wert von 1-2 tötet Mikroorganismen erfolgreich ab. Kommt es nun zu einer pH-Neutralisierung z.B. durch Lebensmittel/Milch oder zu einer geminderten Säuresekretion (Neugeborene, Frühchen), können pathogene Erreger überleben und zu Infektionen führen (ANON. 2007a, DRASAR et al. 1969, GIANELLA et al. 1973, HOWDEN u. HUNT 1987, JOHNSON 2001, SMITH 2002). Der unzureichende Schluss der Darmschranke bei

Frühgeborenen und die nicht voll entwickelten Abwehrmechanismen erleichtern zusätzlich das Eindringen von Mikroorganismen in den Organismus (PEGUES et al. 2006).

Kontaminierte Säuglingsnahrung konnte als Ansteckungsursache mit *E. sakazakii* von BLOCK et al. (2002), CLARK et al. (1990), COIGNARD et al. (2006), HIMELRIGHT et al. (2002), MUYTJENS u. KOLLEE (1990), SIMMONS et al. (1989) und VAN ACKER et al. (2001) nachgewiesen werden. Übertragungen von Kind zu Kind oder Umfeldinfektionen wurden hingegen nicht beobachtet (HIMELRIGHT et al. 2002, SIMMONS et al. 1989, VAN ACKER et al. 2001). Neben keimbelasteter Säuglingsnahrung können kontaminierte Utensilien aus der Milchküche, die bei der Zubereitung des Milchpulvers Verwendung finden, zur Infektion beitragen (BLOCK et al. 2002, JASPER et al. 1990, MUYTJENS et al. 1983, SIMMONS et al. 1989).

2.3.4 Klinik beim Säugling

Die mit *E. sakazakii* infizierten Patienten leiden unter Meningitis, Sepsis sowie nekrotisierender Enterocolitis. Letztere ist durch Darmnekrosen und Emphysembildung charakterisiert (VAN ACKER et al. 2001). In 63 % der Fälle ist die Meningitis von Sepsis begleitet (MUYTJENS et al. 1983). Der Erreger zeigt einen deutlichen Tropismus zum zentralen Nervensystem mit Ausbildung von Gehirnzysten und -abszessen, Ventrikeldilatationen, Hydrocephalus, Gehirninfarkten, Flüssigkeitsansammlungen sowie Nekrosen. Nach überstandener Erkrankung ist mit neurologischen Spätfolgen wie mentalen und physischen Entwicklungsstörungen sowie spastischer Tetraplegie zu rechnen. Die Mortalität liegt zwischen 20 und 80 % (HAWKINS et al. 1991, LAI 2001, LEHNER u. STEPHAN 2004, MUYTJENS et al. 1983, NAZAROWEC-WHITE et al. 2003, VAN ACKER et al. 2001, WILLIS u. ROBINSON 1988). In Tabelle A.3 des Anhang A sind die in der zugänglichen Literatur beschriebenen Krankheitsfälle beim Säugling zusammengefasst.

2.3.5 Klinik bei Patienten über einem Jahr

Im Gegensatz zu Neonaten/Säuglingen sind Patienten über einem Jahr äußerst selten von einer Infektion mit *E. sakazakii* betroffen. Insgesamt wurde seit 1929 nur von acht Fällen (gelb pigmentierter *E. cloacae*- und *E. sakazakii*-Fällen) berichtet. Die meisten Patienten sind älter als 60 Jahre. Es handelt sich um eine Infektion, die mit einer schweren Vorerkrankung wie z.B. einer Tumorerkrankung (50 % der Fälle) oder einem schlechten Allgemeinzustand einhergeht. Hierbei kommt es zu Bakterämien und Sepsis; Fälle von Meningitis wurden nicht berichtet. Die Mortalität von 50 % ist mit der bei Neonaten und Säuglingen vergleichbar (LAI 2001). Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurde die Tabelle der aus der Literatur bekannten Erkrankungsfälle in Anhang A, Tabelle A.4 dargestellt.

2.4 Milchpulverherstellung

Wie bereits unter Punkt 2.2.3 erwähnt wurde, konnte mit *E. sakazakii* kontaminierte, auf Milchpulver basierende Säuglingsnahrung in zahlreichen Fällen mit schweren Erkrankungsfällen bei Säuglingen in Verbindung gebracht werden. Aus 4,17-14 % des weltweit untersuchten Milchpulvers (ESTUNINGSIH et al. 2006, HEUVELINK et al. 2001, IVERSEN u. FORSYTHE 2004, MUYTJENS et al. 1988, NAZAROWEC-WHITE u. FARBER 1997b, POSTUPA u. ALDOVA 1984) und aus 2,4-25 % der untersuchten auf Milchpulver basierenden Säuglingsnahrung (HEUVELINK et al. 2001, IVERSEN u. FORSYTHE 2004, MULLANE et al. 2007, SHAKER et al. 2007) konnte *E. sakazakii* bereits in einem Bereich von < 1-8 KbE/100 g erfolgreich isoliert werden (EDELSON-MAMMEL et al. 2006, MUYTJENS et al. 1988, NAZAROWEC-WHITE u. FARBER 1997b, SIMMONS et al. 1989). Daher soll an dieser Stelle die Milchpulverherstellung noch einmal kurz erläutert werden.

2.4.1 Definition: Dauermilcherzeugnisse

Ein Trockenmilcherzeugnis ist ein Milchprodukt (mit oder ohne Zusatz von Milchsäurebakterien), welches nach partiellem oder vollständigem Wasserentzug durch Hitze oder Kälte im Endprodukt einen maximalen Wassergehalt von 5% aufweist (MilchErzVO). Trockenmilcherzeugnisse sind durch eine lange Haltbarkeit und die Konservierung der Milchinhaltsstoffe gekennzeichnet. Diese Erzeugnisse dienen der Bildung von Nahrungsreserven auf Milchbasis für Notsituationen und Krisenfälle, einer lückenlosen Marktdeckung, einem Ausgleich von saisonalen und regionalen Schwankungen, einer Regelung des Angebots und einer Deckung des Bedarfs in der Futtermittel-, Lebensmittel- (Süßwaren-, Back-, Schokoladen-, Fleisch- und Wurstwarenindustrie), Kosmetik- und Pharmaindustrie. Der Einsatz von Dauermilchprodukten eignet sich vor allem für Länder mit unzureichender Kühltechnik (Tropen) und schlechter Infrastruktur. Unterschieden werden Dauermilcherzeugnisse nach dem zu trocknenden Ausgangsprodukt, Eiweiß- und Fettgehalt (ANON. 2008a). Neben Milchpulvern werden Trockenmilchzubereitungen (Säuglingsnahrung (SN), Milchaustauscher, diätetische Produkte und Substitutionsprodukte) sowie Spezialpulver mit verschiedensten Zusätzen produziert. (BAKE et al. 2003, FRISTER 2007, HAMMER et al. 2006, HAMMER u. HEESCHEN 1996, HELLER et al. 1996, SPREER 2005). In den 27 europäischen Mitgliedsstaaten wurden im Jahr 2008 850.000 t Vollmilch- und 1.060 000 t Magermilchpulver produziert. Davon lieferte Deutschland 157.000 t Vollmilchpulver und 232.000 t Magermilchpulver (ANON. 2007c, ANON. 2008c).

Säuglingsnahrung (SN)

Milchpulver ist eine Grundlage der auf Milch basierenden Säuglingsnahrung. Um die Nahrung an die speziellen Bedürfnisse des Säuglings anzupassen, werden dem Milchpulver die einzelnen Komponenten (Laktose, Stärke, Maltodextrine, Saccharose, Pflanzenfett, Sojaproteinisolat), je nach Löslichkeit und Mischbarkeit in trockenem oder flüssigem Zustand, beigemengt (MULLANE et al. 2007). An die Produktion und Zubereitung von Säuglingsnahrung werden, auf Grund der noch unvollständigen Entwicklung des Immunsystems der Konsumenten, höchste hygienische Anforderungen gestellt. Aus vielfältigen Gründen kommt die rekonstituierte Säuglingsnahrung als Muttermilchersatz zum Einsatz (CARIC 1993, HELLER et al. 1996, SINELL 1996). Seit 1989 werden *E. sakazakii*-Erkrankungen des Menschen mit auf Milchpulver basierender Säuglingsnahrung in Verbindung gebracht. Da für die sensiblen Konsumenten selbst eine geringe Kontamination mit Mikroorganismen gesundheitliche Folgen haben kann, erfordert die Herstellung von Trockenmilch/Säuglingsnahrung einen hohen lebensmittelhygienischen Standard (HANSLIK et al. 2000).

2.4.2 Produktionsablauf: Milchpulver und Kontaminationswege innerhalb der Produktion

Die Milchpulverherstellung ist seit Jahrhunderten bekannt. Marco Polo berichtete bereits über die Herstellung von Milchpulver in der Mongolei mit Hilfe von Sonnenenergie (BAKE et al. 2003). Die Prozessparameter im Vorwege der Milchtrocknung zeigt Abbildung 2.2.

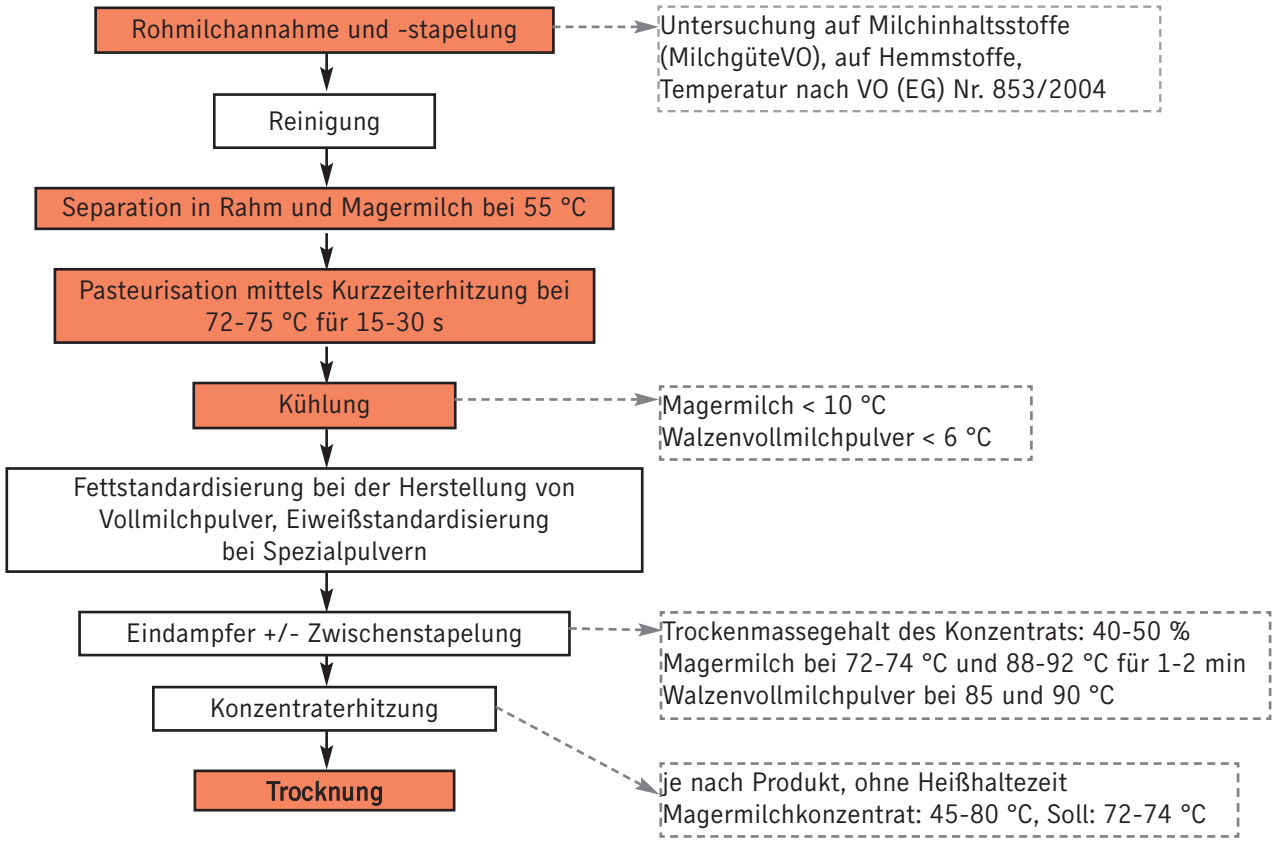


Abbildung 2.2 Prozessparameter im Vorwege der Milchtrocknung mit Critical Control Points des untersuchten Werks (rot)

2.4.2.1 Anlieferung und Pasteurisation

Die Qualität der Rohmilch hat einen entscheidenden Einfluss auf das Endprodukt. Erwünscht ist ein Ausgangsprodukt mit einer niedrigen Gesamtkeimzahl, einem geringen Gehalt an thermoduren und anaerob wachsenden Keimen. Die Milch wird vor der Reinigung zuerst entgast, anschließend in Rahm und Magermilch separiert und durch Kurzzeiterhitzung pasteurisiert. Hierauf kann eine Fett- oder Eiweißstandardisierung erfolgen (ANON. 2008a, BAKE et al. 2003, BARTH et al. 1992, HELLER et al. 1996, SPREER 2005). Um beim Vollmilchpulver einen Fettaustritt während der Lagerung zu verhindern, wird die Milch nach der Fettstandardisierung oder nach dem Konzentrieren zusätzlich homogenisiert.

E. sakazakii wird durch die Pasteurisation ausreichend abgetötet (Punkt 2.1.3), dennoch können thermodure Mikroorganismen innerhalb des Rücklaufsystems des Plattenerhitzers ideale Vermehrungsbedingungen vorfinden. Das System erlaubt neben einer Wachstumstemperatur von 45-55 °C die Anreicherung von Nährstoffen durch Ablagerungen von Kaseinen. Dies führt im Zusammenspiel mit geringen Strömungsverhältnissen (geringer Keimverlust) sowie der Abtötung bzw. dem Schwund einer konkurrierenden Begleitflora durch die Pasteurisation zu Keimanreicherung und Produktkontamination. Die sogenannten „cross-connections“ entstehen

durch Haarrisse oder Plattendurchbrüche und führen zu ungewollten Vermischungen zwischen pasteurisierter und nicht erhitzter Milch. Eine derartige Kontamination der pasteurisierten Milch kann durch schützende Druckgefälle vermieden werden (HAMMER u. HEESCHEN 1996, HELLER et al. 1996).

2.4.2.2 Eindampfer, Konzentratbehälter, Zwischenlagerung

Im Verdampfer wird der Milch 70 % des Wassergehalts entzogen; Masse und Volumen verringern sich, Viskosität und Dichte steigen dagegen an. Um eine optimale Auslastung der Trocknungstürme zu garantieren, wird das Konzentrat in Ausgleichstanks zwischengelagert (HAMMER et al. 2006). Die Erhitzung des Konzentrats erfolgt unmittelbar vor der Zerstäubung um eine unerwünschte Viskositätserhöhung und Wärmebelastung zu vermeiden. Bei der Konzentraterhitzung richtet sich die Temperatur nach Art des Pulvers und beinhaltet keine definierte Heißhaltephase (BAKE et al. 2003, SPREER 2005).

Mikroorganismen, die die Pasteurisierung und Konzentrierung überlebt haben, können sich in den letzten Stufen des Eindampfers einnisten und bei ausreichendem Nährstoffangebot und Temperaturen zwischen 40 und 45 °C gut vermehren. Auch die retrograde Kontamination ist hier zu berücksichtigen.

Eine weitere Gefahr der Kontamination bzw. Keimvermehrung besteht in der Zwischenlagerung des Konzentrats in Ausgleichstanks vor der Trocknung. Um eine ideale Auslastung und gleichmäßige Versorgung des Trocknungsturms zu gewährleisten, wird das Konzentrat in den Ausgleichtanks zwischengelagert. Hier herrschen optimale Vermehrungs- und Auskeimungsbedingungen für neu eingetragene Keime bzw. Mikroorganismen, die den Erhitzungsschritt überlebt haben. Die nachfolgende Konzentraterhitzung ohne definierte Heißhaltezeit und die anschließende Trocknung (Verdunstungskälte) führen zu einer unvollständigen und unzureichenden Keimabtötung (BAKE et al. 2003, BECKER u. TERPLAN 1986a, BECKER u. TERPLAN 1986b, HAMMER u. HEESCHEN 1996, HELLER et al. 1996, LICARI u. POTTER 1970a).

Zusätzlich zur Kontaminations- und Anreicherungsgefahr während der Konzentrierung führt die Eindampfungsphase durch Verringerung der Wasseraktivität zu einer erhöhten Hitzeresistenz der Keime (BECKER u. TERPLAN 1986a, BECKER u. TERPLAN 1986b, GONZALEZ-CABEZAS et al. 1983, MC DONOUGH u. HARGROVE 1968, TERPLAN u. BECKER 1988).

2.4.2.3 Trocknungsverfahren

Bei der Hitzetrocknung kommt es durch Verdampfen oder Verdunstung zu einer Trennung der Komponenten in eine feste und in eine gasförmige Phase; diese endotherme Reaktion lässt

Verdunstungskälte entstehen. Man unterscheidet bei der Milchpulverherstellung die Walzen- und die Sprühtrocknung. Zur Herstellung hochwertigen Pulvers wird auch die Gefriertrocknung eingesetzt. Der Wasserentzug vollzieht sich hierbei durch Sublimation, einhergehend mit einem hohen Energieverbrauch und ohne Eiweißdenaturierung (BAKE et al. 2003, HELLER et al. 1996, SPREER 2005).

Sprühtrocknung

Milchpulver wird heute überwiegend durch Sprühtrocknung hergestellt (Abbildung 2.3). Im Bereich der Eindampfung, Sprühtrocknung, Fließbetttrocknung und -kühlung können, je nach Hersteller und Bauart der Geräte, Modifikationen zu den dargestellten Prozessabschnitten bestehen (Abbildung 2.2, Abbildung 2.3). Der Trocknungsprozess von empfindlichen Produkten (Säuglingsnahrung auf Milchbasis, Molkenprodukte) verläuft mehrstufig, um Schädigungen durch Hitzedenaturierungen zu vermeiden.

Die erste Stufe der Trocknung, die so genannte Primärtrocknung, findet im Trockenturm statt. Dort wird das Konzentrat in feine Tröpfchen von nahezu gleichem Durchmesser versprüht. Ein Liter Tröpfchen erhält so eine Trocknungsoberfläche von ca. 120 m^2, wodurch ein rascher Stoffaustausch zwischen der 170 bis 250 °C heißen Trocknungsluft und den Konzentrattröpfchen erfolgt. Durch Ausbildung einer Dampfhülle werden die Partikel vor Hitzedenaturierung geschützt (Leidenfrostsches Phänomen). Die Pulverteilchen rieseln mit einer Temperatur von 65-75 °C zu Boden (Verdunstungskälte) und lagern sich dort mit einem Restfeuchtegehalt von 10-20 % zu Agglomeraten zusammen. Um das trockene Pulver der Austragungsöffnung zuzuführen, werden im Trockenturm Blas-, Klopf- oder Kehrräumer eingesetzt.

Die zweite Stufe ist die Sekundärtrocknung im Vibrationsbett- oder Wirbelschichttrockner. Die auf dem sog. Fließbett liegende Produktschicht wird mittels Vibrationen des heißen Luftstroms aufgewirbelt und bis auf einen Endfeuchtegehalt von ein bis zwei Prozent getrocknet. Diese Nachtrocknung wird mit einem < 100 °C warmen Luftstrom eingeleitet; das Milchpulver wird gesiebt, nach Korngröße eingeteilt, gekühlt und verpackt. Bei der Nachtrocknung können Mischungen, Granulierungs- und Instantprozesse bzw. Beschichtungen (Lecithinieren) vorgenommen werden. Die in der Prozessluft enthaltenen Pulverteilchen werden mit Zyklonen und Filtereinrichtungen zurückgewonnen und dem Produkt bei entsprechender Qualität zugeführt (BAKE et al. 2003, HAMMER et al. 2006, HELLER et al. 1996, SPREER 2005).

Ein Rekontaminationsrisiko ist auch bei der Nachtrocknung im Fließbett, der Instant-Herstellung und der Rückgewinnung von Pulverteilchen durch Zyklon- und Filteranlagen gegeben. Die Abluft in Fließbett, Zyklon- und Filteranlagen ist warm und feucht; dies führt an

kalten Metalloberflächen zur Kondenswasserbildung, was wiederum in Verbindung mit Milchpulver ideale Vermehrungsbedingungen für Keime schaft (BECKER u. TERPLAN 1986a, BECKER u. TERPLAN 1986b, HAMMER u. HEESCHEN 1996, MULLANE et al. 2007, TERPLAN u. BECKER 1988, WERNSMANN 2007, ZANGERL 2007). Neben der Abluft können schadhafte und verschmutzte Mannlochdichtungen, undichte Filterröhren, lange Standzeiten der Textilfilter und das rückgeführte Filterpulver selbst eine erhebliche Gefahr darstellen (HAMMER u. HEESCHEN 1996, TERPLAN u. BECKER 1988).

Die während der Trocknung gebildeten Pulverklümpchen oder -verkrustungen bzw. abgefallenen Ablagerungen der Turmwand werden durch Siebeinrichtungen teilweise aufgeschlossen. Dabei werden in den Klümpchen eventuell befindliche Keimnester freigesetzt, und was zu einer weitreichenden Kontamination des Endprodukts führen kann (HAMMER u. HEESCHEN 1996, SIMONSEN et al. 1987, TERPLAN u. BECKER 1988).

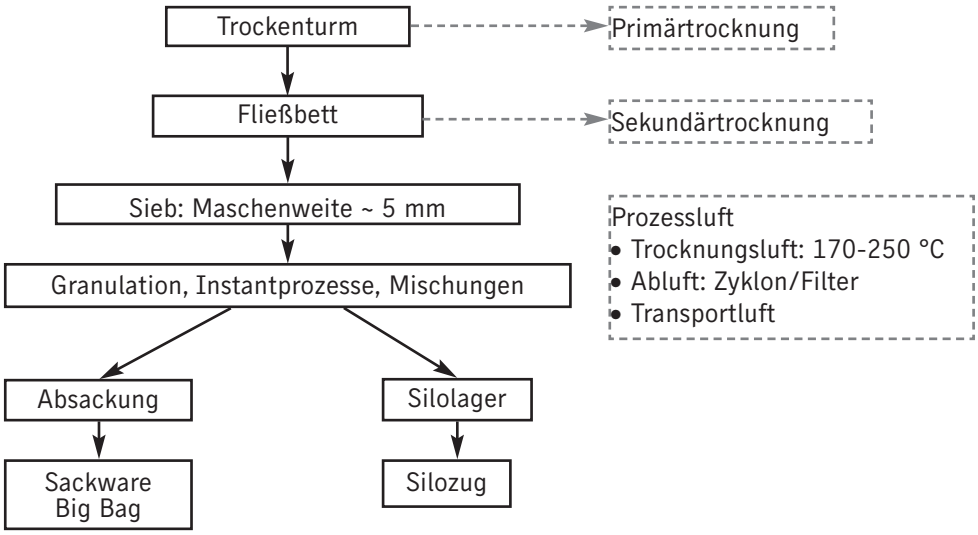


Abbildung 2.3 Prozessabschnitte der Sprühtrocknung

Im Trockenturm bestehen zahlreiche Möglichkeiten zur Rekontamination des Produkts. Zur Herstellung von Milchpulver werden große Luftmengen als Prozessluft (Trocknungs-, Transport-, Abluft) benötigt. Die Luft, die mit dem Produkt in Kontakt kommt, durchläuft in der Regel vorab bakteriendichte Filter. Temperaturunterschiede innerhalb des Produktionsumfelds und die Freisetzung bzw. das Ansaugen von Prozessluft begünstigen das Auftreten von Luftströmungen, welche erheblich zur Verbreitung und Verschleppung von kontaminiertem Material auch an schwer erreichbare Stellen (z.B. Kabelschächte) beitragen können (HAMMER et al. 2006, MULLANE et al. 2007, MULLANE et al. 2008).

Weitere wichtige Kontaminationsquellen stellen das Feuerlöschsystem, defekte Luftfilter, kontaminiertes Konzentrat, Ermüdungsrisse im Bereich der Isolierung (Klopfer) und Ablagerungen im Trockenturm dar. Eine Vermehrung auf der trockenen Oberfläche des Trocknungsturms ist zwar nicht möglich, jedoch können sich in den Ablagerungen Keime einnisten und jederzeit das Endprodukt kontaminieren (HAMMER u. HEESCHEN 1996, MULLANE et al. 2007, TERPLAN u. BECKER 1988, WERNSMANN 2007).

Die äußeren Abdeckbleche der Isolierschicht sind oft nur punktförmig verschweißt bzw. genietet, sodass es zu einem Eindringen von Wasser und Pulver in die Isolierschicht mit anschließender Vermehrung von Mikroorganismen kommen kann (BAKE et al. 2003, BECKER u. TERPLAN 1986a, BECKER u. TERPLAN 1986b, HAMMER u. HEESCHEN 1996, TERPLAN u. BECKER 1988, ZANGERL 2007). Nach dem Anfahren eines stillgelegten Turms können in der Turmisolierung vorhandene Keime durch das entstehende Vakuum durch die oben beschriebenen Ermüdungsrisse ins Innere des Turms angesaugt werden und den Turm kontaminieren. Deshalb ist eine Untersuchung des ersten Sacks nach dem Anfahren eines Turms als Kontrolluntersuchung wünschenswert (BECKER u. TERPLAN 1986a, BECKER u. TERPLAN 1986b, ROWE et al. 1987, TERPLAN u. BECKER 1988).

Das Filterpulver entsteht bei der Trennung der Pulverpartikel von der Trocknungsluft, aus der Abluft des Trocknungsturms, des Fließbetts und der Nachtrocknung durch entsprechende Filter, z.B. durch Textilschlauchfilter. Die Reinigung der Filter geschieht durch regelmäßig auftretende Druckimpulse. Das anfallende Restpulver wird je nach Qualität entweder als Futtermittel vermarktet oder zum primär gewonnenen Milchpulver zurückgeführt. Um ein durch Filter zurückgewonnenes Pulver effektiv nutzen zu können, ist eine gute Pulverqualität und damit ein Austausch von Textilfiltern durch waschbare Filteranlagen unabdingbar (BAKE et al. 2003, MULLANE et al. 2008).

Walzentrocknung

Die Technik der Walzentrocknung wird heute nur noch selten zur Herstellung von Spezialpulvern eingesetzt. Durch die intensivere Hitzebehandlung kommt es bei dieser Methode zur Karamellisierung der Laktose, dies führt neben gustatorischen Veränderungen zu einer Erhöhung des Wasserbindungsvermögens. Neben Verarbeitungsmöglichkeiten in Fertiggerichten sowie in der Wurst- und Backwarenindustrie kommt Walzenvollmilchpulver vor allem in der Schokoladenherstellung zum Einsatz. Das Konzentrat wird in einer dünnen Schicht auf eine dampfbeheizte Trocknungswalze aufgetragen. Dies erfolgt durch Aufsprühung oder Übertragung durch Auftragwalzen aus dem Nassguttrog bzw. „Sumpf“. Die Walzenoberfläche hat eine Temperatur von

140-160 °C. Durch Verdunstung wird dem Konzentrat die restliche Feuchte entzogen. Nach einer ¾ Umdrehung der Walze wird das Produkt durch Schabemesser abgetragen, gemahlen und verpackt (Abbildung 2.4) (BAKE et al. 2003, HELLER et al. 1996, SPREER 2005).

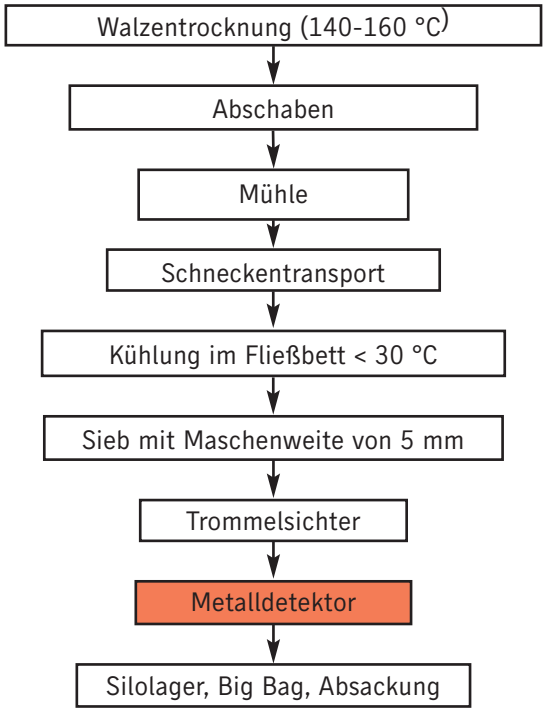


Abbildung 2.4 Prozessabschnitte der Walzentrocknung mit Critical Control Points des untersuchten Werks (rot)

2.4.2.4 Kontaminationen nach der Trocknung

Im Bereich der Abpackung kann kontaminiertes Packmaterial bzw. Aspirationspulver, welches durch Ansaugung des Milchpulvers bei der Verpackung gebildet wird, zu einer Kontamination des Endprodukts führen (HAMMER u. HEESCHEN 1996, HAMMER et al. 2006, SHEPHERD 2008).

Im Silolager ist aufgrund der trockenen Verhältnisse eine Vermehrung der Keime nicht möglich, jedoch entstehen ideale Wachstumsbedingungen bei akzidentellem Auftreten von Feuchtigkeit (HANSLIK et al. 2000, HAMMER et al. 2006, CORDIER 2006).

2.4.2.5 Endprodukt

Die mikrobiologische Qualität des Endprodukts ergibt sich aus der Beschaffenheit der angelieferten Rohmilch, dem Keimwachstum im Produktionsverlauf und einer Rekontamination des Endprodukts (BAKE et al. 2003, HELLER et al. 1996, MÜLLER et al. 1996, SINELL 1996, SPREER 2005). Durch den niedrigen a_w-Wert des Milchpulvers von 0,6 ist eine Vermehrung von Mikroorganismen ausgeschlossen, dennoch können solche Lebensmittel lebensfähige pathogene und saprophytäre Keime sowie hitzstabile Toxine (z.B. von Staphylokokken) enthalten. Eine

unzureichende Trocknung, Kondenswasserbildung, feuchte Lagerbedingungen sowie die hygroskopischen Eigenschaften des Milchpulvers führen zu einer Erhöhung des a_w-Werts und somit ggf. zur Keimvermehrung. Unwissenheit und falsche Zubereitung durch den Verbraucher können in explosionsartigen Vermehrungsraten von eventuell im Milchpulver enthaltenen pathogenen Keimen resultieren (BARTH et al. 1992, CORDIER 2006, MULLANE et al. 2007, MULLANE et al. 2008). Auf Milchpulver basierende Säuglingsnahrung setzt sich aus mehreren Komponenten zusammen, wodurch für Mikroorganismen mehrere Eintragswege ins Produkt bestehen (ANON. 2007a, HAMMER u. HEESCHEN 1996, KRESS et al. 2005, LAMBERT-LEGACE 1982). Ein kontaminiertes Produktionsumfeld des Herstellungsbetriebs für Säuglingsnahrung stellt eine weitere Möglichkeit für Keime ins Produkt zu gelangen dar. MULLANE et al. (2007) konnten mittels PFGE diesen Kontaminationsweg vom mit *E. sakazakii* kontaminierten Umfeld ins Endprodukt Säuglingsnahrung nachweisen.

Nach der Trocknung wird das Pulver abgekühlt, im Silo gelagert, in Dosen, beschichteten Papiersäcken, Plastiksäcken oder Big Bags verpackt oder als Siloware ausgeliefert (BAKE et al. 2003, SPREER 2005). Durch den niedrigen Wassergehalt ist eine lange Haltbarkeit des Milchpulvers gegeben. Eine Vermehrung von Mikroorganismen sowie mikrobieller Verderb findet somit nicht statt (BREEUWER et al. 2003, EDELSON-MAMMEL et al. 2005). Die Haltbarkeit wird allerdings durch die Aktivität der Lipasen begrenzt. Magermilchpulver besitzt durch seinen niedrigen Fettgehalt zwei bis vier, Vollmilchpulver ein bis drei Jahre Stabilität. Die Fettoxidation kann durch Zugabe von Antioxidantien und von Schutzgas (N_2) vermindert werden. Milchpulver hat stark hygroskopische Eigenschaften. Es empfiehlt sich eine trockene Lagerung bei 15 °C und 75 % relativer Luftfeuchte. Sinkt der Trockenmassegehalt < 93 %, kommt es zur Schimmelbildung und mikrobiellem Verderb (BAKE et al. 2003, HELLER et al. 1996, SPREER 2005).

2.4.3 Kontaminationen aus dem Produktionsumfeld

Da es sich bei der Milchpulverproduktion um einen Prozess mit hoher thermischer Einwirkung (Pasteurisation, Eindampfung, Trocknung) handelt, ist eine Kontamination des Endprodukts über den Prozessweg sehr unwahrscheinlich (SIMONSEN et al. 1987). Die Kontamination des Umfelds, hier am Beispiel von Salmonellen, erfolgt u.a über bauliche Mängel wie Undichtigkeiten mit Wassereintritt im Bereich des Daches und ungefilterte Prozessluft. Daneben können belebte Vektoren wie z.B. Schädlinge und deren Ausscheidungen, Vögel, Nager, Personal und unbelebte Vektoren wie Verpackungsmaterial, Transportfahrzeuge, Schimmelpilzsporen, Staub- und Luftpartikel, schwebfähige Einzelkeime und Rohstoffe bei Kontakt mit keimhaltigen Material die Verschleppung und Ausbreitung eines Erregers innerhalb eines Betriebs ermöglichen. In Milch-

trocknungsbetrieben bilden Milchpulverreste in Verkrustungen und Staubnischen in Verbindung mit Wärme und Feuchtigkeit ideale Wachstumsbedingungen für Mikroorganismen. Solche Voraussetzungen entstehen häufig bei Drosselung der Produktion und Stilllegung der Anlage, z.B. für Wartungsarbeiten. Das Endprodukt wird somit durch eine mehr oder weniger starke mikrobielle Kontamination des Umfelds gefährdet (BECKER u. TERPLAN 1986a, BECKER u. TERPLAN 1986b, HANSLIK et al. 2000, KANDHAI et al. 2006, LANGFELDT et al. 1988, MULLANE et al. 2007, MULLANE et al. 2008, TERPLAN u. BECKER 1988).

2.5 Risikoerörterung und Qualitätssicherung

2.5.1 Risikoerörterung

In Deutschland obliegt die offizielle Risikobewertung von mikrobiologischen Risiken in Lebensmitteln hinsichtlich des gesundheitlichen Verbraucherschutzes dem Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR). Aus diesem Grund wird nachfolgend nur noch von Risikoerörterung gesprochen. Weltweit anerkannte Risikobewertungen werden von der WHO vorgenommen (ANON. 2004a, ANON. 2006, ANON. 2007a, ANON. 2008b).

Endprodukt: Milchpulver, auf Milchpulver basierende Säuglingsnahrung

Bei Milchpulver handelt es sich nicht um ein steriles, aber um ein mikrobiologisch stabiles Produkt, d.h. pathogene Erreger können im Milchpulver in geringen Mengen vorkommen und teilweise über sehr lange Zeit überleben (DRUDY et al. 2006b). *E. sakazakii* verfügt über eine ausgeprägte Resistenz gegenüber Austrocknung und überlebt Einlagerungszeiten von über zwei Jahren. Durch den hohen Trockenmassegehalt ist bei trockener Lagerung eine Vermehrung von Mikroorganismen jedoch nicht möglich (AGOSTONI et al. 2004, ANON. 2007a). Die im Milchpulver enthaltenen Inhaltsstoffe bieten jedoch im rekonstituierten Zustand ein ideales Nährmedium für Mikroorganismen. Da *E. sakazakii* in der Lage ist, sich schnell an veränderte Milieubedingungen anzupassen, konnten von NAZAROWEC-WHITE u. FARBER (1997b) und KANDHAI et al. (2006) für auf Milchpulver basierende Säuglingsnahrung kurze Latenzzeiten mit starken Wachstumsraten ermittelt werden. Die *E. sakazakii*-Kontaminationsrate, ermittelt anhand von Stichproben aus der weltweiten Milchpulverproduktion, lag zwischen 4,2 und 14 %, die der auf Milchpulver basierenden Säuglingsnahrung bei 2,4-25,0 % und die der Kleinkindermüslis bei 5,6 %. KRESS et al. (2005) konnten in ihren Untersuchungen dagegen zeigen, dass milchfreie Folgenahrung für Säuglinge eine höhere Kontaminationsrate aufwies als Produkte auf Milchbasis und schließen daraus, dass Milchtrockenerzeugnisse nicht die einzige und möglicherweise nicht die wichtigste Eintragsquelle für *E. sakazakii* in Säuglingsnahrung darstellen. Weitere

Kontaminationsquellen liegen somit in den restlichen Zutaten der Säuglingsnahrung sowie im Herstellungsbetrieb selbst.

2.5.2 Risikominimierung durch Qualitätssicherung bei der Produktion

Der Schwerpunkt der Qualitätssicherung liegt in dieser Arbeit auf den lebensmittelhygienischen Parametern des herzustellenden Produkts (mikrobiologische, chemische und physikalische Gefahren). Der Vollständigkeit halber seien an dieser Stelle auch die produktspezifischen Qualitätsmerkmale erwähnt (Schüttgewicht, Haltbarkeit, Löslichkeit, Schmutzbild, Restfeuchte, Geschmack, Nährwert usw.). Um den Schutz der menschlichen Gesundheit vor Lebensmittelinfektionen und -intoxikationen zu gewährleisten, ist eine ganzheitliche Betrachtung des Produktionsprozesses von der Urproduktion bis zum Endverbraucher nach dem Motto „from stable to table“ unumgänglich (HABRAKEN 1986, ICMSF 2002, MÜLLER et al. 1996).

Die Basis der heutigen Qualitätssicherung ist ein solides Grundgerüst aus idealen räumlichen und technischen Voraussetzungen, Reinigungs- und Desinfektionsmaßnahmen, einer integrierten Schädlingsbekämpfung, regelmäßigen Fortbildungsmaßnahmen, Arbeitsrichtlinien für gute Hygienepraxis, einer durchdachten Betriebshygiene und geeigneten Arbeitsbedingungen. Komplettiert wird dieses Grundgerüst durch prozessbegleitende Kontrollmaßnahmen wie das HACCP-Konzept sowie ein allumfassendes sog. Total Quality Management, welches auf dem Prinzip der Fehlervermeidung durch Rückkopplungssysteme beruht.

2.5.2.1 Umfeldmonitoring

Da wenig Daten bezüglich *E. sakazakii*-Kontaminationen in Milchtrocknungssytemen zur Verfügung stehen, wird im Folgenden auch auf Salmonellen und *Enterobacteriaceaen* im Allgemeinen eingegangen. JARL u. ARNOLD (1981) empfehlen einem Milchtrocknungsbetrieb zur Einschränkung und Beherrschung einer Salmonellen-Kontamination neben einer systematischen Durchführung und Überwachung aller notwendigen Hygienemaßnahmen eine wöchentliche Probenahme aus dem Produktionsumfeld mit anschließender Endproduktkontrolle bei zweimaligem positiven Befund aus dem Umfeld. Da Salmonellen zur Familie der Enterobakterien gehören und somit ähnliche Verbreitungswege aufweisen, werden der Nachweis von Coliformen und *Enterobacteriaceaen* beim Monitoring als Indikatorkeime eingesetzt. Da bei der Milchpulverproduktion von einer Kontamination des Endprodukts aus dem Produktionsumfeld auszugehen ist, gilt: Ein negativer Salmonellenbefund im Umfeld führt zu einem negativen Befund im Endprodukt (BECKER u. TERPLAN 1986a, BECKER u. TERPLAN 1986b, FOSTER 1971, HABRAKEN et al. 1986, ICMSF 2002, JARL u. ARNOLD 1982, HAMMER et al. 2006, LANGFELDT et al. 1988, RAY et al. 1971, ROWE et al. 1987, SIMONSEN et al. 1987,

TERPLAN u. BECKER 1988). CORDIER (2006), MULLANE et al. (2008) und SHEPHERD (2008) weisen ausdrücklich auf die Notwendigkeit eines *Enterobacteriaceae-Monitoring* im Umfeld der Produktionsanlagen für die Bekämpfung von *E. sakazakii* hin.

2.5.2.2 Zonenkonzept

Zonenkonzepte sind betriebsspezifische Hygienekonzepte. Sie beruhen je nach Hygieneanspruch z.B. auf einer Dreiteilung der Produktionsbereiche. Das jeweilige Konzept soll einen Neueintrag von Erregern aus der Außenwelt verhindern, ein Eindringen des Keims zeitnah erkennen, den Ursachen entgegenwirken und einer Verschleppung in die verschiedenen Betriebsabschnitte vorbeugen. Der Bereich mit dem niedrigsten Hygieneanspruch ist z.B. „schwarz“ gekennzeichnet; hier haben Personen und Fahrzeuge zur Außenwelt freien Zugang (Lager mit verpacktem Produkt). Beim einem „grauen“ Bereich handelt es sich um einen Übergangsbereich; Personen und Fahrzeuge haben keinen freien Zugang, jedoch kann nicht dekontaminierbares Material über Übergangsstationen ein- und ausgebracht werden (HAMMER et al. 2006). Der Bereich mit den höchsten Hygieneansprüchen ist „weiß“ gekennzeichnet; der Zutritt erfolgt über Schleusen bzw. Übergabestellen und ist nach Stockwerken und Funktionen in Teilbereiche unterteilt. Diese Unterteilung der weißen Zone spielt eine wichtige Rolle beim Umfeldmonitoring z.B. für Salmonellen. Bei der Umfeldbeprobung kommen für den jeweils definierten Bereich explosionssichere Staubsauger zum Einsatz. In Milchtrocknungsbetrieben fallen hierunter z.B. folgende Bereiche: Eindampfung, Trocknungsturm, Luftfiltration (Turm-, Transport-, Abluft), Silolager, Absackung und Schaltwarte) (CORDIER 2006, HAMMER et al. 2006, MULLANE et al. 2007, SHEPHERD 2008).

2.5.2.3 Reinigungskonzept

In einem Milchtrocknungswerk stellt - neben Milchpulverresten, die als Nährstoffgrundlage und Träger von Bakterien fungieren - die vorhandene Feuchtigkeit eine weitere Möglichkeit zur Vermehrung der Mikroorganismen dar (CORDIER 2006, LICARI u. POTTER 1970b, MULLANE et al. 2008, SIMONSEN et al. 1987). Da ein aus sieben Metern Höhe fallender Tropfen Kondenswasser mit einem Durchmesser von fünf Millimetern in 5.000 Mikrotröpfchen zerfällt, erscheint eine Nassreinigung mit einem erheblichen Gefährdungspotential verbunden zu sein, das zur Vermehrung und Verschleppung von Kontaminanten erheblich beitragen kann. Daher wird in einigen Werken das Prinzip der Trockenreinigung mit mechanischen Mitteln unter Ausschluss von jeglichen Desinfektionsmaßnahmen praktiziert (HAMMER et al. 2006). Eine strikte Trennung zwischen dem Nass- und Trockenbereich ist einzuhalten. Jegliches Eindringen von Wasser sowie

Kondenswasserbildung sind weitestgehend zu vermeiden (CORDIER 2006, MULLANE et al. 2007, SHEPHERD 2008).

2.5.3 Maßnahmen zur Risikominimierung beim Verbraucher bzw. Betreuungspersonen

Durch fehlerhafte Zubereitung und Lagerung von gering kontaminierter Säuglingsnahrung bzw. Milchpulver (Anrühren von zu großen Mengen, zu lange Aufbewahrung bei RT, unzureichende Kühlung ≥ 4 °C und nochmalige Aufwärmung bzw. lange Warmhaltezeiten in Flaschenwärmern < 65 °C) kann sich *E. sakazakii* explosionsartig vermehren (AGOSTONI et al. 2004, CORDIER 2006). Erkrankungsfälle bei Säuglingen und Neugeborenen sind somit zwar auf kontaminierte Säuglingsnahrung zurückzuführen, resultieren aber meistens auch aus mangelhafter Küchenhygiene. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Kontaminationsrate beim Endprodukt der Walzentrocknung zwischen 1,2 und 33,3 % und beim Sprühmagermilchpulver des ersten Turms bei 1,9 % lag. Dieses Milchpulver wird der Säuglingsanfangsnahrung im Dry Mix Verfahren in unterschiedlichen Anteilen beigemischt und trägt somit zur Kontamination der Babynahrung bei (KRESS et al. 2005, MULLANE et al. 2007). Durch das Vermengen der unterschiedlichen Zutaten kommt es zwar zu einer Verdünnung des Keimgehalts, jedoch kann, wie schon oben erwähnt, unter Umständen eine rasante Vermehrung von *E. sakazakii* auftreten.

Deshalb formulierte 2002 die US Food and Drug Administration (FDA) folgende Hinweise zur Zubereitung und Handhabung von Säuglingsnahrung (FDA 2002b):

- Erforderliche Trinkmenge pro Mahlzeit frisch herstellen, Anlegung von Tagesvorräten vermeiden, zubereitete und bei RT gelagerte Säuglingsnahrung nach max 4 h wegwerfen (AGOSTONI et al. 2004, DRUDY et al. 2006b, GURTLER u. BEUCHAT 2007b, LIN u. BEUCHAT 2007)
- Zubereitung der Säuglingsnahrung mit ≥ 70 °C heißem Wasser (EDELSON-MAMMEL et al. 2006)

Eine Infektion könnte durch Stillen verhindert werden, da dies aber in zahlreichen Fällen nicht möglich ist (Agalaktie, Mastitis, Risikopatienten, Verhinderung einer HIV-Infektion überwiegend in der Dritten Welt), ist eine Ernährung mit steriler Säuglingsnahrung anzustreben (DOHERTY et al. 2007, KAUFMAN u. FAIRCHILD 2004). Dies macht jedoch eine umfassende Aufklärung der Verbraucher und eine gute Küchenhygiene nicht überflüssig, da eine Vermehrung des Erregers in geöffneter, rekontaminierter und falsch verwahrter Nahrung stattfinden kann (ANON. 2007a).

Zu dem gesamten Themenkomplex veröffentlichte ein Expertengremium der Welternährungs- (FAO) und Weltgesundheitsorganisation (WHO) folgende Empfehlungen (*Enterobacter sakazakii* and other micoorganisms in powdered infant formula: meeting report, Microbiological Risk Assessment (MRA) Series, No. 6):

1. Regelmäßige Aufklärung der Betreuungspersonen über das Gefährdungspotential von Muttermilchersatznahrung für Säuglinge sowie Hinweise zur Risikominimierung (es handelt sich nicht um ein steriles Produkt, sondern es besteht jederzeit die Möglichkeit einer Kontamination mit pathogenen Erregern)
2. Sterile Säuglingsnahrung bei der Betreuung von Risikopatienten verwenden sowie geeignete Maßnahmen zur Dekontamination ergreifen
3. Richtlinien für die richtige Handhabung, Lagerung und Zubereitung von Säuglingsnahrung erstellen
4. Bereitstellung eines breiten Angebots steriler Babynahrung für Risikopatienten durch die Industrie
5. *E. sakazakii* aus dem Produkt und dem Produktionsumfeld der Industrie durch geeignete Maßnahmen (*Enterobacteriaceae*-Monitoring) zurückdrängen
6. Mikrobiologische Kriterien für *E. sakazakii* in Säuglingsnahrung festsetzen
7. Entwicklungsländer aufgrund der hohen Anzahl an untergewichtigen, immunsupprimierten und HIV gefährdeten Konsumenten besonders unterstützen
8. International anerkannte Isolierungs-, Identifizierungs- und molekularbiologische Typisierungsmethode so schnell wie möglich festlegen
9. Studien zu Vektoren, Kontaminations- und Infektionsquellen erheben
10. Fehlende Kenntnisse in den Bereichen Reservoir, Taxonomie, Virulenz usw. durch gezielte Forschungsvorhaben ausgleichen

Punkt 3 wurde 2007 von der WHO und FAO in: Guidelines: Safe preparation, storage and handling of powdered infant formula umgesetzt. Punkt 6 wurde in der Europäischen Union (EU) bereits erfolgreich in der Verordnung über mikrobiologische Kriterien in Lebensmitteln (EG) Nr. 2073/2005 in Verbindung mit der VO (EG) Nr. 1441/2007 erfüllt, mit einem Probenahmeplan für Säuglingsnahrungsmittel n = 30 à 10 g, c = 0, *E. sakazakii* in keiner Probe nachweisbar.

2.6 Lebensmittelhygienisch relevante Rechtsgrundlagen

2.6.1 Milchpulver

Im Hinblick auf die unter Punkt 2.2.4 bereits hervorgehobenen Risikogruppen für Erkrankungen mit *E. sakazakii* erstellten die Welternährungsorganisation (FAO) und die Weltgesundheitsorganisation (WHO) drei Berichte auf internationaler Ebene mit Angaben zu Epidemiologie, Mikrobiologie, Risikomanagement und Lebensmittelzubereitung (ANON. 2004c, ANON. 2006, ANON. 2007a). Daneben wurden von der FAO/WHO gegründeten Codex Alimentarius-Kommission international anerkannte Standards und Empfehlungen zur Produktion, Hygiene, Beschaffenheit und Kennzeichnung von Lebensmitteln erarbeitet (ANON. 1979, ANON. 1997a, b). Neben den produktspezifischen Hygienevorschriften für Milch und Milchprodukte, dargestellt im CAC/RCP Report 57 (ANON. 2004b), äußerte sich die Kommission im CAC/RCP Report 21-1979 (Tabelle 2.2) (ANON. 1979) ebenfalls unter Einbeziehung des erhöhten Risikos für Säuglinge und Kleinkinder zu spezifischen Hygienemaßnahmen und mikrobiologischen Kriterien.

Tabelle 2.2 Mikrobiologische Kriterien für Säuglingsnahrung (CAC/RCP 21-1979)

Keim	n	c	m/g	M/g
mesophile aerobe Bakterien	5	2	10^3	10^4
coliforme Keime	5	1	< 3*	20
Salmonella in 25 g (Probe)	60	0	0	-

n: Anzahl der Proben, c: Anzahl der Proben mit einer Keimzahl zwischen m und M, m/g: Schwellenwert für die Keimzahl in KbE/g, M/g: Höchstwert für die Keimzahl in KbE/g

*< 3 kein positives Röhrchen im Standard drei Röhrchen MPN (most probable number) method (ICMSF 1978)

Die Herstellung von Milchpulver bietet neben einer vielseitigen Vermarktungsmöglichkeit auch eine abwechslungsreiche Produktpalette. Die Milcherzeugnisverordnung schafft hierfür die rechtliche Grundlage auf nationaler Ebene. Neben dem klassischen Ersatz für herkömmliche Frischmilch spielt Milchpulver als Bestandteil in zahlreichen Produkten der Lebensmittelindustrie, aber auch bei der Herstellung von diätetischen Produkten für ältere, kranke Personen sowie Säuglinge eine wichtige Rolle. In Bezug auf diese diätetischen Lebensmittel für Säuglinge und Kleinkinder setzt die Diätverordnung in § 14 folgende mikrobiolgische Kriterien fest (Tabelle 2.3).

Tabelle 2.3 Mikrobiologische Kriterien für diätetische Lebensmittel für Säuglinge und Kleinkinder nach § 14 der Diätverordnung

Produktbeschaffenheit	mikrobiologisches Kriterium
genussfertig	≤ 10.000 Keime/ml
trocken, eingedickt	≤ 50.000 Keime/g
genussfertig	≤ 150 aerobe sporenbildende oder eiweißlösende Bakterien/ml
trocken, eingedickt	≤ 150 aerobe sporenbildende oder eiweißlösende Bakterien/0,1 g

Das grundlegende Ziel des europäischen Lebenmittelrechts ist ein hohes Schutzniveau der Gesundheit der Bevölkerung in allen Mitgliedsstaaten der Europäischen Union. Den Grundstein des europäischen Lebensmittelrechts bildet die VO (EG) Nr. 178/2002 mit den darauf aufbauenden VO (EG) Nr. 852/2004, 853/2004, 854/2004 und 882/2004. Die Bewertung von Milchpulver bzw. auf Milchpulver basierender Säuglingsnahrung erfolgt nach Artikel 14, 2 und 4a in Verbindung mit § 5 des Lebensmittel-, Bedarfsgegenstände- und Futtermittelgesetzbuchs (LFGB). Darin heißt es, dass nicht sichere (gesundheitsschädliche) Lebensmittel nicht in den Verkehr gebracht werden dürfen.

Um unterschiedliche Auslegungen des Lebensmittelrechts zu vermeiden, wurde auf europäischer Ebene eine Harmonisierung der Sicherheitskriterien für Lebensmittel in der VO (EG) Nr. 2073/2005 bzw. der Nachfolge-VO 1441/2007 vorgenommen. Hier wurden mikrobiologische Kriterien für bestimmte Mikroorganismen für das Produkt (Lebensmittelsicherheitskriterium) und für das Herstellungsverfahren (Prozesshygienekriterium) sowie Durchführungsbestimmungen für allgemeine und spezielle Hygienemaßnahmen nach VO (EG) 852/2004 festgelegt.

2.6.2 Lebensmittelsicherheitskriterium für Milchpulver und diätetische Produkte

Die in Tabelle 2.4 aufgeführten Kriterien gelten am Ende des Herstellungsprozesses von Milch und Milcherzeugnissen (Prozesshygienekriterien) sowie für die in den Verkehr gebrachten Erzeugnisse während der Haltbarkeitsdauer. Bei einem positiven Erregernachweis handelt es sich nach VO (EG) Nr. 2073/2005 in Verbindung mit VO (EG) Nr. 1441/2007 um ein unbefriedigendes Ergebnis, d.h. ein nicht sicheres Lebensmittel (Lebensmittelsicherheitskriterien). Der Lebensmittelunternehmer darf das Produkt nicht in den Warenverkehr bringen bzw. muss es vom Markt nehmen.

Tabelle 2.4 Lebensmittelsicherheits- und Prozesshygienekriterien nach VO (EG) Nr. 2073/2005 in Verbindung mit Nr. 1441/2007

Lebenmittelsicherheitskriterien

Keim	n	c	m = M	Produkt	Analyse-Methode
L. monocytogenes	10	0	in 25g nicht nachweisbar	a	α
Salmonella	5	0	in 25g nicht nachweisbar	b	β, *
Staph.-Toxin	5	0	in 25g nicht nachweisbar	b	γ
Salmonella	30	0	in 25g nicht nachweisbar	c	β
Salmonella	30	0	in 25g nicht nachweisbar	d	β
E. sakazakii	30	0	in 10 g nicht nachweisbar	c	δ, **

Prozesshygienekriterien

Keim	n	c	Grenzwerte in KbE/g		Produkt	Bemerkung
			m	M		ε, ***
Enterobacteriaceae	5	0		10	e	ζ, ****
Staphylokokken (KP)	5	2	10	100	e	η, **, *****
Enterobacteriaceae	10	0	in 10 g nicht nachweisbar		c	η, *****
Enterobacteriaceae	5	0	in 10 g nicht nachweisbar		d	******
präsumptiver *B. cereus*	5	1	50	500	c	

n: Anzahl der Probeneinheiten der Stichprobe, c: Anzahl der Probeneinheiten, deren Werte zwischen m und M liegen, m: Schwellenwert für die Keimzahl in KbE/g, M: Höchstwert für die Keimzahl in KbE/g, *L. monocytogenes*: *Listeria monocytogenes*, *Staph.* – Toxin: Staphylokokken – Enterotoxine, *E. sakazakii*: *Enterobacter sakazakii,* KP Koagualse positiv, *B. cereus*: *Bacillus cereus*

Produkt: a: 4 Verzehrsfähige Lebenmittel, die für Säuglinge oder für besondere medizinische Zwecke bestimmt sind – bei Lebensmitteln, die einer Wärmebehandlung oder einer anderen Verarbeitung unterzogen wurden, durch die *Listeria monocytogenes* abgetötet werden, wenn eine erneute Kontamination nach der Verarbeitung nicht möglich ist; **b:** Milch- und Molkepulver; **c:** Getrocknete Säuglingsanfangsnahrung und getrocknete diätetische Lebensmittel für besondere medizinische Zwecke, die für Säuglinge < 6 Monaten bestimmt sind, **d:** Getrocknete Folgenahrung, **e:** Milch und Molkepulver, Kriterium gilt nicht für Erzeugnisse, die zur weiteren Verarbeitung in der Lebensmittelindustrie bestimmt sind

Analytische Referenzmethode: α: EN/ISO 11290-1; β: EN/ISO 6579; γ: Europäisches Screening-Verfahren des Gemeinschaftlichen Referenzlaboratoriums für koagulasepositive Staphylokokken und Staphylokokken-Enterotoxine in Milch und Milcherzeugnissen; δ: ISO/TS 22964; ε: ISO: 21528-2; ζ: EN/ISO 6888-1 oder 6888-2; η: ISO 21528-1

Bemerkung: *: gemäß den Kriterien für koagulasepositive Staphylokokken; **:** 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; ***:** Maßnahme im Fall unbefriedigender Ergebnisse: Kontrolle der Wirksamkeit der Wärmebehandlung und Verhinderung einer erneuten Kontamination; ****:** Verbesserungen der Herstellungshygiene; sofern Werte > 10^5 KbE/g nachgewiesen werden, ist die Partie auf Staphylokokken-Enterotoxine zu untersuchen; *****:** Verbesserung der Herstellungshygiene zur Minimierung der Kontamination, eine Paralleluntersuchung; ******:** Verbesserung der Herstellungshygiene, Verhinderung der Rekontamination, Auswahl der Rohstoffe

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 Material

3.1.1 Beschreibung des untersuchten Milchpulverwerks

Die Auswahl des Werks erfolgte ausschließlich nach logistischen Gründen. Der Betrieb befindet sich in der näheren Umgebung des Max Rubner Instituts (MRI), was eine zeitnahe und tägliche Probenahme ermöglichte. Eine Skizze des Werks befindet sich in Anhang B, Abbildung B.1.

3.1.1.1 Milchpulverherstellung

Nach der Rohmilchanlieferung erfolgt eine automatische Probenahme mit Untersuchung auf Hemm- und Milchinhaltsstoffe, anschließend wird die Rohmilch grob filtriert (Sieb mit 1 mm Maschenweite). Eine zusätzliche Reinigung bzw. Entgasung erfolgt nicht. Die weiteren Prozessschritte im Vorwege der Milchtrocknung entsprechen den Ausführungen unter Punkt 2.4.2, Abbildung 2.2.

Sprühtrocknung

Die zwei Trocknungstürme werden hauptsächlich zur Produktion hochwertigen Sprühmager- und Buttermilchpulvers für die Süßwarenindustrie verwendet. Die Produktionskapazität liegt bei 2,5 t/h/Turm. Bauartliche Unterschiede zwischen beiden Türmen bestehen bei Textilfiltern, Fließbetttrocknung und Siebanlagen. Die Modifikationen in der Fließbetttrocknung und der Siebeinrichtung beeinflussen jedoch nur die produktspezifischen Eigenschaften des Milchpulvers (z.B. Schüttgewicht). Turm 1 verfügt über ein integriertes Fließbett und eine Siebanlage nach dem Zyklon, bei Turm 2 dagegen handelt es sich um ein externes Fließbett mit anschließender Sichtung. Die Filteranlage des ersten Turms verfügt im Gegensatz zu der des zweiten Turms über eine heißere Filterkammer, dadurch kommt es zu einer geringeren Belagbildung durch Milchpulverreste und zu einem geringeren Luftfeuchtegehalt der Abluft. Detailliertere Angaben zur Sprühtrocknung sind unter Punkt 2.4.2.3, Abbildung 2.3 beschrieben.

Prozessluft

Die Prozessluft eines Milchtrocknungswerks setzt sich zusammen aus der Trocknungs- und Transportluft. Die benötigte Prozessluft wird in diesem Werk durch Luftansauganlagen aus der zur Verfügung stehenden Raumluft entnommen. Die Belüftung erfolgt über eine circa 15 m^2 große Luftöffnung (Anhang C, Abbildung C.3). Diese Öffnung ist mit einem groben „Fliegengitter“ (~1 cm^2 Maschenweite) und einem Lamellenschutz ausgestattet. Innerhalb einer Stunde werden Luftmassen von ~100.000 m^3 Luft allein im Trocknungsbereich der Sprühtrocknung durch die Ansauganlagen und Ventilatoren (Temperaturregelung) umgewälzt. Die Trocknungsluft wird im jeweiligen Lufterhitzer auf > 220 °C erhitzt und wird nun keimfrei zur Trocknung des

Konzentrats zu den beiden Türmen geleitet. Die unerhitzte Transportluft wird bei der Ansaugung grob filtriert und durch HEPA (High Efficiency Particulate AIR 10) Filter entkeimt. Diese haben einen Gesamtabscheidegrad von > 85 % MPPS (Most Penetrating Particle Size). Die Abluft gelangt über Abluftschächte wieder in die Außenwelt.

Filteranlagen

Die beiden Trocknungstürme des Werks sind mit Textilfiltern ausgestattet (Anhang C, Abbildung C.3). Die Filterschläuche werden jährlich erneuert. Die Filteranlagen verfügen über Mannlochöffnungen, welche zur Kontrolle, Reparatur usw. vom Personal geöffnet und „betreten“ werden können. Je nach mikrobiologischem Status wird das rückgewonnene Filterpulver des ersten Turms in den Produktstrom rückgeführt (Tabelle 3.1).

Tabelle 3.1 Vom Werk fixierte mikrobiologische Qualitätskriterien des Filterpulvers vor der Rückführung zum Produktstrom

Mikrobiologisches Kriterium	Warnwert KbE/g	Grenzwert KbE/g
Schimmel	10	100
Hefen	10	100
Enterobacteriaceae	10	100
Enterokokken	10	100
Gesamtkeimzahl	40.000	50.000

Das anfallende Filterpulver des zweiten Sprühturms wird grundsätzlich separat abgefüllt und als Futtermittel verwertet. Pro Stunde fallen 25 kg Filterpulver pro Turm an. Weitere Angaben zur Rückgewinnung des anfallenden Filterpulvers finden sich unter Punkt 2.4.2.3.

Konzentratherstellung

Im Erdgeschoss des Trocknungsbereichs befindet sich der Nassbereich der Konzentratherstellung. Der Übergang zwischen Nass- und Trocknungsbereich erfolgt über Schuh- und Arbeitskleidungswechsel sowie Händedesinfektion am Fuß der Treppe zu den Trocknungstürmen.

Walzentrocknung

Das Werk verfügt über vier Trocknungswalzen älteren Baujahrs (~1950), welche räumlich getrennt von den beiden Sprühtürmen 1 und 2 zur Herstellung hochwertigen Walzenvollmilchpulvers für die Süßwarenindustrie verwendet werden (Anhang C, Abbildung C.2). Das Produktionsvolumen beträgt 800 kg/h/Walze. Der Zutritt zum Trocknungsraum sowie zur Absackung efolgt über eine Hygieneschleuse. Über ein Rolltor ist der Raum mit der Außenwelt verbunden, gegenüber befindet sich der Zugang zur Absackung. Die vier Walzen sind hintereinander aufgereiht, die trockene Seite und die nasse Seite sind sich jeweils zugewandt.

Der Konzentratsumpf für die Auftragwalze wird über eine Standleitung bzw. Zwischenlagertanks gespeist. Das Konzentrat wird über zwei Auftragwalzen in einer dünnen Schicht auf die mit Dampf auf 150 °C erhitzte Trocknungswalze aufgebracht. Das Zermahlen des Pulvers erfolgt ausschließlich durch Transportvorgänge (Schneckentransport und Trommelsieb). Alle weiteren Prozessschritte sind in Punkt 2.4.2.3, Abbildung 2.4 dargestellt.

3.1.1.2 Qualitäts- und Prozesssicherheit

Qualitätssicherheit

Das Werk unterliegt im Hinblick auf ein Total Quality Management dem auf der ISO-Norm 9001:2000 aufbauenden International Food Standard, dessen Anforderungen vom Deutschen Einzelhandelsverband und der Fédération des Entreprises du Commerce et de la Distribution definiert wurden.

Das produktspezifische HACCP-Konzept baut auf einem soliden Grundgerüst auf und bildet das Dach des werkspezifischen Hygienemanagements. Die kritischen, vom Werk fixierten Kontrollpunkte des Herstellungsprozesses, sind in den Abbildungen 2.2 und 2.4 des Kapitels 2.4.2 rot unterlegt. Bei Nicht-Einhalten der vorgegebenen Parameter treten entsprechende Umschaltventile (Pasteurisation) in Kraft oder führen zum Ausschluss der Ware (Metalldetektor) für den menschlichen Verzehr; sie stellen somit das Einhalten der Parameter der risikoreichen Prozessschritte sicher.

Begleitend zum HACCP geben Eingangs-, Prozess- und Endproduktkontrollen pro Produktionseinheit einen Überblick über mikrobielle und qualitätsprägende Parameter. Nach der Anlieferung ins Werk unterliegt die Rohmilch zuerst einer Probeneingangskontrolle (Milchinhaltsstoffe, Hemmstofftest) (Abbildung 2.2). Die Mikrobiologischen Trendanalysen (MTA-Proben) stellen eine zeitnahe, prozessbegleitende, mikrobiologische Kontrollmöglichkeit dar. Die Probenahme erfolgt fünfmal täglich bzw. pro Charge im Bereich der beiden Sprühtürme und der Walzentrocknung. Zusätzlich wird auf Höhe der MTA-Probenahmestelle sowie vor der Absackung des Milchpulvers eine Probe des Endprodukts durch Autosampler genommen. Pro Produktionseinheit (10 h) wird alle zwei min eine Probe aus dem Produktstrom entnommen. Die kundenspezifischen Untersuchungskriterien werden nach mikrobiologischen (Salmonellen, Enterokokken, Enterobakterien, Sporenbildner, Gesamtkeimzahl) und qualitativ-produktspezifischen (Fettgehalt, Trockenmasse, Schüttgewicht usw.) Aspekten definiert und berücksichtigt. Daneben wird ein *Enterobacteriaceae*-Umfeldmonitoring (Punkt 3.2.2.3 und 3.3.1.1) und Salmonellen-Monitoring durchgeführt.

Prozesssicherheit

Ein dreistufiges Zonenkonzept gliedert den Produktionsbereich in Teilabschnitte mit unterschiedlichen Hygieneansprüchen (Punkt 2.5.2.2). Das Werk verfügt über ein farblich gekennzeichnetes Zonenkonzept (grün, gelb, rot). Hygienisch anspruchsvolle rot markierte Hygienebereiche sind die Trocknung, Absackung und Silolagerung. Zutritt erfolgt nur über Schleusen mit Händedesinfektion, entsprechender Schutzkleidung und Schuhwechsel. Der Rotbereich unterliegt zudem einer weiteren Aufteilung in Teilbereiche mit entsprechender Probensammlung durch Staubsauger (Umfeld). Die grüne Zone ist der Bereich mit freiem Zugang zur Außenwelt. Es bestehen keine Zutrittsregelungen für Personal oder Material. Zwischen den hygienisch anspruchsvollen Rot- und den frei zugänglichen grünen Außenbereich fällt der gelb gekennzeichnete Übergangsbereich. Hier erfolgt in markierte Übergabestationen der Materialaustausch. Der Personalzutritt ist geregelt, Händedesinfektion bzw. Schuhwechsel werden vorgenommen.

Die Reinigung der Produktionsanlagen verläuft überwiegend im Cleaning in Place (CIP)-Verfahren, daneben können manuelle Reinigungsschritte erfolgen. Hierzu werden durchstrukturierte Reinigungs- und Desinfektionspläne aufgestellt. Der Zugang des Personals zum Bereich der Milchtrocknung erfolgt unterirdisch auf gekennzeichneten Wegen über die Umkleideräume im Nebengebäude.

3.2.1 Bakterienstämme

3.2.1.1 Isolate von *E. sakazakii*

Im untersuchten Milchtrocknungsbetrieb, wurden im Zeitraum 2005-2007 insgesamt 15.173 Proben aus den Produktionsbereichen der Sprühtrocknung (Sprühturm T1und 2), Walzentrocknung, Absackung und Silolagerung gezogen und daraus 424 *E. sakazakii*-Isolate gewonnen. Von den 15.173 Proben wurden 13.681 (MTA-Proben) im werkseigenen Labor untersucht, 2.308 Proben wurden im Max Rubner Institut bearbeitet.

Zur Darstellung betriebsepidemiologischer Aspekte wurden die für diese Arbeit nach Produktionsbereich und Probenart ausgewählten Isolate (siehe unten) einer phänotypischen, biochemischen (API 20 E) und molekularbiologischen Identifizierung (PCR) sowie Feintypisierung (PFGE) unterzogen.

Trocknungswerk

Abstriche von Flächen im Produktionsumfeld des 1. Sprühturms	7 Isolate
Abstriche von Flächen im Produktionsumfeld des 2. Sprühturms	10 Isolate
Abstriche von Flächen im Produktionsumfeld der Walzentrocknung	10 Isolate
Filterpulver aus T1	15 Isolate
Filterpulver aus T2	10 Isolate
Sprühpulver aus T 1, isoliert aus Mikrobiologischen Trendanalysen (MTA)	16 Isolate
Walzenvollmilchpulver, isoliert aus MTA	10 Isolate
Walzenvollmilchpulver	5 Isolate
Gesamt	83 Isolate

Eine detailliertere Liste der ausgewählten Isolate befindet sich in Anhang B, Tabelle B.1.

3.2.1.2 Referenzstämme

Der *E. sakazakii* DSMZ Stamm 4485 (ATCC 29544) diente als Positivkontrolle bei der PCR und als Referenzstamm für Wiederholbarkeit und Vergleichbarkeit bei der PFGE. Als Negativkontrolle kam bei der PCR *E. cloacae* 65 zum Einsatz (Stammsammlung des Max Rubner Instituts, Standort Kiel).

3.2.2 Probenmaterial

3.2.2.1 Mikrobiologische Trendanalyse (MTA)

Bei den MTA-Proben handelt es sich um Produktproben, die im Rahmen der internen Qualitätssicherung des Herstellers fünfmal täglich bzw. pro Charge aus der Produktion entnommen und auf Enterobakterien und *E. sakazakii* untersucht wurden. Die Pulverproben des ersten Sprühturms enthielten bei Rückführung entsprechende Anteile an Filterpulver, bei Turm 2 kam eine Rückführung des Pulvers grundsätzlich nicht vor. Im Labor des Herstellers wurden 10 g Pulver in 90 ml doppelt gepuffertem Peptonwasser über Nacht bei 37°C angereichert und anschließend fraktioniert auf VRBD-Agar ausgestrichen. VRBD-Platten, die typisches Keimwachstum zeigten, wurden ins MRI, Standort Kiel gesandt und ausgewertet. Insgesamt wurden im Zeitraum 02/2005-12/2007 13.681 MTA-Proben im Milchtrocknungsbetrieb genommen und im werkseigenen Labor untersucht. Davon wurden 816 VRBD-Platten zur weiteren Ausdifferenzierung ans MRI gesandt:

Sprühturm 1	4.198 MTA-Proben (Werk)/ 181 ans MRI gesandt
Sprühturm 2	4.540 MTA-Proben (Werk)/ 58 ans MRI gesandt
Walzentrocknung	4.943 MTA-Proben (Werk)/ 577 ans MRI gesandt.

Die Anzahl der Isolate, die zur weiteren molekularbiologischen Untersuchung ausgewählt wurden, sind unter Punkt 3.2.1.1 gelistet.

3.2.2.2 Filterpulver (Fipu)

Das Filterpulver wurde aus der Abluft des ersten und zweiten Sprühturms jeweils durch Textilfilter gewonnen. Insgesamt wurden 124 Proben à 300 g im Zeitraum vom 19.06.2006 bis zum 14.12.2007 wöchentlich genommen und im MRI untersucht.

Sprühturm 1	58 Proben
Sprühturm 2	66 Proben.

Die Anzahl der molekularbiologisch untersuchten Isolate ist unter Punkt 3.2.1.1 genannt.

3.2.2.3 Flächenproben (Q)

Auf definierten Flächen im Umfeld des Produktionsbereichs des Milchtrocknungswerks wurden die Proben als Wischproben genommen und in 100 ml doppelt gepuffertem Peptonwasser in Bechern ins MRI zur Untersuchung eingesandt. Die Größe der Probenahmefläche betrug 25 dm^2. Um das Wachstum durch eine eventuelle Kontamination mit Bakterien nach den Probenahmen auszuschließen, wurde die Probenahmefläche anschließend desinfiziert. Insgesamt wurden im Zeitraum vom 22.02.2005 bis zum 18.12.2007 1.273 Proben untersucht:

Sprühturm 1	198 Proben
Sprühturm 2	634 Proben
Walzentrocknung	120 Proben
Absackung	78 Proben
Silolagerung	243 Proben.

Die Probenahme erfolgte einmal wöchentlich. Zusätzlich zum *E. sakazakii*-Nachweis wurde ein Umfeldmonitoring basierend auf einer Keimzahlerhebung von *Enterobacteriaceae* auf VRBD-Agar durchgeführt. Die Anzahl der *E. sakazakii*-Isolate aus den Bereichen, die zur nachfolgenden Untersuchung herangezogen wurden, sind unter Punkt 3.2.1.1 zusammengestellt.

3.2.2.4 Walzenvollmilchpulver (WVP)

Die 15 Produktproben bestanden aus 750 g Walzenvollmilchpulver und wurden im Rahmen einer ersten Statuserhebung im Zeitraum vom 14.02. bis zum 21.04.2005 gezogen zur Untersuchung ans MRI geschickt. Daraus konnten fünf *E. sakazakii*-Isolate isoliert werden.

3.2.2.5 Staubsaugerpulver (Staub.)

Für eine erste Statuserhebung wurden max. 300 g Proben aus, den definierten Arbeitsbereichen zuordnungsfähigen, Staubsaugern verwendet. Insgesamt wurden im Werk im Zeitraum 01.02.-24.06.2005 80 Proben aus den Produktionsbereichen der Sprühtrocknung (Turm 1 und 2, Absackung und Silolagerung) genommen. Die Ergebnisse vermittelten den Eindruck, dass das gesamte Produktionsumfeld des Werks relativ gleichmäßig mit *E. sakazakii* kontaminiert war. Versuche, die Staubsauger zu dekontaminieren, zeigten aber, dass die Geräte *per se* so kontaminiert waren, dass deren Verwendung als Probenehmer die Situation im Umfeld nicht richtig abbildete. Eine vollständige Dekontaminierung nach jedem positiven Befund konnte aber aus praktischen und finanziellen Gründen nicht durchgeführt werden. Daher wurde die Probenahme bereits nach vier Monaten eingestellt und durch definierte Flächenabstriche ersetzt bzw. erweitert (Punkt 3.2.2.3 und Tabelle B.1 in Anhang B).

Für die Auswertung der PFGE wurden fünf *E. sakazakii*-Isolate eines zweiten Milchtrocknungswerks herangezogen. Diese konnten aus Staubsaugerproben gewonnen werden und wurden zum Vergleich der PFGE-Ergebnisse in Abbildung 4.5 herangezogen (Spur 13, 81-84).

Eine Auflistung der verwendeten Nährmedien, Reagenzien und Gerätschaften befindet sich in Anhang B.

3.3 Methoden

3.3.1 Isolierung von *E. sakazakii*

3.3.1.1 Flächenproben

E. sakazakii

- Becherinhalt (Schwammtupfer + 100 ml Peptonwasser) im Stomacher 3 min bei 260 rotations per minute (rpm) homogenisieren
- Zugabe von 100 ml doppelt gepuffertem Peptonwasser in den Stomacherbeutel, Bebrütung: 18-24 h bei 37 °C
- Beimpfung der LST-Bouillon mit 0,1 ml der Voranreicherung, Bebrütung: im Wasserbad 18-24 h bei 45 °C
- Fraktionierter Ausstrich auf TSA-Agar, Bebrütung: 24-48 h bei Tageslicht und RT
- Ausstrich gelbfarbener Kolonien auf TSA-α-MUG-Agar, Bebrütung: 18-24 h bei 37 °C
- Fluoreszenzkontrolle der Platten mit UV-Lampe
- nach positiver kultureller Isolierung von *E. sakazakii* erfolgte die Kontrolle per API 20 E siehe unter Punkt 3.3.3.2.

Enterobacteriaceae

- Becherinhalt (Schwammtupfer + 100 ml Peptonwasser) im Stomacher 3 min/260 rpm homogenisieren
- Spiralförmige lineare Ausbringung von 400 µl auf VRBD-Platten mit dem Spiralplater (einfache Bestimmung), Bebrütung: 24-48 h bei 30 °C
- Die statistische Auswertung des Vergleichs zwischen der *Enterobacteriaceae*-Keimzahl und dem qualitativen *E. sakazakii*-Nachweis erfolgte auf Basis des Vierfelder-χ^2-Tests (Tabelle B.2, Gleichung (1) in Anhang B).

3.3.1.2 MTA-Proben

MTA-Probenaufbereitung im werkseigenen Labor

- Lösen des Pulvers im Verhältnis 1:10 (10 g in 90 ml) in doppelt gepuffertem Peptonwasser, Bebrütung der Kolben 18-24 h bei 37 °C
- Ausstrich auf VRBD-Platten, Bebrütung: 18-24 h bei 37 °C
- Bei typischem Koloniewachstum (Enterobakterien) im Labor des Herstellers wurden die VRBD-Platten ans MRI, Kiel zur weiteren Ausdifferenzierung bzw. *E. sakazakii*-Bestätigung gesandt.

MTA-Proben im MRI, Kiel

- Erneuter Ausstrich ausgesuchter Kolonien auf VRBD- und Blutagar, Bebrütung: 18-24 h/37 °C
- *Enterobacteriaceae*: Ausdifferenzierung typischer Kolonien mit dem API 20 E-Testsystem (siehe Punkt 3.3.3.2)
- *E. sakazakii*: Ausstrich typischer Kolonien auf TSA-Agar (Anhang C, Abbildung C.1)
- Das weitere Vorgehen entspricht Punkt 3.3.1.1

3.3.1.3 Pulverproben

Bei den Walzenvollmilch-, Staubsauger- und Filterpulverproben handelte es sich um Pulverproben unterschiedlicher Menge.

- Beim Filterpulver erfolgte der *E. sakazakii*-Nachweis anhand einer dezimalen Abstufung der abzuwiegenden Pulvermenge: 0,1; 1; 10 und 300 g
- Lösen des Pulvers im Verhältnis 1:10 in doppelt gepufferter Salzlösung
- Bebrütung der Kolben bei 37 °C für 18-24 h
- Beimpfung der LST-Bouillon mit 0,1 ml der Voranreicherung
- Das weitere Vorgehen entspricht Punkt 3.3.1.1

3.3.2 Lagerung der gewonnenen Isolate

Die mit Hilfe des API 20 E-Testsystems identifizierten bzw. die als verdächtig geltenden *E. sakazakii*-Isolate wurden in zwei Cryotubes in einem Verhältnis 0,25 ml 50 %igen Glycerin zu 1 ml TSB-Bouillon (18-24 h, 37 °C) eingefroren und bei -80 °C aufbewahrt.

3.3.3 Phänotypische Charakterisierung

3.3.3.1 Koloniemorphologie

Die Beschreibung der Koloniemorphologie erfolgte an den ausgewählten und unter Punkt 3.2.1.1 aufgelisteten *E. sakazakii*-Isolaten. Die Isolate wurden aus der Gefriertruhe bei -80 °C entnommen, auf Blutagar ausgestrichen und 18-24 h bei 37 °C bebrütet. Anschließend wurden die verschiedenen Kolonieformen anhand folgender Charakteristika (Größe, Pigmentbildung, Oberflächenbeschaffenheit, Form, Präzipitionshofverhalten, Glanzausprägung, Randbeschaffenheit, Fluoreszenzbildung, Erhabenheit und Konsistenz) erfasst und in Typen eingeteilt. Typische Vertreter eines Typus wurden mit der Digitalkamera aufgenommen und katalogisiert. In gleicher Weise erfolgte die Koloniebetrachtung auf den Nährmedien (VRBD-Agar 24-48 h bei 30 °C und 18-24 h bei 37 °C, TSA-Agar 24-48 h bei RT und TSA-α-MUG-Agar 18-24 h bei 37 °C) nach Ausstrich einer Kolonie vom Blutagar und entsprechender Bebrütung.

3.3.3.2 Biochemische Typisierung mit dem API 20 E-Testsystem

Die als verdächtig isolierten, oxidasenegativen Stämme wurden mittels API 20 E-Testsystem kontrolliert. Durchführung und Auswertung erfolgten nach Herstellerangaben und Software (apiweb) (Anhang C, Abbildung C.1).

3.3.4 Molekularbiologischer Nachweis und Typisierung

3.3.4.1 Polymerase Kettenreaktion

Aufbereitung

Der *E. sakazakii* DSMZ 4485 wurde als Positivkontrolle, *E. cloacae* 65 als Negativkontrolle bei jeder Aufbereitung mitgeführt.

- Ausstrich der Isolate mit steriler Plastiköse auf Blutagar, Bebrütung: 37 °C/18-24 h
- Beimpfung der TSB-Bouillon mit einer mittelgroßen Kolonie, Bebrütung: 37 °C/18-24 h
- Abfüllung von 1 ml bebrüteter TSB-Bouillon in sterile 2 ml Safe Lock Cups
- Erhitzung der Cups im Thermomixer 15 min bei 94 °C, Abkühlung der Cups im Eiswasser

Die Proben wurden bis zu ihrer weiteren Verwendung bei -20 °C aufbewahrt.

Mastermix und Laufprofil

- Bereitstellen, Mischen und Anzentrifugieren der Reagenzien und Proben 15 s/13.586*g*

- Ansatz des Mastermix für n Proben im sterilen 2 ml Safe Lock Biopur Cup (Tabelle 3.2)
- Abfüllung von 48 µl Mastermix in sterile 0,5 ml Safe Lock Cups
- Zugabe von 2 µl Probe oder 2 µl steriles A. bidest. (zur Selbstkontrolle)

Tabelle 3.2 PCR-Mastermix für n Proben

Reagenzien	Ansatz/n = 1	Ansatz/n = 10 + 2	Endkonzentration/Ansatz
A. bidest.	23,5 µl	282 µl	-
Puffer	5 µl	60 µl	1x
d NTP (Mix)	5 µl	60 µl	0,2 mmol
Primer: Esakf (1:50 H_2O)	5 µl	60 µl	10 pmol
Primer: Esakr (1:50 H_2O)	5 µl	60 µl	10 pmol
$MgCl_2$	2,5 µl	30 µl	2,5 mmol
Polymerase	2 µl	24 µl	2 U
Mastermix gesamt	48 µl	576 µl	-
Template/Kontrolle	2 µl	-	-
Gesamt	50 µl	-	-

n: Anzahl der Proben, n = 10: 6 Proben, eine Positiv-, eine Negativ- und 2 Selbstkontrollen (steriles A. bidest.), n = 10 + 2: Ansatz reicht aus für n = 10 siehe oben, zusätzlich werden 2 Proben als Reserve in den Ansatz eingerechnet, A. bidest.: Aqua bidestillata, H_2O: Aqua bidestillata

- Programmierung des Thermocyclers mit dem Temperatur-Zeit-Profil (Tabelle 3.3)

Tabelle 3.3 PCR-Temperatur-Zeit-Profil

Reaktionsablauf	Temperatur in °C	Zeit in min	Zyklen
Initialisierung	94	5	1
Denaturierung	94	0,5	30
Primer-Annealing	66	1	
Elongation	72	1,5	
Extension	72	4	1
Kühlung	4	-	

Gelherstellung und Elektrophorese

Herstellung eines 1,5 % Agarose Gels

- Aufkochen und Lösen von 0,75 g Agarose in 50 ml 1x TRIS-Borat-EDTA-Puffer (TBE-Puffer) bei 200 °C, 250 rpm auf der Heizplatte mit integriertem Magnetrührer, 6 min
- Zugabe von 2 µl Ethidiumbromid auf dem Magnetrührer bei 350 rpm, 1 min
- Gelträger mit 1 oder 2 Kämmen (12^{er} oder 18^{er}) je nach Probenanzahl bestücken
- Agarose in bestückten Gelträger (n = 10 + 2, 12^{er} Kamm) gießen und aushärten lassen
- Amplifikate, Gelladepuffer und zwei Marker VI (bereits in 0,5 ml Safe Lock Cups à 2 µl abgefüllt) 15 s bei 13.586*g* anzentrifugieren
- neue 0,5 ml Safe Lock Cups für die Amplifikate und anzentrifugierte Marker VI bereitstellen und nach Pipettierschema aus Tabelle 3.4 befüllen

Tabelle 3.4 PCR-Pipettierschema

Substanz	Marker VI in µl	Amplifikat in µl
Marker VI	2	-
Amplifikat	-	8
Gelladepuffer	1	1
A. bidest.	6	-

- Anzentrifugieren der abgefüllten Cups 15 s bei 13.586g,
- Einsetzen des Gelträgers in die Elektrophoresekammer und Entfernung der seitlichen Stege, Elektrophoresekammer mit 450 ml 1x TBE-Puffer füllen, Kamm entfernen
- Einpipettieren der Amplifikate, Positivkontrolle: *E. sakazakii* DSMZ 4485, Negativ-kontrolle: *E. cloacae* 65 und Marker in die Geltaschen
- Start der Elektrophorese bei 0,85 V für 45 min

Auswertung

Nach Beendigung des Durchlaufes wurde das Gel in die UV-Kammer eingelegt, fotografiert, digitalisiert, mit Hilfe des EDV-Programms Quantity-one von Bio-Rad beschriftet und katalogisiert. Die Auswertung erfolgte visuell.

3.3.4.2 Pulsfeld-Gelelektrophorese

Aufbereitung für 12 Proben (n = 11 + DSMZ 4485) + 2

Der Stamm *E. sakazakii* 4485 wurde zur Kontrolle bei jeder Aufbereitung mitgeführt. Die Arbeitsanleitungen und die Zusammensetzung der verwendeten Puffer, Lösungen und Gele sind in Anhang B, Punkt B.3 dargestellt.

Tag 1

- Fraktionierter Ausstrich der Isolate auf Blutagar, 18-24 h bei 37 °C bebrüten

Tag 2

- Beimpfung einer BHI-Bouillon mit einer mittelgroßen Kolonie und 18 h/37 °C bebrüten
- Ansetzen des TE-Puffers und 0,5x TBE-Puffers

Tag 3

Herstellung der Incerts

- Vorkühlung der Zentrifuge auf 4 °C bei 13.684*g* für 30 min
- BHI-Bouillon 3 x auf dem Vortexer bei 2.500 rpm mischen, 2 ml der Bouillon in sterile 2 ml Safe Lock Cups abfüllen, 15 min bei 4 °C und 13.684*g* zentrifugieren, Überstand mit Filtertip abnehmen und verwerfen

- Pellet in 1 ml TE-Puffer resuspendieren (2x), Cups bei 15 min bei 4 °C und 13.684*g* zentrifugieren (2x), Überstand abnehmen und verwerfen (2x)
- Pellet im Wasserbad bei 50 °C, 10 min anwärmen
- Aufkochen der 0,8 % Incertagarose, anschließend im Wasserbad auf 50 °C abkühlen
- Pellet in 1 ml Incertagarose resuspendieren, 3x auf dem Vortexer bei 2.500 rpm durchmischen und 2x je 100 µl in die Plug molds pipettieren, 30 min bei 4 °C aushärten
- Reinheitskontrollen der BHI-Bouillon auf Blutagar ausstreichen, 18-24 h/37 °C bebrüten

Aufbereitung der Incerts im Thermomixer

- Ansetzen des Lysispuffers
- Aufschluss der Incerts in 1,5 ml Lysispuffer für 3 h bei 37 °C auf dem Thermomixer (ohne Schütteln)
- Ansetzen der ESP-Lösung,
- Inkubation in 1,5 ml ESP-Lösung für 1 h bei 50 °C auf dem Thermomixer
- Incerts in 1,5 ml TE-Puffer für 1 h bei 50 °C auf dem Thermomixer waschen
- Ansetzen der Pefabloc-Lösung,
- Inkubation in 1,5 ml Pefabloc für 18 h bei 37 °C im Thermomixer

Tag 4

- Reinheitskontrolle vom Vortag auswerten

Waschen und Aufbewahrung der Incerts

- Waschen der Incerts in 1,5 ml TE-Puffer für 30 min bei 37 °C im Thermomixer (6x)
- Aufbewahrung der Incerts in 2 ml Safe Lock Biopur Cups, gefüllt mit 2 ml TE-Puffer bei 4 °C

Äquilibrierung und Restriktion

- Ansetzen des Äquilibrierungspuffers und der Restriktionslösung
- Incerts mit einer Skalpellklinge auf einer Glasplatte auf die Größe von 2,5 x 5 mm zurechtschneiden
- Äquilibrierung der Incertstücke in 150 µl Äquilibrierungspuffer für 30 min bei RT
- Restriktion in 150 µl Restriktionslösung für 20 h bei 37 °C im Thermomixer
- Ansetzen des Laufpuffers und des 0,5x TBE-Puffers mit Thioureazusatz
- Aufbewahrung der Puffer bei 4 °C

Tag 5

Stopping und Einsetzen ins Trägergel

- Herstellung des Trägergels und Ansetzen der Stopping-Lösung
- Abbruch der Restriktion in 200 µl Stoppinglösung für 30 min bei 4 °C
- Zuschnitt des Pulse Markers auf 2,5 x 5 mm (3x)
- Einsetzen des Längenstandards ins Trägergel auf die Positionen 1, 8 und 15
- Einsetzen der Proben ins Trägergel
- Erhitzen der SeaKem-Agarose auf 200 °C und Abkühlung im Wasserbad auf 57 °C
- Verschluss der Geltaschen des Trägergels mit der SeaKem-Agarose
- Lösen des Gels mit der Skalpellklinge aus dem Rahmen des Gelträgers

Start der PFGE

- Befüllen der Elektrophoresekammer mit dem Laufpuffer
- Gel mit der Grundplatte aus dem Rahmen des Gelträgers lösen, Agarosereste entfernen
- Trägergel mit der Grundplatte in die Elektrophoresekammer einlegen
- Je nach Restriktionsenzym Laufbedingungen aus Tabelle 3.5 eingeben, Lauf starten

Tabelle 3.5 PFGE-Laufbedingungen

Bedingungen	Spe I	Xba I
Pulszeit	4s/40 s	5 s/50 s
Spannung	6 V	6 V
Winkel	120 °	120 °
Temperatur	10 °C	10 °C
Laufzeit	22 h	22h

Tag 6

Färbung und Darstellung der Banden

- Färbung des Gels im Ethidiumbromidbad für 35 min bei 32 rpm auf dem Schüttler
- Entfärbung in 800 ml A. bidest. für 40 min bei 32 rpm
- Fotografieren des Gels in der Kammer unter UV-Licht, Digitalisierung, Speicherung in der Geldatenbank

Auswertung

- Auswertung der digitalisierten Gele im EDV-Programm Gel Compar II, Version 3.0 der Firma Applied-Maths.

4 ERGEBNISSE

4.1 *Enterobacter sakazakii*: Kultureller Nachweis

4.1.1 Vorkommen und Verbreitung von *E. sakazakii* im Milchtrocknungsbereich

Im Zeitraum 02/2005-12/2007 wurden insgesamt 15.173 Proben aus den Produktionsbereichen Sprüh- und Walzentrocknung, der Absackung und dem Silolager eines Milchtrocknungswerks auf *E. sakazakii* untersucht. Ziel dieser Untersuchungen war die Ermittlung des Kontaminationsstatus und der möglichen Verbreitungswege des Mikroorganismus innerhalb des Betriebs. *E. sakazakii* konnte aus durchschnittlich 2,8 % (424/15.173) der Proben isoliert werden. Zur weiteren Analyse und Interpretation der Ergebnisse sind die Resultate nach Produktionsbereich und Probenart in Tabelle 4.1 und Tabelle 4.2 dargestellt.

Die *E. sakazakii*-Kontamination erstreckte sich flächendeckend über alle Arbeits- und Produktionsbereiche der Milchpulverherstellung. Die Belastung der Produktionsbereiche lag bei 1,9-3,5 %, der Bereich der Silolagerung sowie der Absackung dagegen bei 16,2 bzw. 18,0 % (Tabelle 4.1).

Tabelle 4.1 Übersicht der *E. sakazakii*-Isolate im Zeitraum 02/2005-12/2007, geordnet nach Produktionsbereich

	Produktionsbereich				
	Turm 1	Turm 2	Walze	Silo	Absackung
n Proben	4.469	5.262	5.081	272	89
n *E. sakazakii*	158	101	105	44	16
E. sakazakii in %	3,5	1,9	2,1	16,2	18,0

Turm 1 und 2: Sprühtrocknung, Walze: Walzentrocknung, Silo: Silolagerung, Absackung: Big Bag- und Sackware, n: Probenanzahl

Der Kontaminationsgrad des Umfelds der Milchpulverproduktion, ermittelt anhand von definierten Flächenabstrichen und Staubsaugerproben, betrug zwischen 8,3 und 81,3 %. Die Belastung des Milchpulvers mit *E. sakazakii* wurde anhand von mikrobiologischen Trendanalysen (MTA, Punkt 3.2.2.1), Walzenvollmilchpulver (Endprodukt) und Filterpulver ermittelt und lag zwischen 1,0 und 88,7 % (Tabelle 4.2).

Tabelle 4.2 Übersicht der *E. sakazakii*-Isolate im Zeitraum 02/2005-12/2007, geordnet nach Probenart

	Probenart				
	Fipu	Fläche	MTA	Staubsauger	WVP
n Proben	124	1.269	13.681	80	15
n *E. sakazakii*	110	105	137	65	5
E. sakazakii in %	88,7	8,3	1,0	81,3	33,3

Fipu: Filterpulver der Sprühtürme T1 und T2, Fläche: Umfeldproben aus dem Bereich der Milchpulverherstellung, MTA: Mikrobiologische Trendanalyse von T 1, T2 und Walzentrocknung; Staubsauger: Staubsaugerproben aus dem Bereich der Milchpulverherstellung, die Proben wurden lediglich vom 01.02.-24.06.2005 gezogen, da sich alle Geräte als kontaminiert erwiesen und eine Sanierung zu aufwändig gewesen wäre, WVP: Walzenvollmilchpulver, n: Probenanzahl

Bei einer detaillierteren Betrachtung der Produktionsabschnitte (Abbildung 4.1) lag die Belastung des Walzenvollmilchpulvers, ermittelt an MTA- und WVP-Proben, bei 1,2-33,3 %, das Umfeld der Fließbetttrocknung der Walzentrocknung bei 32,5 %. Der Kontaminationsgrad des Produktionsumfelds der Trocknungstürme T1und T2 lag bei 6,3-8,2 % bzw. 3,2-8,0 %, der des Filterpulvers bei 82,8 % (T 1) bzw. 93,9 % (T2). Das Milchpulver des ersten Turms war in 1,9 % der untersuchten Proben kontaminiert, im Pulver des zweiten Turms dagegen konnte *E. sakazakii* nicht nachgewiesen werden.

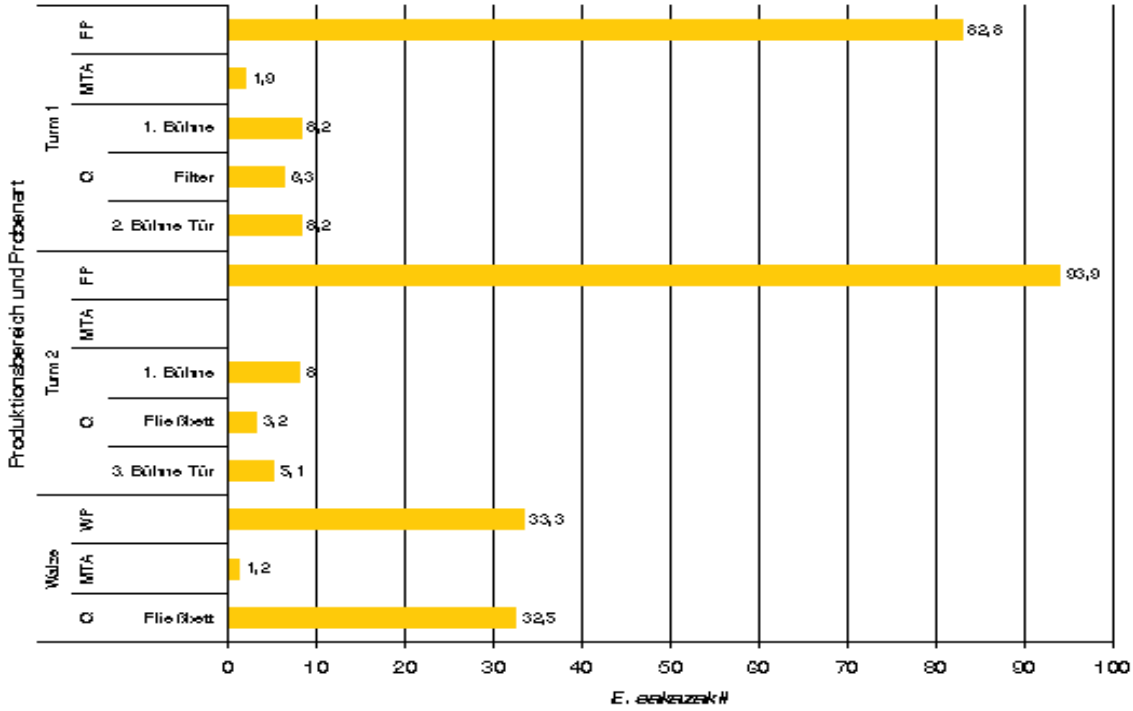


Abbildung 4.1 Verteilung der *E. sakazakii*-Isolate in Prozent, geordnet nach Produktionsabschnitt und Probenart. Turm 1 und 2: Sprühtrocknung, Walze: Walzentrocknung. Q: Umfeldproben von definierten Flächen im Produktionsbereich, WP: Walzenvollmilchpulver, MTA: Mikrobiologische Trendanalyse, FP: Filterpulver

Für eine erste Statuserhebung wurden Staubsaugerproben verwendet, die den definierten Arbeitsbereichen zuzuordnen waren. Durch die Ergebnisse entstand der Eindruck, dass das gesamte Produktionsumfeld relativ gleichmäßig mit *E. sakazakii* kontaminiert war (Tabelle 4.3). Aus Gründen die bereits unter Punkt 3.2.2.5 erläutert wurden, erfolgte nach vier Monaten die Einstellung der Probenahme mit Hilfe der Staubsauger. Diese konnten durch definierte Flächenabstriche ersetzt bzw. erweitert (Tabelle 4.4).

Tabelle 4.3 Übersicht der *E. sakazakii*-Isolate aus Staubsaugerproben der verschiedenen Arbeitsbereiche im Zeitraum 02-06/2005

Arbeitsbereich	n Proben	n *E. sakazakii*	% *E. sakazakii*
Sprühturm 1	15	15	100
Sprühturm 2	22	12	54,5
Walzentrocknung	3	2	66,7
Absackung	9	8	88,9
Silolagerung	31	28	90,3
insgesamt	80	65	81,3

Arbeitsbereich: teilweise mehrere Staubsauger pro Produktionsabschnitt, n: Probenanzahl

Im Umfeld der Milchpulverherstellung wurden im Zeitraum 02/2005-12/2007 auf definierten 25 dm^2 großen Flächen Wischproben genommen (Tabelle 4.4). Hierbei wurde die Anzahl an *Enterobacteriaceae* insgesamt ermittelt, der *E. sakazakii*-Nachweis erfolgte lediglich qualitativ.

Tabelle 4.4 Übersicht der *E. sakazakii*-Isolate aus definierten Flächenabstrichen im Zeitraum 02/2005-12/2007

Fläche Q	n Proben	n *E. sakazakii*	% *E. sakazakii*
T1: 1. Bühne vor der Treppe	73	6	8,2
T1: vor dem Filter	48	3	6,3
T1: 2. Bühne vor der Turmtür	73	6	8,2
T1: insgesamt	194	15	7,7
T2: 1. Bühne	75	6	8,0
T2: Fließbett	438	14	3,2
T2: 3. Bühne vor der Turmtür	118	6	5,1
T2: insgesamt	631	26	4,1
Walze: Fließbett Raum	120	39	32,5
Absackung, Schaltwarte Schleusentür	78	6	7,7
Silo 1-3, vor Ausgang Schleuse	117	11	9,4
Silo 4-7	117	7	6,0
Silo 8-9	9	0	0
Silo: insgesamt	243	18	7,4

Fläche Q: Flächenabstriche im Milchtrocknungsbereich (25 dm^2), n: Probenanzahl, T1 und T2: Sprühturm 1 und 2, Walze: Walzentrocknung, Absackung: Big Bag- und Sackware, Silo: Silolagerung

Das in der Trocknungsluft enthaltene Milchpulver wurde durch Textilfilter zurückgewonnen und seit Juni 2006 einmal wöchentlich auf *E. sakazakii* untersucht (Tabelle 4.5). Das Filterpulver des ersten Sprühturms wurde bei entsprechender mikrobiologischer Qualität, d.h. Erfüllung der Kriterien der Tabelle 3.1, durch Rückführung dem Produktstrom beigemischt und nahm somit Einfluss auf die Qualität des Endprodukts (Tabelle 4.6 und 4.7). Die stets mangelhafte Qualität des Filterpulvers des zweiten Turms (Schimmel) führte zu einem generellen Ausschluss einer Rückführung zum Endprodukt.

Tabelle 4.5 Positiver *E. sakazakii*-Nachweis aus Filterpulverproben der Sprühtürme T 1 und T2 im Zeitraum 06/2006-12/2007

Sprühturm	n Proben	n *E. sakazakii*	% *E. sakazakii*
T1	58	48	82,8
T2	66	62	93,9

n: Probenanzahl, Turm 1 und 2: Sprühtrocknung

Die mikrobiologische Qualität des Endprodukts wurde zeitnah vom Hersteller mittels MTA-Proben ermittelt. Die MTA-Proben wurden fünfmal täglich pro Tag bzw. Charge genommen. Das aufgelöste und in gepuffertem Peptonwasser angereicherte Pulver wurde auf VRBD-Platten ausgestrichen, Platten mit verdächtigen Kolonien (Enterobakterien) wurden zur weiteren Ausdifferenzierung ans MRI gesandt (Tabelle 4.6). Anhand der eingesandten MTA-Platten konnte nicht nur ein Überblick über die Kontamination des Endprodukts mit *E. sakazakii* gewonnen werden, sondern auch ein Bild der mikrobiologischen Beschaffenheit in Bezug auf *Enterobacteriaceae* im Allgemeinen (Abbildung 4.2, Achtung: unterschiedliche Skalierung der y-Achsen).

Tabelle 4.6 Übersicht der genommenen und eingesandten MTA-Proben im Zeitraum 2005-2007

Arbeitsbereich	MTA	2005		2006		2007	
		n	%	n	%	n	%
Turm 1	gesamt	1.676	-	1.427	-	1.095	-
	MRI	29	1,7	90	6,3	62	5,6
	E. sakazakii	2	0,1	54	3,8	22	2,0
Turm 2	gesamt	1.871	-	1.453	-	1.216	-
	MRI	19	1,0	19	1,3	20	1,6
	E. sakazakii	0	0	0	0	0	0
Walze	gesamt	1.530	-	1.684	-	1.729	-
	MRI	193	12,6	198	11,8	186	10,8
	E. sakazakii	27	1,8	23	1,4	10	0,6

MTA: Mikrobiologische Trendanalyse, n: Probenanzahl, Turm 1 und 2: Trocknungstürme 1 und 2 der Sprühtrocknung, Walze: Walzentrocknung, gesamt: Anzahl der im Werk angelegten und untersuchten MTA-Platten, MRI: VRBD-Platten mit verdächtige Koloniewachstum, die zur Ausdifferenzierung ans MRI, Kiel geschickt wurden

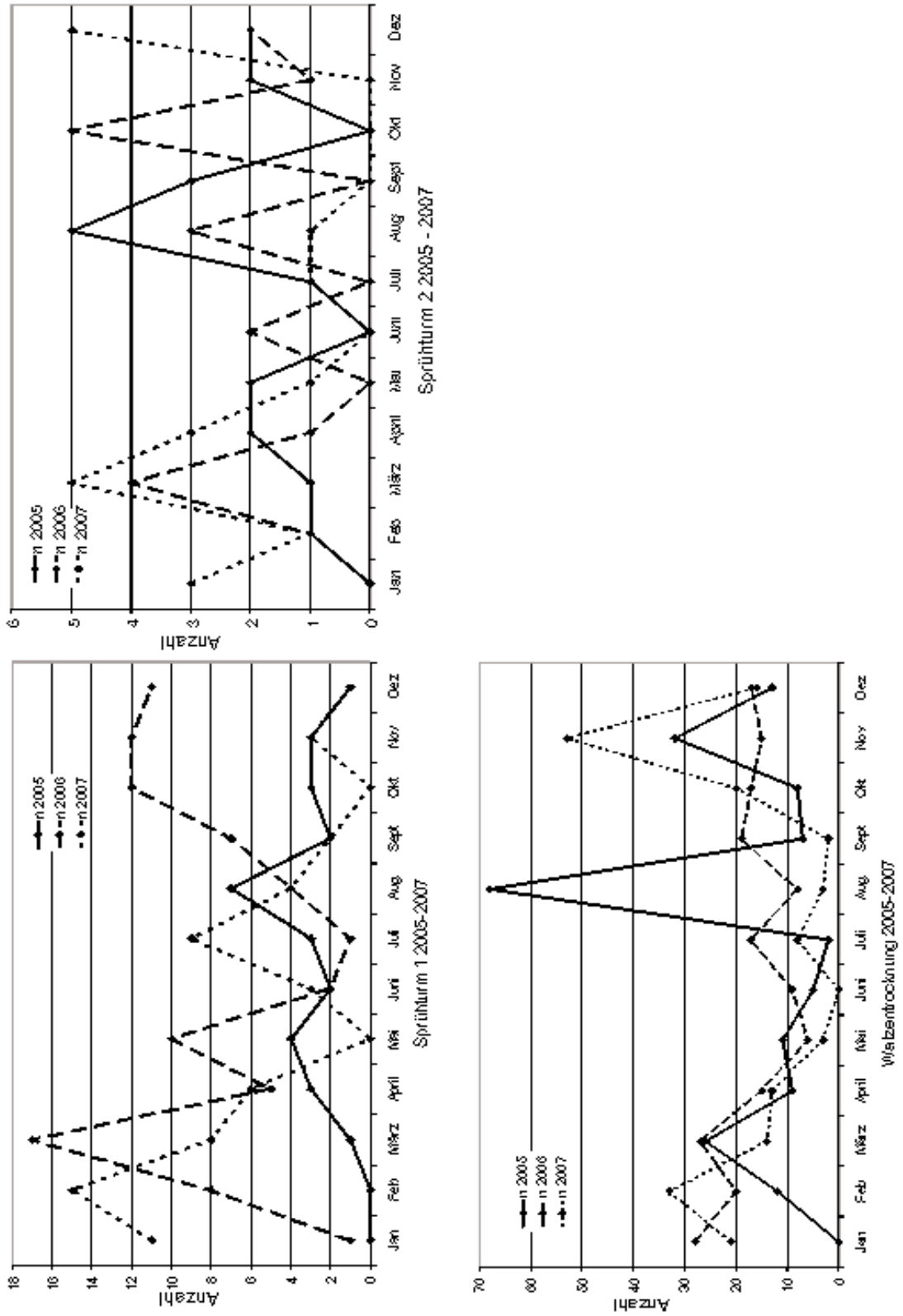


Abbildung 4.2 Verteilung der im Zeitraum 2005-2007 an das MRI gesandten, Enterobakterien-verdächtigen MTA-Proben.

n: Probenanzahl (unterschiedliche Skalierung der y-Achse beachten)

Die Entnahme der MTA-Proben erfolgte im Produktionsablauf nach der eventuellen Rückführung des Filterpulvers in den Produktstrom. Das rückgeführte Filterpulver des ersten Sprühturms hatte somit einen Einfluss auf die Qualität des Endprodukts. Das Filterpulver des zweiten Turms wurde grundsätzlich separat abgefüllt und hatte somit keinen Einfluss auf die MTA-Proben. Ergebnisse von am selben Tag genommenen Filterpulverproben von Turm 1 und Produktproben (MTA) dieses Turms, zeigten deutlich den Einfluss der Filterpulver-Rückführung (Tabelle 4.7). Eine intensivere Betrachtung erlaubte die molekularbiologische Feintypisierung der untersuchten MTA- und Filterpulverproben des ersten Turms (Abbildung 4.7, S. 70). In drei Fällen konnten die engen verwandtschaftlichen Beziehungen zwischen MTA- und Filterpulverproben durch am selben Tag genommenen Proben bestätigt werden (Spur 1, 7 und 9; Spur 3 und 4 sowie 2 und 10) (siehe auch Punkt 4.3.2).

Tabelle 4.7 Einfluss der Filterpulver-Rückführung des ersten Trocknungsturms auf die mikrobiologische Beschaffenheit des Milchpulvers (MTA) von Turm 1

Probenahme	Uhrzeit	positiver *E. sakazakii*-Befund in:
01.12.2006	keine Angaben	Filterpulver
	10°°	MTA
15.12.2006	keine Angaben	Filterpulver
	05°° und 21 °°	MTA
26.06.2007	keine Angaben	Filterpulver
	02°° und 16°°	MTA
06.07.2007	keine Angaben	Filterpulver
	02°°, 11°° und 14°°	MTA
09.07.2007	keine Angaben	Filterpulver
	08°°, 12°° und 16°°	MTA
13.07.2007	keine Angaben	Filterpulver
	02°°	MTA

MTA: Mikrobiologische Trendanalyse

4.1.2 *Enterobacteriaceae*-Umfeldmonitoring

Die Anzahl der *Enterobacteriaceaen* auf definierten, 25 dm^2 großen Flächen (Flächenproben) wurde ermittelt, um den Keimdruck insgesamt zu bestimmen. Da *E. sakazakii* auch zu dieser Gruppe gehört und somit ähnliche Verbreitungswege haben dürfte, könnte die *Enterobacteriaceae*-Keimzahl eventuell als Indikator für eine zu- oder abnehmende Gefährdung durch *E. sakazakii* dienen. Die ermittelte Keimzahl wurde in zwei Kategorien eingeteilt: Kategorie I (Kat I) mit < 1000 KbE/25 dm^2, Kategorie II (Kat II) mit ≥ 1000 KbE/25 dm^2 (Tabelle 4.8). Anschließend wurde sie mit dem Nachweis von *E. sakazakii* verglichen (siehe auch Tabelle 4.4).

Tabelle 4.8 *Enterobacteriaceae*-Keimzahl von definierten Flächenproben

Fläche	n	Kat I	n *E. s.*	Kat II	n *E. s.*
T1: 1. Bühne vor der Treppe	71	67	6	4	0
T1: vor dem Filter	43	41	1	2	0
T1: 2. Bühne vor der Turmtür	71	63	4	8	2
T2: 1. Bühne	73	55	1	18	5
T2: vor dem Fließbett	416	359	9	57	3
T2: 3. Bühne vor der Turmtür	116	109	3	7	3
Walze: Fließbett Raum	116	69	13	47	24
Absackung: Schaltwarte Tür Schleuse	76	51	1	25	5
Silo 1-3: vor Ausgang zur Schleuse	114	78	6	36	4
Silo 4 -7	115	97	3	18	4
Silo 8-9	9	5	0	4	0

n: Probenanzahl, Kat I: *Enterobacteriaceae*-Keimzahl < 1000 KbE/25 dm², Kat II: *Enterobacteriaceae*-Keimzahl ≥ 1000 KbE/25 dm², n *E. s.*: Anzahl positiver *E. sakazakii*-Befunde, T 1, 2: Sprühturm 1 und 2, Walze: Walzentrocknung, Absackung: Big Bag- und Sackware, Silo: Silolagerung 1-9. Die Differenzen zwischen den Angaben n bzw. n *E.s.* in den Tabellen 4.4 und 4.8 entstanden durch nicht auswertbare Keimzahlen der Flächenproben

Anhand der ermittelten Daten (Tabellen 4.4 und 4.8) konnten die Ergebnisse der Enterobakterien-Keimzahl mit dem *E. sakazakii*-Nachweis in ein prozentuales Verhältnis gesetzt (Tabelle 4.9) und graphisch für die einzelnen Bereiche darstellt werden (Abbildung 4.3). Der Bereich der Walzentrocknung und der Absackung wurde nicht abgebildet, weil nur ein definierter Flächenabschnitt zugrundelag; die entsprechenden Daten sind in Tabelle 4.9 dargestellt.

Tabelle 4.9 Vergleich zwischen Enterobakterien-Keimzahl und *E. sakazakii*-Nachweis im Zeitraum 2005-2007, Angaben in %

Arbeitsbereich	Kat I	*E. sakazakii*/Kat I	Kat II	*E. sakazakii*/Kat II
T1: gesamt	92,4	5,9	7,6	1,1
T1: 1. Bühne vor der Treppe	94,4	8,5	5,6	0
T1: vor dem Filter	95,3	2,3	4,7	0
T1: 2. Bühne vor der Turmtür	88,7	5,6	11,3	2,8
T2: gesamt	86,4	2,1	13,6	1,8
T2: 1. Bühne	75,3	1,4	24,7	6,8
T2: vor dem Fließbett	86,3	2,2	13,7	0,7
T2: 3. Bühne vor der Turmtür	94,0	2,6	6,0	2,6
Walze: Fließbett Raum	59,5	11,2	40,5	20,7
Absackung	67,1	1,3	32,9	20,0
Silo 1-3	68,4	5,3	31,6	3,5
Silo 4-7	84,3	2,6	15,6	3,5
Silo 8-9	55,5	0	44,4	0
Silolagerung	75,6	3,8	24,4	3,4

E.sakazakii/Kat I oder II: *E. sakazakii*-Nachweis bezogen auf die Probenanzahl der Kategorie I oder II, Kat I: < 1000 KbE/25dm², Kat II: ≥ 1000 KbE/25 dm², Silo: Silolagerung 1-9, Walze: Walzentrocknung.

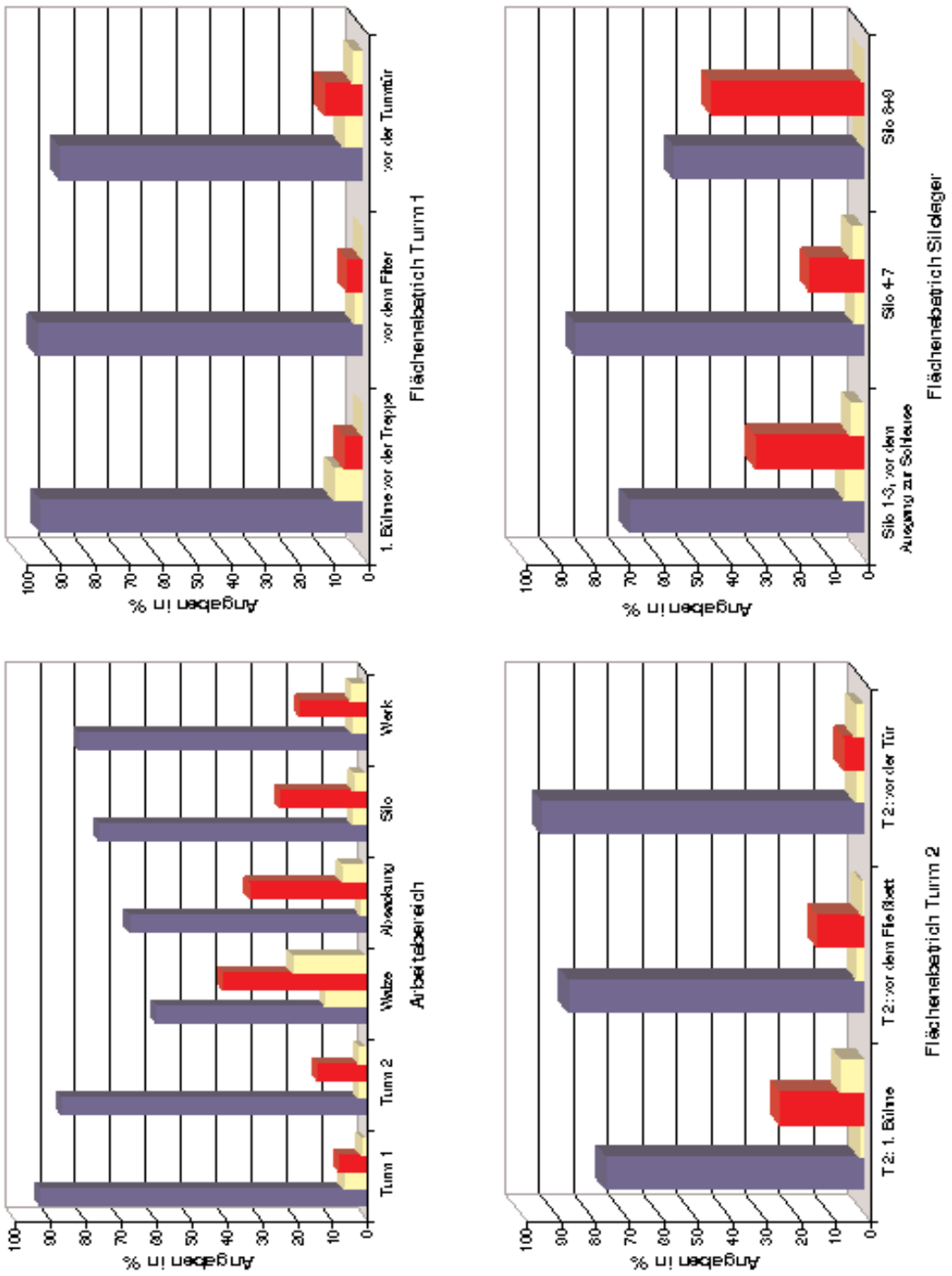


Abbildung 4.3 Vergleich zwischen der Enterobakterien-Keimzahl der Kategorie I (blau) und II (rot) und dem *E. sakazakii*-Nachweis (hellgelb), isoliert aus Flächenproben für die einzelnen Produktionsabschnitte

Zusätzlich wurde eine statistische Auswertung mit Hilfe des Vierfelder-χ^2-Tests vorgenommen, mit dem Ziel, einen Zusammenhang zwischen den ermittelten Enterobakterien-Keimzahlen und den *E. sakazakii*-Befunden nachzuweisen. Da für die Bereiche der Absackung, Silolagerung und Sprühtrocknung die Datengrundlage keinen Vierfeldertest erlaubte, konnten lediglich die Walzentrocknung und das Werk insgesamt jeweils für den gesamten Zeitraum und für 2006 zum *Enterobacteriaceae-E. sakazakii*-Vergleich herangezogen und dargestellt werden. Der Vierfeldertest (Anhang B, Tabelle B.2) erbrachte für die oben erwähnten Bereiche folgendes Ergebnis (Tabelle 4.10).

Tabelle 4.10 Vierfeldertest, geordnet nach Arbeitsbereich

Arbeitsbereich	KbE/25 dm²	*E. s.* pos.	*E. s.* neg.	Summe	χ^2
Walze 2006	100-1.000	8	18	26	
	≥ 1.000	17	8	25	
	Summe	25	26	51 (n)	7,07
Walze 2005-2007	100-1.000	13	56	66	
	≥ 1.000	24	23	47	
	Summe	37	76	113 (n)	13,36
Werk 2006	100-1.000	27	346	373	
	≥ 1.000	28	69	97	
	Summe	55	415	470 (n)	34,85
Werk 2005-2007	100-1.000	47	947	994	
	≥ 1.000	50	176	226	
	Summe	97	1.123	1.220 (n)	76,13

Die erste Bedingung des Vierfeldertests nach LORENZ (1992) (Anhang B, Punkt B.2), n ≥ 30, wurde mit 51, 113, 470 und 1.220 (siehe Tabelle 4.10) erfüllt. Die zweite Bedingung, Ergebnisse der Kontrollformeln > 5, wurde ebenfalls erfüllt (Daten nicht dargestellt), KbE: Kolonie bildende Einheiten, *E.s.*: *E. sakazakii*, Walze: Walzentrocknung

Die Nullhypothese H_0 nimmt an, dass kein Zusammenhang zwischen der ermittelten *Enterobacteriaceae*-Keimzahl und der Anzahl gefundener *E. sakazakii*-Isolate besteht. Die H_1-Hypothese besagt das Gegenteil.

$\Rightarrow$ wenn $\chi^2 \geq 3{,}84$ (siehe Tabelle 4.10), wird die Nullhypothese H_0 zugunsten von H_1 mit 95 % Sicherheit ($\alpha = 0{,}05$) verworfen; d.h. es besteht ein Zusammenhang zwischen der ermittelten *Enterobacteriaceae*-Keimzahl und dem Auftreten von *E. sakazakii* für die in Tabelle 4.10 aufgeführten Bereiche. Eine Keimzahl der Kategorie II führt somit eher zu einem positiven *E. sakazakii*-Nachweis als eine Keimzahl der Kategorie I.

4.2 Phänotypische Charakterisierung

4.2.1 Koloniemorphologie

Die Beschreibung der Koloniemorphologie basierte auf den 81/83 ausgewählten und unter Punkt 3.2.1.1 aufgeführten *E. sakazakii*-Isolaten und dem DSMZ-Stamm 4485. Für die verwendeten Nährmedien, außer VRBD, erfolgte eine Einteilung der Isolate in Morphologietypen. Charakteristische Vertreter der einzelnen Typen wurden fotografiert und sind im Anhang C, Tabelle C.1-C.5 für das jeweilige Nähmedium dargestellt. Zwei der 83 ausgewählten *E. sakazakii*-Isolate konnten im späteren Verlauf der Diagnosefindung (API 20 E siehe Punkt 4.2.2, PCR siehe Punkt 4.3.1) als *E. amnigenus* und *Pantoea* spp. identifiziert werden. Sie wurden einer erneuten kulturellen Betrachtung unterzogen und in einer separaten Tabelle C.6 und C.7 in Anhang C zusammengestellt.

4.2.1.1 Blutagar

Auf Blutagar bildeten 74,4 % der ausgewählten Isolate 1-3 mm große, runde, glatte, glänzende Kolonien mit gelbem, leicht erhabenem Zentrum und hell-graugelbem Rand (Anhang C, Tabelle C.1, Typ I). Am zweithäufigsten bildeten sich mit 12,2 und 8,5 % 1 mm große, hellgraugelbe, leicht erhabene, runde Kolonien mit glatter glänzender Oberfläche (Typ II) bzw. Typ II-Kolonien mit zusätzlichem hell-graugelbem Rand (Typ III). Die restlichen Morphologietypen auf Blutagar kamen mit 2,4 % eher selten vor und wurden lediglich in Anhang C beschrieben.

4.2.1.2 TSA- und TSA-α-MUG-Agar

Auf TSA- sowie TSA-α-MUG-Agar bildeten sich lediglich drei bzw. zwei Morphologievarianten aus. Auf TSA-Agar bildeten 75,6 % der Isolate 1-1,5 mm große, gelbe, grießkornartige Kolonien mit matter und rauer Oberfläche (TSA-Typ I). Der zweite Morphologietyp war mit 21,9 % vertreten. Die Kolonien waren 2 mm groß, gelb, flach mit glatt-glänzender Oberfläche. Die Blutagartypen I und II zeigten auf TSA-Agar ein differenziertes Morphologiebild (Tabelle 4.11); die Blutagar-Typen III und V spiegelten auf TSA hingegen ein einheitliches Wachstum wider (TSA-Typ I). Zwei Isolate des Blutagar-Typs IV zeigten ein deutliches Radspeichen- bzw. Blumenmuster, welches abgeschwächt auch auf TSA- sowie TSA-α-MUG-Agar in Erscheinung trat (Tabelle 4.11, Anhang C: Tabelle C.2, C.3). Die restlichen 80 Isolate formten auf TSA-α-MUG-Agar 1-3 mm große, gelbe Kolonien mit leicht erhabenem Zentrum und hellgelbem Rand sowie glatt glänzender Oberfläche. Einen Überblick über die Kriterien zur Morphologiebeschreibung zeigt Tabelle 4.12.

Tabelle 4.11 Einteilung und Verteilung der Morphologietypen der *E. sakazakii*-Isolate nach Nährmedium

			Nährmedium				
Blutagar			TSA			TSA-α-MUG	
Typ			I	II	III	I	II
I	n	61/82	44/61	17/61	0/61	61/61	0/61
	%	74,4	72,1	27,9		100	
II	n	10/82	9/10	1/10	0/10	10/10	0/10
	%	12,2	90	10		100	
III	n	7/82	7/7	0/7	0/7	7/7	0/7
	%	8,5	100			100	
IV	n	2/82	0/2	0/2	2/2	0/2	2/2
	%	2,4			100		100
V	n	2/82	2/2	0/2	0/2	2/2	0/2
	%	2,4	100			100	
		gesamt:	62/82	18/82	2/82	80/82	2/82
			75,6	21,9	2,4	97,6	2,4

TSA: Trypton-Soja-Agar, TSA-α-MUG: TSA mit 4-Methylumbelliferyl-α-D-Glucopyranosid, n: Probenanzahl

Tabelle 4.12 Verteilung der Kriterien zur Koloniebeschreibung für die verschiedenen Nährmedien

Kriterium:	Blutagar		TSA		TSA-α-MUG	
Größe in mm:	1-3		1-1,5		1-3	
	n	%	n	%	n	%
Oberfläche:						
glatt	80/82	97,6	18/82	22,0	80/82	97,6
Blumenmuster	2/82	2,4	2/82	2,4	2/82	2,4
Glanz: matt	4/82	4,9	64/82	78,0	2/82	2,4
Erhabenheit: flach	0/82		18/82	22,0	0/82	
Form: rund	80/82	97,6	82/82	100	82/82	100

TSA: Trypton-Soja-Agar, TSA-α-MUG: TSA mit 4-Methylumbelliferyl-α-D-Glucopyranosid

4.2.1.3 MTA 2/696 und Q 41/376

Die MTA-Probe 2/696, gelistet unter den ausgewählten *E. sakazakii*-Isolaten unter Punkt 3.2.1.1, wies das API-Profil 330 5173 auf und wurde nach Herstellerangaben (apiweb), ohne Einbeziehung des Zusatztests für Pigmentbildung, mit 51,1 % als *E. sakazakii* identifiziert (Tabelle 4.13). Die nächstfolgende Identifikation lautete *E. amnigenus* (31,7 %).

Das Isolat konnte auch nicht molekularbiologisch (PCR) als *E. sakazakii* bestätigt werden (2x) (Abbildung 4.4: Bahn 7). Nach erneuter Betrachtung der kulturellen Ergebnisse wurde eine fehlende Gelbfärbung auf Blut- sowie TSA- und TSA-α-MUG-Agar festgestellt, daher wurde das Isolat von den weiteren Untersuchungen (PFGE) ausgeschlossen (Anhang C, Tabelle C.6).

Das Umfeldisolat Q 41/376, ebenfalls gelistet unter den ausgewählten *E. sakazakii*-Isolaten unter Punkt 3.2.1.1, hatte folgendes API-Profil: 100 5373. Nach Herstellerangaben handelte es sich um einen Mikroorganismus des Genus *Pantoea* spp.. Nach erneuter Betrachtung der Ergebnisse wurde eine deutliche gelb-orangefarbene Pigmentbildung auf Blutagar nach 18-24 h bei 37 °C sowie TSA-Agar nach 24-48 h bei RT festgestellt. Zusätzlich zeigte sich eine Fluoreszenzbildung auf TSA-α-MUG-Agar nach 18-24 h bei 37 °C. Da das Isolat mit Hilfe der PCR molekularbiologisch nicht bestätigt werden konnte und die Koloniemorphologie auf Blutagar deutlich von denen der *E. sakazakii*-Isolate abwich, wurde das Isolat gleichfalls von den weiterführenden Untersuchungen ausgeschlossen (Anhang C, Tabelle C.7).

4.2.2 Testkit API 20 E

Da neben *E. sakazakii* auch *Pantoea* spp. und *Escherichia vulneris* sowie *Escherichia hermannii* eine Gelbfärbung aufweisen können und *Pantoea* spp. auch fluoreszierende Eigenschaften besitzt, wurden von den 424 *E. sakazakii*-verdächtigen Isolaten (gelbes Pigment +, Fluoreszenz +, Punkt 3.3.1) des untersuchten Werks 145 Isolate mit dem biochemischen Testkit API 20 E untersucht und bestätigt (Tabelle 4.13). Der Identifizierungsgrad nach Auswertung des reinen Profilschlüssels lag nach Angaben des Herstellers zwischen 2,5 und 99,9 %. Bei 95 der 145 untersuchten Isolate (62,8 %) handelte es sich nach Auswertung des siebenstelligen Profilschlüssels mit 95 %iger Sicherheit um *E. sakazakii*. Bei zweifelhaften Ergebnissen des Profilschlüssels bot die Herstellersoftware apiweb das Merkmal gelbe Pigmentbildung als Zusatztest mit 98 %iger Sicherheit für die Identifizierung des Keims an. Unter Berücksichtigung des Zusatztests Pigmentproduktion handelte es sich bei 99,3 % (144/145) der untersuchten Isolate mit 98 %iger Sicherheit um *E. sakazakii*.

Tabelle 4.13 API 20 E-Ergebnisse der 145 Isolate des untersuchten Werks

Profilschlüssel	n	%	Identifizierungsgrad nach apiweb in %	Identifizierungsgrad nach Zusatztest Pigment: gelb (apiweb) in %
130 5173	6	4,1	2,5	98,0
230 5373	1	0,7	95,4	98,0
230 7773	2	1,4	94,7	98,0
300 7373	1	0,7	85,7	98,0
330 4373	1	0,7	97,3	98,0
330 5173	16	11,0	51,1	98,0
330 5373	74	51,0	98,4	98,0
330 5375	4	2,8	98,4	98,0
330 5573	1	0,7	3,0	keine Angaben
330 5773	24	16,6	40,4	98,0
330 6373	1	0,7	40,4	98,0

Fortsetzung der Tabelle 4.13

Profilschlüssel	n	%	Identifizierungsgrad nach apiweb in %	Identifizierungsgrad nach Zusatztest Pigment: gelb (apiweb) in %
330 7373	5	3,4	99,9	98,0
330 7773	6	4,1	98,4	98,0
730 5373	3	2,1	82,1	98,0

n: Anzahl der Isolate, apiweb: Herstellersoftware, Profilschlüssel: Schlüssel zur Identifizierung nach Herstellerangaben (bioMérieux). Die beiden Isolate MTA 2/696 und Q 41/7376 wurden in dieser Tabelle nicht berücksichtigt.

4.2.3 Reaktionsmuster

Die Gattungs- und Speziesdiagnose des API 20 E-Testkits beruhte auf 20 biochemischen Reaktionsmöglichkeiten des kulturell isolierten, oxidasenegativen Keims. Zusätzlich wurden in Tabelle 4.14 die α-Glucosidase-Aktivität (Fluoreszenz) und die gelbe Pigmentbildung erfasst. Unter den 145 Isolaten befanden sich die unter Punkt 3.2.1.1 aufgezählten Isolate.

Tabelle 4.14 Biochemisches Profil der 145 *E. sakazakii*-Isolate

Reagenz/Reaktion	n = 145	in %
2-Nitrophenyl-α-D-Galactopyranosid	142	97,9
Amygdalin-Oxidation/Fermentation	145	100
Arabinose-Oxidation/Fermentation	141	97,2
Arginin-Dihydrolase	139	95,9
Cytochrom-Oxidase	145	100
Gelatinase	15	10,3
Glucose-Oxidation/Fermentation	145	100
H_2S-Bildung	0	0
Indol-Bildung	0	0
Inosit-Oxidation/Fermentation	123	84,8
L-Ornithin-Decarboxylase	144	99,3
Lysin-Decarboxylase	3	2,1
Mannit-Oxidation/Fermentation	145	100
Melibiose-Oxidation/Fermentation	145	100
Rhamnose-Oxidation/Fermentation	145	100
Saccharose-Oxidation/Fermentation	145	100
Sorbit-Oxidation/Fermentation	33	22,8
Trinatriumcitrat	144	99,3
Tryptophan Desaminase	0	0
Urease	0	0
Voges Proskauer (Acetoin-Bildung)	143	98,6
Pigmentbildung (gelb) (24-48 h bei RT)	145	100
Fluoreszenz (18-24 h bei 37 °C)	145	100

n: Probenanzahl. Die beiden Isolate MTA 2/696 und Q 41/7376 wurden in dieser Tabelle nicht berücksichtigt.

4.3 Molekularbiologische Identifizierung und Typisierung

4.3.1 Polymerase-Kettenreaktion

An insgesamt 106/424 willkürlich ausgewählten, im Zeitraum 02/2005-12/2007 gewonnenen *E. sakazakii*-verdächtigen Isolaten (Fluoreszenz +, Pigmentbildung +) wurde ein molekularbiologischer Nachweis mittels PCR nach LEHNER et al. (2004) durchgeführt. Von den 106 Isolaten wurden 82,1 %, darunter die ausgewählten *E. sakazakii*-Isolate des Punkts 3.2.1.1, zuvor biochemisch mit dem API 20 E-Testkit identifiziert (Punkt 4.2.2). Die nachfolgenden API-Profile mit einem Identifizierungsgrad zwischen 2,5 und 99,9 % (130 5173, 230 5373, 3304373, 3305173, 3305373, 3305773, 330 7373, 3307773, 730 5373) konnten dabei durch die PCR in 98,8 % der Fälle bestätigt werden (Tabelle 4.13). Lediglich das Isolat MTA 2/696 mit dem API-Profil 330 5173 konnte nicht molekularbiologisch nachgewiesen werden (Punkt 4.2.2).

Die restlichen 19/106 (17,9 %) der *E. sakazakii*-verdächtigen Isolate, die nur nach kulturellen Eigenschaften (Morphologie +, Pigmentbildung +, Fluoreszenzverhalten +) klassifiziert worden waren (Abschnitt 3.3.1), konnten mit der PCR ebenfalls zu 100 % bestätigt werden. Die genotypische Bestätigung erfolgte auf Basis des 16 S rRNA-Abschnitts, was zu einer deutlichen Bandenbildung im Bereich von ca. 929 bp führte. Ferner konnten Banden im Bereich von 653 und 1.766 bp auftreten (Abbildung 4.4). Der Längenstandard VI reproduzierte Banden über einen Bereich von 154-2.176 bp.

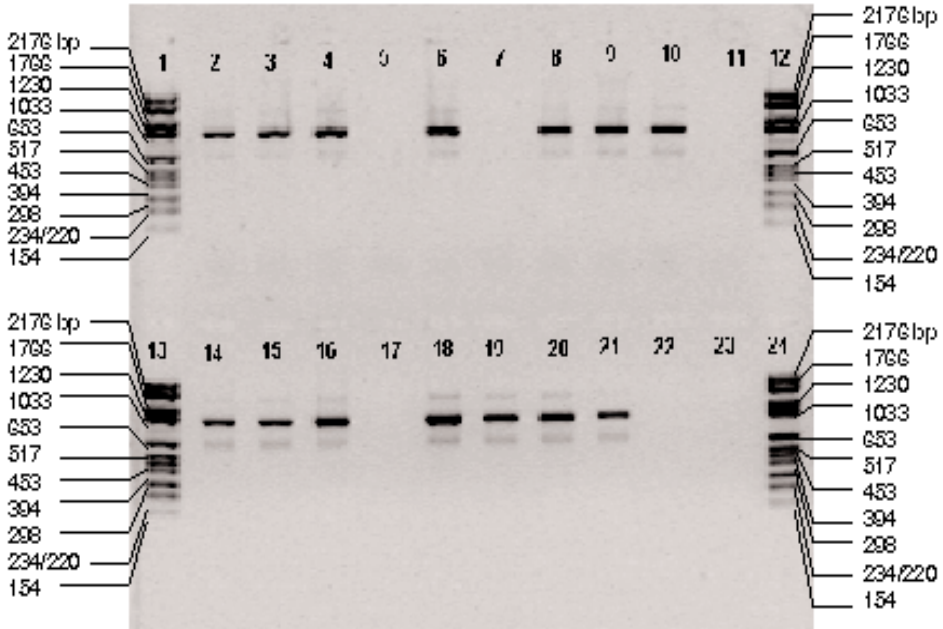


Abbildung 4.4 PCR vom 16. 11. 2006, Marker VI (Bahn 1, 12, 13, 24), A. bidest. (Bahn 5, 11, 17, 22), Positivkontrolle DSMZ-Stamm 4485 (Bahn 2), Negativkontrolle *E. cloacae* 65 (Bahn 23), *E. sakazakii*-Isolate (Bahn 3, 4, 6, 8-10, 14-16, 18-21), Bahn 7: MTA 2/696 PCR negativ (*E. amnigenus*)

4.3.2 Pulsfeld-Gelelektrophorese

Nach der molekularbiologischen Bestätigung des API 20 E-Resultats, erfolgte eine Untersuchung der verwandtschaftlichen Beziehungen zwischen den Isolaten mittels PFGE. Dies führte zu epidemiologischen, betriebsspezifischen Aussagen. Zum Vergleich mit den Isolaten des untersuchten Werks (n = 83) wurden fünf Staubsaugerisolate eines zweiten Milchpulverwerks herangezogen (Spur 13, 81-84 in Abbildung 4.5). Nach einer Restriktion mit den Enzymen Spe I und Xba I wurden über das Bandenmuster für das gesamte Werk (Abbildung 4.5), für die Sprühtrocknung (Abbildung 4.6), den ersten Sprühturm (Abbildung 4.7) und die Walzentrocknung Abbildung 4.8) jeweils Dendrogramme erstellt. Die Banden lagen im Bereich von 40,00-700,00 kb.

Für das untersuchte Werk bildeten sich insgesamt drei Hauptgruppen (HG) I-III (Abbildung 4.5). Die erste Hauptgruppe bestand aus den Spuren 1-84 und gliederte sich in die drei Untergruppen (UG): I a, I b und I c mit den entsprechenden Spuren 1-13, 14-67 und 58-84. Die Spur 85 bildete die zweite Hauptgruppe. Die Hauptgruppe III bestand aus den Spuren 86 und 87. Bei einer Ähnlichkeit von 90 % ergaben sich für das untersuchte Werk insgesamt 15 Klone aus insgesamt 81 identifizierten *E. sakazakii*-Isolaten, für die fünf zum Vergleich herangezogenen Staubsaugerisolate des zweiten Betriebs bildeten sich drei Klone; einen selbstständigen Klon formte der DSMZ-Stamm 4485. Eine Zusammenstellung der einzelnen Klone in den jeweiligen Produktionsabschnitten findet sich in Tabelle 4.15. Die Bezeichnung der Klone wurde für die nachfolgenden Abbildungen 4.6 und 4.8 beibehalten.

Tabelle 4.15 Anzahl und Verteilung der Klone im Milchtrocknungswerk

Produktionsbereich	Anzahl der Klone	Klonnummer	Anzahl Isolate/Klon
Sprühtrocknung	7	7, 17	1
		3, 9	2
		8	8
		5	14
		6	29
Walzentrocknung	8	11, 12, 14, 18	1
		10	2
		1	4
		2	6
		13	8

Die Isolate der Sprühtrocknung befanden sich in den Untergruppen Ia, b und c in Abbildung 4.5, eine genauere Interpretation liefert hingegen Abbildung 4.6. Dort ließen sich die Isolate der beiden Trocknungstürme, isoliert aus MTA-, Filterpulver- und Umfeldproben, in drei HG IV-VIII gliedern (Abbildung 4.6). Bei einer Ähnlichkeit von 90 % ergaben sich für die Sprüh-

trocknung insgesamt sieben verschiedene Klone aus 57 Isolaten über einen Zeitraum von 22 Monaten. Die engen verwandtschaftlichen Beziehungen bestanden nicht nur zwischen Isolaten eines Turms (T1: K3, T2: K8 und 9), sondern im gesamten Bereich der Sprühtrocknung (T1 und T2: K 5 und 6). Diese Durchmischung der Isolate betraf nicht nur den Produktionsbereich (Türme), sondern auch die Probenart. Enge verwandtschaftliche Beziehungen fanden sich unter Isolaten des Filterpulvers des zweiten Turms (K9) und des Umfelds des ersten Turms (K 3), aus dem Umfeld- und Filterpulver der beiden Türme (K 5), dem Umfeld und dem Produkt (MTA, Fipu) der beiden Türme (K 6).

Eine eingehendere Betrachtung des bereits unter Punkt 4.1.1 beschriebenen Einflusses der Filterpulverrückführung zum Produktstrom des ersten Trocknungsturms resultierte in Abbildung 4.7. Die Isolate entstammten dem Zeitraum 11/2005-07/2007 und wurden aus Filterpulver- und MTA-Proben gewonnen. Es zeigten sich zwei Hauptgruppen: Hauptgruppe VII mit den Untergruppen VII a-d (Spur 1-11, 12-20, 21-25 und 26), HG VIII mit den Spuren 27-31. Bei einer Ähnlichkeit von 90 % ließen sich insgesamt drei Klone (K 20-22) mit den jeweiligen Spuren 1-25, 26, 37-31 darstellen. Somit bestand Klon 20 aus 25 Isolaten, gewonnen über 22 Monate aus MTA- und Filterpulverproben, Klon 21 aus einem MTA-Isolat, Klon 22 aus Filterpulverisolaten, gewonnen über einen Zeitraum von drei Monaten. In drei Fällen konnten enge verwandtschaftliche Beziehungen zwischen MTA- und Filterpulverproben von am selben Tag genommenen Proben bestätigt werden (Spur 1, 7 und 9; Spur 3 und 4 sowie 2 und 10).

Die Isolate, gewonnen aus Produkt- und Umfeldproben der Walzentrocknung, gehörten zu den Untergruppen I a, Ic der HG I sowie Spur 86 der HG III (Abbildung 4.5). Eine detailliertere Betrachtung der PFGE-Resultate lässt Abbildung 4.8 für die Walzentrocknung zu. Die beiden Hauptgruppen IX und X setzen sich aus den jeweiligen UG IX a, b, c zusammen. Bei einem angenommenen Verwandtschaftsgrad von 90 % zeigten sich insgesamt acht Klone aus 24 Isolaten über einen Zeitraum von 20 Monaten. Die Produkt- und Umfeldisolate zeigten nicht nur enge verwandtschaftliche Beziehungen unter den Produktisolaten (MTA, WVP), sondern auch zwischen Isolaten aus der Produktion und dem Umfeld (K 1, 2, 10 und 13) (Abbildung 4.5 und 4.8).

Die Staubsaugerisolate des zweiten Werks bildeten die Spur 13 der UG Ia (K4) und die Spuren 81-84 der UG Ic mit den Klonen (K 15 und 16) der Abbildung 4.5. Diese Klone standen in keinerlei Beziehung zu den Isolaten des untersuchten Betriebs.

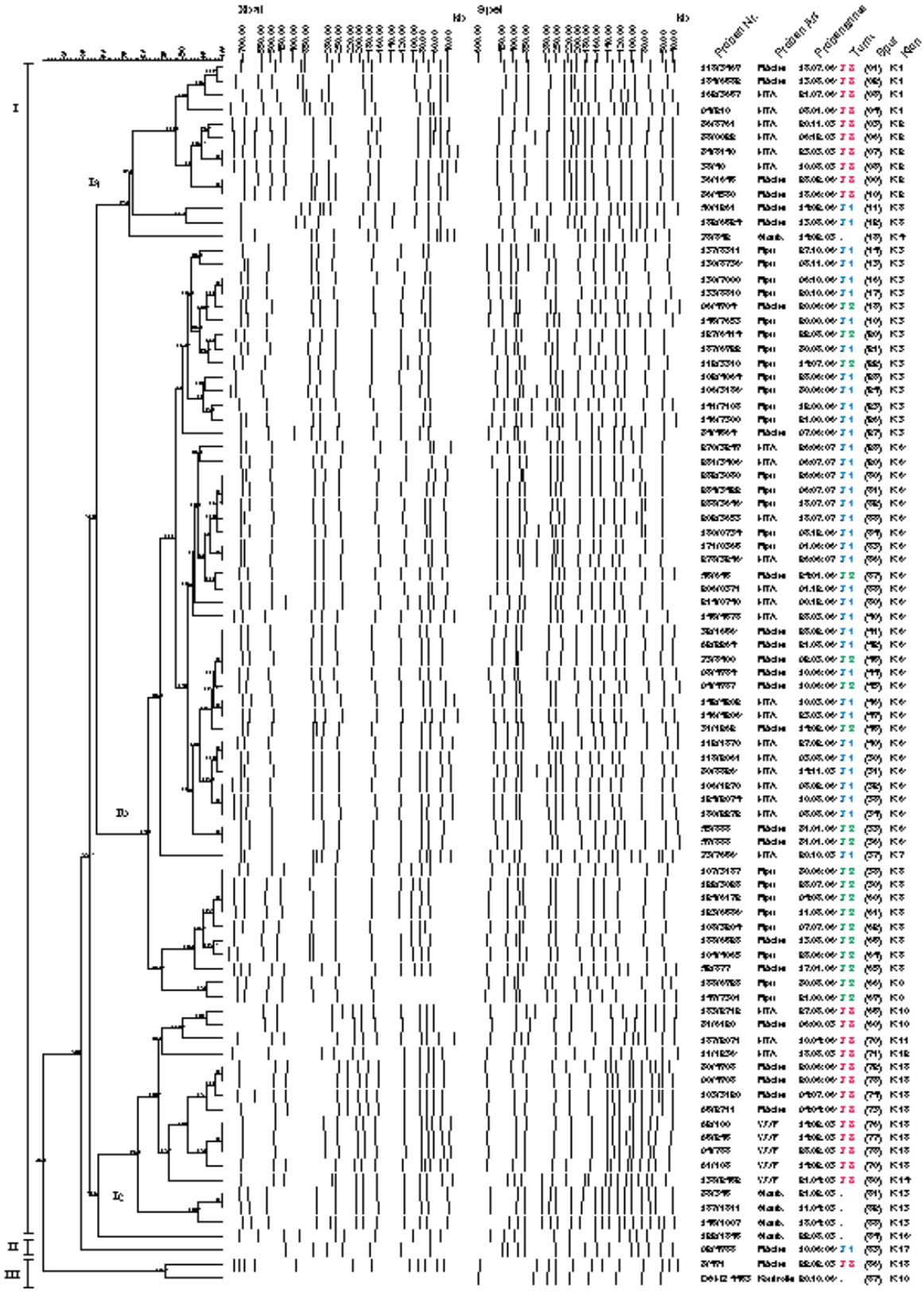


Abbildung 4.5 PFGE der 81 ausgewählten *E. sakazakii*-Isolate des Milchtrocknungswerks im Vergleich mit 5 Isolaten des Werks B sowie DSMZ-Stamm 4485. Von links nach rechts: Dendrogramm Hauptgruppen I-III mit Untergruppen I a-c, Bandenmuster nach Restriktion Xba I und Spe I.

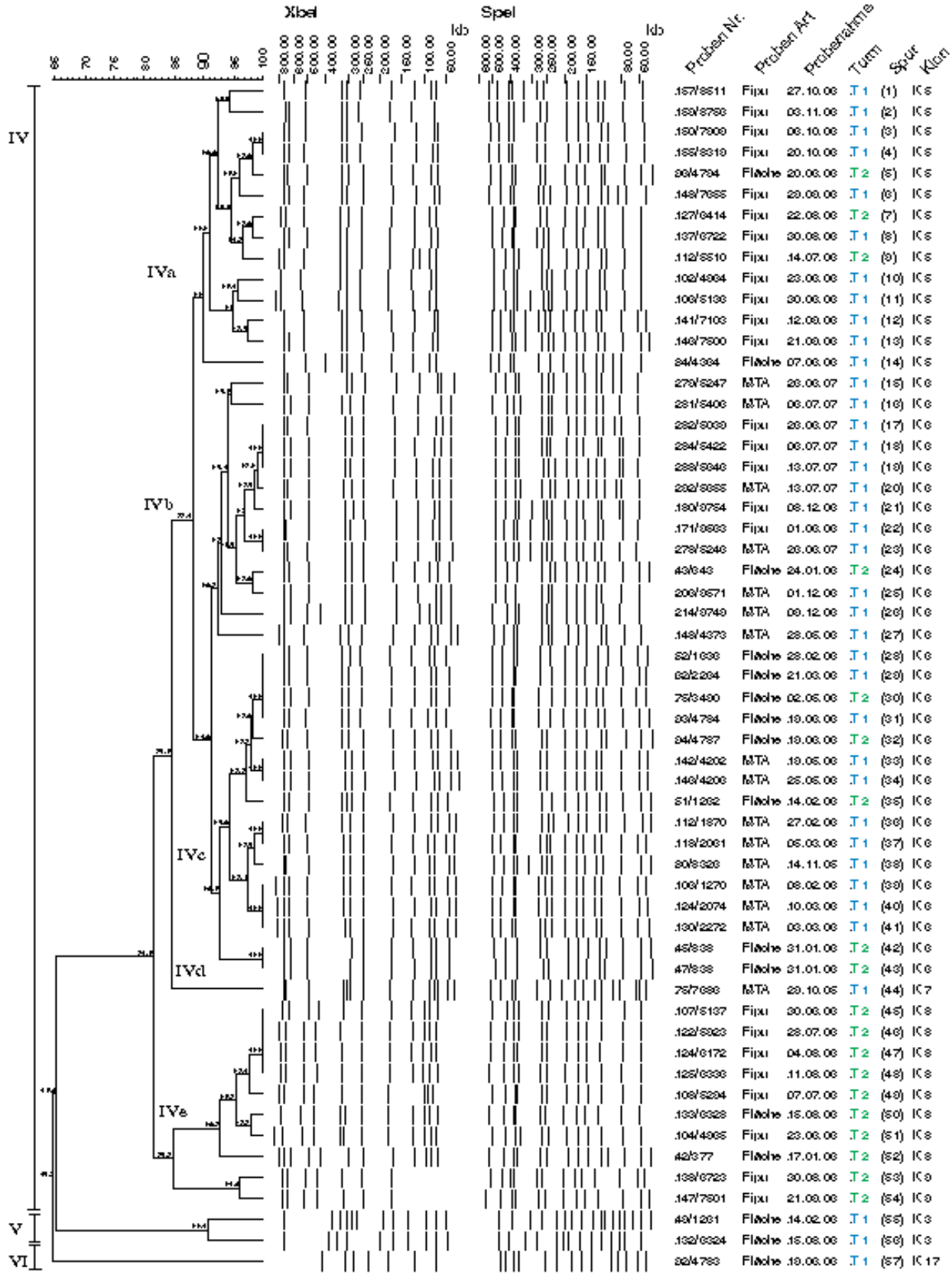


Abbildung 4.6 **PFGE ausgewählter *E. sakazakii*-Isolate aus dem Bereich der beiden Trocknungstürme.** Von links nach rechts: Hauptgruppen IV-VI mit den Untergruppen IV a-e.

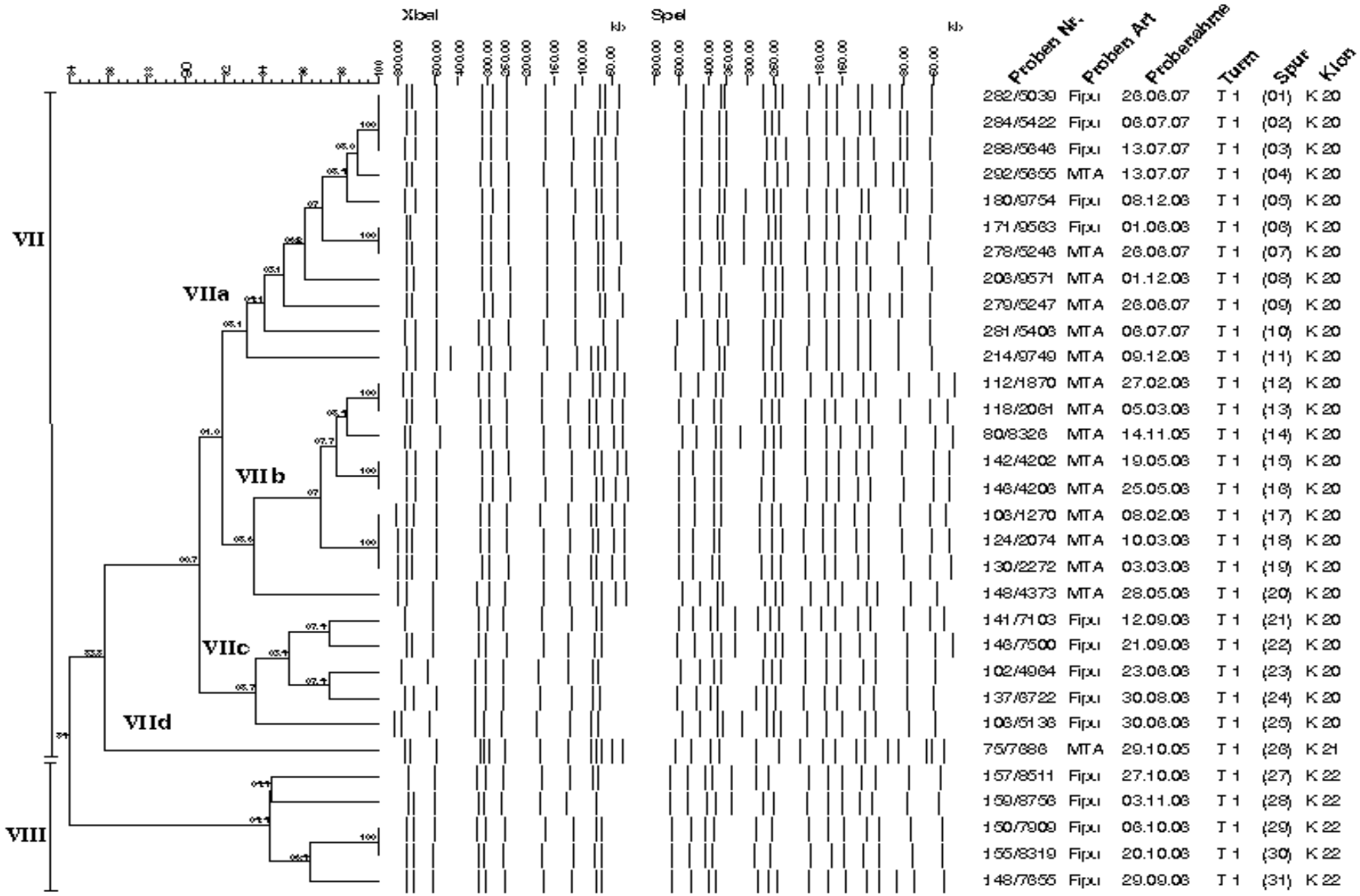


Abbildung 4.7 PFGE ausgewählter *E. sakazakii*-Isolate, gewonnen aus MTA- und Filterpulverproben des 1. Turms.
Von links nach rechts: Haupt-gruppen VII und VIII mit den Untergruppen VII a-d.

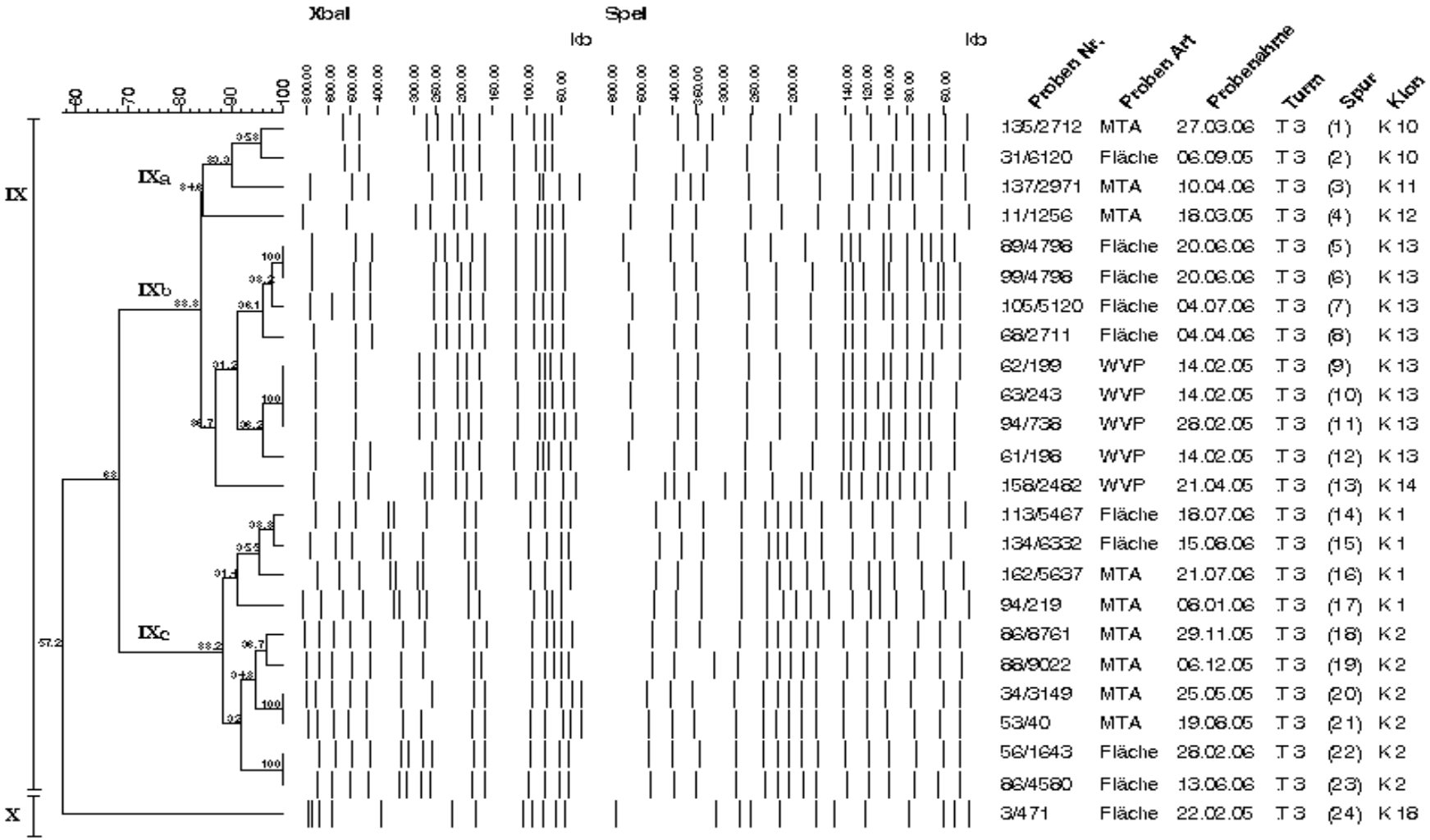


Abbildung 4.8 PFGE ausgewählter *E. sakazakii*-Isolate aus der Walzentrocknung 2005-2006.
Von links nach rechts: Hauptgruppen IX-X mit den Untergruppen IX a-c.

5 DISKUSSION

Die mikrobiologische Qualität eines Milchpulvers spielt nicht nur eine entscheidende Rolle bei der Herstellung von Säuglingsnahrung (als mögliche Infektionsquelle für Früh- und Neugeborene), sondern auch in Bezug auf Marketing und Wettbewerb in der Europäischen Union und der Welt. In Deutschland wurden im Jahr 2008 circa 389.000 t Milchpulver hergestellt. Durch die weltweite Nachfrage, vor allem in Ländern wie China und Indien, deren Bedarf schnell wächst, ist mit einer anhaltenden Produktionssteigerung für diesen Sektor zu rechnen (ANON. 2007c, ANON. 2008c, GORN 2008, GORN u. HELLEBRAND 2008).

Mit Blick auf die Gewährleistung und Verbesserung der mikrobiologischen Qualität wurden in einem Milchtrocknungsbetrieb Umfeld- und Produktproben aus den Bereichen der Sprüh- und Walzentrocknung auf *E. sakazakii* untersucht. Zur Ermittlung erregerspezifischer Verbreitungswege innerhalb des Werks wurden die Isolate ferner phänotypisch charakterisiert, molekularbiologisch identifiziert und typisiert. Ziel war es, anhand der ermittelten Daten betriebsepidemiologische Zusammenhänge zu erfassen und diese mit der Prozesssicherheit zu verknüpfen, um Maßnahmen zur Verbesserung der Betriebshygiene entwickeln zu können.

5.1 Phänotypische Charakterisierung und kultureller Nachweis

5.1.1 Koloniemorphologie

In den durchgeführten Untersuchungen erfolgte die kulturelle Anzüchtung der *E. sakazakii*-Isolate auf Blut-, TSA-, TSA-α-MUG- und VRBD-Agar. Dabei variierte die Koloniemorphologie je nach Isolat und Agar bzw. Bebrütungszeit (VRBD-37 °C und VRBD-30 °C) (Tabelle 4.11, 4.12 und Anhang C, Tabelle C.1-5).

5.1.1.1 VRBD-Agar

Das Erscheinungsbild der 82 Isolate und des DSMZ-Stamms 4485 variierte auf dem für Enterobakterien im Allgemeinen entwickelten Nährmedium (VRBD) sehr. Daher konnte kein spezifisches Bild für *E. sakazakii,* weder für das Nährmedium, noch für eine Bebrütungszeit (30 bzw. 37 °C) ermittelt werden. Die in Anhang C zusammengestellten Tabellen C.4 und C.5 stellen somit lediglich einen Überblick über die Koloniemorphologie auf VRBD dar.

5.1.1.2 Blut-, TSA- und TSA-α-MUG-Agar

Bei den *E. sakazakii*-Isolaten handelt es sich in Bezug auf Form und Erhabenheit in der Regel um runde und eher flache Kolonien. Auf dem nährstoffreicheren Blutagar zeigt *E. sakazakii* eine vielfältige Koloniemorphologie, insgesamt konnten fünf verschiedene Typen definiert werden (Anhang C, Tabelle C.1). Auf TSA- sowie TSA-α-MUG-Agar bildeten sich dagegen drei

bzw. zwei Morphologietypen (Anhang C, Tabelle C.2 und C.3). Die Kolonien auf Blut- sowie TSA- bzw. TSA-α-MUG-Agar fallen mit ein bis drei mm Durchmesser eher klein aus. Die Mehrzahl der Kolonien haben auf Blut- und TSA-α-MUG-Agar eine glatte Oberfläche (Blutagar 97,6 %, TSA-α-MUG 97,6 %), auf TSA dagegen nur (22,0 %). Eine Varianz zwischen den Isolaten in Bezug auf Oberflächenbeschaffenheit und Konsistenz konnte von FARMER III. et al. (1980) und HAWKINS et al. (1991) ebenfalls bestätigt werden. In Bezug auf die Koloniegröße erzielten sie auf TSA-Agar mit 2-3 mm großen Kolonien ein ähnliches Ergebnis. Der von NAZAROWEC-WHITE u. FARBER (1997c) festgestellte Übergang zwischen der rauen und glatten Kolonieform konnte in den vorliegenden Untersuchungen ebenfalls bestätigt werden (siehe Anhang C). Neben den Unterschieden in der Oberflächenstruktur weisen die Kolonien auf TSA-Agar eine überwiegend matte Oberfläche auf (78,0 %), auf Blut- und TSA-α-MUG-Agar überwiegt dagegen mit 95,1 und 97,6 % eine glänzende Oberfläche.

5.1.1.3 Pigmentbildung

Bevor *E. sakazakii* von FARMER III. et al. (1980) als eigenständige Spezies beschrieben wurde, war der Erreger bereits als gelb pigmentierter *Enterobacter cloacae* in der Literatur bekannt (FARMER III. et al. 1980, GRIMONT u. GRIMONT 2006). Wie bereits unter Punkt 2.1.2.2 erwähnt, hängt die Ausprägung dieses Pigments stark von der Bebrütungstemperatur ab. In den vorliegenden Untersuchungen wurde eine deutliche Gelbfärbung der Kolonien auf TSA-Agar nach 24-48 h bei Raumtemperatur und eine verringerte Farbgebung auf TSA mit α-MUG-Zusatz bei einer Bebrütung von 18-24 h bei 37 °C festgestellt (Anhang C, Tabelle C.2 und C.3). Neben der hellen Gelbfärbung auf TSA-Agar kann eine Pigmentbildung auch auf Blutagar beobachtet werden (Anhang C, Tabelle C.1). Der Farbton variierte auf Blutagar zwischen hell- und graugelb. Der von BRENNER u. RICHARD (1984) geschilderte Pigmentverlust durch Subkultivierung wurde dagegen nicht beobachtet.

Da in dieser Arbeit die *E. sakazakii*-Selektion auf der Pigmentbildung auf TSA-Agar nach 24-48 h bei RT beruhte und somit bei allen Isolaten eine Pigmentbildung Voraussetzung für die weitere Isolierung und Identifizierung war, ist das Ergebnis einer 100 %igen Gelbfärbung bei den gewonnen Isolaten (Tabelle 4.14) nicht weiter hervorzuheben. Das von IVERSEN u. FORSYTHE (2007) und BLOCK et al. (2002) beschriebene Fehlen des Pigments bei zwei Prozent der Isolate konnte daher gar nicht in auftreten, da nicht gelbe Kolonien nicht weiter berücksichtigt wurden. Für den Überblick über die Gesamtkontamination eines Milchtrocknungswerks mit *E. sakazakii* und im Hinblick auf die möglichen epidemiologischen Aussagen für die Produktions-

stätte war dieser theoretische Fehler von zwei Prozent beim *E. sakazakii*-Nachweis in dieser Arbeit jedoch von untergeordneter Bedeutung.

Durch das Vorhaben der Association Française de Normalisation (AFNOR) die gelbe Pigmentierung als phänotypisches Charakteristikum im zukünftigen ISO-Standard, aus den unter Punkt 2.1.2.2 bereits erläuterten Gründen, auszuschließen, fällt ein zuverlässiger (98 %) und leicht durchführbarer Identifizierungsschritt beim kulturellen sowie biochemischen Nachweisverfahren (API 20 E) weg (Tabelle 4.13 und 4.14).

5.1.1.4 Fluoreszenz

Neben der chromogenen Eigenschaft des Keims unter den *Enterobacter* spp. spielt die α-Glucosidase-Aktivität eine entscheidende Rolle (Punkt 2.1.5 und 2.2.1). Hierbei handelt es sich ebenfalls um ein zuverlässiges und leicht handhabbares Diagnostikum beim kulturellen Nachweis von *E. sakazakii* (Anhang C, Tabelle C.3, C.6 und C.7). Da in den vorliegenden Untersuchungen der kulturelle *E.sakazakii*-Nachweis auf den fluoreszierenden Eigenschaften der Isolate beruhte, sei an dieser Stelle der Vollständigkeit halber erwähnt, dass unter den 424 gewonnen *E. sakazakii*-Isolaten die Fluoreszenz auf TSA mit α-MUG-Zusatz zu 100 % bestätigt werden konnte (biochemischer Nachweis erfolgte nach kultureller Isolierung, Tabelle 4.14). Eine fehlende Aktivität der α-Glucosidase hätte somit gar nicht beobachtet werden können.

5.1.2 Kulturelle Nachweismethoden

Die kulturelle Isolierung erfolgte anhand der morphologischen Kriterien Pigmentbildung und Fluoreszenzverhalten. Da neben *E. sakazakii* auch *Pantoea* spp. und *Escherichia vulneris* sowie *Escherichia hermannii* eine Gelbfärbung aufweisen können und *Pantoea* spp. ebenfalls fluoreszierende Eigenschaften besitzt, wurden von den 424 *E. sakazakii* verdächtigen Isolaten des Werks 145 weiter biochemisch differenziert (API 20 E), 106 mit der PCR identifiziert und 81 mit der PFGE typisiert. Zum Vergleich wurden fünf Staubsaugerisolate eines zweiten Milchtrocknungswerks typisiert (Punkt 3.3.1, 3.3.3 und 3.3.4).

Isolierung aus Milchpulver und Umfeldproben

Probenmaterial und Voranreicherung

Um *E. sakazakii* optimal aus Probenmaterial isolieren zu können, ist eine Anreicherung des Keims dringend notwendig (EL-PRINCE et al. 2007). Die Autoren konnten durch einfache Voranreicherung in gepuffertem Peptonwasser ohne zusätzliche Selektivanreicherung eine höhere Anzahl an Isolaten gewinnen als mit der von der US Food and Drug Administration (FDA) empfohlenen Voranreicherung in A. dest. mit nachfolgender Selektivanreicherung in EE (FDA 2002a). Als weiteres Anreicherungsmedium wurde gepuffertes Peptonwasser (MUYTJENS et al.

1988, NAZAROWEC-WHITE u. FARBER 1997a, b, c) mit einer 18-24stündigen Bebrütung bei 37 °C (IVERSEN u. FORSYTHE 2003) genannt. In der vorliegenden Arbeit wurde für die Isolierung aus Flächenproben das Anreicherungsverfahren mit Peptonwasser gewählt. Dieses Verfahren bot die geeigneten Nährstoffe (Peptonwasser) für die mit einer ausgeprägten Konkurrenzflora behafteten Proben aus dem Produktionsumfeld. Die im Werk untersuchten mikrobiologischen Trendanalysen (MTA-Proben: hierbei handelte es sich um Produktproben, die fünfmal täglich bzw. pro Charge auf Enterobakterien untersucht wurden, wurden ebenfalls mit Peptonwasser angereichert. Dies wäre nicht unbedingt notwendig gewesen, da das Proben material (Milchpulver) ausreichende Nährstoffe enthielt. Eine Anreicherung in doppelt gepufferter Salzlösung hätte in diesem Fall genügt und wurde in der vorliegenden Arbeit für selbst untersuchte Pulverproben verwendet (Punkt 3.3.1.3).

Für die Pulverproben wurden die von der FDA empfohlene Titerbestimmung sowie das Anreicherungsverhältnis modifiziert bzw. übernommen (FDA 2002a). Die unter Punkt 2.1.2 beschriebenen Wachstumseigenschaften sowie der hohe Eigenanteil an Nährstoffen der Milchpulverproben (Walzenvollmilchpulver, Staubsaugerproben, Filterpulver) führten dazu, dass das Peptonwasser durch doppelt gepufferte Salzlösung ersetzt wurde. Für die Titerbestimmung wurde das Milchpulver neben den von der FDA vorgegebenen Mengen von 100, 10 und 1g zusätzlich auf Basis von 0,1 g angereichert. Die Ergebnisse von EL-PRINCE et al. (2007) (s.o) fanden in dieser Arbeit keine Berücksichtigung (die Publikation erschien nach den eigenen experimentellen Arbeiten) und konnten deshalb weder bestätigt noch widerlegt werden.

Selektivanreicherung

Zur selektiven Anreicherung (Hemmung der Begleitflora, vor allem bei Flächenproben) wird ausschließlich die von der International Dairy Federation (IDF), GUILLAUME-GENTIL et al. (2005), HAHN (2003) und HAMMER (2005) zum Nachweis von coliformen Bakterien empfohlene LST verwendet (ANON. 2004c). Wie bereits von HAHN (2003) und HAMMER (2005) erwähnt, ist eine Modifizierung (0,5 M NaCl + 10 mg/l Vancomycin) nach GUILLAUME-GENTIL et al. (2005) zur Isolierung von *E. sakazakii* nicht erforderlich. Dagegen wurde zur weiteren Hemmung der nicht-thermophilen Begleitflora die Inkubationstemperatur auf 45 °C erhöht (ANON. 2004c, GUILLAUME-GENTIL et al. 2005, HAHN 2003).

Der von der IDF und HAMMER (2005) publizierte Inokulationsmodus von 0,1 ml in 10 bzw. 9 ml der Selektivbouillon wurde in den eigenen Untersuchungen für die Isolierung aus Flächen- und Pulverproben beibehalten (ANON. 2004c) (Punkt 3.3.1).

Detektionsmedium

Ein vorläufiges positives Ergebnis von chromogenen *E. sakazakii*-selektiven Nährmedien (DFI, COMPASS usw.) reicht nicht aus, um das Isolat endgültig als *E. sakazakii* auszuweisen. Ein erneuter Ausstrich auf TSA (Pigmentbildung) und Fluoreszenznachweis sind nötig um das vorläufig positive Resultat der chromogenen Medien zu erhärten (HAHN 2003, GONZALES et al. 2006, KRESS et al. 2005, MUYTJENS et al. 1988, NAZAROWEC-WHITE et FARBER 1997a, b,c). Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit auf den Einsatz von chromogenen Medien verzichtet und zur weiteren Ausdifferenzierung auf die Nährmedien TSA (Pigmentbildung) und TSA mit α-MUG-Zusatz (Fluoreszenznachweis) zurückgegriffen. Die Ausstrichmenge von 10 µl mit anschließender Fraktionierung (FDA 2002a, ANON. 2004c) ermöglichte eine gute Betrachtung der Koloniemorphologie.

Die Isolierung von Kolonien der zur Weiterbearbeitung verschickten MTA-Proben erfolgte durch erneuten Ausstrich auf Blut- und VRBD-Agar. Die Sensitivität und Spezifität des eingesetzten VRBD-Agars führt laut DERZELLE et al. (2007) in Bezug auf *E. sakazakii* in knapp der Hälfte der Fälle zu einem zuverlässigen vorläufigen positiven Ergebnis. Dabei handelte es sich um ein Resultat, welches weder biochemisch noch molekularbiologisch bestätigt wurde. Im Zeitraum 2005-2007 wurden insgesamt 816 der 13.681 im Trocknungswerk angesetzten MTA-Proben zur weiteren Ausdifferenzierung an das MRI gesandt (Tabelle 4.6). Da sich das Hauptaugenmerk des Werks bei den Flächen- (Umfeldmonitoring) und MTA-Proben auf die Enterobakterien im Allgemeinen richtete und der *E. sakazakii*-Nachweis zusätzlich zu den Routineproben nur beim MRI durchgeführt wurde, wurde im Werk der VRBD-Agar angewendet. Eine weitaus größere Problematik als die von DERZELLE et al. (2007) beschriebene geringe Spezifität des VRBD-Agars bildeten in dieser Arbeit die oftmals eingetrockneten Kolonien auf den VRBD-Platten, die vom Werk über eine Woche gesammelt wurden, bevor sie ans MRI geschickt wurden, weil sie und ein erneutes Anwachsen auf Blut- und VRBD-Agar wesentlich erschwerten bzw. unmöglich machen.

Pigmentbildung und Fluoreszenznachweis

Wie bereits unter Punkt 5.1.1.3 und 5.1.1.4 eingehend dargestellt, bildet *E. sakazakii* eine deutliche gelbe Pigmentierung auf TSA-Agar und Fluoreszenz auf TSA-α-MUG-Agar aus. Die Pigmentbildung ist nicht ausschließlich *E. sakazakii* vorbehalten (DERZELLE et al. 2007, GUILLAUME-GENTIL et al. 2005), sondern wurde auch bei *Pantoea* spp. (51 Isolate von 987 *Enterobacteriaceae*-Isolaten aus 3.124 untersuchten Proben) und *Escherichia vulneris* (5 Isolate von 987 *Enterobacteriaceae*-Isolaten aus 3.124 untersuchten Proben) beobachtet. Neben den oben erwähnten Erregern zeigte sich im Laufe der Untersuchungen eine Gelbfärbung

auch bei *Escherichia hermannii* (33 Isolate von 987 *Enterobacteriaceae*-Isolaten aus 3.124 untersuchten Proben).

Unter den *Enterobacter* spp. bildet einzig und allein *E. sakazakii* die α-Glucosidase aus, allerdings verfügen zahlreiche Spezies anderer Genera der Familie der *Enterobacteriaceae* über dieselbe enzymatische Aktivität (*Yersinia* spp., *Klebsiella* spp., *Kluyvera* spp., *Proteus* spp.). Wegen der einfachen Durchführbarkeit des Tests bot sich der Nachweis der α-Glucosidaseaktivität zur weiteren Ausdifferenzierung an und wird in zahlreichen *E. sakazakii*-spezifischen und nicht-selektiven Nährmedien angewendet (GONZALEZ et al. 2006, GUILLAUME-GENTIL et al. 2005, HAHN 2003, KANDHAI et al. 2004b, MUYTJENS et al. 1988, NAZAROWEC-WHITE u. FARBER 1997a, b, c). Zur Ermittlung der fluoreszierenden Eigenschaften von *E. sakazakii* diente in dieser Arbeit die Zugabe des α-MUGs zum TSA-Agar. Neben *E. sakazakii* und den oben bereits erwähnten Enterobakterienarten bilden *Pantoea* spp. eine deutliche Fluoreszenz auf TSA-α-MUG nach 18-24 h bei 37 °C aus. Da *Pantoea* spp. auch deutlich ausgeprägte chromogene Eigenschaften auf TSA- sowie Blutagar aufweisen, war damit zu rechnen, dass sich unter den 260 nicht weiter identifizierten der 424 *E. sakazakii*-verdächtigen Isolate einige *Pantoea* spp.-Isolate befinden (siehe Q 41/376 unter Punkt 4.2.1.3, Anhang C, Tabelle C.7). Ein ähnliches Verhalten wie bei den *Pantoea* spp. konnte bei *Staphylococcus* spp. beobachtet werden. Neben deutlichen morphologischen Abweichungen fiel die Fluoreszenz aber wesentlich geringer aus. Erfahrene Untersucher sind in der Lage, *E. sakazakii* von *Pantoea* spp. bzw. *Staphylococcus* spp. anhand der Koloniemorphologie bereits optisch zu unterscheiden.

5.1.3 Bestätigung des kulturellen Nachweises durch biochemische Testkits

Beim API 20 E handelt es sich um ein gängiges, kommerzielles Testkit, basierend auf der Auswertung des biochemischen Reaktionsmusters des zu untersuchenden Keims, das auch für die Charakterisierung von *E. sakazakii* gut geeignet ist (BIERING et al. 1989, KANDHAI et al. 2004b, MONROE u. TIFT 1979, MUYTJENS et al. 1983, NAZAROWEC-WHITE u.FARBER 1999, SEO u. BRACKETT 2005, SIMMONS et al. 1989). IVERSEN et al. (2004a) berichteten hingegen auch von falsch positiv bestätigten Isolaten. Von den 424 gewonnenen Isolaten wurden 145 willkürlich ausgewählt, mit dem API 20 E untersucht und als *E. sakazakii* bestätigt (Tabelle 4.13). Der Grad der Identifizierung lag nach Herstellerangaben (apiweb) zwischen 2,5 und 99,9 % und erlaubte bei 62,8 % der untersuchten Isolate mit 95 % Sicherheit oder mehr eine Identifizierung von *E. sakazakii*. Unter Zuhilfenahme des vom apiweb angegebenen Zusatztests der Pigmentbildung liegt der Identifizierungsgrad mindestens bei 98,0 %. Daraus folgt, dass mit Hilfe des API 20 E-Resultats 62,8 % der Isolate mit > 95 % als *E. sakazakii* identifiziert wurden;

mit Zusatztest wurden 99,3 % mit über > 98,0 %iger Sicherheit als *E. sakazakii* identifiziert. Der Zusatztest lag bei 89/145 Isolaten unter dem Identifizierungsgrad des apiweb. Wie bereits unter Punkt 5.1.1.3 erwähnt wurde, fehlte die Ausprägung bei zwei Prozent der Isolate. Somit lag der Identifizierungsgrad des apiweb mit Zusatztest bei 61,4 % der Isolate lediglich bei 98 %, obwohl der Identifizierungsgrad nach apiweb ohne Zusatztests > 98 % betrug. In diesen Fällen zählte der höhere Identifizierungsgrad. Käme es nach Bestreben der AFNOR zu einem Wegfall dieses phänotypischen Charakteristikums beim ISO-Standard, läge der Nachweisgrad in 37,2 % der Fälle < 95 % und würde die Zuverlässigkeit des API 20 E deutlich mindern.

Von den insgesamt 145 biochemisch untersuchten Stämmen wurden 106 mit Hilfe der PCR molekularbiologisch zu 98,8 % identifiziert. Der Identifizierungsgrad dieser Stämme liegt nach apiweb-Angaben zwischen 2,5 und 99,9 % (Tabelle 4.13). Nach Wegfall des phänotypischen Charakteristikums der gelben Pigmentausbildung wäre ein molekularbiologischer Nachweis in der Lage, die biochemische Identifizierung zu bestätigen.

Biochemische Eigenschaften

Zur phänotypischen Charakterisierung werden häufig biochemische Eigenschaften eines Keims genutzt (BINGEN et al. 1994, FARMER et al. 1985). Auf Basis dieser Eigenschaften wurden kommerzielle Testkits für Keimfamilien erstellt und zur Bestätigung bzw. Ausdifferenzierung von kulturell isolierten Keimen angewendet. Anhand der in Tabelle A.1 in Anhang A beschriebenen biochemischen Eigenschaften und Reaktionsmuster des in dieser Arbeit eingesetzten API 20 E-Testkits (Tabelle 4.14) konnten folgende Übereinstimmungen ermittelt werden: In 90-100 % der Fälle verwerteten die *E. sakazakii*-Isolate Amygdalin, Arabinose, Arginin, Citrat, Glucose, Mannitol, Melibiose, ONPG, Ornithin, Rhamnose, Saccharose und Voges Proskauer. Dagegen kam es bei H_2S, Lysin, Cytochrom Oxidase, Tryptophan und Urease zu keinerlei Reaktion. Zusätzlich konnte Inosit mit 84,8 % als variable Reaktion bestätigt werden. Laut Literatur gehört die Gel-Hydrolyse zu den negativen Ergebnissen, mit 10,3 % positiven Resultaten lag diese Reaktion im API 20 E an der Grenze zu den variablen Eigenschaften. FARMER et al. (1977) hoben eine negative Sorbitol-Reaktion zur phänotypischen Abgrenzung zu *E. cloacae* hervor. HEUVELINK et al. (2001) berichteten hingegen von Sorbitol- positiven Reaktionen. In den vorliegenden Untersuchungen konnte eine positive Sorbitol-Reaktion bei 22,8 % der untersuchten Isolate festgestellt werden. BRENNER (1981), FARMER III. et al. (1980), Farmer III. und KELLY (1992) und IVERSEN et al. (2006) berichteten von einer Variabilität hinsichtlich der Indol-Reaktion bei *E. sakazakii*, dies konnte dagegen in dieser Arbeit nicht bestätigt werden (0/145). Da den letztgenannten Reaktionen (Inosit, Gel Hydrolase und Indol) im Gegensatz zur Sorbitol-Reaktion in

der Literatur keine erwähnenswerte Aufmerksamkeit zuteil wurde und da es sich bei der Inosit- und Indol-Verwertung lediglich um eine variable und somit unzuverlässige Reaktion handelt, hatte dieses Ergebnis keinerlei Einfluß auf die Auswertung des biochemischen Nachweises.

5.2 Molekularbiologischer Nachweis und Typisierungsmethoden

5.2.1 Molekularbiologische Identifizierung

106 der 424 gewonnenen Isolate, darunter die für die PFGE ausgewählten Isolate (Punkt 3.2.1.1), wurden zufällig ausgesucht und zusätzlich zur biochemischen Identifizierung molekularbiologisch mit einer PCR-Methode nach LEHNER et al. (2004) bestätigt. Der Nachweis erfolgt anhand eines Ausschnitts der 16 S rRNA Gensequenz. Diese Darstellung des Genabschnitts ermöglicht einen schnellen und sicheren Keimnachweis mit hoher Sensitivität und Spezifität; sie wurde neben LEHNER et al. (2004) auch von HASSAN et al. (2005) und WEILI et al. (2006) angewendet. In dieser Arbeit wurde das in LEHNER et al. (2004) verwendete Temperatur-Zeit-Profil in Bezug auf die Annealing Temperatur auf 66 °C angehoben (Tabelle 3.3, Abbildung 4.4). Durch diese Temperaturerhöhung konnten vorherige Fehlbanden bei eng verwandten Spezies (*Pantoea* spp., *Citrobacter* spp., *Enterobacter* spp.) vermieden werden. Die Isolate wurden mit dem modifizierten PCR-Ansatz zu 98,8 % erkannt und zeigten im erwarteten Bereich von 929 bp eine deutliche Bande. Im Bereich von 1.230 und 517 bp traten dennoch zusätzliche Fehlbanden auf. Diese waren möglicherweise auf eine unterschiedliche DNA-Aufbereitung (Angaben zur DNA-Aufbereitung fehlen bei LEHNER et al. (2004)), die Bildung von unspezifischen oder unvollständigen Amplifikaten, bedingt durch zu geringe Extinktionszeit, oder auf zu große Mengen des Ausgangsmaterials (Matrize) zurückzuführen. Da diese Zusatzbanden beim DSMZ-Stamm 4485 ebenso vorkommen, wurde das Profil für charakteristisch erklärt und als positiver *E. sakazakii*-Nachweis bewertet.

5.2.2 Molekularbiologische Typisierung

Die molekularbiologische Typisierung wird z.B. bei der Ermittlung von nosokomialen Infektionsketten und bei betriebsepidemiologischen Fragestellungen in der gesamten Lebensmittelkette eingesetzt (Punkt 2.2.3.2). Die Pulsfeld-Gelelektrophorese überzeugt dabei durch ihre universelle Anwendbarkeit (MASLOW et al. 1993), ihre hohe Diskriminierung, Reproduzierbarkeit, Standardisierbarkeit und weltweite Vergleichbarkeit (DRUDY et al. 2006a).

Die vorliegenden Untersuchungen führten nach Anwendung einer hausinternen Methode zu folgenden Aussagen: Im Bereich der Milchpulverherstellung konnten mit einem Diskriminator bei einer Ähnlichkeit von 90 % im Bereich der Sprühtrocknung 7 Klone und im Bereich der Walzentrocknung acht Klone differenziert werden (Punkt 4.3.2, Abbildung 4.5). Bezogen auf die

Verteilung dieser Klone in Haupt- und Untergruppen ist eine deutliche Trennung für die jeweiligen Trocknungsbereiche erkennbar. Innerhalb des Werks kommt es also zu keiner Vermischung und Verschleppung der *E. sakazakii*-Klone zwischen der Sprüh- und Walzentrocknung. Die Betrachtung des untersuchten Werks in Bezug auf Qualitäts- und Prozesssicherung konnte somit für beide Trocknungsbereiche (das geschlossene Trocknungssystem der Sprühtrocknung und das offene Herstellungsverfahren der Walzentrocknung) getrennt erfolgen (Punkt 5.3).

5.2.2.1 Walzentrocknung

Die acht Klone aus der Walzentrocknung setzten sich aus 24 Isolaten zusammen, die aus Produkt- und Umfeldproben über einen Zeitraum von 02/2005-08/2006 gewonnen wurden (Abbildung 4.8, Tabelle 4.15). Die Vielzahl an unterschiedlichen Klonen kam vermutlich durch einen wiederholten Eintrag aus der Außenwelt zustande. Dies ermöglicht u.a. ein im Produktionsraum befindliches Rolltor, über welches häufiger Materialaustausch stattfand. Hierbei kam es zu einer Unterbrechung des werksspezifischen Zonenkonzepts.

Die Isolate des 2. und 13. Klons der Walzentrocknung zeigten deutlich (Ähnlichkeit von 90 %), dass es sich um ein erneutes Auftreten des gleichen Klons handeln musste. Aus dem Produktionsumfeld konnte über einen Zeitraum von Monaten der gleiche *E. sakazakii*-Klon zweimal (Klon 2) bzw. dreimal (Klon 13) isoliert werden.

Den Eintrag aus dem Produktionsumfeld ins Endprodukt verdeutlichen die Spuren 14-16 der gleichen Abbildung. Nach dem Nachweis im Umfeld konnte der gleiche Klon nach drei Tagen aus dem Endprodukt isoliert werden. Nach drei Wochen konnte ein erneutes Auftreten im Umfeld festgestellt werden (Spur 15, Abbildung 4.8); d.h. unabhängig vom Zeitpunkt des tatsächlichen Eintrags können Klone auch längere Zeit persistieren. Auf die möglichen Kontaminationswege wird unter Punkt 5.3.2.2 näher eingegangen.

5.2.2.2 Sprühtrocknung

Im Bereich der Sprühtrocknung konnten sieben Klone identifiziert werden, die sich aus insgesamt 57 Isolaten, gewonnen aus Umfeld- und Produktproben, zusammensetzten (Abbildung 4.6, Tabelle 4.15). Die bereits bei der Walzentrocknung erwähnte Vielzahl an unterschiedlichen Klonen trat auch bei der Sprühtrocknung auf. Hierbei handelte es sich ebenfalls um Neueinträge bzw. um ein Wiederauftreten von bereits isolierten Klonen, die nach unterschiedlichen Zeiträumen erneut im Produktionsumfeld nachgewiesen wurden. Wie auch bei der Walzentrocknung bietet im Bereich der Sprühtrocknung neben einer 15 m^2 großen Luftöffnung

ein Rolltor eine weitere Eintragungsquelle, da hier ein regelmäßiger Materialaustausch stattfindet, was auch hier zu einer Unterbrechung des Zonenkonzepts mit Erzeugung zusätzlicher Luftturbulenzen führt. Der Nachweis eines gleichen Klons aus beiden Bereichen der beiden Türme am selben Tag (Spur 31 und 32) zeigte die weite Verteilung des Erregers in dem Gebäudekomplex.

Der Nachweis von eng verwandten *E. sakazakii*-Isolaten (Klon 20, 22) aus dem Filterpulver des ersten Sprühturms bestätigte eine Besiedlung des Textilfilters mit *E. sakazakii.* Ursache sind die guten Wachstums- und Nährbedingungen, die ein Textilfilter bieten kann (Wärme, Nahrung: Milchpulver, Feuchtigkeit). Klon 20 konnte 25mal im Zeitraum 14.11.05-21.09.06 isoliert werden, Klon 22 im Zeitram 29.09.06-03.11.06 fünfmal. Enge verwandtschaftliche Beziehungen zwischen den Isolaten aus dem Produktionsumfeld und den Isolaten aus dem Filterpulver sind in Abbildung 4.6 dargestellt (Spur 5 und 24, Spur 22 und 29, Spur 51 und 52). Die Kontamination des Umfelds führt somit zur Besiedelung der Filteranlagen mit *E. sakazakii.* Durch die idealen Milieubedingungen für mikrobielles Wachstum bildet sich in diesen Textilfiltern ein *E. sakazakii*-Reservoir aus.

Die Probenahmestelle der MTA-Proben ist nach der Rückführung des Filterpulvers des ersten Turms lokalisiert. Eine entsprechende Probenahme am selben oder nächsten Tag könnte durch Nachweis einer engen verwandtschaftlichen Beziehung zwischen Isolaten aus MTA- und Filterpulverproben eine Verschleppung des Keims ins Endprodukt durch Filterpulverrückführung aufzeigen, falls auf diesem Wege ein Eintrag ins Milchpulver erfolgt (Abbildung 4.7). Da davon auszugehen war, dass das Filterpulver des ersten Sprühturms bei Auslastung des Turms generell den mikrobiologischen Anforderungen des Werks (Tabelle 3.1) entsprach und daher rückgeführt wurde, zeigten die am selben oder darauffolgenden Tag gewonnen Filter- und MTA-Proben deutlich, dass eine mikrobielle Kontamination des Endprodukts durch belastetes Filterpulver möglich war (Abbildung 4.7, Spur 1, 7, 9, 23, 25 und Spur 2, 10 und Spur 3, 4 und Spur 5, 11).

Da das Filterpulver des zweiten Turms aufgrund starken Schimmelbefalls immer separat abgefüllt wurde, war bei diesem Turm eine Kontamination des Endprodukts über das Filterpulver ausgeschlossen (Abbildung 4.1). Allerdings war auch dieser Textilfilter von *E. sakazakii* besiedelt.

Die zum Vergleich herangezogenen Staubsaugerisolate des zweiten Werks bildeten insgesamt drei Klone, die in keinerlei Beziehung zu den Isolaten des untersuchten Werks standen.

5.3 Qualitäts- und Prozesssicherheit

E. sakazakii konnte in beiden Trocknungsbereichen (Sprüh- und Walzentrocknung) des Milchpulverwerks nachgewiesen werden (Punkt 4.1.1). Die Betrachtung epidemiologischer und prozesssichernder Aspekte musste unter mehreren Gesichtspunkten vorgenommen werden: a) allgemeine Maßnahmen zur Sicherung der mikrobiellen Qualität des Produkts, b) Kontamination während des Herstellungsprozesses und c) Kontamination aus dem Produktionsumfeld.

5.3.1 Allgemeine Maßnahmen zur mikrobiellen Qualitätssicherung

Das im Milchtrocknungswerk eingesetzte Hygienemanagement baut auf einem Grundgerüst allgemeiner Hygienevorschriften auf (Werk ist nach dem International Food Standard (IFS) zertifiziert) und wird durch ein prozessorientiertes HACCP-Konzept vervollständigt (Abschnitt 3.1.1.2). Die kritischen Kontrollpunkte des Herstellungsprozesses sind in den Abbildungen 2.2 und 2.4 rot unterlegt. Bei Nichteinhaltung der vorgegebenen Parameter treten entsprechende Korrekturmaßnahmen in Kraft (Umschaltventile bei der Pasteurisation, Metalldetektor: Ausschluss der Ware für den menschlichen Verzehr). Für die dauerhafte Gewährleistung eines qualitativ hochwertigen Produkts ist eine Identifizierung der Mitarbeiter mit dem Betrieb und eine Sensibilisierung für die Gefahren für das Produkt während des Herstellungsprozesses unumgänglich. Hierfür sorgen regelmäßige Fort- und Weiterbildungsmaßnahmen sowie die strikte Einhaltung und Kontrolle der Hygienemaßnahmen (Reinigung und Desinfektion). Dies gilt vor allem innerhalb der Zone mit den höchsten hygienischen Ansprüchen sowie in den Produktionsbereichen mit Unterbrechungen des Zonenkonzepts, z.B. durch Lufteinlass, Rolltore und Einbringung von Holzpaletten bei der Big Bag-Abfüllung.

Begleitend zum HACCP-Konzept werden Eingangs-, Prozess- und Endproduktkontrollen pro Produktionseinheit zur Erhebung von mikrobiellen und anderen qualitätsprägenden Parametern eingesetzt. Um eine Produktion eines hochwertigen Produktes sicherzustellen, erfolgt nach Anlieferung der Rohmilch ins Werk zuerst eine Eingangskontrolle. Hierbei werden die gesetzlich vorgeschriebenen Kontrollen und eine Prüfung der Milchinhaltsstoffe vorgenommen, (Abbildung 2.2, SPREER 2005). Die MTA-Proben stellen durch fünfmalige Probenahme pro Produktionseinheit und Tag eine zeitnahe Kontrollmöglichkeit der mikrobiellen Beschaffenheit (Enterobakterien im Allgemeinen) des Endprodukts dar. Die starken Anstiege der Enterobakterien-Keimzahlen, erkennbar in den graphischen Darstellungen über die eingesandten MTA-Proben aus den Bereichen der Sprüh- und Walzentrocknung, unterlagen keiner saisonalen Häufung, sondern verwiesen vor allem auf eine Verschlechterung der mikrobiologischen

Qualität im Hinblick auf Enterobakterien im Allgemeinen während Produktionsstillständen sowie Umbaumaßnahmen (Abbildung 4.2). Die damit verbundene Ansammlung von Feuchtigkeit führt zu einer Verbesserung der Wachstumsbedingungen für Enterobakterien und erklärt somit den teilweise steilen Anstieg und Abfall an Einsendungen von VRBD-Platten durch das Werk (Abbildung 4.2, Tabelle 4.6). Weitere Probenahmen des Endprodukts erfolgen durch Autosampler, ebenfalls auf der Höhe der MTA-Probenahmestelle sowie vor der Absackung. Diese Proben werden neben qualitätsspezifischen Untersuchungen auch einer mikrobiologischen Untersuchung auf Salmonellen, Enterobakterien, Enterokokken, Sporenbildner und die Gesamtkeimzahl unterzogen. Die qualitätsprägenden und mikrobiologischen Parameter wurden vom Hersteller und den Kunden fixiert und eingehalten. Durch Rückführung des Filterpulvers des ersten Turms in den Produktstrom hat dieses einen nicht unerheblichen Einfluss auf die Qualität des Endprodukts. Nur bei Einhaltung der mikrobiologischen, vom Hersteller fixierten Parameter aus Tabelle 3.1 erfolgt eine Rückführung zum Endprodukt. Da eine permanente Kontamination des jeweiligen Filters der beiden Türme mit *E. sakazakii* jedoch als gegeben anzunehmen ist, sollte die Pulverrückführung in Frage gestellt werden. Zumindest in der Herstellung von Babynahrung sollte die Rückführung in jedem Fall unterbleiben.

Ein dreistufiges Zonenkonzept gliedert den Produktionsbereich in Teilabschnitte mit unterschiedlichen Hygieneansprüchen (Abschnitt 3.1.1.2). Ziel dieser Unterteilung war es u.a., einen Neueintrag bzw. erneuten Eintrag von Keimen aus der Außenwelt zu erschweren, durch entsprechendes mikrobiologisches Monitoring eine Kontamination zeitnah zu erkennen, die Ursachen zu bekämpfen und eine Verbreitung innerhalb des Werkes zu verhindern (HAMMER et al. 2006, MULLANE et al. 2007). Die Resultate der PFGE zeigten deutlich eine Ansammlung einer klonalen Vielfalt der *E. sakazakii*-Isolate in beiden Bereichen der Milchtrocknung; diese wurden durch Unterbrechungen des Zonenkonzepts zwischen Außenwelt und Produktionsstätte entweder neu oder erneut mit dem gleichen Klon kontaminiert. Im Bereich der Walzentrocknung wird die Zone mit dem höchsten Hygieneanspruch durch ein Rolltor zur Material- und Warenübergabe sowie durch Personalverkehr zur Außenwelt unterbrochen. Ein ähnliches Rolltor befindet sich im Sprühtrocknungsbereich, zusätzlich bildet eine 15 m^2 große Luftöffnung einen Zugang von der Außenwelt zum Produktionsraum. Für die Materialbewegungen über die Rolltore bietet es sich als bewährte Lösung an, Übergabesituationen mit Gabelstaplern, die nur in bestimmten Zonen eingesetzt werden dürfen, einzurichten. Im Bereich der Absackung bildet eine Übergabestelle von Holzpaletten zur Big Bag-Abfüllung einen Einschnitt in die Zone des hochsensiblen Hygienebereichs. Die Einbringung von Holzpaletten lässt sich technisch derzeit

nicht verändern; hier hat sich jedoch das Monitoring-System zur Gefahrenabwehr als geeignet erwiesen.

Um eine sichere Produktion zu gewährleisten, wird die Überwachung des Kontaminationsstatus eines Betriebs mit einem Umfeldmonitoring empfohlen (Abschnitt 2.5.2.1). Da coliforme Erreger lediglich eine Untergruppe der großen Familie der *Enterobacteriaceae* darstellen und somit ähnliche Verbreitungswege aufweisen sollten, werden diese als Indikatorkeime bei der Überwachung eingesetzt. Nach Meinung der EFSA besteht im Gegensatz zu den Problemkeimen (*Salmonella*) ein Zusammenhang zwischen dem Auftreten der Indikatorkeime *Enterobacteriaceae* und *E. sakazakii*. Hierbei handelt es sich jedoch nicht um einen generellen, sondern um einen individuellen Zusammenhang, der für jeden einzelnen Betrieb ermittelt werden muss, um ein *Enterobacteriaceae*-Monitoring erfolgreich gegen *E. sakazakii* einzusetzen (EFSA 2007, MULLANE et al. 2007). Dadurch können bestehende Kontaminationen zurückgedrängt und Hygienemaßnahmen auf ihre Wirksamkeit überprüft werden. In der vorliegenden Arbeit konnte für das Werk insgesamt und für die Walzentrocknung im gesamten Zeitraum sowie für das Jahr 2006 ein Zusammenhang zwischen den gewonnenen Enterobakterien-Keimzahlen der Kategorie II (≥ 1.000 KbE/dm^2) aus dem *Enterobacteriaceae*-Umfeldmonitoring und dem gleichzeitigen Auftreten von *E. sakazakii* mit Hilfe des χ^2-Tests statistisch bestätigt werden (Abschnitt 4.1.2, Tabelle 4.10). Die Aussage von LORENZ (1992), die Resultate der vier Korrekturformeln sollten nicht allzu stark voneinander abweichen, unterlag dagegen der individuellen Einschätzung und Interpretation. Danach ist der χ^2-Test lediglich für die Walze im Jahr 2006 anwendbar, die Ergebnisse lagen zwischen 12,25-13,25; für den gesamten Zeitraum 2005-2007 liegt die Spanne bereits zwischen 15,39 und 44,39. Die Resultate für das gesamte Werk weichen gagegen bereits für das Jahr 2006 deutlich ab (Werk 2006: 11,35-329,35); für den gesamten Zeitraum schwankt die Spanne deutlich zwischen 17,97 und 914,97. Für die anderen Bereiche (Turm 1 und 2, Absackung, Silolagerung) waren für die Durchführung des Tests nicht genügend Daten vorhanden. Dennoch zeigen Tabelle 4.9 und Abbildung 4.3 für das Werk und die Walzentrocknung, für die anderen Arbeitsbereiche der Sprühtrocknung sowie Absackung und Silolagerung eine deutlich erkennbare Tendenz des oben erwähnten Zusammenhangs. Auch wenn die Datenlage keine fundierte Aussage zuließ, bot das *Enterobacteriaceae*-Umfeldmonitoring auf jeden Fall einen ersten leicht zugänglichen Hinweis zur Gesamtsituation des Werkes im Allgemeinen und bei entsprechender Keimzahl im Bereich der Kategorie II auf *E. sakazakii* im Speziellen. Die Aussagen der EFSA in Bezug auf den nicht darstellbaren Zusammenhang zwischen einem durchgeführten *Enterobacteriaceae*-Monitoring und dem Vorkommen von Salmonellen

konnten dahingehend bestätigt werden, dass über einen Zeitraum von zwei Jahren im durchgeführten Enterobakterien-Monitoring des Werks keine *Salmonella* spp. aus den definierten Flächenproben isoliert werden konnten. Ein Zusammenhang zwischen dem durchgeführten *Enterobacteriaceae*-Monitoring und dem Auftreten von *E. sakazakii* konnte dagegen für Werk gezeigt werden. Um ein zeitnahes Auftreten des Keims zu ermitteln und rechtzeitig geeignete Reinigungs- und Desinfektionsmaßnahmen durchführen zu können, ist eine Beibehaltung des Monitorings zu empfehlen.

5.3.2 Kontamination während des Herstellungsprozesses

Die im großtechnischen Maßstab eingesetzte Kurzzeiterhitzung der Milch führt nach Aussagen von BREEUWER et al. (2003), IVERSEN et al. (2004b), MUYTJENS et al. (1988), MUYTJENS u. KOLLEE (1990) und NAZAROWEC-WHITE u. FARBER (1997b) zu einer ausreichenden Abtötung von *E. sakazakii.* Die Autoren gehen im Falle einer Produktkontamination, grundsätzlich von einer Rekontamination nach dem Erhitzungsschritt aus. Mikrobielle Kontaminationen können durch Fehlfunktionen in der ersten Phase der Kühlung der pasteurisierten Milch mit Wärmeaustauschplatten im Gegenstromprinzip mit noch unerhitzter Rohmilch stattfinden (defekte Dichtungen, Druckdifferenzen beim Plattenerhitzer „Plattendurchbrüche“). Eine weitere Möglichkeit der Kontamination im Herstellungsprozess bietet die letzte Stufe des Eindampfers, welche eine Temperatur von nur 45 °C aufweist. Die bakterielle Kontamination findet dabei entweder bei der Reinigung durch kontaminiertes Brüdenwasser oder reziprok durch Rückfluss von kontaminiertem und zwischengelagertem Konzentrat aus Vorlaufbehältern statt. Die anschließende Konzentraterhitzung (ohne definierte Heißhaltezeit), falls überhaupt vorgesehen, reicht zur vollständigen Keimabtötung in der Regel nicht aus. Im Rahmen der dieser Forschungsarbeit konnte in weiterführenden Untersuchungen an Konzentratproben im Jahr 2008 gezeigt werden, dass diese Problematik im untersuchten Werk nicht auftrat. Die Konzentratproben wurden nach Austritt der letzten Stufe des Eindampfers genommen, in 25 untersuchten Proben konnte *E. sakazakii* nicht nachgewiesen werden.

Wie bereits erwähnt, handelt es sich bei der Milchpulverproduktion um einen Prozess mit hoher thermischer Belastung, welcher bei laufender Produktion die Herstellung eines keimfreien oder keimarmen Endprodukts garantieren kann. Bei Stillständen kommt es jedoch zur Bildung von Kondenswasser innerhalb der Produktionsanlagen, was unter geeigneten Wachstumsbedingungen (Milchpulver, Wärme) zu einer starken Keimvermehrung und Produktkontamination führen kann. Um das Risiko einer bakteriellen Kontamination so gering wie möglich zu halten,

ist eine fortlaufende Produktion sicherzustellen bzw. Stillstand zu minimieren und ggf. die Phase des „Trocken- und Heißfahrens“ zu verlängern.

5.3.2.1 Sprühtrocknung

Kontaminiertes Konzentrat könnte zu einer erheblichen mikrobiellen Belastung des Endprodukts führen. Durch die erzeugte Verdunstungskälte reicht die Temperatur der Trocknungsluft (bis 220 °C) nicht aus, um die Erreger in den Konzentrattröpfchen völlig abzutöten (BECKER u. TERPLAN 1986 a,b, LICARI u. POTTER 1970a). Durch Einschluss von Erregern in Pulverablagerungen an den Turmwänden bzw. in Pulveragglomeraten könnte es zu einer Rekontamination des Endprodukts vor allem bei Siebprozessen kommen, wenn diese „Nester“ mechanisch aufgebrochen werden.

Eine solche Kontamination über den Prozessweg konnte durch die Auswertung der eingesandten MTA-Proben des zweiten Sprühturms ausgeschlossen werden. Da das Filterpulver des zweiten Turms grundsätzlich separat abgefüllt wird und somit die MTA-Proben ausschließlich Proben des Produktstroms darstellen, geben die 4.540, über einen Zeitraum von zwei Jahren untersuchten MTA-Proben einen guten Überblick über die Gesamtsituation der Sprühtrocknung im Allgemeinen und über den Trockenturm im Speziellen. Da *E. sakazakii* aus keiner MTA-Probe des zweiten Turms isoliert werden konnte (Tabelle 4.6), ist von einer Kontamination mit *E. sakazakii* nach der eigentlichen Sprühtrocknung auszugehen.

Ein schwerwiegendes Problem sind die Textilfilteranlagen. Diese mit Nährstoffen (Milchpulver) und Feuchtigkeit belasteten Einrichtungen bieten dem Keim ein ideales Mikroklima. Diese Bedingungen reichen aus, um das Überleben sowie die Vermehrung von *E. sakazakii* über längere Zeiträume (01.06.06-13.7.07) zu garantieren (Abbildung 4.7, Klon 20). Wie bereits oben erwähnt, ist das Milchpulver (Endprodukt) des zweiten Turms *E. sakazakii*-frei. Dies ist auf eine separate Abfüllung des kontaminierten Filterpulvers ohne Rückführung in den Produktstrom zurückzuführen. Daneben konnte eine im Vergleich mit dem ersten Turm bessere mikrobiologische Qualität des Endprodukts im Hinblick auf Enterobakterien im Allgemeinen beobachtet werden. Dies wurde darin deutlich, dass über den gesamten Untersuchungszeitraum nur 58 MTA-Platten von Turm 2 (ohne Filterpulverrückführung), von Turm 1 (mit Filterpulverrückführung) aber 181 eingesandt wurden. Im untersuchten Werk kam es nach Aussagen des Herstellers bei Turm 1 öfter zu einem Stillstand, was zu einer Feuchtigkeitsansammlung in den Produktionsanlagen führte und in Verbindung mit Milchpulverresten eine Keimvermehrung nach sich zog, was sich wiederherum in einer höheren Anzahl von MTA-Einsendungen niederschlug. Wenn das Filterpulver von Turm 1 die internen, vom Hersteller

fixierten Parameter erfüllt (Tabelle 3.1), werden aus ökonomischen Gründen 25 kg/h in den Produktstrom rückgeführt. Diese Rückführung hat einen erheblichen Einfluss auf die Qualität des Endprodukts (Tabelle 4.7, Abbildung 4.7). Wenn man davon ausgeht, dass an den entsprechenden Tagen (Tabelle 4.7) Filterpulver rückgeführt wurde, deutet die positiven *E. sakazakii*-Befunde aus den MTA-Proben deutlich auf ihre Herkunft hin. Zusätzlich bot die Feintypisierung die Möglichkeit, die am selben oder in den nächsten Tagen nachgewiesenen Isolate zu vergleichen und bei den aus Endprodukt oder Filterpulver stammenden Isolaten verwandtschaftliche Beziehungen nachzuweisen. Aus dem Filterpulver des ersten Turms vom 26.06.2006 konnte *E. sakazakii* isoliert werden (Klon 20, Abbildung 4.7). Der gleiche Klon konnte mittels MTA-Proben noch am selben Tag zweimal aus dem Endprodukt isoliert werden. Dieser Vorgang wiederholte sich am 06.07. und am 13.07. 2006. Die Filterpulverrückführung bei Turm 1 führt also eindeutig zur Kontamination des Endprodukts. Die jährliche Erneuerung der Textilschläuche reicht bei weitem nicht aus, um die Kontamination über das Filterpulver zu minimieren oder auszuschließen. Da die Ergebnisse deutlich den entscheidenden Einfluss der kontaminierten Textilfilter auf die mikrobielle Qualität des Endprodukts unterstrichen und ein Austausch der Textilfilter zu keinem befriedigenden Ergebnis in Bezug auf die mikrobielle Qualität des Milchpulvers führte bzw. führen kann, sollte entweder auf die Rückführung des Filterpulvers verzichtet werden oder durch CIP-fähige Filter ersetzt werden. Bei der Produktion von Milchpulver zur Herstellung von Säuglingsnahrung ist in der derzeitigen Situation ein Verzicht auf die Filterpulverrückführung unumgänglich, um eine Kontamination des Endprodukts mit *E. sakazakii* ausschließen zu können.

5.3.2.2 Walzentrocknung

Die Oberflächentemperatur von circa 150 °C und die unvollständige Aufbringung des Trocknungsgutes auf die Trocknungswalze (Rand der Trocknungswalze nicht benetzt) führt zu einer vollständigen Abtötung von Enterobakterien. Eine besondere Anreicherungs- und Kontaminationsquelle bildet der offene Nassguttrog (Konzentratsumpf), der über Standleitungen aus dem Konzentratvorlaufbehälter gespeist wird. Die entsprechende Wanne wird während der Produktion niemals vollständig geleert, so dass bei Standzeiten bis zu zwei Tagen, Temperaturen von 45-50 °C und fehlender Umwälzung am Boden und in den Winkeln der Wanne ideale Bedingungen für eine Keimvermehrung vorliegen. Im Rahmen des fortwährenden Forschungsprojektes konnte im Jahr 2008 gezeigt werden, dass 28 von 62, im Wochenabstand genommene Proben mit *E. sakazakii* kontaminiert waren. Bei den entsprechenden Pulverproben konnte der Erreger in 7 von 58 Fällen nachgewiesen werden. Dies lässt sich dadurch erklären, dass beim

Auftragen des Konzentrates Spritzer ungünstigerweise auch auf die trockene Seite der Walzenanlage gelangen und dort zu einer Rekontamination des Pulvers führen können.

Die Kontamination des Konzentratsumpfs erfolgt vermutlich dadurch, dass z.B. Neueinträge aus der Außenwelt über das Rolltor eindringen können oder bereits vorhandene Keime in Aerosolen mobilisiert. Die Aerosole wiederum entstehen, weil wegen der ständigen Konzentratspritzerbildung häufig bei laufender Produktion der Fußboden mit einem Wasserschlauch gereinigt wird. Da die Kontamination von Konzentratsumpf und Pulver bei allen vier baugleichen Walzenanlagen auftritt, erscheint der angenommene Kontaminationsweg sehr wahrscheinlich.

Um die Kontamination des Pulvers über diesen Prozessweg zu verringern, sollte vermehrt darauf geachtet werden, dass der Nassguttrog nach der Produktion vollständig entleert und gereinigt wird, damit die Desinfektionsmaßnahmen in vollem Umfang greifen können. Darüber hinaus ist der Keimdruck aus dem Umfeld zu vermindern. Letzteres dürfte schwierig sein, da die Konzentratspritzer Rutschgefahr auslösen und so auch eine Gefahr für die Arbeitssicherheit darstellen, weshalb sie regelmäßig entfernt werden müssen. Die sinnvollste Maßnahme dürfte darin liegen, die Walzenanlagen derart umzubauen – z.B. mit Prallblechen –, dass die Spritzerbildung weitgehend vermieden werden kann. Dies würde den Reinigungsbedarf und damit auch das Auftreten von Aerosolen reduzieren. Die Übertragung von kontaminierten Spritzern von der nassen auf die trockene Seite der Walzenanlagen wird nicht zu verhindern sein, da die Walzen schon sehr alt sind (Baujahr 1950) und nicht mehr entsprechend umgerüstet werden können. Wenn es durch die erstgenannten Maßnahmen allerdings gelingt, eine Kontamination des Nassguttroges zu vermeiden, ist letzteres Problem nur noch sekundär. Betrachtet man die Kontamination von Umfeld und Konzentratsumpf als Kreislaufgeschehen, ist es besonders wichtig, die oben angedachten Maßnahmen zu treffen, um die Kontamination möglichst an mehreren Stellen zu unterbrechen bzw. zu schwächen (siehe Abbildung 5.1).

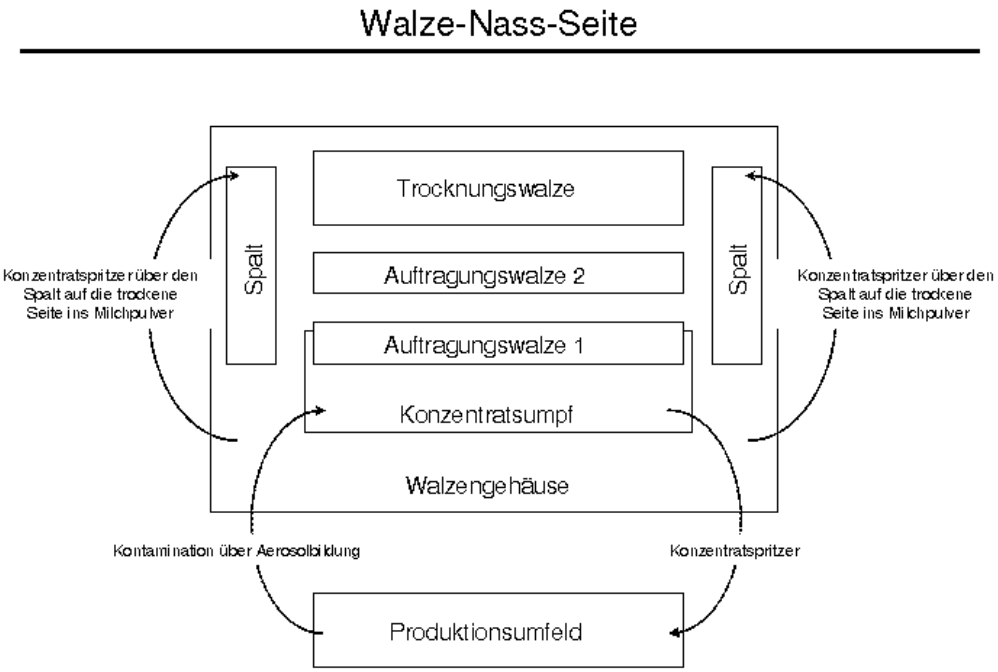


Abbildung 5.1 Kontaminationskreislauf im Bereich der Walzentrocknung

5.3.3 Kontamination aus dem Produktionsumfeld

Die Milchpulverproduktion mittels Sprühtrocknung stellt ein geschlossenes System dar und ist durch mehrere Prozessabschnitte mit hoher thermischer Belastung gekennzeichnet (Pasteurisation, Eindampfer, Trocknung). Somit ist eine Kontamination über den Prozessweg nahezu auszuschließen. Dagegen bietet das Herstellungsumfeld zahlreiche Eintragungsmöglichkeiten von Mikroorganismen in die Produktionsanlagen und schließlich ins Endprodukt (Punkt 2.4.3). Dies konnte für die Sprühtrocknung in vollem Umfang bestätigt werden (siehe Punkt 5.3.2). Für die Walzentrocknung als offenes System ist die Problematik des Nassguttrogs und der Kontaminationen aus dem Umfeld bereits im vorherigen Abschnitt dargelegt worden.

Sprühtrocknung

Da neben den kontaminierten Textilfilteranlagen vermutlich vor allem der Neueintrag aus der Außenluft ins Produktionsumfeld beider Trocknungsbereiche eine erhebliche Rolle spielt, sei an dieser u.a. Stelle nochmals auf den Einfluss der Prozessluft vor allem bei der Sprühtrocknung eingegangen.

Die Ansaugung der gesamten Prozessluft erfolgt in der Regel über bakteriendichte Filter in Luftkammern außerhalb des Produktionsbereichs. Wie bereits unter Punkt 3.1.1.1 beschrieben, wird

die Prozessluft im untersuchten Werk im Bereich der Sprühtrocknung jedoch innerhalb des Produktionsbereichs aus der Raumluft angesogen. Die Belüftung des Sprühtrocknungsbereichs erfolgt über eine große Luftöffnung (15 m^2). Diese Luftöffnung ist lediglich durch Lamellen sowie ein „Fliegengitter“ mit 1 cm^2 Maschenweite geschützt, sodass im Bereich der Luftapertur im Gebäude erhebliche Mengen an Insekten, Staub und Blättern aufzufinden waren. Zusätzlich ist bekannt, dass Außenluft je nach Lokalisation des Betriebs, Windrichtung, Luftfeuchte, -temperatur und Jahreszeit einen Keimgehalt von 300-2.500 KbE/m^3 aufweisen kann (SCHAPER 2004). Die Luft im Turmgebäude ist durch die Ansaugung, durch die zur Temperaturregelung aufgestellten Ventilatoren sowie durch die Temperaturgradienten erheblichen Strömungen und Turbulenzen unterworfen, was zu einer Verbreitung von Milchpulverresten und *E. sakazkii* sowie Enterobakterien im gesamten Produktionsbereich führt (HAMMER et al. 2006). Die umgewälzte Luftmenge liegt hier bei > 100.000 m^3/h. In diesem Zusammenhang führt der starke Eintrag von Mikroorganismen aus der Außenwelt mit der Verteilung von Luftfeuchtigkeit und kontaminiertem bzw. nicht-kontaminiertem Milchpulver durch die erzeugten Luftturbulenzen innerhalb der gesamten Produktionsstätte zu einer mikrobiellen Belastung der Produktionsanlagen (z.B. Textilfilter) mit anschließender Kontamination des Endprodukts. Um eine Verbesserung der Betriebshygiene zu erreichen und die Kontamination des Produktionsumfelds und damit des Endprodukts mit *E. sakazakii* zu reduzieren, sollte die Luftöffnung versiegelt werden und die Ansaugung der Prozessluft aus Luftkammern außerhalb des Gebäudes mit bakteriendichten Filtern erfolgen. Die Problematik der großen Luftapertur kann nicht ohne Umbaumaßnahmen mit erheblichem Investitionsbedarf gelöst werden. Entsprechendes ist für das Jahr 2009 geplant.

An schwer erreichbaren Stellen (Kabelschächte, Regenrinne, Isolierschicht Turm) können sich die eingetragenen Mikroorganismen einnisten, sich unter idealen Wachstumsbedingungen (Wärme, Milchpulverreste, Luftfeuchtigkeit) vermehren, sich durch die erzeugten Luftströmungen im umliegenden Produktionsumfeld verteilen und zu Kontaminationen führen. Aus drei Proben aus dem direkten Umfeld des Textilfilters des ersten Sprühturms konnte *E. sakazakii* dreimal isoliert werden. Unter den Probenahmestellen befand sich die Dichtung der Textilfilteranlage.

Daneben bildete ein zusätzliches Rolltor für den Materialaustausch einen Durchbruch im Zonenkonzept, wobei Bewegungen von Gabelstaplern und Personal einen permanenten Wiedereintrag von Keimen ermöglichen. Eine mögliche Abhilfe für dieses Problem wurde bereits unter Punkt 5.3.1 dargestellt.

Ungünstigerweise ist im Bereich der Sprühtrocknung eine strikte Nass-Trockentrennung nicht gegeben. Im Erdgeschoss des Trocknungsbereichs befindet sich die Konzentratherstellung, die permanent nass ist und als Bereich mit mittleren Hygieneanforderungen gilt. Über eine Station zum Anziehen von Überschuhen und zur Händedesinfektion am Fuß der Treppe zum Obergeschoss erfolgt der Zugang zum eigentlichen Hygienebereich (Trocknungstürme). Die Feuchtigkeit im Bereich der Eindampfung könnte in Verbindung mit dem in den Luftströmungen enthaltenen Milchpulver und den hohen Umgebungstemperaturen eine Vermehrung und Verbreitung von *E. sakazakii* erlauben (Tabelle 4.4), da eine räumliche Trennung durch geschlossene Decken und Wände nicht gegeben ist (Stahlgitterkonstruktionen). Um dieses Risiko zu minimieren, sollten Nass- und Trocknungsbereich streng getrennt werden. Auch diese Investition soll 2009 getätigt werden. Zusätzlich bildeten die innerhalb des Gebäudes verlaufenden Fallrohre für Regenwasser eine ideale Möglichkeit zur Kondenswasserbildung mit den entsprechenden, bereits oben erklärten Folgen.

Die Big Bag-Abfüllung erfolgt im hochsensiblen Hygienebereich der Produktion. Durch Einbringung von Holzpaletten für den Abtransport der Säcke gelangt jedoch Material der Außenwelt in die Produktionsstätte und bildet eine Möglichkeit zur reziproken Verschleppung von *E. sakazakii.* Die in Tabelle 4.4 aufgeführte Probenahmestelle „Silo 4-7“ liegt genau in diesem Bereich. Hier wurden aus 117 Proben sieben Isolate gewonnen. Obwohl dies ein reiner Trockenbereich ist, wurden zweimal Enterobakterien-Keimzahlen von $4x10^4$ KbE/25 dm^2 und einmal sogar $8,3x10^5$ KbE/25 dm^2 ermittelt. Demnach konnten über Paletten also erhebliche Keimmengen eingetragen werden. Deshalb ist an dieser Stelle ein intensives Monitoring mit konsequenten Hygienemaßnahmen bei entsprechendem Befund notwendig. Ein an dieser Stelle zeitgleich durchgeführtes Salmonellen-Monitoring unterstrich durch positive Salmonellen-Befunde die Signifikanz eines intensiven Monitorings. Im Zeitraum von sechs Jahren wurde hier der Eintrag von sechs verschiedenen Serovaren festgestellt.

5.4 Schlussbetrachtung

Unter Berücksichtigung der erarbeiteten Ergebnisse und der oben genannten Risikofaktoren wurden für das untersuchte Milchtrocknungswerk folgende allgemeine Empfehlungen ausgesprochen und für den Bereich der Sprüh- und Walzentrocknung Maßnahmen zur Reduktion von *E. sakazakii* vorgeschlagen.

5.4.1 Allgemeine Maßnahmen

- Sensibilisierung der Mitarbeiter für die vom kontaminierten Produkt ausgehende Gefahr für Früh- und Neugeborene und die Kontaminationsquellen während des Herstellungsprozesses im Bereich der Sprühtrocknung (Textilfilter) und Walzentrocknung (Fußbodenreinigung)
- Einhaltung des werks- und produktspezifischen Qualitätssicherungskonzepts (HACCP, Reinigung + Desinfektion, regelmäßige Fort- und Weiterbildungsmaßnahmen)
- Einrichtung von für den Bereich definierten Gabelstaplern zur Materialbewegung an den Rolltoren
- Aufrechterhaltung und Beibehaltung des *Enterobacteriaceae*-Monitorings
- Sicherstellung einer fortlaufenden Produktion, Minimierung von Stillständen Verlängerung der Phase des „Trocken- und Heißfahrens“

5.4.2 Maßnahmen im Bereich der Sprühtrocknung

- Versiegelung der 15 m^2 großen Luftöffnung und Ansaugung der Prozessluft aus Luftkammern außerhalb des Gebäudes mit bakteriendichten Filtern (die Umsetzung soll im Jahr 2009 erfolgen)
- Verzicht auf Filterpulverrückführung bei der Herstellung von Milchpulver für Säuglingsnahrung, Textilfilter durch CIP-fähige Filter ersetzen
- Einhaltung bzw. Aufbau einer strikten Nass-Trocken-Trennung bei der Konzentratherstellung (auch diese Investition soll 2009 getätigt)

5.4.3 Maßnahmen im Bereich der Walzentrocknung

- Minimierung bzw. Vermeidung der Spritzerbildung beim Auftragen des Konzentrats auf die Trocknungswalzen durch Anbringung von entsprechenden Schutzblechen
- Sicherstellung einer vollständigen Entleerung des Konzentratsumpfs vor der Reinigung und Desinfektion der Anlagen

6 ZUSAMMENFASSUNG

Cécile Jacobs

Vorkommen und Bedeutung von *Enterobacter (E.) sakazakii* in einem Milchtrocknungsbetrieb - Betriebsepidemiologie und Prozesssicherheit.

Institut für Lebensmittelhygiene der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig und Institut für Sicherheit und Qualität bei Milch und Fisch des Max Rubner Instituts, Bundesforschungsinstitut für Ernährung und Lebensmittel am Standort Kiel

Eingereicht im Mai 2009

96 Seiten, 17 Abbildungen, 58 Tabellen, 232 Literaturquellen, 10 Internetquellen, 3 Anhänge

Schlüsselwörter: Betriebsepidemiologie, *Enterobacter sakazakii*, Milchpulver, Prozesssicherheit, Pulsfeld-Gelelektrophorese (PFGE), Säuglingsnahrung, Sprühtrocknung, Walzentrocknung

Die weltweite Nachfrage nach Milchpulver, gekoppelt mit einer erheblichen Preissteigerung im Jahr 2007 zeigt nicht nur den wachsenden Bedarf an einem vielseitig einsetzbaren Produkt, sondern auch die Bedeutung einer sicheren Herstellung von qualitativ hochwertigem Milchpulver.

Auf Milchpulver basierende Säuglingsnahrung konnte als Infektionsquelle bei mehreren Erkrankungsfälle durch *Enterobacter (E.) sakazakii* nachgewiesen werden. Zusätzlich zeigten weltweit durchgeführte Stichproben, dass 4,2-14 % des Milchpulvers mit *E. sakazakii* in geringen Mengen kontaminiert waren. Die Früh- und Neugeborenen leiden bei einer Infektion unter Sepsis, nekrotisierender Enterocolitis und Meningitis. Der selten beobachtete Krankheitsverlauf ist gekennzeichnet durch eine geringe Infektionsdosis und hohe Mortalität.

Aus diesen Gründen wurden in der vorliegenden Arbeit 15.173 Proben (2.308 MRI + 13.681 Werk) aus dem gesamten Trocknungsbereich eines Milchtrocknungswerks auf das Vorkommen und die Verbreitung von *E. sakazakii* untersucht. Hierzu wurden aus 14.636 Produkt- (955 MRI, 13.681 Werk) und 1.349 Umfeldproben 422 *E. sakazakii*-Isolate gewonnen, phänotypisch und molekularbiologisch identifiziert und mittels PFGE typisiert. Mit Hilfe der so gewonnenen Daten konnten Aussagen zur Betriebsepidemiologie getroffen und Maßnahmen zur Verbesserung der Betriebshygiene abgeleitet werden.

Aus 2,8 % der untersuchten Proben aus dem Milchtrocknungswerk konnte *E. sakazakii* isoliert werden; die Kontamination erstreckte sich auf den gesamten Trocknungsbereich, dessen Produktionsanlagen und das Milchpulver. In beiden Trocknungsbereichen erfolgte die

Kontamination über das Herstellungsumfeld. Der Eintrag ins Umfeld aus der Außenwelt geschah über Material-, Personal- und Luftbewegungen. Dies wurde im jeweiligen Produktionsabschnitt durch ein Rolltor ermöglicht; zusätzlich trug die Belüftungsanlage der Sprühtrocknung, eine 15 m^2 große Luftapertur im Gebäude, erheblich zur Besiedelung, Verbreitung und Verteilung von *E. sakazakii* im Gebäude bei. Im Sprühtrocknungsbereich setzte sich *E. sakazakii* in den Textilschläuchen der Filteranlage der beiden Trocknungstürme fest. Es konnte hierbei gezeigt werden, dass die Rückführung des gewonnenen Filterpulvers erheblich zur Kontamination des Endprodukts beitrug. Im Bereich der Walzentrocknung hatte sich dagegen ein Kontaminationskreislauf durch Konzentratspritzer gebildet. Durch das Auftragen des zähflüssigen Konzentrats aus einem offenen sogenannten Konzentratsumpf auf die Auftragungswalzen kommt es zu einer erheblichen Spritzerbildung. Diese führt zum einen zu einer Kontamination des Endprodukts und zum zweiten zu einer Beschmutzung des Produktionsumfelds. Die Verschmutzung des Bodens macht aus Sicherheitsgründen eine gründliche Reinigung mit Wasser erforderlich, die zu einer Aerosolbildung und auf diesem Weg wieder zu einer Kontamination des Konzentratsumpfes führen kann.

Neben allgemeinen Maßnahmen (wie Einschränkung und Optimierung der Personal- und Materialbewegungen, Reduktion von Produktionsstillständen, Verlängerungen von „Trocken- und Heißfahrzeiten“ sowie Optimierung der Reinigungs- und Desinfektionsmaßnahmen durch Beibehaltung des *Enterobacteriaceae*-Monitorings) würden werksspezifische Umbaumaßnahmen in beiden Bereichen die hygienische Qualität des Milchpulvers verbessern. Im Bereich der Sprühtrocknung sollte vor allem die Luftöffnung versiegelt und durch Luftkammern zur Ansaugung der Prozessluft durch bakteriendichte Filter im Außenbereich ersetzt werden. Zusätzlich sind für die Filterpulverrückführung CIP-fähige Filteranlagen vorzusehen. Ohne diese ist bei der Herstellung von Milchpulver für Säuglingsnahrung auf eine Filterpulverrückführung zu verzichten. Die Etablierung einer vollständigen Nass-Trockentrennung im Bereich der Konzentratherstellung am Fuß des Trockenbereichs würde die Gefahr einer Vermehrung unerwünschter Keime in diesem Abschnitt erheblich minimieren.

Im Sektor der Walzentrocknung muss zur Verbesserung der gegebenen Situation der Kontaminationskreislauf durchbrochen bzw. geschwächt werden. Da die Spritzerbildung technologisch nicht vollständig beseitigt werden kann, ist die Beschmutzung des Umfelds durch Konzentrat mit Hilfe von Schutzblechen zu verhindern. Dies würde zu einer geringeren Reinigungsfrequenz und Aerosolbildung und damit zu einer deutlichen Reduktion der Kontamination des Konzentratsumpfes und somit des Endprodukts führen.

7 SUMMARY

Cécile Jacobs

Occurrence and relevance of *Enterobacter sakazakii* in a milk powder plant - epidemiology in the specific milk powder plant and process reliability.

Institute of Food Hygiene, Faculty of Veterinary Medicine, University of Leipzig and Department of Safety and Quality of Milk and Fish Products, Max Rubner Institut (MRI), Federal Research Institute of Nutrition and Food, location Kiel, Germany

Submitted in May 2009

96 pages, 17 figures, 58 tables, 232 references, 10, internet sources, 3 appendices

Keywords: epidemiology, *Enterobacter sakazakii,* milk powder, process safety, pulsed field gel electrophoresis (PFGE), powdered infant formula, spray drying, roller drying

The worldwide, strong demand for milk powders, combined with a substantial price increase in the year 2007, not only shows the increasing demand for a versatile applicable product but also the importance of the safe manufacture of a high quality milk powder.

Cases of illness caused by *Enterobacter* (*E.*) *sakazakii* could be traced back to contaminated infant formula based on milk powder. Studies conducted worldwide documented the presence of low levels of *E. sakazakii* in 4.2-14 % of the milk powder production. On infection with *E. sakazakii* neonates suffer from meningitis, sepsis or necrotizing enterocolitis. The progress of the rarely observed illness is characterized by a small infectious dose and a high mortality rate.

Therefore we analyzed 15.173 samples (2.308 MRI + 13.681 plant) from the spray and roller drying areas of a milk powder plant with regard to the incidence and distribution of *E. sakazakii*. 14.636 Product (955 MRI + 13.682 plant) and 1.349 environmental samples were screened to obtain *E. sakazakii* isolates. The identified isolates were subjected to phenotypical and molecular biological analysis and subtyped with PFGE. The data allowed us to make statements on the epidemiology and to derive measures as well as proposals for improving the hygienic situation of the milk powder plant.

E. sakazakii could be isolated from 2.8 % out of 15.173 examined samples taken from the milk powder plant. In both production areas (spray and roller drying), manufacturing facilities and the final products were contaminated. The main source of the contamination of the manufacturing facilities and of the final product was the manufacturing environment. In both areas the contamination originated from the environment outside the factory and was imported via

material, personnel and air movements. A rolling shutter gate in both areas, and, in addition, the ventilating system for the spray drying facilities, namely a 15 m^2 air opening in the building, contributed substantially to the colonization, spread and distribution of *E. sakazakii* within the building. In the spray drying area, *E. sakazakii* colonized in the textile hoses of the filters in the two drying towers. The refeeding of the produced filter powder contributed considerably to the contamination of the final product.

In the roller drying area, a contamination cycle was caused by splashes of the concentrate. Splashes occur while feeding the viscous concentrate from an open container onto the application rollers. This leads firstly to a contamination of the final product and, secondly, to a pollution of the manufacturing environment. The latter requires a frequent and thorough cleaning of the floor with water for safety reasons, which causes aerosol formation and subsequently contamination of the concentrate container.

Beside general measures (such as limitation and optimization of material and personnel movements, reduction of production stops, extension of times for predrying and preheating of the drying facilities, regular participation of personnel in measures for further education as well as optimization of cleaning and disinfection measures by continuous *Enterobacteriaceae* monitoring) special reconstruction measures in both areas could improve the hygienic quality of the milk powder. In the spray drying area, above all, the air opening should be sealed and replaced by air chambers for aspiration of the processing air, supplied with germtight filters outside of the building. Additionally, CIP-compatible filtering units should be installed for the refeeding of the filter powder. Without these filters, recirculation of filter powder during the manufacture of milk powder used for infant formula should be strictly avoided. A complete wet-dry separation in the production area of the milk concentrate at the basis of the drying area would minimize the risk of a dramatic multiplication of undesirable bacteria.

In the roller drying area the contamination circuit should be disrupted or at least weakened. Since, from a technical point of view, the splash formation cannot be eliminated completely, the pollution of the floor should be prevented by installing protective plates. This would reduce cleaning intervals as well as the formation of aerosols and thus the contamination of the concentrate container or/and the final product.

8 LITERATURVERZEICHNIS

(1) Adamson DM, Rogers JR. *Enterobacter sakazakii* meningitis with sepsis. Clinical Microbiology Newsletter 1981;3(3):19-20.

(2) Adegbola RA, Old DC. Fimbrial haemagglutinins in *Enterobacter* species. Journal of General Microbiology 1983;129:2175-80.

(3) AFNOR. Report of the 1st meeting of the Ad'hoc group "*Enterobacter sakazakii*". 23 Feb 2006. Report No.: ISO/TC 34/SC 9 N722. AFNOR, 11, avenue Francis de préssensé, F-93571 Saint-Denis la Plaine Cedex, France. AFNOR;2006.

(4) Agostoni C, Axelsson I, Goulet O, Koletzko B, Michaelsen KF, Puntis JWL, et al. Preparartion and handling of powdered infant formula: a commentary by the ESPGHAN Committee on nutrition. Journal of Pediatric Gasteroenterology and Nutrition 2004;39:320-2.

(5) Aldova E, Hausner O, Postupa R. Tween-esterase activity in *Enterobacter sakazakii*. Zentralblatt für Bakteriologie, Mikrobiologie und Hygiene [A] 1983;256(1):103-8.

(6) Anon. Recommended international code of hygienic practice for foods for infants and children. Report No.: CAC/RCP 21-1979. Codex Alimentarius Commission (CAC);1979.

(7) Anon. Food Safety Inspection Service. Recommendations of the National Advisory Committee on Microbiological Criteria for Foods for refrigerated foods containing cooked, uncured meat or poultry products that are packaged for extended refrigerated shelf life and that are ready-to-eat or prepared with little or no additional heat treatment. USDA, Washington DC, USA;1990.

(8) Anon. Food hygiene basic texts. Food and Agriculture Organization (FAO) of the United Nations (UN) and World Health Organization (WHO). FAO/WHO Standards Programme. FAO Headquarters, Viale delle Terme di Caracalla, I-00100 Rome, Italy. Report No.: CAC/RCP 1-1969, Rev.3 (1997). FAO/WHO;1997a.

(9) Anon. Principles for the establishment and application of microbiological criteria for foods. Report No.: CAC/GL 21-1997. CAC;1997b.

(10) Anon. Risk profile of *Enterobacter sakazakii* and other micoorganisms in powdered infant formula. 36th session Codex Committee on Food Hygiene, Washington DC, USA. Report No.: FAO/WHO/CAC CX/FH 04/12.FAO/WHO/CAC;2004a.

(11) Anon. Code of hygienic practice for milk and milk products. Report No.: CAC/RCP 57-2004.CAC;2004b.

(12) Anon. Milk and milk products - detection of *Enterobacter sakazakii*. Report No.: ISO/DTS 22964 | IDF/DRM 210. International Dairy Federation;2004c.

(13) Anon. *Enterobacter sakazakii* and *Salmonella* in powdered infant formula. FAO Headquarters, Viale delle Terme di Caracalla, I-00100 Rome, Italy. FAO/WHO;2006.

(14) Anon. *Enterobacter sakazakii* and other microorganisms in powdered infant fomula. 23 Feb 2007. Report No.: MRA series 6. ISBN: 924 156 2662. Microbiological Risk Assessment Series (MRA);2007a. http://who.int/foodsafety/publications/micro/mra6/en/.

(15) Anon. ESBL und AmpC: ß-Laktamasen als eine Hauptursache der Cephalosporin-Resistenz bei Enterobakterien. Epidemiologisches Bulletin 2007b;28:147-253.

(16) Anon. ZMP Zentrale Markt- und Preisberichtstelle für Erzeugnisse der Land-, Forst- und Ernährungswirtschaft GmbH, Jahresrückblick, Milch 2007c;48:VI.

(17) Anon. Eiweißstandardisierung bei Milchpulver erlaubt. Deutsche Molkerei-Zeitung 2008a;3:24-5.

(18) Anon. *Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter* spp.) in powdered follow-up formulae. 8 Oct 2008. FAO/WHO Meeting report, Department of Food Safety, Zoonoses and Foodborne Diseases World Health Organization, 20, avenue Appia, CH-1211 Geneva 27, Switzerland. Microbiological Risk Assessment Series;2008b.

(19) Anon. The world dairy situation 2008. Bulletin of the International Dairy Federation 2008c;432.

(20) Arseni A, Malamou-Ladas E, Kostalos C, Staikou A, Koutsia H. A fatal case of sepsis in a premature newborn baby associated with *Enterobacter sakazakii* bacteremia. Acta Microbiologica Hellenica 1984;29:402-7.

(21) Arseni A, Malamou-Ladas E, Koutsia C, Xanthou M, Trikka E. Outbreak of colonization of neonates with *Enterobacter sakazakii*. Journal of Hospital Infection 1987;9(2):143-50.

(22) Asakura H, Morita-Ishihara T, Yamamoto S, Igimi S. Genetic characterization of thermal tolerance in *Enterobacter sakazakii*. Microbiology and Immunology 2007;51(7):671-7.

(23) Bake K, Beeck U, Dyck B, Eyers A, Feuerriegel B, Gieske P, et al. Handbuch der Milch- und Molkereitechnik. 3. Auflage Gelsenkirchen: Verlag Th. Mann;2003.

(24) Bar-Oz B, Preminger A, Peleg O, Block C, Arad I. *Enterobacter sakazakii* infection in the newborn. Acta Paediatrica 2001;90(4):356-8.

(25) Barth CA, Becker H, Belitz G, Brandl M, Burchardi H, Coldewey I, et al. Handbuch Milch. Loseblattausgabe, 8. Aktualisierungs-Lieferung, Hamburg: B. Behr's Verlag;1992.

(26) Becker H, Terplan G. Salmonellen in Milch und Milchprodukten. Journal of Veterinary Medicine B 1986a;33:1-25.

(27) Becker H, Terplan G. Salmonellen in Milchtrockenprodukten. Deutsche Molkerei-Zeitung 1986b;42:1398-403.

(28) Bergey DH, Harrison FC, Breed RS, Hammer BW, Huntoon FM. Bergey's manual of determinative bacteriology. 1st ed. Baltimore: Williams and Wilkins;1923.

(29) Biering G, Karlsson S, Clark NC, Jonsdottir KE, Ludvigsson P, Steingrimsson O. Three cases of neonatal meningitis caused by *Enterobacter sakazakii* in powdered milk. Journal of Clinical Microbiology 1989;27(9):2054-6.

(30) Bingen EH, Denamur E, Elion J. Use of ribotyping in epidemiological surveillance of nosocomial outbreaks. Clinical Microbiology Reviews 1994;7(3):311-27.

(31) Blanc DS, Siegrist HH, Sahli R, Francioli P. Ribotyping of *Pseudomonas aeruginosa*: discriminatory power and usefulness as a tool for epidemiological studies. Journal of Clinical Microbiology 1993;31(1):71-7.

(32) Block C, Peleg O, Minster N, Bar-Oz B, Simhon A, Arad I, et al. Cluster of neonatal infections in Jerusalem due to biochemical variant of *Enterobacter sakazakii*. European Journal of Clinical Microbiology & Infectious diseases 2002;21:613-6.

(33) Bone RC. Gram-negative sepsis: a dilemma of modern medicine. Clinical Microbiology Reviews 1993;6(1):57-68.

(34) Breeuwer P, Lardeau A, Peterz M, Joosten HM. Desiccation and heat tolerance of *Enterobacter sakazakii*. Journal of Applied Microbiology 2003;95(5):967-73.

(35) Brenner DJ. The genus *Enterobacter*. In: Starr MP, Stolp H, Trüper HG, Balows A, Schlegel HG, editors. The Procaryotes. Berlin, Heidelberg, New York: Springer Verlag;1981:1173-80.

(36) Brenner DJ, Richard C. Facultatively anaerobic gram-negative rods, Family I *Enterobacteriaceae,* Genus VI *Enterobacter*. In: Krieg NR, Holt JG, editors. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Baltimore, MD 21202, USA: Williams & Wilkins;1984:465-9.

(37) Burdette JH, Santos C. *Enterobacter sakazakii* brain abscess in the neonate: the importance of neuroradiologic imaging. Pediatric Radiology 2000;30(1):33-4.

(38) Caric M. Dairy science and technology handbook. In: Hui YH, editor. Dairy Science and Technology Handbook. New York: VCH Publishers.; 1993:257-300.

(39) Castellani A, Chalmers AJ. Sur la classification de certains groupes de bacilles aérobies de l'intestin humain. Annales de l'Institut Pasteur 1920;36:600-21.

(40) Clark NC, Hill BC, O'Hara CM, Steingrimsson O, Cooksey RC. Epidemiologic Typing of *Enterobacter sakazakii* in two neonatal nosocomial outbreaks. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease 1990;13(6):467-72.

(41) Coignard B, Vaillant V, Vincent J-P, Leflèche A, Mariani-Kurkdjian P, Bernet C, et al. Infections sévères à *Enterobacter sakazakii* chez des nouveau-nés ayant consommé une préparation en poudre pour nourrissons, France, octobre-décembre 2004. Bulletin épidémiologique hebdomadaire 2006;2-3:10-3.

(42) Cordier J-L. *Enterobacter sakazakii*.
Mitteilungen aus Lebensmitteluntersuchung und Hygiene 2006;97:22-29.

(43) Costerton JW, Cheng K-J, Geesey GG, Ladd TI, Nickel JC, Dasgupta M, et al.
Bacterialbiofilms in nature and disease.
Annual Review of Microbiology 1987;41:435-64.

(44) Costerton JW, Caldwell DE, Korber DR, Laapin-Scott HM. Microbial biofilms.
Annual Review of Microbiology 1995;49:711-45.

(45) Crowe JH, Hoekstra FA, Crowe LM. Anhydrobiosis.
Annual Review of Physiology 1992;54:579-99.

(46) Davis JG. Milk testing. The laboratory control of milk. London:1951.

(47) Derzelle S, Dilasser F. A robotic DNA purification protocol and real-time PCR for the detection of *Enterobacter sakazakii* in powdered infant formulae.
BMC Microbiol 2006;6:100.

(48) Derzelle S, Dilasser F, Maladen V, Soudrie N, Leclercq A, Lombard B, et al. Comparison of three chromogenic media and evaluation of two molecular-based identification systems for the detection of *Enterobacter sakazakii* from environmental samples from infant formulae factories. Journal of Food Protection 2007;70(7):1678-84.

(49) Doherty T, Chopra M, Jackson D, Goga A, Colvin M, Persson L-A. Effectiveness of the WHO/UNICEF guidelines on infant feeding for HIV-positive women: results from a prospective cohort study in South Africa. AIDS 2007;21:1791-7.

(50) Drasar BS, Shiner M, McLeod GM. Studies on the intestinal flora. I. The bacterial flora of the gastrointestinal tract in healthy and achlorhydric persons.
Gastroenterology 1969;56(1):71-9.

(51) Drudy D, O'Rourke M, Murphy M, Mullane NR, O'Mahony R, Kelly L, et al.
Characterization of a collection of *Enterobacter sakazakii* isolates from environmental and food sources. International Journal of Food Microbiology 2006a;10:127-34.

(52) Drudy D, Mullane NR, Quinn T, Wall G, Fanning S. *Enterobacter sakazakii*: An emerging pathogen in powdered infant formula.
Clinical Infectious Diseases 2006b;42:996-1001.

(53) Duck WM, Steward CD, Banerjee SN, Mc Gowan Jr. JE, Tenover FC. Optimization of computer software settings improves accuracy of pulsed-field gel electrophoresis macrorestriction pattern analysis.
Journal of Clinical Microbiology 2003;41(7):3035-42.

(54) Edelson-Mammel SG, Buchanan RL. Thermal inactivation of *Enterobacter sakazakii* in rehydrated infant formula. Journal of Food Protection 2004;67(1):60-3.

(55) Edelson-Mammel SG, Porteous MK, Buchanan RL. Survival of *Enterobacter sakazakii* in a dehydrated powdered infant formula.
Journal of Food Protection 2005;68(9):1900-2.

(56) Edelson-Mammel SG, Porteous MK, Buchanan RL. Acid resistance of twelve strains of *Enterobacter sakazakii*, and the impact of habituating the cells to an acidic environment. Journal of Food Science 2006;71(6):201-7.

(57) ESFSA 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.
Report No.: EFSA-Q-2006-078. The EFSA Journal 2007;(444):1-14.

(58) El-Prince E, Sayed M, Abdel-Haleem AA. Incidence and public health hazard of *Enterobacter sakazakii* in milk powder and some dried milk-based foods.
Assiut Veterinary Medical Journal 2007;53(113):124-37.

(59) Emery CL, Weymouth LA. Detection and clinical significance of extended-spectrum beta-lactamases in a tertiary-care medical center.
Journal of Clinical Microbiology 1997;35(8):2061-7.

(60) Estuningsih S, Kress C, Hassan AA, Akineden Ö, Schneider E, Usleber E. *Enterobacteriaceae* in dehydrated powdered infant formula manufactured in Indonesia and Malaysia. Journal of Food Protection 2006;69(12):3013-7.

(61) Fang FC, McClelland M, Guiney DG, Jackson MM, Hartstein AI, Morthland VH, et al. Value of molecular epidemiologic analysis in an nosocomial methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* outbreak. Journal of the American Medical Association 1993;270(11):1323-8.

(62) Farmer III. JJ, Hickman FW, Brenner DJ. Yellow *Enterobacter cloacae*: A new species of *Enterobacteriaceae* isolated from clinical specimens. Abstracts of the annual meeting of the American Society for Microbiology 1977;C 154:61.

(63) Farmer III. JJ, Asbury MA, Hickman-Brenner FW, Brenner DJ, and the *Enterobacteriaceae* Study group. *Enterobacter sakazakii*: a new species of "*Enterobacteriaceae*" isolated from clinical specimens.
International Journal of Systematic Bacteriology 1980;30(3):569-84.

(64) Farmer III. JJ, Davis BR, Hickman-Brenner FW, Mc Whorter A, Huntley-Carter GP, Asbury MA, et al. Biochemical identification of new species and biogroups of *Enterobacteriaceae* isolated from clinical specimens.
Journal of Clinical Microbiology 1985;21(1):46-76.

(65) Farmer III. JJ, Kelly MT. *Enterobacteriaceae*. In: Balows A, editor. Manual of Clinical Microbiology. 5th Edition.
Washingtopn DC: American Society for Microbiology;1992:360-83.

(66) FDA. Isolation and Enumeration of *Enterobacter sakazakii* from Dehydrated Powdered Infant Formula. US Food and Drug Administration, Center for Food Safety and Applied Nutrition;2002a. http://www.cfsan.fda.gov/~comm/mmesakaz.html.

(67) FDA. Health Professionals Letter on *Enterobacter sakazakii* infections associated with use of powdered (dry) infant formulas in neonatal intesive care units. US Food and Drug Administration (USDA), Center for Food safety and applied nutrition, office of nutritional products, labeling and dietary supplements;2002b. http://www.cfsan.gov/~dms/inf-ltr.html.

(68) Foster EM. The Control of *Salmonellae* in processed food: A classification system and sampling Plan. Journal of the Association of Official Analytical Chemists (AOAC) International 1971;54(2):259.

(69) Frank JF. Microbial attachment to food and food contact surfaces. Advances in Food and Nutrition Research 2000;43:319-70.

(70) Frister H. Technologische Aspekte der Milchverarbeitung. In: Krömker V, editor. Kurzes Lehrbuch Milchkunde und Milchhygiene. Stuttgart: Parey in Medizinverlage Stuttgart (MVS) GmbH & Co. KG; 2007:103-9.

(71) Gallagher PG. *Enterobacter* bacteremia in pediatric patients. Reviews of Infectious Diseases 1990;12(5):808-12.

(72) Gallagher PG, Ball WS. Cerebral infarctions due to CNS infection with *Enterobacter sakazakii*. Pediatric Radiology 1991;21(2):135-6.

(73) Giannella RA, Broitman SA, Zamcheck N. Influence of the gastric acidity on bacterial and parasitic enteric infections. Annals of Internal Medicine 1973;278:271-6.

(74) Gilardi GL, Bottone E. *Erwinia* and yellow-pigmented *Enterobacter* isolates from human sources. Antonie van Leeuwenhoek 1971;37:529-35.

(75) Gonzalez S, Flick GJ, Arritt FM, Holliman D, Meadows B. Effect of high-pressure processing on strains of *Enterobacter sakazakii*. Journal of Food Protection 2006;69(4):935-7.

(76) Gonzalez-Cabezas MP, Becker H, Terplan G. Vergleichende Untersuchungen zur Thermo-resistenz von einigen *Salmonella*-Serovaren aus Trockenprodukten und unbehandelten Materialien. Archiv für Lebensmittelhygiene 1983;34:109-32.

(77) Gorn A. Nachfrage nach Blockbutter leicht belebt. Deutsche Molkerei-Zeitung 2008;3:48-9.

(78) Gorn A, Hellebrand D. Nachfrage nach Magermilchpulver belebt, Preise stabilisiert. Deutsche Molkerei-Zeitung 2008;2:48-9.

(79) Grimont F, Grimont PA. The Genus *Enterobacter*. In: Dworkin M, Falikow S, Rosenberg E, Schleifer KH, Stachebrandt E, editors.
The Procaryotes. 3rd Edition. Springer Verlag; 2006:197-214.

(80) Guillaume-Gentil O, Sonnard V, Kandhai MC, Marugg JD, Joosten H. A simple and rapid cultural method for detection of *Enterobacter sakazakii* in environmental samples. Journal of Food Protection 2005;68(1):64-9.

(81) Gurtler JB, Kornacki JL, Beuchat LR. *Enterobacter sakazakii*: a coliform of increased concern to infant health.
International Journal of Food Microbiology 2005;104(1):1-34.

(82) Gurtler JB, Beuchat LR. Survival of *Enterobacter sakazakii* in powdered infant formula as affected by composition, water activity, and temperature.
Journal of Food Protection 2007a;70(7):1579-86.

(83) Gurtler JB, Beuchat LR. Growth of *Enterobacter sakazakii* in reconstituted infant formula as affected by composition and temperature.
Journal of Food Protection 2007b;70(9):2095-103.

(84) Habraken CJM, Mossel DAA, van den Reek S. Management of *Salmonella* risks in the production of powdered milk products.
Netherlands milk and dairy journal 1986;40:99-116.

(85) Hagens S, Loessner MJ. Application of bacteriophages for detection and control of foodborne pathogens. Applied Microbiology and Biotechnology 2007;76:513-9.

(86) Hahn G. Vereinfachte konventionelle Methodik zur Isolierung von *E. sakazakii* aus Milchpulver. Vortrag bei der Milchkonferenz in Osnabrück am 18.-19. Sept. 2003.

(87) Hamilton JV, Lehane MJ, Braig HR. Isolation of *Enterobacter sakazakii* from midgut of *Stomoxys calcitrans*. Emerging Infectious Diseases 2003;9:1355-6.

(88) Hammer P, Heeschen W. Milch und Milchprodukte. In: Sinell H-J, Meyer H, editors. HACCP in der Praxis. 1. Auflage. Hamburg: B. Behr's Verlag; 1996:285-310.

(89) Hammer P. Anreicherung von *Enterobacter sakazakii* in Laurylsulfatbouillon - Einfluss der eingebrachten Voranreicherungsmenge auf die Nachweisgrenze.
Kieler Milchwirtschaftliche Forschungsberichte 2005;57(2):81-6.

(90) Hammer P, Knappstein K, Teufel P. Umfeld- versus Endproduktmonitoring - Praktische Erfahrungen bei der Kontrolle von *Salmonella*-Kontaminationen im Umfeld einer Milchtrocknungsanlage.
Kieler Milchwirtschaftliche Forschungsberichte 2006;58:59-80.

(91) Hansen N-H, Riemann H. Factors affecting the heat resistance of nonsporing organisms. Journal of Applied Bacteriology 1963;26(3):314-33.

(92) Hanslik N, Kitzmüller C, Woidich A, Gombos J, Gorny D. Hygiene-Management.
1. Auflage. Hamburg: B. Behr's Verlag GmbH & Co.; 2000.

(93) Hassan AA, Sanjaq S, Akineden O, Kress C, Fischer M, Schneider E, et al. Vergleich kultureller, biochemischer und molekularbiologischer Methoden zur Identifizierung von *Enterobacter sakazakii*. Abstract der 46. Arbeitstagung des "Arbeitsgebietes Lebensmittelhygiene" der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft e.V.;2005.

(94) Hassan AA, Akineden O, Kress C, Estuningsih S, Schneider E, Usleber E. Characterization of the gene encoding the 16S rRNA of *Enterobacter sakazakii* and development of a species-specific PCR method.
International Journal of Food Microbiology 2007;116(2):214-20.

(95) Hawkins RE, Lissner CR, Sanford JP. *Enterobacter sakazakii* bacteremia in an adult.
Southern Medical Journal 1991;84(6):793-5.

(96) Heller KJ, Jöckel J, Otte-Südi I, Seiler H, Weber H, Wegner K, et al. Mikrobiologie der Lebensmittel: Milch und Milchprodukte. 1. Auflage.
Hamburg: B. Behr's Verlag;1996.

(97) Heuvelink AE, Kodde FD, Zwartkruis-Nahuis JTM, de Boer E. *Enterobacter sakazakii* in melkpoeder. Keuringsdienst van Waren Oost 2001;Project Number OT 0110.

(98) Himelright I, Harris E, Lorch V, Anderson M, Univ. of Tennessee Dept.of Health., Kuehnert M, et al. *Enterobacter sakazakii* infections associated with the use of powdered infant formula - Tennessee, 2001.
CDC Morbidity and Mortality Weekly Report 2002;51:297-300.

(99) Hormaeche E, Edwards PR. Observations on the Genus *Aerobacter* with a description of two species. International bulletin of bacteriological nomenclature and taxonomy 1958;8(2):111-5.

(100) Hormaeche E, Edwards PR. Proposal for the rejection of the generic name *Cloaca* Castellani and Chalmers, and proposal of *Enterobacter* as a generic name with designation of the type species and its type culture. International bulletin of bacteriological nomenclature and taxonomy 1960;10(2):75-6.

(101) Howden CW, Hunt RH. Relationship between gastric secretion and infection.
Gut 1987;28:96-107.

(102) ICMSF., Their significance and methods of enumeration represents a major step in establishing a common understanding of, and developing standard methods for, important foodborne microorganisms.
Microorganisms in foods, Volume 1. Toronto: University of Toronto Press; 1978.

(103) ICMSF. Microbiological testing in food safety management. Microorganisms in foods, Volume 7. New York; USA: Kluwer Academic/Plenum; 2002.

(104) Iversen C, Forsythe S. Risk profile of *Enterobacter sakazakii*, an emergent pathogen associated with infant formula.
Trends in Food Science & Technology 2003;14(11):443-54.

(105) Iversen C, Forsythe S. Isolation of *Enterobacter sakazakii* and other *Enterobacteriaceae* from powdered infant formula milk and related products. Food Microbiology 2004;21:771-7.

(106) Iversen C, Forsythe SJ. Comparison of media for the isolation of *Enterobacter sakazakii*. Applied and Environmental Microbiology 2007;73(1):48-52.

(107) Iversen C, Druggan P, Forsythe S. A selective differential medium for *Enterobacter sakazakii*, a preliminary study. International Journal of Food Microbiology 2004a;96(2):133-9.

(108) Iversen C, Lane M, Forsythe SJ. The growth profile, thermotolerance and biofilm formation of *Enterobacter sakazakii* grown in infant formula milk. Letters in Applied Microbiology 2004b;38(5):378-82.

(109) Iversen C, Waddington M, On SL, Forsythe S. Identification and phylogeny of *Enterobacter sakazakii* relative to *Enterobacter* and *Citrobacter* Species. Journal of Clinical Microbiology 2004c;42(11):5368-70.

(110) Iversen C, Waddington M, Farmer III. JJ, Forsythe SJ. The biochemical differentiation of *Enterobacter sakazakii* genotypes. BioMed Central Microbiology 2006; 6:1-7.

(111) Iversen C, Lehner A, Mullane N, Bidlas E, Cleenwerck I, Marugg J, et al. The Taxonomy of *Enterobacter sakazakii*: proposal of a new genus *Cronobacter* gen. nov. and descriptions of *Cronobacter sakazakii* comb nov., *Cronobacter sakazakii* subsp. *sakazakii*, comb. nov., *Cronobacter sakazakii* subsp. *malonaticus* subsp. nov., *Cronobacter turicensis* sp. nov., *Cronobacter muytjensii* sp. nov., *Cronobacter dublinensis* sp. nov. and *Cronobacter genomospecies* 1. BioMed Central Evolutionary Biology 2007;7:1-34.

(112) Iversen C, Mullane N, McCardell B, Tall BD, Lehner A, Fanning S, et al. *Cronobacter* gen. nov., a new genus to accommodate the biogroups of *Enterobacter sakazakii*, and proposal of *Cronobacter sakazakii* gen. nov., comb. nov., *Cronobacter malonaticus* sp. nov., *Cronobacter turicensis* sp. nov., *Cronobacter muytjensii* sp. nov., *Cronobacter dublinensis* sp. nov., *Cronobacter genomospecies* 1, and of three subspecies, *Crono-bacter dublinensis* subsp. *dublinensis* subsp. nov., *Cronobacter dublinensis* subsp. *lausannensis* subsp. nov. and *Cronobacter dublinensis* subsp. *lactaridi* subsp. nov. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 2008;58:1442-7.

(113) Izard D, Richard C, Leclerc H. DNA relatedness between *Enterobacter sakazakii* and other members of the Genus *Enterobacter*. Annales de Microbiologie (Paris, Institut Pasteur) 1983;134 A(3):241-5.

(114) Jarl DL, Arnold EA. Influence of drying plant environment on *Salmonellae* contamination of dry milk products. Journal of Food Protection 1982;45(1):16-8.

(115) Jasper AHJ, Muytjens HL, Kollée LAA. Neonatale meningitis door *Enterobacter sakazakii*: melkpoeder is niet steriel en bacteriën lusten ook melk! Tijdschrift voor Kindergeneeskunde 1990;58(5):151-3.

(116) Jimenez EB, Gimenez CR. Septic shock due to *Enterobacter skazakii*. Clinical Microbiology Newsletter 1982;4(4):30.

(117) John JF. Molecular analysis of nosocomial epidemics. Infectious Disease Clinics of North America 1989;3(4):683-700.

(118) Johnson LR. Gastric secretion. Gastrointestinal Physiology. 6th edition. Mosby, St. Louis, Johnson LR: 2001:75-94.

(119) Jordan EO. A report on certain species of bacteria observed in sewage. A report on the biological work of the Lawrence Experiment Station, including an account of methods employed and results obtained in the microscopical and bacteriological investigation of sewage and water. Report on water supply and sewerage (part II). Report of the Massachusetts Board of Public Health. 1890.

(120) Jøker RN, Norholm T, Siboni KE. A case of neonatal meningitis caused by a yellow *Enterobacter*. Danish Medical Bulletin 1965;12(5):128-30.

(121) Kandhai MC, Reij MW, Gorris LGM, van Schothorst M. Occurrence of *Enterobacter sakazakii* in food production environments and households. The Lancet 2004a;363(9402):39-40.

(122) Kandhai MC, Reij MW, van Puyvelde K, Guillaume-Gentil O, Beumer RR, van Schothorst M. A new protocol for the detection of *Enterobacter sakazakii* applied to environmental samples. Journal of Food Protection 2004b;67(6):1267-70.

(123) Kandhai MC, Reij MW, Grognou C, van Schothorst M, Gorris LGM, Zwietering MH. Effects of preculturing conditions on lag time and specific growth rate of *Enterobacter sakazakii* in reconstituted powdered infant formula. Applied and Environmental Microbiology 2006;72(4):2721-9.

(124) Kaufman D, Fairchild KD. Clinical microbiology of bacterial and fungal sepsis in Very-Low-Birth-Weight Infants. Clinical Microbiology Reviews 2004;17(3):638-80.

(125) Keller R, Pedroso MZ, Ritchmann R, Silva RM. Occurence of virulence-associated properties in *Enterobacter cloacae*. Infection and Immunity 1998;66(2):645-9.

(126) Kempf B, Bremer E. Uptake and synthesis of compatible solutes as microbial stress responses to high-osmolality environments. Archives of Microbiology 1998;170:319-30.

(127) Kim H, Ryu J-H, Beuchat LR. Attachment of and biofilm formation by *Enterobacter sakazakii* on stainless steel and enteral feeding tubes. Applied and Environmental Microbiology 2006;72(9):5846-56.

(128) Kim H, Ryu J-H, Beuchat LR. Effectiveness of disinfectants in killing *Enterobacter sakazakii* in suspension, dried on the surface of stainless steel, and in a biofilm. Applied and Environmental Microbiology 2007;73(4):1256-65.

(129) Kindle G, Busse A, Kampa D, Meyer-Konig U, Daschner FD. Killing activity of microwaves in milk. Journal of Hospital Infection 1996;33(4):273-8.

(130) Kleiman MB, Allen SD, Neal P, Reynolds J. Meningoencephalitis and compartmentalization of the cerebral ventricles caused by *Enterobacter sakazakii*. Journal of Clinical Microbiology 1981;14(3):352-4.

(131) Kline MW. Pathogenesis of brain abscess caused by *Citrobacter diversus* or *Enterobacter sakazakii*. The Pediatric Infectious Disease Journal 1988;7(12):891-2.

(132) Kress C, Hassan AA, Akineden O, Schneider E, Estuningsih S, Becker H, et al. *Enterobacter sakazakii* in Trockenerzeugnissen auf Milchbasis. 46. Arbeitstagung der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft e.V. vom 27.-30. September 2005 in Garmisch-Partenkirchen.

(133) Kumar CG, Anand SK. Significance of microbial biofilms in food industry: a review. International Journal of Food Microbiology 1998;42:9-27.

(134) Kuzina LV, Peloquin JJ, Vacek DC, Miller TA. Isolation and identification of bacteria associated with adult laboratory Mexican fruit flies, *Anastrepha ludens* (Diptera: *Tephritidae*). Current Microbiology 2001;42:290-4.

(135) Lai KK. *Enterobacter sakazakii* infections among neonates, infants, children, and adults. Case reports and a review of the literature. Medicine (Baltimore) 2001;80(2):113-22.

(136) Lambert-Legace L. Other milks before and after six months. Feeding your child general publishing Co Don Mills Ontario Canada 1982;70-7.

(137) Langfeldt N, Hahn G, Heeschen W. Zum Vorkommen von Salmonellen in Milchpulver: Untersuchungen zur Kontamination durch Analyse kritischer Punkte. Kieler Milchwirtschaftliche Forschungsberichte 1988;40(1):81-90.

(138) Lau DK, Rotton JW. Development of a Real Time PCR method for the detection of *Enterobacter sakazakii*. 2005. http://www.cfsan.fda.gov/~frf/forum04/C-PO-07.htm.

(139) Lechner E, Hüfner J. Handbuch der landwirtschaftlichen Versuchs- und Untersuchungsmethodik (Methodenbuch). Darmstadt: VDLUFA-Verlag 2000;VI.

(140) Leclerc H, Mossel DAA, Edberg SC, Struijk CB. Advances in the bacteriology of the coliform group: Their suitability as markers of microbial water safety. Annual Review of Microbiology 2001;55:201-34.

(141) Leclercq A, Wanegue C, Baylac P. Comparison of fecal coliform agar and violet red bile lactose agar for fecal coliform enumeration in foods. Applied and Environmental Microbiology 2002;68(4):1631-8.

(142) Lehner A, Stephan R. Microbiological, epidemiological, and food safety aspects of *Enterobacter sakazakii*. Journal of Food Protection 2004;67(12):2850-7.

(143) Lehner A, Tasara T, Stephan R. 16 S rRNA gene based analysis of *Enterobacter sakazakii* strain from different sources and development of a PCR assay for identification. BioMed Central Microbiology 2004;4(43):1-7.

(144) Lehner A, Riedel K, Eberl L, Breeuwer P, Diep B, Stephan R. Biofilm formation, extracellular polysaccharide production, and cell-to-cell signaling in various *Enterobacter sakazakii* strains: aspects promoting environmental persistence. Journal of Food Protection 2005;68(11):2287-94.

(145) Lehner A, Nitzsche S, Breeuwer P, Diep B, Thelen K, Stephan R. Comparison of two chromogenic media and evaluation of two molecular based identification systems for *Enterobacter sakazakii* detection. BioMed Central Microbiology 2006a;6(15):1-8.

(146) Lehner A, Riedel K, Rattei T, Ruepp A, Frishman D, Breeuwer P, et al. Molecular characterization of the alpha-glucosidase activity in *Enterobacter sakazakii* reveals the presence of a putative gene cluster for palatinose metabolism. Systematic and Applied Microbiology 2006b;29:609-25.

(147) Leslie SB, Israeli E, Lighthart B, Crowe JH, Crowe LM. Trehalose and sucrose protect both membranes and proteins in intact bacteria during drying. Applied and Environmental Microbiology 1995;61(10):3592-7.

(148) Leuscher RG. A medium for the presumptive detection of *Enterobacter sakazakii* in infant Formula. Food Microbiology 2004;21(527):533.

(149) Licari JJ, Potter NN. *Salmonella* survival during spray drying and subsequent handling of skimmilk powder. I. *Salmonella* Enumeration. Journal of dairy science 1970a;53(7):865-70.

(150) Licari JJ, Potter NN. *Salmonella* survival during spray drying and subsequent handling of skimmilk powder. III. Effects of storage temperature on *Salmonella* and dried milk properties. Journal of dairy science 1970b;53(7):877-82.

(151) Lienau J-A, Ellerbroek L, Klein G. Tracing flock-related *Campylobacter* clones from broiler farms through slaughter to retail products by Pulsed-Field Gel Electrophoresis. Journal of Food Protection 2007;70(3):536-42.

(152) Lin L-C, Beuchat LR. Survival and growth of *Enterobacter sakazakii* in infant cereal as affected by composition, reconstitution liquid, and storage temperature. Journal of Food Protection 2007;70(6):1410-22.

(153) Lindh E, Ursing J. Genomic groups and biochemical profiles of clinical isolates of *Enterobacter cloacae*. Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica 1991;99:507-14.

(154) Lorenz RJ. Grundbegriffe der Biometrie. 3. Auflage. Stuttgart, Jena, New York: Gustav Fischer Verlag;1992.

(155) Malorny B, Wagner M. Detection of *Enterobacter sakazakii* strains by Real-Time PCR. Journal of Food Protection 2005;68(8):1623-7.

(156) Manafi M, Kneifel W, Bascomb S. Fluorogenic and chromogenic substrates used in bacterial diagnostics. Microbiological Reviews 1991;55(3):335-48.

(157) Maslow JN, Mulligan ME, Arbeit RD. Molecular epidemiology: application of contemporary techniques to the typing of microorganisms.
Clinical Infectious Diseases 1993;17:153-64.

(158) Mc Donough FE, Hargrove RE. Heat resistance of *Salmonella* in dried milk.
Journal of dairy science 1968;51(10):1587-91.

(159) Monroe PW, Tift WL. Bacteremia associated with *Enterobacter sakazakii* (yellow, pigmented *Enterobacter cloacae*).
Journal of Clinical Microbiology 1979;10(6):850-1.

(160) Møller V. Simplified tests for some aminoacid decarboxylases and for the arginine dihydrolase system. Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica 1955;36(2):158-72.

(161) Mossel DAA. Media for *Enterobacteriaceae*.
International Journal of Food Microbiology 1985;2:27-32.

(162) Mramba FBA, Zurek L. Isolation of *Enterobacter sakazakii* from stable flies, *Stomoxys calcitrans L.* (Diptera: *Muscidae*).
Journal of Food Protection 2006;69(3):671-3.

(163) Mullane NR, Murray J, Drudy D, Prentice N, Whyte P, Wall PG, et al. Detection of *Enterobacter sakazakii* in dried infant milk formula by cationic-magnetic-bead capture. Applied and Environmental Microbiology 2006;72(9):6325-30.

(164) Mullane NR, Whyte P, Wall PG, Quinn T, Fanning S. Application of pulsed-field gel electrophoresis to characterise and trace the prevalence of *Enterobacter sakazakii* in an infant formula processing facility.
International Journal of Food Microbiology 2007;116:73-81.

(165) Mullane, N, Healy B, Meade J, Whyte P, Wall, PG, Fanning S. Dissemination of *Cronobacter* spp. (*Enterobacter sakazakii*) in a powdered milk protein manufacturing facility. Applied and Environmental Microbiology 2008;74(19):5913-7.

(166) Muytjens HL, Zanen HC, Sonderkamp HJ, Kollee LA, Wachsmuth IK, Fanning S. Analysis of eight cases of neonatal meningitis and sepsis due to *Enterobacter sakazakii*. Journal of Clinical Microbiology 1983;18(1):115-20.

(167) Muytjens HL, van der Ros-van de Repe J, van Druten HA. Enzymatic profiles of *Enterobacter sakazakii* and related Species with special reference to the α-Glucosidase reaction and reproducibility of the test system.
Journal of Clinical Microbiology 1984;20(4):684-6.

(168) Muytjens HL, van der Ros-van de Repe J. Comparative in vitro susceptibilities of eight *Enterobacter* species, with special reference to *Enterobacter sakazakii*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 1986;29(2):367-70.

(169) Muytjens HL, Roelofs-Willemse H, Jaspar GH. Quality of powdered substitutes for breast milk with regard to members of the family *Enterobacteriaceae*. Journal of Clinical Microbiology 1988;26(4):743-6.

(170) Muytjens HL, Kollee LA. *Enterobacter sakazakii* meningitis in neonates: causative role of formula? The Pediatric Infectious Disease Journal 1990;9(5):372-3.

(171) Müller G, Weber H, Müller C. Mikrobiologie der Lebensmittel. 8. Auflage. Hamburg: B. Behr's Verlag; 1996.

(172) Naqvi SH, Maxwell MA, Dunkle LM. Cefotaxime therapy of neonatal gram-negative bacillary meningitis. The Pediatric Infectious Disease Journal 1985;4(5):499-502.

(173) Nazarowec-White M, Farber JM. *Enterobacter sakazakii*: a review. International Journal of Food Microbiology 1997a;34(2):103-13.

(174) Nazarowec-White M, Farber JM. Incidence, survival, and growth of *Enterobacter sakazakii* in infant formula. Journal of Food Protection 1997b;60(3):226-30.

(175) Nazarowec-White M, Farber JM. Thermal resistance of *Enterobacter sakazakii* in reconstituted dried-infant formula. Letters in Applied Microbiology 1997c;24(1):9-13.

(176) Nazarowec-White M, Farber JM. Phenotypic and genotypic typing of food and clinical isolates of *Enterobacter sakazakii*. Journal of Medical Microbiology 1999;48(6):559-67.

(177) Nazarowec-White M, McKellar RC, Piyasena P. Predictive modelling of *Enterobacter sakazakii* inactivation in bovine milk during high-temperature short-time pasteurization. Food Research International 1999;32(5):375-9.

(178) Nazarowec-White M, Farber JM, Reij MW, Cordier J-L, van Schothorst M. *Enterobacter sakazakii*. In: Miliotis MD, Bier JW, editors. International Handbook of foodborne pathogens. New York: Marcel Dekker; 2003:47-413.

(179) Näther G, Toutounian K, Ellerbroek L. Genotypisierung von *Campylobacter* spp. mittels AFLP in wiederkehrend *Campylobacter*-positiven Masthähnchenherden. Archiv für Lebensmittelhygiene 2007;58(9/10):175-9.

(180) Noriega FR, Kotloff KL, Martin MA, Schwalbe RS. Nosocomial bacteremia caused by *Enterobacter sakazakii* and *Leuconostoc mesenteroides* resulting from extrinsic contamination of infant formula. The Pediatric Infectious Disease Journal 1990;9(6):447-9.

(181) O'Toole G, Kaplan HB, Kolter R. Biofilm formation as microbial development. Annual Review of Microbiology 2000;54:49-79.

(182) Oh S-W, Kang D-H. Fluorogenic selective and differential medium for isolation of *Enterobacter sakazakii*.
Applied and Environmental Microbiology 2004;70(9):5692-4.

(183) Owen RJ. Chromosomal DNA fingerprinting - a new method of species and strain identification applicable to microbial pathogens.
The Journal of Medical Microbiology 1989;30:89-99.

(184) Pagotto FJ, Nazarowec-White M, Bidawid S, Farber JM. *Enterobacter sakazakii*: Infectivity and enterotoxin production in vitro and in vivo.
Journal of Food Protection 2003;66(3):370-5.

(185) Pangalos G. Sur un bacille chromogène isolé par hémoculture.
Comptes rendus 1929;1097-8.

(186) Payne SM. Iron and virulence in the family *Enterobacteriaceae*.
CRC Critical Reviews in Microbiology 1988;16(2):81-111.

(187) Pegues DA, Ohl ME, Miller SI. *Salmonella* species, including *Salmonella typhi*. In: Mandell GL, Benett JE, Dolin R, editors. Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases. 6th Edition. Philadephia, Pennsylvania, USA: Elsevier Churchill Livingstone, The Curtis Center; 2005:2636-54.

(188) Pfaller MA. Typing methods for epidemiologic investigation. Manual of Clinical Microbiology. 5th Edition.American Society for Microbiology.1991:171-82.

(189) Pina Pérez MC, Rodrigo Aliaga D, Saucedo Reyes D, Martinez Lopez A. Pressure inactivation kinetics of *Enterobacter sakazakii* in infant formula milk.
Journal of Food Protection 2007;70(10):2281-9.

(190) Pitout JDD, Moland ES, Sanders CC, Thomson KS, Fitzsimmons SR. β-Lactamases and detection of β-Lactam resistance in *Enterobacter* spp.
Antimicrobial Agents and Chemotherapy 1997;41(1):35-9.

(191) Popovic T, Bopp CA, Olsvik Ø, Kiehlbauch JA. Ribotyping in molecular epidemiology. In: Persing DH, Smith TF, Tenover FC, White TJ, editors. Diagnostic molecular microbiology-principles and application. Washington DC, USA:
American Society for Microbiology; 1993: 573-83.

(192) Postupa R, Aldova E. *Enterobacter sakazakii*: a tween 80 esterase-positive representative of the genus *Enterobacter* isolated from powdered milk specimens.
Journal of Hygiene, Epidemiology, Microbiology and Immunology
1984;28(4):435-40.

(193) Potts M. Desiccation tolerance of Prokaryotes.
Microbiological Reviews 1994;58(4):755-805.

(194) Pratt LA, Kolter R. Genetic analysis of *Escherichia coli* biofilm formation: roles of flagella, motility, chemotaxis and type I pili.
Molecular Microbiology 1998;30(2):285-93.

(195) Pribyl C, Salzer R, Beskin J, Haddad RJ, Pollock B, Beville R, et al. Aztreonam in the treatment of serious orthopedic infections.
The American Journal of Medical Sciences 1985;78(2A):51-6.

(196) Raghav M, Aggarwal PK. Isolation and Characterization of *Enterobacter sakazakii* from milk foods and environment. Milchwissenschaft 2007;62(3):266-9.

(197) Ray B, Jezeski JJ, Busta FF. Isolation of *Salmonellae* from naturally contaminated dried milk products. Journal of Milk and Food Technology 1972;35(10):607-13.

(198) Reissbrodt R, Rabsch W. Further differentiation of *Enterobacteriaceae* by means of siderophore-pattern analysis. Zentralblatt für Bakteriologie, Mikrobiologie und Hygiene Reihe A 1988;268:306-17.

(199) Restaino L, Frampton EW, Lionberg WC, Becker RJ. A chromogenic plating medium for the isolation and identification of *Enterobacter sakazakii* from foods, food ingredient, and environmental sources.
Journal of Food Protection 2006;69(2):315-22.

(200) Richards GM, Gurtler JB, Beuchat LR. Survival and growth of *Enterobacter sakazakii* in infant rice cereal reconstituted with water, milk, liquid infant formula, or apple juice. Journal of Applied Microbiology 2005;99(4):844-50.

(201) Rowe B, Hutchinson DN, Gilbert RJ, Hales BH, Begg NT, Dawkins HC, et al. *Salmonella*e ealing infections associated with consumption of infant dried milk.
The Lancet 1987;900-3.

(202) Schaper G. Orientierende Untersuchung zum Luftkeimgehalt im Umfeld von Nutztierställen eines viehstarken Gebietes in Norddeutschland. Institut für Tierhygiene, Tierschutz und Nutztierethologie der Tierärztlichen Hochschule Hannover; 2004.

(203) Seo KH, Brackett RE. Rapid, specific detection of *Enterobacter sakazakii* in infant formula using a Real-Time PCR assay.
Journal of Food Protection 2005;68(1):59-63.

(204) Shaker R, Osaili T, Al-Omary W, Jaradat Z, Al-Zuby M. Isolation of *Enterobacter sakazakii* and other *Enterobacter* spp. from food and food production environments. Food Control 2007;18:1241-5.

(205) Shepherd J. *E. sakazakii* - An Update on Risk Assessment Activity.
Bulletin of the International Dairy Federation 2008;430:80-86

(206) Siegrist HH, Blanc DS. Typisierung von Bakterien: Methoden und epidemiologische Aussagekraft. Swiss-Noso: Nosokomiale Infektionen und Spitalhygiene: aktuelle Aspekte 1995;2(1):1-5. http://www.chuv.ch/swiss-noso/d21a3.htm.

(207) Simmons BP, Gelfand MS, Haas M, Metts L, Ferguson J. *Enterobacter sakazakii* infections in neonates associated with intrinsic contamination of a powdered infant formula. Infection Control and Hospital Epidemiology 1989;10(9):398-401.

(208) Simonsen B, Bryan FL, Christian JHB, Roberts TA, Tompkin RB, Silliker JH. Prevention and control of food-borne salmonellosis through application of Hazard Analysis Critical Control Point (ICMSF).
International Journal of Food Microbiology 1987;4:227-47.

(209) Sinell H-J. Grundlagen, Entwicklung und Begriffe. In: Sinell H-J, Meyer H, editors. HACCP in der Praxis. 1. Auflage. Hamburg: B. Behr's Verlag; 1996:5-30.

(210) Singh A, Goering RV, Simjee S, Foley SL, Zervos MJ. Application of molecular techniques to the study of hospital infection.
Clinical Microbiology Reviews 2006;19(3):512-30.

(211) Skladal P, Mascini M, Salvadori C, Zannoni G. Detection of bacterial contamination in sterile UHT milk using an L-lactate biosensor.
Enzyme Microbial Technology 1993;15:508-12.

(212) Smith JL. The role of gastric acid in preventing foodborne disease and how bacteria overcome acid conditions. Journal of Food Protection 2002;66(7):1292-303.

(213) Soriano JM, Rico H, Moltó JC, Mañes J. Incidence of microbial flora in lettuce meat and spanish potato omelette from restaurants.
Food Microbiology 2001;18:159-63.

(214) Spreer E. Technologie der Milchverarbeitung. 8. Auflage.
Hamburg: B.Behr's Verlag; 2005.

(215) Stoll BJ, Hansen N, Fanaroff AA, Lemons JA. *Enterobacter sakazakii* is a rare cause of neonatal septicemia or meningitis in VLBW infants.
The Journal of Pediatrics 2004;144(6):821-3.

(216) Strøm AR, Kaasen I. Trehalose metabolism in *Escherichia coli*: stress protection and stress regulation of gene expression. Molecular Microbiology 1993;8(2):205-10.

(217) Swaminathan B, Matar GM. Molecular Typing Methods. Persing DH, Smith TF, Tenover FC, White TJ. Diagnostic molecular microbiology - principles and application. Washington DC, USA: American Society for Microbiology; 1993. 26-50.

(218) Tekkök IH, Baeesa SS, Higgins MJ, Ventureyra ECG. Abscedation of posterior fossa dermoid cysts. Child's Nervous System 1996;12:318-22.

(219) Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by Pulsed-Field Gel Electrophoresis: criteria for bacterial strain typing.
Journal of Clinical Microbiology 1995;33(9):2233-9.

(220) Terplan G, Becker H. Salmonellen, *E. coli*, Staphylokokken und Listerien in Trockenmilchprodukten. Molkereitechnik 1988;82:71-5.

(221) Tompkins LS. The use of molecular methods in infectious diseases.
The New England Journal of Medicine 1992;327(18):1290-7.

(222) Urmenyi AMC, Franklin AW. Neonatal death from pigmented coliform infection. The Lancet 1961;1:313-5.

(223) van Acker J, de Smet F, Muyldermans G, Bougatef A, Naessens A, Lauwers S. Outbreak of necrotizing enterocolitis associated with *Enterobacter sakazakii* in powdered milk formula. Journal of Clinical Microbiology 2001;39(1):293-7.

(224) van Belkum A. DNA fingerprinting of medically important microorganisms by use of PCR. Clinical Microbiology Reviews 1994;7(2):174-84.

(225) Weili X, Xu D., Yang Z., Chen B-Q., Jin Z., Zhang Y. Detection of *Enterobacter sakazakii* in powdered milk by polymerase chain reaction. China Dairy Industry 2006;34(5):54-6.

(226) Weischer M, Kolmos HJ. Retrospective 6-year study of *Enterobacter* bacteraemia in a Danish university hospital. Journal of Hospital Infection 1992;20:15-24.

(227) Welsh DT, Reed RH, Herbert RA. The role of trehalose in the osmoadaptation of *Escherichia coli* NCIB 9484: interaction of trehalose, K^+ and glutamate during osmoadaptation in continous culture. Journal of General Microbiology 1991;137:745-50.

(228) Wernsmann RA. Mikrobiologische Umgebungsuntersuchung bei der Herstellung von Säuglingsnahrung unter Berücksichtigung von Hygieneparametern, *Enterobacter sakazakii*, *Listeria monocytogenes* und Salmonellen. Tierärztliche Hochschule Hannover; 2007. <http://elib.tiho-hannover.de/dissertations/wernsmannr_ws07.pdf>.

(229) Willis J, Robinson JE. *Enterobacter sakazakii* meningitis in neonates. The Pediatric Infectious Disease Journal 1988;7(3):196-9.

(230) Zangerl P. Mikrobiologie der Produkte. Kurzes Lehrbuch Milchkunde und Milchhygiene. Stuttgart: Parey in Medizinverlage Stuttgart (MVS); 2007:156-79.

(231) Zwietering MH, Jongenburger I, Rombouts FM, Van't Riet K. Modeling of the bacterial growth curve. Applied and Environmental Microbiology 1990;56(6):1875-81.

(232) Zwietering MH, De Koos JT, Hasenack BE, De Witt JC, Van't Riet K. Modeling of bacterial growth as a function of temperature. Applied and Environmental Microbiology 1991;57(4):1094-101.

8.1 QUELLEN IM WORLD WIDE WEB

(1) Anon. <http://www.foodpoisonblog.com/Sakazakii.jpg>. 21.04.2009.

(2) Anon. World health organization. <http://www.who.int/foodsafety/en/>. 21.04.2009.

(3) Anon. World health organization. 2007 (23.02.2007). ISBN: 92 4 156262 5 (WHO). <http://www.who.int.foodsafety/publications/micro/mra6/en/>. 21.04.2009.

(4) FDA. US food and drug administration. Isolation and enumeration of *Enterobacter sakazakii* from dehydrated powdered infant formula. 2002 (22. 08. 2002). <http://www.cfsan.fda.gov/~comm/mmesakaz.html>. 21.04.2009.

(5) FDA. US food and drug administration. Health professionals letter on *Enterobacter sakazakii* infections associated with use of powdered (dry) infant formulas in neonatal intensive care units. 2002 (10.10.2002). <http://www.cfsan.fda.gov/~dms/inf-ltr3.html>. 21.04.2009.

(6) Kosako Y. In memoriam - Riichi Sakazaki. 2002 :1435. DOI: 10.1099/ijs.0.02487-0. <http://ijs.sgmjournals.org/cgi/reprint/52/5/1435.pdf>. 21.04.2009.

(7) Euzéby JP. LPSN. List of prokaryotic names with standing in nomenclature. 2009. (first home page 28.01.1998, last full update 28.03.2009). <http://www.bacterio.net>. 21.04.2009.

(8) Lau DK, Rotton JW, FDA, SANDO, Alameda, CA. 2004 (02.04.2004). <http://www.cfsan.fda.gov/~frf/forum04/C-PO-07.htm>. 21.04.2009.

(9) Siegrist HH, Blanc DS. 1995 (03.1995). <http://www.chuv.ch/swiss-noso/d21a3.htm>. 21.04.2009.

(10) Wernsmann RA. 2007. (12.11.2007):1-160. <http://elib.tiho-hannover.de/dissertations/wernsmannr_ws07.pdf>. 21.04.2009.