



universität
wien

DIPLOMARBEIT

Titel der Diplomarbeit

Eine Vergleichsstudie von chromogenen Nährmedien zum Nachweis von
Cronobacter in Säuglingsnahrungen

angestrebter akademischer Grad

Magistra der Naturwissenschaften (Mag. rer.nat.)

Verfasserin:	Sandra Eisenwagen
Studienrichtung:	A 474 Ernährungswissenschaften
Betreuerin / Betreuer:	Univ. Prof. Dr. Mohammad Manafi Medizinische Universität Wien, Institut für Hygiene und Angewandte Immunologie des Zentrums für Pathophysiologie, Infektiologie und Immunologie

Wien, im September 2010

Danksagung

Danke.....

Ein Wort, das mir zu kurz erscheint, um all das ausdrücken zu können, was ich an dieser Stelle damit sagen möchte.

Mein größtes Dankeschön gilt meinen Eltern, die mir das Studium ermöglicht haben, sowie meiner Oma und meinem Bruder. Ihr habt mich immer bei all meinen Vorhaben und Entscheidungen unterstützt und seid mir mit Rat und Tat zur Seite gestanden.

Ein weiterer Dank gilt all meinen Freunden. Sonja und Marion, die mich seit dem Zusammenstoß in der ersten Chemievorlesung bereits mein ganzes Studium begleiten. Ebenfalls gilt mein Dank auch Petra, Claudia, Wali und Mara sowie all meinen Mitbewohnern in Wien und Rom, besonders Aima.

Danke, dass ihr für mich da seid und immer ein offenes Ohr für mich hattet und habt.

Danke an Claudia und Flo sowie meine Eltern, die mir tatkräftig durch das Korrekturlesen der Arbeit und Veränderungsvorschlägen zur Seite gestanden sind.

Natürlich gilt mein herzlicher Dank auch Univ. Prof. Dr. Manafi für die engagierte Betreuung meiner Diplomarbeit.

Mein Dank gilt euch allen, auch wenn ihr hier nicht namentlich erwähnt seid.

Alle, die ich von früher kenne oder im Rahmen meines Auslandsaufenthaltes, beim Arbeiten oder während meines Studiums kennengelernt habe.

Seid es doch ihr, die dazu beigetragen haben, meine Studienzeit zu der zu machen, die sie war. Durch eure aktive Unterstützung sowie moralischen Beistand habt ihr mitgeholfen das ich mein Studium als auch meine Diplomarbeit zu Ende gebracht habe.

Ihr alle habt diese Zeit bereichert und ohne euch wäre sie einfach nicht dieselbe gewesen und ich wäre nicht die, die ich heute bin.

....Danke 😊

....für Matti und Papa...

INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG UND FRAGESTELLUNG.....	1
2. LITERATURÜBERBLICK.....	3
2.1. Entdeckung und Taxonomie	3
2.1.1. Definitionen.....	3
2.1.2. Taxonomische Fortschritte.....	4
2.2. Aufbau und Eigenschaften	6
2.2.1. Hauptmerkmale des Genus <i>Cronobacter</i>	6
2.2.2. Kolonietypisierung.....	7
2.2.3. Überlebens- und Wachstumscharakteristika.....	8
2.3. Vorkommen und Infektionsquellen.....	13
2.3.1. Vorkommen in Lebensmitteln und Umwelt.....	13
2.3.2. Vorkommen in klinischen Bereichen.....	15
2.3.3. Vorkommen in pulverförmiger Säuglingsnahrung	16
2.4. Klinische Bedeutung, Pathogenese und Vorsichtsmaßnahmen	18
2.4.1. Klinisches Erkrankungsbild	18
2.4.2. Pathogenese, Pathogenität und Virulenz.....	21
2.4.3. Vorsichtsmaßnahmen zur Verhinderung von Infektionen	23
2.5. Mikrobiologische Nachweismethoden.....	24
2.5.1. Methodenentwicklung und -vergleich.....	24
2.5.3. Fortschritte bei der Entwicklung von Anreicherungsmedien.....	27
2.5.2. Fortschritte bei der Entwicklung von Isolationsmedien.....	29
2.5.4. Chromogene Isolationsmedien zur Detektion.....	31

3. MATERIAL UND METHODEN	39
3.1. UNTERSUCHUNGSMATERIAL	39
3.1.1. Referenzstämme	39
3.1.1.1. <i>Cronobacter</i> Referenzstämme	39
3.1.1.2. Weitere Referenzstämme	40
3.1.2. Lebensmittelproben.....	41
3.1.3. Wiederfindungsraten.....	41
3.2. VERWENDETE METHODE UND NÄHRMEDIEN	42
3.2.1. Geeignete Methode	42
3.2.2. Geeignete Nährmedien.....	42
3.2.3. Verwendete Nährbouillon/-agar.....	43
3.3. PROBENUNTERSUCHUNGEN	43
3.3.1. Voruntersuchung der Referenzstämme	43
3.3.2. Lebensmitteluntersuchung	44
3.3.2.1. Verwendete Nährmedien und Geräte	44
3.3.2.2. Schema der Untersuchungsmethode	46
3.3.2.3. Versuchsdurchführung	48
3.3.3. Verwendete Identifikationsmethoden	55
3.3.3.1. Gram - Färbung.....	55
3.3.3.2. Oxidase-Test	57
3.3.3.3. API 20 E Identifikationssystem	58
3.3.4. Durchführung der Wiederfindungsraten	60
4. ERGEBNISSE	61
4.1. Auswertung der Referenzstämme	61
4.1.1. <i>Cronobacter</i> Referenzstämme	61
4.1.1.1. Erscheinungsbild auf DFI	63
4.1.1.2. Erscheinungsbild auf ESPM	63
4.1.1.3. Erscheinungsbild auf CES	64
4.1.2. Weitere Referenzstämme	65

4.2. Auswertung der Lebensmittelproben	67
4.2.1. Verteilung der Proben	67
4.2.2. Beurteilung der Proben	68
4.2.3. Beurteilung der nativen Proben.....	68
4.2.2.1. Gesamtbeurteilung	68
4.2.2.2. Beurteilung der Milchbreie	69
4.2.2.3. Beurteilung der Anfangsnahrungen	70
4.2.2.4. Beurteilung der Folgenahrungen.....	70
4.2.4. Beurteilung der kontaminierten Proben	70
4.3. Auswertung der Identifikationsmethoden	71
4.3.1. Gram – Färbung	71
4.3.2. Oxidase-Test	71
4.3.3. API 20 E Identifikationssystem	72
4.4. Auswertung der Wiederfindungsraten	73
4.4.1. Durchschnittswerte aller Wiederfindungsraten.....	74
4.4.2. Wiederfindungsrate auf CES	75
4.4.3. Wiederfindungsrate auf DFI	76
4.4.4. Wiederfindungsrate auf ESPM	77
5. DISKUSSION	78
5.1. Voruntersuchung	78
5.2. Probenuntersuchung.....	79
5.3. Wiederfindungsrate	84
6. ZUSAMMENFASSUNG	85
7. SUMMARY	86
8. LITERATURVERZEICHNIS	87
9. ABBILDUNGS-, TABELLEN & ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	105
10. ANHANG	112

1. EINLEITUNG UND FRAGESTELLUNG

Der opportunistisch pathogene Krankheitserreger *Cronobacter* kann sich bei inadäquater Handhabung von Säuglingsnahrung stark vermehren, was schwerwiegende Infektionen zur Folge haben kann. Da der Mikroorganismus insbesondere mit pulverförmiger Säuglingsnahrung auf Milchpulverbasis als Infektionsquelle in Verbindung gebracht wird, ist die gesundheitliche Gefahr in erster Linie für Früh- und Neugeborene besonders hoch.

Neue Forschungsergebnisse zeigen phäno- und genotypische Unstimmigkeiten. Dies führte zur Einführung der neuen Gattung *Cronobacter* anstelle der als bisher unter dem Namen [*Enterobacter*] *sakazakii* bekannten Art. Nicht zuletzt aufgrund dieser und weiterer neuer Ergebnisse über das Bakterium fand im Jahr 2009 die erste internationale Konferenz zum Austausch bisheriger und neuer Erkenntnisse rund um *Cronobacter* statt.

Bei den im Zusammenhang mit diesem Erreger vorkommenden Erkrankungen handelt es sich insbesondere um Meningitis, Septikämien und nekrotisierende Enterokolitis bei Frühgeborenen und immungeschwächten Säuglingen. Weltweit sind seit dem ersten in der Literatur dokumentierten Ausbruch von 1958 ca. 120 neonatale *Cronobacter*-Fälle bekannt geworden. Ungeachtet des seltenen Auftretens der Infektion besteht bei einem Ausbruch durch häufig vorkommende Komplikationen und einem letalen Krankheitsverlauf mit einer Rate von 40 bis 80% eine große Relevanz für die Gesundheit von Säuglingen.

Trotz zunehmender Kontrollen, Weiterentwicklung von Identifikationsmethoden und dem Einsatz von adäquaten Hygienemaßnahmen, konnte der Keim in den letzten Jahren immer wieder in Säuglingsnahrungen detektiert werden. Es ist wichtig, auf eine Kontamination mit unverzüglichen Gegenmaßnahmen, wie strikter Hygiene und Desinfektionsmaßnahmen, Anwendung von gesetzlich festgelegten mikrobiologischen Kriterien, Überwachung des Prozessumfeldes, Testen des Rohmaterials und des Endprodukts, Einhaltung der Rezeptur sowie

einem raschen und präzisen Nachweis zu reagieren, um dadurch rascher Maßnahmen ergreifen zu können, welche Infektionen durch den fakultativ pathogenen Keim vorbeugen.

Vor dem Hintergrund des vor allem für Säuglinge bestehenden Gefährdungspotentials durch *Cronobacter* werden in der durchgeführten Studie 50 pulverförmige Säuglingsnahrungen mit Hilfe der 2006 veröffentlichten Internationalen Norm (Technische Spezifikation) ISO/TS 22964 analysiert. Dieses Verfahren gilt als Referenzverfahren zum qualitativen Nachweis von *Cronobacter* in Milchpulver und Säuglingsnahrung auf Milchpulverbasis.

Das bei der Methode ISO/TS 22964 routinemäßig verwendete Nährmedium Chromogener *Enterobacter sakazakii* Isolierungsagar (ESIA) wird in dieser Studie nicht herangezogen, sondern es werden andere auf dem Markt befindliche chromogene Selektivmedien evaluiert. Dabei handelt es sich um Chromocult® *Enterobacter sakazakii* Agar (CES), Brillance™ *Enterobacter sakazakii* Agar (DFI) und ChromID™ *Sakazakii* Agar (ESPM) mit dem Ziel, deren Sensitivität und Spezifität zu beurteilen.

Im Vorfeld der Untersuchung werden die zur Analyse herangezogenen Referenzstämme auf den drei verwendeten Nährmedien auf ihre morphologischen Eigenschaften untersucht. Im Anschluss erfolgt als quantitative Überprüfung der Selektivmedien die Durchführung der Wiederfindungsrate, die sich auf ein kollektives Referenzmedium bezieht. Die tatsächliche Probenanalyse ist in mehrere Stufen gegliedert, beinhaltet das Anlegen einer bei Lebensmitteluntersuchungen unumgänglichen Verdünnungsreihe und dauert mehrere Tage. Die Identifizierung des Keims erfolgt durch die Gramfärbung, den Oxidase-Test sowie das API 20E.

Der Mikroorganismus wird dabei in keiner der getesteten Lebensmittelproben gefunden.

2. LITERATURÜBERBLICK

2.1. Entdeckung und Taxonomie

2.1.1. Definitionen

En.te.ro.bac.te.ri.a'ce.ae. M.L. n. enterobacterium ist ein Darmbakterium;
- aceae Endung um eine Familie zu kennzeichnen;
M.L. fem. pl. n. *Enterobacteriaceae* die Familie der *Enterobacteria* [BRENNER und FARMER, 2005]

En.te.ro.bac'ter. Gr. neut. n. enteron intestine: Darm/ Eingeweide;
M.L. masc. n. bacter äquivalent zu Bakterium, kleines Stäbchen;
M.L. masc. n. *Enterobacter* - Eingeweide kleines Stäbchen [GRIMONT und GRIMONT, 2005]

Sa.ka.za'ki.i. N.L. gen. n. *sakazakii* von Sakazaki; zu Ehren des Mikrobiologen Riichi Sakazaki
[IVERSEN et al., 2008]

Cro.no.bac'ter. Gr.n. Cronos, einer der Titanen aus der Mythologie; der seine eigenen Kinder, sobald sie geboren sind verschluckt;
N.L. masc. n. bacter ein Stäbchen;
N.L. masc. n. *Cronobacter* ein Stäbchen, das Infektionen bei Neugeborenen hervorrufen kann
[IVERSEN et al., 2008]

2.1.2. Taxonomische Fortschritte

Die erste definitive Erwähnung von [*Enterobacter*] *sakazakii* in der wissenschaftlichen Literatur erfolgt im Jahr 1961. Zu diesem Zeitpunkt wird diese Bakterienart als „gelbpigmentierter *Enterobacter cloaceae*“ im Zusammenhang mit den für [*E.*] *sakazakii* typischen Symptomen neonataler Meningitiden beschrieben [URMENYI und FRANKLIN, 1961].

Bereits vor diesem Zeitpunkt gibt es andere Quellen, in welchen von „coliform“, „gelbem coliform“, „unidentifiziertem *Enterobacteriaceae*“ und einigen ähnlichen Bezeichnungen die Rede ist [FARMER, 2008]. So wird bereits im Jahr 1929 ein *Enterobacter cloaceae* charakterisiert, der ein gelbes Pigment bildet [PANGALOS et al., 1929]. Aus heutiger Sicht lässt sich darin die als gegenwärtig definierte Gattung *Cronobacter spp.* vermuten.

Durch Unterschiede in DNA-DNA Hybridisierungen, biochemischen Reaktionen, der Pigmentbildung sowie der Antibiotikaempfindlichkeit zwischen *E. cloaceae* und [*E.*] *sakazakii* wird eine Abänderung der Klassifizierung des ursprünglich als „gelbpigmentierten *Enterobacter cloaceae*“ benannten Bakteriums erreicht. Mithilfe der DNA-DNA Hybridisierung kann eine 53 - 54%ige Verwandtschaft zu den zwei Gattungen *Citrobacter* und *Enterobacter* aufgezeigt werden. Die phäno- und genotypischen Gemeinsamkeiten ähneln jedoch mehr *E. cloace* als *Citrobacter freundii*. Die neue Art wird daher [*E.*] *sakazakii* benannt und der Gattung *Enterobacter* zugeordnet [FARMER et al., 1980].

Aufgrund des Verwandtschaftsverhältnisses zu Arten in zwei verschiedenen Gattungen wird bereits damals vermutet, dass [*E.*] *sakazakii* mehrere Arten beinhalten könnte [FARMER et al., 1980].

Dies wird im Rahmen weiterer Untersuchungen bestätigt [IVERSEN et al., 2004], [LEHNER et al., 2004], [IVERSEN et al., 2006].

Im Rahmen von Untersuchungen zum phylogenetischen Verwandtschaftsverhältnis können auf Basis der Sequenz des 16S rRNA- und hsp60- Gens [*E.*] *sakazakii* Stämme auf vier taxonomisch heterogene Cluster aufgeteilt werden [IVERSEN et al., 2004].

Durch die Untersuchung von 189 Stämmen können innerhalb dieser vier Cluster insgesamt 16 Biogruppen definiert werden [IVERSEN et al., 2006].

Vor dieser Analyse waren nur 15 Biogruppen durch die biochemische Charakterisierung von 57 Stämmen bekannt [FARMER et al., 1980].

[E.] sakazakii zeigt sich im Lauf der Jahre als genetisch unterschiedlichere und taxonomisch komplexere Art als ursprünglich angenommen.

Der Vorschlag der Reklassifizierung von *[E.] sakazakii* durch die Einführung der Gattung *Cronobacter* erfolgte nach einer mehrphasigen Studie, in der eine große Zahl von Stämmen von *[E.] sakazakii* gesammelt werden konnte [IVERSEN et al., 2007a], [IVERSEN et al., 2008].

Die Abänderung der Klassifizierung basiert auf den Ergebnissen der Gesamtlänge von Gensequenzen durch 16S rRNA, des genetischen Fingerabdrucks (f-AFLP), der Ribotypisierung, der DNA-DNA Hybridisierung als auch von phänotypischen Profilen.

Die phäno- und genotypischen Verschiedenheiten führen dazu, dass die Typisierung der Spezies als *[Enterobacter] sakazakii* von 1980 durch die neue Gattung *Cronobacter* spp. nov. mit sechs Spezies und drei Subspezies ersetzt wird [IVERSEN et al., 2007a], [IVERSEN et al., 2007], [IVERSEN et al., 2008].

Cronobacter sakazakii gen. nov., comb. nov.

Cronobacter malonaticus sp. nov.

Cronobacter turicensis sp. nov.

Cronobacter muytjensii sp. nov.

Cronobacter genomospecies 1

Cronobacter dublinensis sp. nov.

C. dublinensis subsp. *dublinensis* subsp. nov.

C. dublinensis subsp. *lausannensis* subsp. nov.

C. dublinensis subsp. *lactaridi* subsp. nov.

Durch diese Reklassifikation soll die Identifizierung und Einordnung des Mikroorganismus erleichtert werden. Die neue Benennung als Genus *Cronobacter* spp. ist zukünftig synonym für die Art *[E.] sakazakii* zu verwenden und soll damit diese Bezeichnung ersetzen [IVERSEN et al., 2008].

2.2. Aufbau und Eigenschaften

2.2.1. Hauptmerkmale des Genus *Cronobacter*

Die im Jahr 2008 neu definierte Gattung *Cronobacter* zählt zur Familie der *Enterobacteriaceae* und setzt sich nach derzeitigem Stand der Forschung aus sechs Arten zusammen [IVERSEN et al., 2008].

Cronobacter ist ein opportunistisch pathogenes, gram-negatives, sporenloses, peritrich begeißeltes, gerades Stäbchen mit einer Länge von ca. 3 µm und einer Breite von etwa 1 µm, welches einen fakultativ anaeroben Stoffwechsel besitzt [FARMER et al., 1980], [NAZOROWEC – WHITE und FARBER, 1997].

Des Weiteren vergärt das Bakterium D-Glukose und andere Kohlenhydrate unter Säurebildung, ist Oxidase-negativ und Katalase-positiv. Es reduziert Nitrat zu Nitrit, verwertet Citrat, hydrolisiert Äsculin und Arginin, gibt einen positiven Test bei der Decarboxylierung von L-Ornithin, ist negativ beim Methylrot-Test und zeigt einen positiven Voges-Proskauer Test [IVERSEN et al., 2008]. Die ursprünglich als Merkmal geltende Unfähigkeit, D-Sorbitol zu fermentieren sowie ausschließlich gelb pigmentierte Kolonien zu bilden, kann widerlegt werden [IVERSEN und FORSYTHE, 2004], [IVERSEN et al., 2004b]. Eine Besonderheit von *Cronobacter* im Gegensatz zu anderen *Enterobacteriaceen* ist der positive Nachweis von Tween™ 80-Esterase, eine Abwesenheit des Enzyms Phosphoamidase [NAZOROWEC – WHITE und FARBER, 1997] und eine positive α-Glucosidaseaktivität im Gegensatz zu anderen *Enterobacter*-Spezien [MUYTJENS et al., 1984].

Da die Expression des α-Glucosidasegens ein spezifisches Merkmal des Bakteriums darstellt, macht man sich diese enzymatische Reaktion für die Identifikation durch chromogene und fluorogene Nährmedien zunutze [FANNING und FORSYTHE, 2008].

2.2.2. Kolonietypisierung

Ein typisches Charakteristikum von *Cronobacter*, das ursprünglich zur Differenzierung verwendet wurde, ist die Bildung von gelb pigmentierten Kolonien auf dem festen Nährmedium Trypton Soja Agar (TSA) [FARMER et al., 1980]. Dieses gelbe Pigment trägt dazu bei, dass der Mikroorganismus gegen die UV-Strahlen der Sonne geschützt ist. Das erleichtert das Überleben in der Umwelt [CAUBILLA - BARRON und FORSYTHE, 2007]. Die Produktion des gelben Pigments variiert in Abhängigkeit von Licht, Temperatur sowie Nährmedium und kann bei einigen Stämmen gänzlich wegfallen [FARMER et al., 1980], [BLOCK et al., 2002], [GUILLAUME – GENTIL et al., 2005].

Frisch isolierte Stämme von *Cronobacter* zeigen zwei oder mehrere verschiedene morphologische Kolonietypen. Der erste Typ (A) wird als trockener oder schleimiger Typus mit konvexer Form und rauer Oberfläche beschrieben. Bei der Berührung mit einer Impföse wirkt die Konsistenz gummi-beziehungsweise lederartig und nach kurzem Anhaften an der Öse schnappt die Kolonie wieder auf den Agar zurück [FARMER et al., 1980]. Diese Charaktereigenschaften dürften auf die Produktion von Heteropolysacchariden zurückzuführen sein [HARRIS und ORIEL, 1989]. Der zweite Typ (B) besitzt eine glatte Oberfläche. Einzelne Kolonien lassen sich mit Hilfe einer Impföse leicht entnehmen [FARMER et al., 1980].

Diese zwei Typen werden in jüngerer Zeit als „matt“ oder „glänzend“ in Abhängigkeit von Nährmedium und Stamm beschrieben [IVERSEN und FORSYTHE, 2003].

Eine weitere Eigenschaft, die bei der Kultivierung von *Cronobacter* in Nährbouillon beobachtet werden kann, ist eine Tendenz der Klumpung und der Sedimentbildung [FARMER et al., 1980]. Diese Eigenschaft wird auch in anderen Studien erwähnt [NAZOROWEC – WHITE und FARBER, 1997].

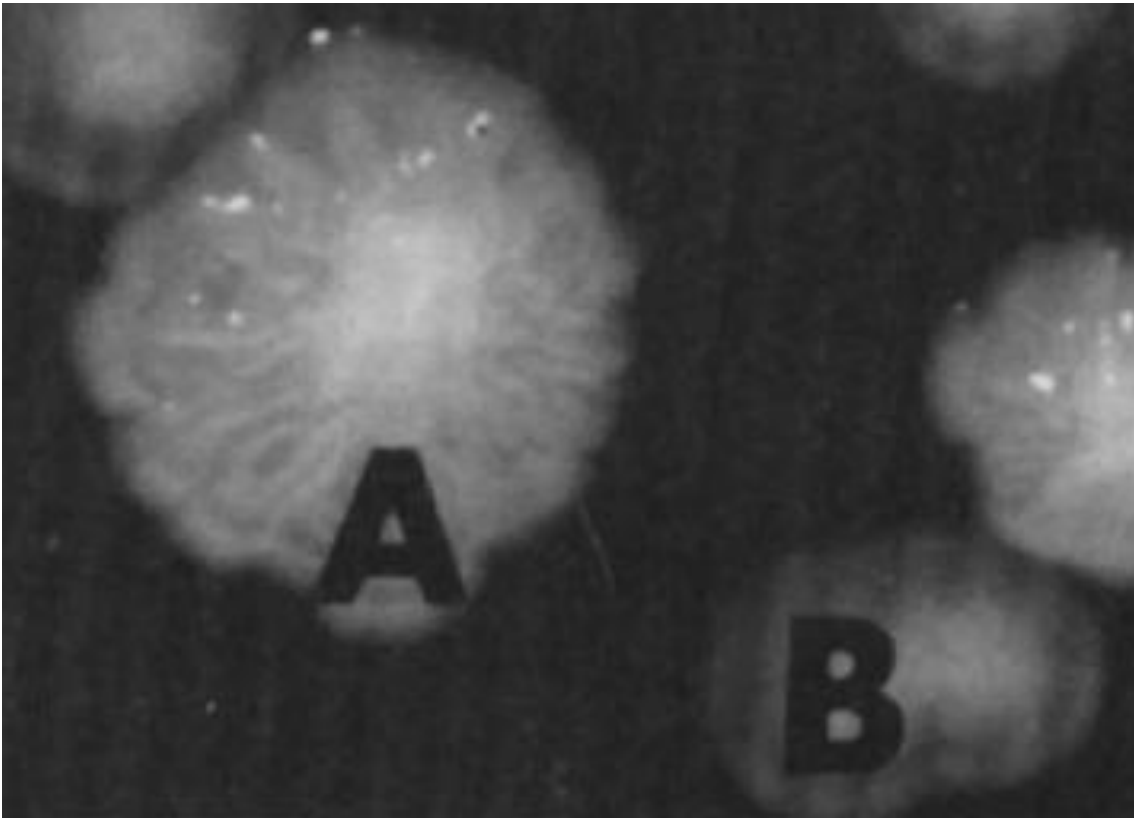


Abbildung 1 Unterschiede in der Morphologie der Kolonien von *Cronobacter* auf TSA nach 48h Inkubation bei 25°C. Stamm 33 zeigt den etwas größeren Typ A (ca. 3mm Durchmesser) mit rauer Oberfläche und den kleineren Typ B mit glatter Oberfläche. [FARMER et al., 1980]

2.2.3. Überlebens- und Wachstumscharakteristika

Der besonders in pulverförmigen Säuglingsnahrungen vorkommende Mikroorganismus *Cronobacter* besitzt eine Reihe von Eigenschaften, wie die Resistenz gegen Trockenperioden oder osmotischen Stress, die ihm das Überleben auch bei ungünstigen Bedingungen über eine lange Zeitspanne hinweg sichern [OSAILI und FORSYTHE, 2009].

Wachstumstemperatur und Wachstumsrate

Das Wachstum von *Cronobacter* wird sowohl mit Hilfe von diversen Nährmedien als auch mit rekonstituierter Säuglingsnahrung quantifiziert. Die Temperaturspannweite, in der das Bakterium wächst, liegt zwischen 5,5 – 47°C

und die Generationszeit in verschiedenen Anreicherungsmedien wie regenerierter Säuglingsanfangsnahrung beträgt je nach Stamm in etwa 20 min bei 37°C [NAZAROWEC – WHITE und FARBER, 1997a], [BREEUWER et al., 2003], [IVERSEN et al., 2004a], [KANDHAI et al., 2006].

Ein optimales Wachstum erfolgt in Temperaturbereichen von 37 – 43°C [IVERSEN et al., 2004a]. Isolate aus trockener Säuglingsanfangsnahrung zeigen ein minimales Wachstum bei einer Temperatur von 5,5 – 8,0°C. Bei einem weiteren Absenken der Temperatur auf 4°C ist kein Wachstum mehr nachzuweisen. Bei einer Lagerung unter diesen Temperaturverhältnissen sterben die Zellen ab [NAZAROWEC – WHITE und FARBER, 1997a].

Bei näherer Betrachtung der Generationszeiten lässt sich die Schlussfolgerung ziehen, dass höhere Temperaturen einen beschleunigenden Effekt auf die Wachstumsrate von *Cronobacter* haben, denn es wurden bei rekonstituierter Milchnahrung Generationszeiten von 4,98 h bei 10°C und 40 min bei 23°C [NAZAROWEC – WHITE und FARBER, 1997a] sowie von 13,7 h bei 6°C, 1,7 h bei 21°C und 21 min bei 37°C erfasst [IVERSEN et al., 2004a].

Daraus resultiert, dass rekonstituierte Milchnahrung gekühlt in vorzugsweise kleinen Portionen aufzubewahren, oder frisch zuzubereiten und sofort zu verzehren ist, um so eine Vermehrung von *Cronobacter* zu unterbinden [KANDHAI et al., 2009].

Tenazität gegenüber thermischen und osmotischen Einflüssen

Die Fähigkeit von *Cronobacter*, in trockener Umgebung zu überleben und die Hitzetoleranz im Gegensatz zu anderen Enterobacteriaceae erklärt das häufige Vorkommen in Säuglingsanfangsnahrung [IVERSEN und FORSYTHE, 2004], [NAZAROWEC – WHITE und FARBER, 1997b].

In einer Studie, in der *Enterobacteriaceae* auf ihre Resistenz gegen Austrocknung in dehydrierter Säuglingsnahrung über einen Zeitraum von zweieinhalb Jahren beobachtet wurden, konnte festgestellt werden, dass einige bekapselte Stämme der Spezies *Cronobacter* in der Lage sind, über den gesamten Beobachtungszeitraum zu überleben [CAUBILLA – BARRON und FORSYTHE, 2007].

Weitere Studien zeigen, dass *Cronobacter* im Gegensatz zu anderen Keimen wie *Salmonellen* oder *Citrobacter* eine höhere Widerstandsfähigkeit gegen osmotischen Stress oder Lufttrocknung besitzt [BREEUWER et al., 2003].

Die Kernaussage über die Hitzetoleranz diverser Isolate von *Cronobacter* in Säuglingsnahrungen, die resultierend aus Untersuchungen zur thermalen Abtötung gemacht werden kann, ist, dass es eine breite stammabhängige Fächerung gibt [EDELSON – MAMMEL und BUCHANAN 2004], [IVERSEN et al., 2004a], [BREEUWER et al., 2003] [NAZAROWEC – WHITE und FARBER, 1997b] [OSAILI et al., 2009].

Die ungleiche Verteilung zeigt sich in den ermittelten dezimalen Reduktionszeiten (D-Werten). Der $D_{58^{\circ}\text{C}}$ Wert erstreckt sich von 0,4 min [BREEUWER et al., 2003] über 2,6 min [IVERSEN et al., 2004a] bis zu 4,2 min [NAZAROWEC – WHITE und FARBER, 1997b].

Eine aktuellere Studie, in der verschiedene Milchpulver und Säuglingsnahrungen untersucht werden, zeigt im Vergleich zu früheren Veröffentlichungen im Durchschnitt niedrigere D-Werte [OSAILI et al., 2009]. Als plausible Erklärung für die Streuung der beobachteten D-Werte gilt der Unterschied in der Zusammensetzung der zu testenden Produkte. Höhere Gehalte von Fetten, Proteinen oder Kohlenhydraten dürften *Cronobacter* vor der Inaktivierung schützen. Diese protektive Wirkung zieht erhöhte D-Werte nach sich [GURTLEIR et al., 2005].

Das Überleben der Keime in Lebensmitteln mit niedriger Wasseraktivität (a_w) über ausgedehnte Lagerzeiten ist kein Problem. Eine anfänglich in Getreidenahrung für Kleinkinder gemessene Rate von zwei koloniebildenden Einheiten (KbE)/g konnte bei a_w - Werten von 0,30 – 0,83 einen Zeitraum von 12 Monaten überdauern [LIN und BEUCHAT, 2007].

Bei der Überprüfung der Säureresistenz von 12 Stämmen in der stationären Phase zeigt sich bei der Großzahl, nach Akklimatisierung an ein saures Medium, eine gesteigerte Resistenz gegen eine saure Umgebung. Eine Korrelation zwischen der Zunahme der Resistenz gegen Säure in der stationären Phase und der Toleranz von Hitze kann dabei nicht festgestellt werden [EDELSON – MAMMEL et al., 2006].

Im Rahmen eines Modells über Wachstum und Hemmung von *Cronobacter* wird der pH-Wert als ein unabhängiger hemmender Faktor definiert. Der Mindest-pH-Wert, bei dem ein Wachstum stattfindet, wird mit 3,89 ermittelt [LAMBERT und BIDLAS, 2007].

Inaktivierung

Viele *Cronobacter*-Stämme zeigen in diversen Studien im Gegensatz zu anderen Keimen eine höhere Resistenz gegenüber Hitzestress [EDELSON – MAMMEL und BUCHANAN 2004], [IVERSEN et al., 2004a], [BREEUWER et al., 2003] [NAZAROWEC – WHITE und FARBER, 1997b], [OSAILI et al., 2009]. Dennoch sollte für ihre Eliminierung ein normaler Pasteurisationsprozess ausreichend sein [OSAILI et al., 2009]. Wird im erzeugten Produkt dennoch *Cronobacter* nachgewiesen, liegt der Fehler vermutlich in einer fehlerhaften Pasteurisation oder in einer Kontamination im Rahmen des Herstellungsprozesses [BREEUWER et al., 2003].

Nach einer 16 sek andauernden Behandlung bei 68°C kann eine 5-log-Reduktion der Keime beobachtet werden [NAZAROWEC – WHITE et al., 1999]. Auch beim Einsatz von heißem Wasser ($\geq 70^\circ\text{C}$) für die Rekonstitution von Säuglingsnahrung liegt eine effiziente Abtötung von *Cronobacter* vor [OSAILI et al., 2009]. Basierend auf bisher erhobenen Daten über die Hitzeresistenz von *Cronobacter* sind zur effizienten Inaktivierung laut Weltgesundheitsorganisation (WHO) und Organisation für Lebensmittel und Landwirtschaft der Vereinten Nationen (FAO) 70°C notwendig [FAO – WHO; 2004, 2006, 2007].

Biofilmbildung

Die Eigenschaft des Mikroorganismus, Biofilme auszubilden, hilft ihm in der Umwelt zu überleben. Bereits nach einer Kontaktzeit von 24 h bei 37°C kann es zu einem Anheften an Materialien, die zur Herstellung von Saugern und Flaschen verwendet werden, kommen. Insbesondere sind Materialien wie Latex, Silikon oder Polykarbonat im Gegensatz zu Stahl [IVERSEN et al., 2004a] oder Glas [LEHNER et al., 2005] betroffen.

Bei der Überprüfung von 72 *Cronobacter*-Stämmen auf ihre Fähigkeit, Biofilme zu bilden, wurde im Rahmen der Herstellung von Magermilch festgestellt, dass

Stickstoffquellen der Milch, wie Molkeeiweiß oder Casein, eine wichtigere Rolle auf die Ausbildung von Biofilmen spielen als Kohlenhydrate [DANCER et al., 2009]. Eine teilweise vorhandene Kapselbildung begünstigt nicht nur das Überleben von *Cronobacter* über die gesamte Haltbarkeitsdauer von Säuglingsnahrungen, sondern auch das Anheften an Oberflächen sowie das Ausbilden von Biofilmen und fördert die Resistenz gegenüber Desinfektions- und Reinigungsmitteln [IVERSEN und FORSYTHE, 2003], [LEHNER et al., 2005], [KIM et al., 2006], [GRIMM et al., 2008].

Antimikrobielle Resistenz

Im Gegensatz zu Monoglyceriden [NAIR et al., 2004] oder Chitosan und deren Oligomeren und anderen natürlichen antimikrobiellen Bestandteilen [NO et al., 2002], die ein hohes Potential besitzen, *Cronobacter* in rekonstituierter Säuglingsnahrung zu reduzieren, zeigt der Keim gegenüber einer Vielzahl von Antibiotika eine große Resistenz. Diese Resistenz ist von großer Bedeutung, da sie eine direkte Auswirkung auf die Behandlungseffektivität der durch *Cronobacter* ausgelösten Infektionen hat.

In einer Untersuchung, in der verschiedene *Enterobacteriaceae* auf ihre Empfindlichkeit gegen eine breite Palette von Antibiotika getestet wurden, erkannte man, dass *Cronobacter* gegenüber den Antibiotika β -Lactam und Cephalosporin eine erhöhte Sensibilität aufweist. Gegenüber anderen Antibiotika, wie Benzylpenicillin oder Oxacillin, weist sie eine sehr hohe natürliche Resistenz auf [STOCK und WIEDEMANN, 2002].

Traditionell erfolgt die Behandlung von Infektionen mit *Cronobacter* durch die Kombination von Ampicillin-Gentamicin oder Ampicillin-Chloramphenicol [LAI, 2001]. Durch die zunehmende Resistenz gegenüber Ampicillin [PITOUT et al., 1997], [GIRLICH et al., 2001] und die Fähigkeit der *Enterobacteriaceae*, die Wirkung von Breitband-Penicillin sowie -Cephalosporin zu inaktivieren, wird der Einsatz von Carbapeneme oder neueren Cephalosporinen in Kombination mit einem zweiten Wirkstoff vorgeschlagen [LAI, 2001], [LEHNER und STEPHAN, 2004].

2.3. Vorkommen und Infektionsquellen

Das natürliche Reservoir des ubiquitär vorkommenden Mikroorganismus [KANDHAI et al., 2004] gilt gegenwärtig als unbekannt. Basierend auf den physiologischen Eigenschaften besteht die Vermutung, dass Pflanzenmaterial die mögliche Quelle sein könnte [IVERSEN et al., 2004a].

Cronobacter ist weit verbreitet und kann bisher aus einer Vielzahl von Lebensmitteln, der Umwelt sowie aus dem klinischen Bereich isoliert werden [GURTLE et al., 2005].

2.3.1. Vorkommen in Lebensmitteln und Umwelt

Der Nachweis von *Cronobacter* in Lebensmitteln, deren näherem Umfeld sowie der Umwelt gelang bereits mehrmals [KANDHAI et al., 2004], [FRIEDEMANN, 2007], [SHAKER et al., 2007], [BAUMGARTNER et al., 2009]. Im Lebensmittelbereich wird der Keim in einer Vielzahl roher und zubereiteter Lebensmittel pflanzlicher und tierischer Herkunft [IVERSEN und FORSYTHE, 2004], [FRIEDEMANN, 2007], [BAUMGARTNER et al., 2009], in erster Linie jedoch in pulverförmiger Säuglingsnahrung, gefunden [FARMER et al., 1980], [IVERSEN und FORSYTHE, 2004], [BAR – OZ et al., 2001] [SHAKER et al., 2007]. Eine 2009 veröffentlichte Studie, in welcher 268 verzehrsfertige Lebensmittel auf das Vorkommen von *Cronobacter* untersucht werden, zeigt, dass nicht nur bisher bekannte Lebensmittel wie Sprösslinge, Gewürze oder Kräuter eine Quelle darstellen, sondern auch verzehrsfertige Süßwaren kontaminiert sein können [BAUMGARTNER et al., 2009]. Darüber hinaus zählt *Cronobacter* zu den am häufigsten aus hyperthermalen Mineralwasserquellen isolierten Mikroorganismen [MOSSO et al., 1994].

Um einen besseren Überblick über die Vielfalt des Vorkommens von *Cronobacter* in Lebensmitteln zu erhalten, können diese in verschiedene Produktgruppen unterteilt werden [FRIEDEMANN, 2007].

I. <i>Cronobacter</i> in Lebensmitteln tierischen Ursprungs		
Produktgruppe	Lebensmittel (Beispiele)	Quelle
1. Milch (Produkte)	Milchpulver	[IVERSEN und FORSYTHE, 2004]
	Käseerzeugnisse	[IVERSEN und FORSYTHE, 2004]
	Käse (Pecorino Abbruzzese)	[CHAVES – LOPEZ et al., 2006]
2. Fleisch (Produkte)	Würste	[GOULLET und PICARD, 1986]
	Geflügel	[JIMENEZ et al., 2003]
3. Eier (Produkte)	Eier	[GURTLE et al., 2005]
4. Fisch (Produkte)	Fisch (gebraten, verzehrfertig)	[MENSAH et al., 2002]

II. <i>Cronobacter</i> in Lebensmitteln pflanzlichen Ursprungs		
Produktgruppe	Lebensmittel (Beispiele)	Quelle
1. Getreide (Produkte)	Reis, Reisstärke, Reismehl	[GURTLE et al., 2005]
	Reis und Mais gemahlen	[IVERSEN und FORSYTHE, 2004]
2. Hülsenfrüchte (Produkte)	Tofu	[NO et al., 2002]
	Sojabohnen (Sojaprotein)	[IVERSEN und FORSYTHE, 2004]
3. Tee, Gewürze, Kräuter	Saurer Tee	[NO et al., 2002]
	Kräuter	[IVERSEN und FORSYTHE, 2004] [BAUMGARTNER et al., 2009]
	Gewürze	[IVERSEN und FORSYTHE, 2004] [BAUMGARTNER et al., 2009]
4. Obst & Gemüse	Kopfsalat	[SORIANO et al., 2001]
	Nüsse	[IVERSEN und FORSYTHE, 2004]
	Tomateneintopf	[MENSAH et al., 2002]
5. Süßwaren	Schokoladenkuchen	[BAUMGARTNER et al., 2009]
	Vanillecremeriegel	[BAUMGARTNER et al., 2009]

Tabelle 1 *Cronobacter* in tierischen und pflanzlichen Lebensmitteln

Einige Ausbrüche von *Cronobacter* können auf kontaminiertes Geschirr wie Löffel und Mixer [BAR – OZ et al., 2001] oder Bierkrüge [SCHINDLER und METZ, 1990] zurückgeführt werden. Im Bereich der Lebensmittelproduktion gelang es, das Vorkommen des Mikroorganismus nicht nur in der Milchindustrie [BREEUWER et al., 2003], [LEHNER et al., 2004] sondern auch bei der Produktion von Schokolade, Frühstücksgetreideprodukten, Gewürzen und Erzeugnissen aus Kartoffeln oder Nudeln festzustellen. Dabei ist in acht von neun Betrieben mindestens eine Probe positiv [KANDHAI et al., 2004].

Ein Nachweis aus verschiedenen Umweltbereichen, wie aus Oberflächen [ALONSO et al., 1999] oder Trinkwasser [SCHINDLER und METZ, 1991], dem Boden [KHAN et al., 1998] oder Staub (eine Isolation von *Cronobacter* aus fünf von 16 Staubsaugerproben wurde erzielt) [KANDHAI et al., 2004] wird dokumentiert. Berichten zufolge konnte *Cronobacter* auch aus tierischen Proben von Ratten [GAKUYA et al., 2001], Vögeln [GOULLET und PICARD, 1986] und Insekten [HAMILTON et al., 2003] isoliert werden. Da Insekten Kontakt zum Menschen sowie verschiedenen Haus- und Nutztieren haben, sollte ihr Potential als Transportmedium zu fungieren und Lebensmittel zu kontaminieren, nicht unterschätzt werden [HAMILTON et al., 2003].

2.3.2. Vorkommen in klinischen Bereichen

Cronobacter ist fähig, in klinischen Bereichen über lange Zeiträume hinweg zu überleben. So wurde in einem Krankenhaus durch Ribotypisierung über 11 Jahre hinweg immer wieder derselbe Stamm nachgewiesen [NAZAROWEC – WHITE und FARBER, 1999a]. Berichten zufolge stammen die meisten Isolate infizierter Patienten aus Rückenmarksflüssigkeit, Blut, Knochenmark, Ohr, Auge, Haut, Wunden, Nase, Rachen oder Stuhl. Die meisten dieser Isolate sind sehr rar und zumeist nur sporadisch anzutreffen [GURTNER et al., 2005].

2.3.3. Vorkommen in pulverförmiger Säuglingsnahrung

Ungeachtet des ubiquitären Vorkommens von *Cronobacter* ist pulverförmige Säuglingsnahrung ein besonders kritischer Faktor im Zusammenhang mit dem Infektionsrisiko von Kleinkindern [GURTLE et al., 2005]. Aufgrund dieser kausalen Rolle von *Cronobacter* bei schweren Infektionen von Neugeborenen wurde eine Vielzahl von Studien zum Nachweis des Pathogens in pulverförmiger Säuglingsanfangsnahrung durchgeführt [MUYTJENS et al., 1988], [NAZAROWEC – WHITE und FARBER, 1997], [IVERSEN und FORSYTHE, 2004], [IVERSEN et al., 2004a].

Die Inzidenz von *Cronobacter* bleibt jedoch niedrig, denn in diversen Proben blieben die Keimzahlen in einem Rahmen von 0,22 KbE/100g und 1,61 KbE/100g [HEALY et al., 2010]. Die Spannweite der Rate, in dem der Mikroorganismus nachgewiesen wurde, erstreckt sich von maximal 14% aus einer im Rahmen einer Studie durchgeführten Untersuchung von 141 Säuglingsnahrungen aus 35 Ländern [MUYTJENS et al., 1988] bis mindestens 2,9% aus einer weiteren Untersuchung von 82 Säuglingsnahrungen [IVERSEN und FORSYTHE, 2004].

Die Überlebensrate des Keims in Säuglingsnahrungen sowie das Potential sich in rekonstituierter Säuglingsnahrung zu vermehren sind groß [GURTLE et al., 2005]. Die derzeit hergestellten Säuglingsnahrungen sind keine sterilen Endprodukte [CAUBILLA – BARRON und FORSYTHE, 2007]; das bedeutet, dass pulverförmige Säuglingsnahrung mit *Cronobacter* kontaminiert sein kann. Rekonstituiert unterstützt die Matrix der Säuglingsnahrung das Wachstum von *Cronobacter*, wodurch es zu einer Infektion kommen kann. Eine klare Verbindung zwischen einer kontaminierten Charge pulverförmiger Säuglingsnahrung und dem Ausbruch in einem Krankenhaus ist dokumentiert [HIMELRIGHT et al., 2002]. Eine Kontamination während des Produktionsprozesses [KANDHAI et al., 2004] oder bei der Zubereitung der Säuglingsnahrung [BAR – OZ et al., 2001] durch kontaminierte Oberflächen im Herstellungsprozess oder durch die Zugabe hitzestabiler kontaminierter Zutaten kann vorkommen.

Bei der Untersuchung von 31 unterschiedlichen Produkten von Folgenahrungen und Kindergetränken auf Milch-, Soja-, oder Getreidebasis sowie Teegetränken konnte nur bei zwei auf Getreide basierenden Folgenahrungen eine Kontamination mit *Cronobacter* festgestellt werden. Sehr interessant ist, dass beide Produkte als Geschmacksstoffe Malzextrakt und Kakao beinhalteten, was eine bisherige Vermutung unterstützt, dass rohe Zutaten eine wichtige Quelle sind, um Säuglingsnahrungen zu kontaminieren [O'BRIEN et al., 2009a].

In einem milchverarbeitenden Produktionsbetrieb konnte im Rahmen einer Analyse des Vorkommens von *Cronobacter* in Milchpulver aufgezeigt werden, wie wichtig ein adäquates Anbringen von Luftfiltern im Fertigungsbereich ist, um so ein großräumiges Ausbreiten des persistenten Mikroorganismus zu verhindern [MULLANE et al., 2008].

Auf Grund des Gefährdungspotentials durch das Vorkommen von *Cronobacter* in pulverförmiger Säuglingsnahrung für Babies, fanden mittlerweile drei Expertentreffen der Organisation für Lebensmittel und Landwirtschaft der Vereinten Nationen (FAO) und Weltgesundheitsorganisation (WHO) zum Austausch neuer wissenschaftlicher Erkenntnisse von pathogenen Mikroorganismen in pulverförmiger Säuglingsnahrung statt [FAO/ WHO, 2004, 2006, 2008].

2.4. Klinische Bedeutung, Pathogenese und Vorsichtsmaßnahmen

Seitdem *Cronobacter* in den frühen 1980ern als neue Spezies akzeptiert wurde, gilt ihm als ein an Bedeutung zunehmendes lebensmittelbedingtes Pathogen eine immer größer werdende Aufmerksamkeit seitens der Wissenschaftlergemeinschaft, der Gesundheitsvorsorge als auch der Lebensmittelindustrie [PAGOTTO et al., 2008]. Trotz vieler neuer Erkenntnisse über den Mikroorganismus und der daraus resultierenden Neuklassifizierung [IVERSEN et al., 2008] gibt es immer noch einen Mangel an Information betreffend der Mechanismen der Pathogenität und Virulenz sowie die Dosis-Wirkungs-Beziehung für Infektionen des Menschen [PAGOTTO et al., 2008].

2.4.1. Klinisches Erkrankungsbild

Die epidemiologische Beziehung zwischen den sporadischen, aber meist schweren Verläufen der durch *Cronobacter* bei Neugeborenen ausgelösten Infektionen und kontaminierter Säuglingsnahrung wird bereits durch einige Studien bestätigt [MULLANE et al., 2007], [LAI, 2001].

Durch den opportunistischen Krankheitserreger sind seit dem Auftreten des definitiv ersten Ausbruchs 1958, bei dem zwei Säuglinge in England an neonataler Meningitis starben [URMENYI und FRANKLIN, 1961], bis zum Jahr 2008 ca. 120 Krankheitsfälle unter Säuglingen und Kleinkindern, die maximal drei Jahre alt waren, bekannt [FAO/ WHO, 2008]. Weltweit kommen jährlich, basierend auf Daten der Seuchenschutz- und Krankheitspräventionsbehörde („Centers of Disease Control and Prevention“), schätzungsweise sechs neue Fälle von *Cronobacter*-Infektionen hinzu [HEALY et al., 2010]. Dabei wird bei neonatalen Infektionen von Mortalitätsraten von bis zu 80% berichtet [NAZAROWEC – WHITE und FARBER 1997], [LAI et al., 2001]. Die Überlebenden leiden häufig unter irreversiblen neurologischen Störungen. Ein besonders hohes Risiko besteht für Säuglinge (< 1 Jahr), im speziellen für Neugeborene ($\leq$ 28 Tage) mit niedrigem Geburtsgewicht (< 2500g) und

geschwächtem Immunsystem, sowie für Säuglinge von HIV-positiven Müttern [FAO/ WHO, 2004].

Eine Gefahrenanalyse von 46 Krankheitsfällen bei Säuglingen zeigt, dass Frühgeborene ein höheres Risiko tragen, an invasiven Krankheiten des Zentralnervensystems zu erkranken. Sie erhalten empfohlenerweise sterile Säuglingsnahrung. Im Gegensatz dazu erhalten kontroverserweise Säuglinge mit Normalgewicht und normaler gastrointestinaler Entwicklung keine sterilen Produkte, wodurch deren Gefahr, an *Cronobacter*-Infektionen zu erkranken, potentiell erhöht wird [BOWEN und BRADEN, 2006].

Die Risikorate einer invasiven Infektion bei Säuglingen (< 12 Monate) ist, basierend auf erhobenen Daten in den USA, bei starkem Untergewicht (9,4:100.000) besonders hoch. Im Vergleich dazu betragen die Risikoraten bei gesunden Säuglingen 1: 100.000 [FAO/ WHO, 2006]. Zu den Hauptsymptomen zählen vor allem Meningitis, Sepsis oder Bakteriämien und nekrotisierende Enterokolitis [HEALY et al., 2010].

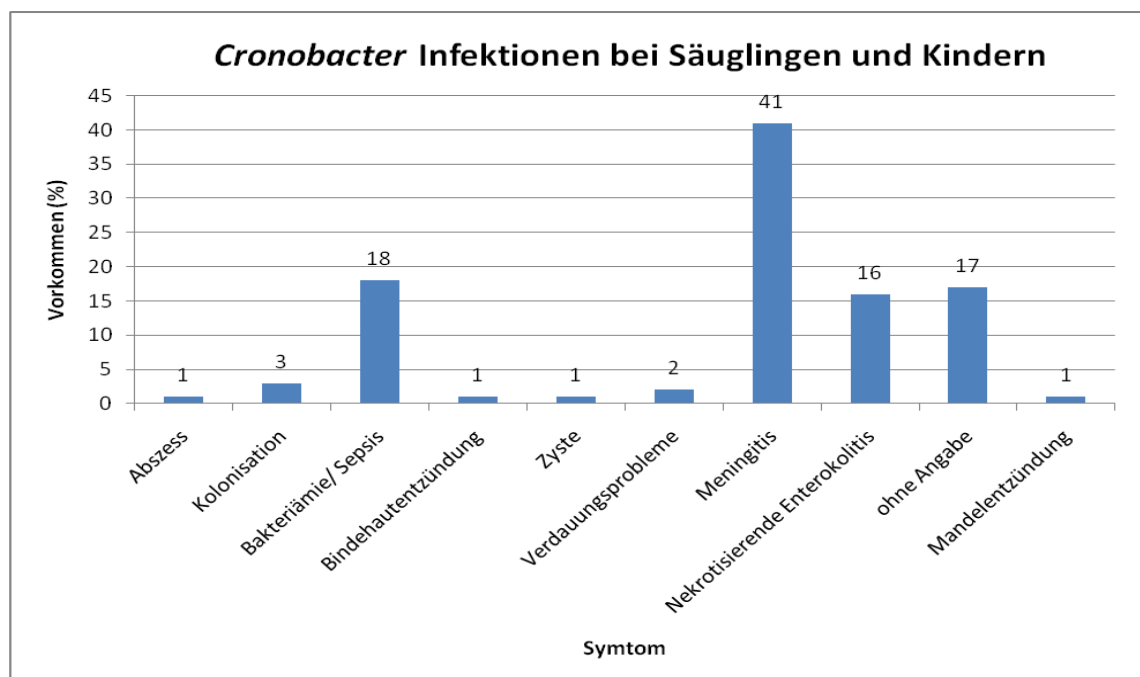


Abbildung 2 Kolonisation, Symptome und Vorkommenshäufigkeit von *Cronobacter* - Infektionen bei Säuglingen und Kindern, in Prozenten angegeben [HEALY et al., 2010]

Neben der Hauptrisikogruppe der Säuglinge können alle Altersgruppen, im speziellen immungeschwächte ältere Menschen, von einer Infektion betroffen sein [HEALY et al., 2010]. Die erste Isolation des Mikroorganismus von einem Erwachsenen mit Bakteriämie gelang im Jahr 1982 [JIMINEZ und GIMENEZ, 1982]. Eine Vielzahl weiterer Isolationen aus immungeschwächten Patienten, wie aus der Mundhöhle von sieben Schlaganfallpatienten, wurden erzielt [GOSNEY et al., 2006]. Erst kürzlich konnte ein Milzabszess, der durch *Cronobacter* ausgelöst wurde, bei einer nicht immungeschwächten 75-Jährigen festgestellt werden [SEE et al., 2007]. Diese Erkenntnisse weisen darauf hin, dass auch ältere Individuen eine höhere Empfänglichkeit für *Cronobacter*-Infektionen aufweisen.

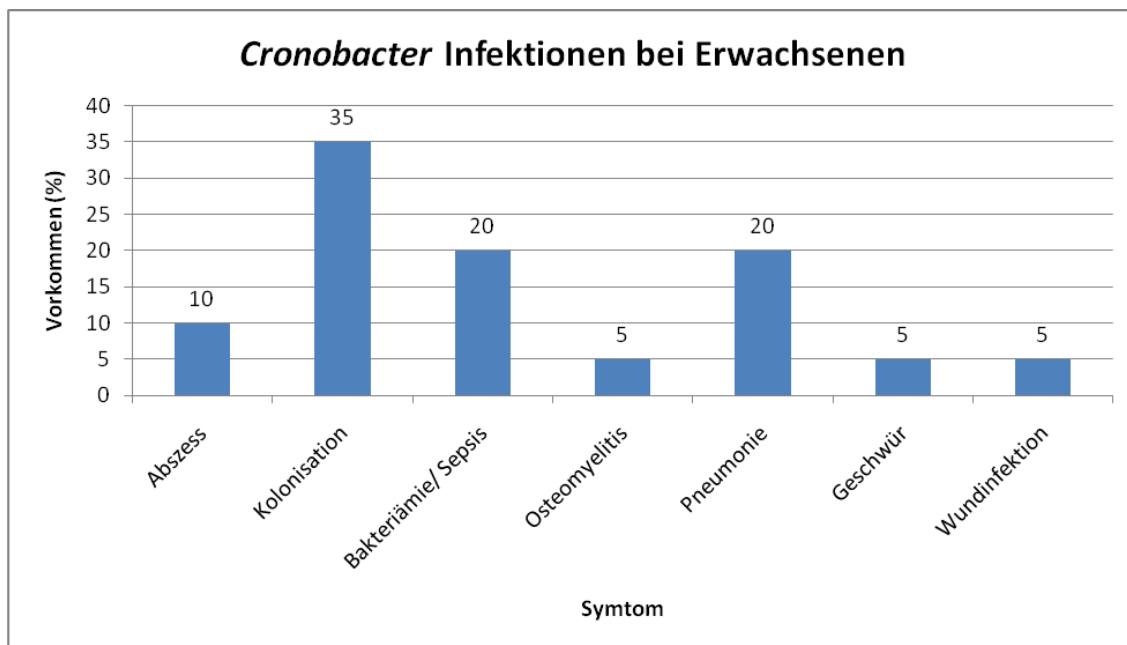


Abbildung 3 Kolonisation, Symptome und Vorkommenshäufigkeit von *Cronobacter* - Infektionen bei Erwachsenen, in Prozenten angegeben [HEALY et al., 2010]

Auf Basis der lebensbedrohlichen lang andauernden Krankheiten, die erhebliche chronische Spätfolgen haben können, wurde *Cronobacter* im Jahr 2002 als akute Gefahr für bestimmte Populationen, wie Neugeborene und immungeschwächte Säuglinge, eingestuft [ICMSF, 2002].

2.4.2. Pathogenese, Pathogenität und Virulenz

Der häufigste Übertragungsweg von *Cronobacter* auf Säuglinge erfolgt über kontaminierte Nahrungsmittel. Eine Translokation der gastrointestinalen Schranke ist eine Grundvoraussetzung, die es dem Keim ermöglicht, die Blut-Hirn-Schranke zu überqueren. Besonders das zentrale Nervensystem wird in Mitleidenschaft gezogen [PAGOTTO und FARBER, 2009]. Eine Vielzahl von in vitro Studien an Zelllinien von Säugetieren wurde bisher durchgeführt, um das Phänomen des Anhaftens und der Invasionfähigkeit verschiedener *Cronobacter*-Stämme genauer zu untersuchen [MOHAN NAIR und VENKITANARAYANAN, 2007], [HEALY et al., 2010]. Das Bakterium wies an zerebralen Endothelzellen und humanen Epithelzellen adhäsive fimbrienunabhängige Eigenschaften auf [MANGE et al., 2006]. Die Adhäsion an Zellen und Oberflächen, als auch die Biofilmbildung wird durch die Zelluloseproduktion von *Cronobacter* unterstützt [ZOGAIJ et al., 2003]. Weiters konnte die Invasionsfähigkeit des Keims, begünstigt bei der Produktion eines äußeren Membranproteins (Omp A), das an zerebrale Fibronektinstrukturen des Wirtes binden kann, bereits mehrmals bestätigt werden [MOHAN NAIR und VENKITANARAYANAN, 2007]. Die Mortalitätsrate von neugeborenen Ratten durch *Cronobacter*-Stämme, welche das Gen Omp A exprimieren, beträgt 100%. Die positiven Omp A Isolate überqueren ohne Probleme die intestinale Schranke, vermehren sich im Blut und überschreiten die Blut-Hirn-Schranke. Im Gegensatz dazu bleibt bei einem Fehlen des Gens eine Bindung an die intestinalen Epithelzellen sowie eine pathologische Manifestation aus [MITTAL et al., 2009].

Eine weitere bekannte Fähigkeit ist die Bildung von Siderophoren-, Endo- und Enterotoxin und die Persistenz von *Cronobacter* in Makrophagen [TOWNSEND et al., 2007], [PAGOTTO et al., 2003], [MOKRACKA et al., 2004]. Die genaue Rolle des Enterotoxins ist immer noch unklar, da das verantwortliche Codierungsgen des mutmaßlichen Toxins und das Protein selbst noch nicht definiert sind [CHENU und COX, 2009].

Bei Extrapolation bisher erhobener Daten aus Tiermodellen auf den Menschen scheint es, dass höhere Dosen notwendig sind, um eine Infektion auszulösen. [PAGOTTO et al., 2003].

Bei einer falschen Handhabung bei der Zubereitung, Lagerung und/oder Fütterung kann das Keimwachstum potentiell hohe Zahlen erreichen [FAO/WHO, 2006].

Abgesehen von vorläufigen Schätzungen der Infektionsdosis von 1000 KBE [IVERSEN und FORSYTHE, 2004] bis hin zu 10.000 KBE [FAO/WHO, 2004] ist es allgemein akzeptiert, dass die Dosis–Wirkungs-Beziehung vom Wirt abhängig ist.

Eine weitergehende Forschung der Mechanismen, die zur Pathogenität führen, als auch zu den Virulenzfaktoren, ist unbedingt notwendig [HEALY et al., 2010], [PAGOTTO et al., 2008].

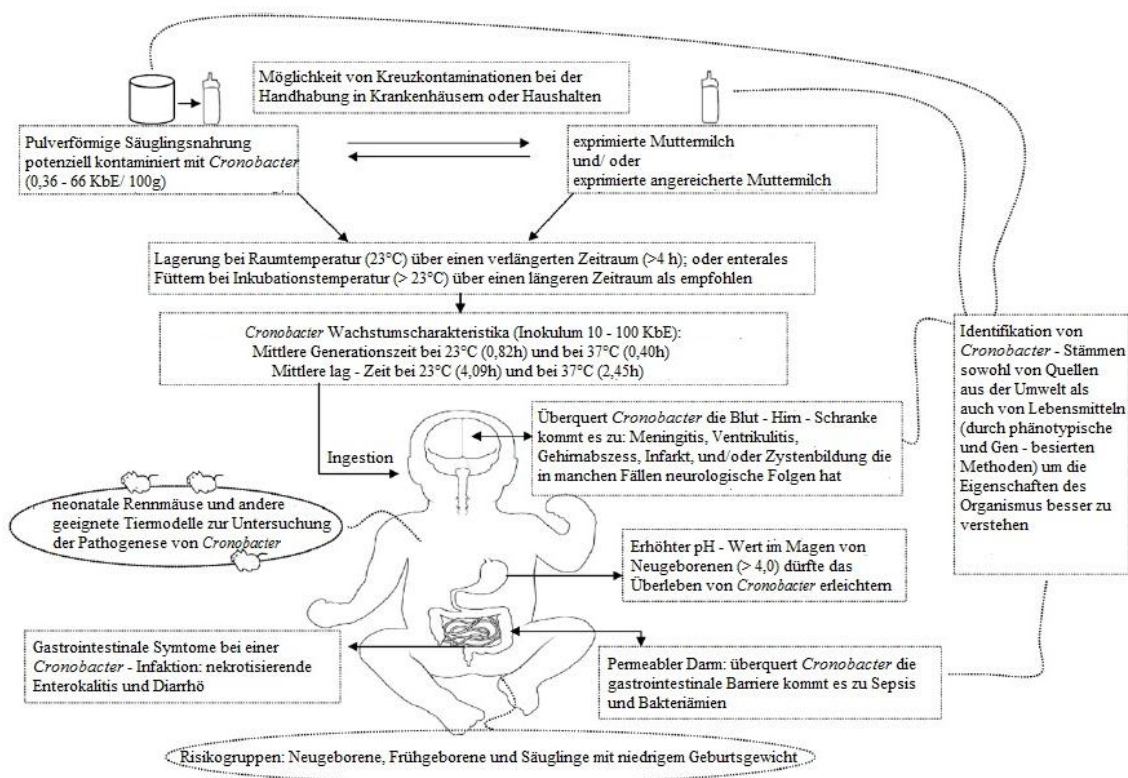


Abbildung 4 Vorgeschlagenes Modell für die Pathogenese einer *Cronobacter* – Infektion, Wirt ist der Mensch [PAGOTTO und FARBER, 2009], [IVERSEN et al., 2004b], [MUJTJENS et al., 1988], [BERSETH et al., 2004], [SONDHEIMER et al., 1985], [DINSMORE et al., 1997], [MEHALL et al., 2001], [HAMMERMAN und KAPLAN, 2006]

2.4.3. Vorsichtsmaßnahmen zur Verhinderung von Infektionen

Die Kontamination von Säuglingsnahrung auf Trockenmilchpulverbasis ist nicht auszuschließen, da es sich um keine sterilen Präparate handelt [CAUBILLA - BARRON und FORSYTHE, 2007]. Darum sind präventive Maßnahmen, die bereits bei der Entscheidung beginnen, auf Muttermilch zurückzugreifen, äußerst wichtig. Ist dies nicht möglich, soll auf eine sterile, den Ansprüchen entsprechende Säuglingsnahrung geachtet werden [BOWEN & BRADEN, 2008]. Die Präparation und der Umgang mit Säuglingsnahrung sollen genau definierten Richtlinien entsprechen [FDA, 2002], [EFSA, 2004]:

- ✓ Gute Hygienemaßnahmen zur Kontaminationsvermeidung (z.B. Sauberkeit in der Küche sowie von Geräten, Händewaschen)
- ✓ Zum Ansatz rekonstituierter Milch sterilisierte Fläschchen verwenden
- ✓ Für die Herstellung rekonstituierter Milch, heißes ($>70^{\circ}\text{C}$) bzw. abgekochtes und anschließend abgekühltes Wasser verwenden, umgehend auf Trinktemperatur abkühlen und verfüttern
- ✓ Trinkmenge für jede Mahlzeit frisch zubereiten, keine Vorräte herstellen
- ✓ Heißhaltezeiten und Lagerung vermeiden (z.B. Flaschenwärmer)
- ✓ Nahrungsreste verwerfen und unter keinen Umständen aufbewahren
- ✓ In Kliniken bei Versorgung von Frühgeborenen-Stationen: bei Sonderernährung sorgfältige Handhabung der Nahrung, Vermeidung von zu langen Lagerzeiten der verzehrsfertigen Milchnahrung in den Sonden
- ✓ Für in Kliniken betreute Neu- und Frühgeborene ist bevorzugt sterile, trinkfertig portionierte Flüssignahrung zu verwenden



Abbildung 5 Risikofaktoren in rekonstituierter Säuglingsnahrung durch *Cronobacter*

2.5. Mikrobiologische Nachweismethoden

2.5.1. Methodenentwicklung und -vergleich

Da bereits eine niedrige Zellzahl von *Cronobacter* ein Gesundheitsrisiko darstellt [FAO/WHO, 2004], ist eine präzise und sensitive Methode für die schnelle Detektion wichtig. Die erste Methode, um *Cronobacter* quantitativ zu detektieren, wurde 1988 entwickelt [MUYTJENS et al., 1988]. In den Neunzigerjahren erfolgten kleine Modifikationen dieses Verfahrens [NAZAROWEC – WHITE und FARBER, 1997b] und bald darauf gab es, entwickelt auf Basis dieser beiden Methoden, ein von der FDA - U.S. Food and Drug Administration definiertes und weltweit adaptiertes Standardverfahren zum Nachweis von *Cronobacter* spp. [FDA, 2002]. Dabei handelt es sich um keine spezifische Methode für *Cronobacter*, sondern nur um eine selektive Methode für *Enterobacteriaceae* [CHENU und COX, 2009]. Nachteile dieser quantitativen Methode sind insbesondere der Zeitaufwand, denn zum Nachweis werden mindestens fünf Tage benötigt, sowie der Ausschluss von nicht gelb pigmentierten Stämmen bei der Identifizierung [IVERSEN et al., 2004b], [IVERSEN et al., 2004a], [FDA, 2002]. Der für die Auswertung verwendete biochemische Test ist im Gegensatz zu anderen Identifikationsmethoden unzuverlässig [IVERSEN und FORSYTHE, 2004].

Die Methode nach FDA wurde weiter überarbeitet und als verbesserte Methode nach FDA bekannt. Sie erzielt erheblich bessere Resultate als die nicht modifizierte Form und beinhaltet sowohl eine Kultivierung auf chromogenem Selektivmedium als auch eine Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (PCR) zur Detektion von *Cronobacter* spp. [CHEN et al., 2009], [LAMPEL und CHEN, 2009]. Da die Einführung einer zuverlässigen, international gültigen kulturellen Referenzmethode zum Nachweis von *Cronobacter* in pulverförmiger Säuglingsnahrung notwendig war, wurde durch die ISO (International Organization for Standardization) und die IDF (International Dairy Federation) im Jahr 2006 das international standardisierte Analyseverfahren, die sogenannte ISO/TS 22964 zur Isolation von *Cronobacter* spp. aus Säuglingsnahrungen auf Milchbasis eingeführt [ANONYMOUS, 2006]. Da einige *Cronobacter*-Isolate in

der verwendeten Anreicherungsbouillon mLST nicht wachsen, ist das Verfahren nicht ganz zuverlässig [LEHNER et al., 2006], [IVERSEN und FORSYTHE, 2007], [FOX und JORDAN, 2008]. Bereits kurz nach der Realisierung dieses als vorübergehende Lösung eingeführten Standards, wurde an einer ausgereiften Methode, dem sogenannten CEN-ISO Standard, gearbeitet, der Mängel des bisherigen Standards beheben und ab ca. 2012 Anwendung finden soll [JOOSTEN und IVERSEN, Stand 10.03.2010]. Durch die neue Methode soll die Untersuchung aller Babynahrungstypen, inklusive Sojanahrung, als auch einzelner Inhaltsstoffe möglich sein. Die Gelbpigmentierung gilt nicht mehr länger als Bestätigungskriterium und die taxonomischen Änderungen werden mit einbezogen, sodass jetzt auch die Bestimmung phenotypisch verwandter Spezies möglich ist. Eine weitere Verbesserung soll durch den Austausch von bisher zu selektiven Nährmedien erzielt werden [MARLER, Stand 10.03.2010]. Erst vor kurzem wurde ein einstufiges Schema, bestehend aus der Kombination des Voranreicherungs- und Anreicherungsschritts mit anschließendem Aufbringen auf ein Selektivmedium evaluiert. Dabei ist die Detektion des Keims aus sämtlichen kontaminierten Proben möglich und das Ergebnis ist, verglichen mit anderen Anreicherungsmedien, signifikant besser. Es wird gezeigt, dass auch eine Kombination der Anreicherungsschritte möglich ist, was zu enormer Zeitersparnis führt [O'BRIEN et al., 2009].

Neben den beschriebenen Methoden wurden im Lauf der Zeit eine Vielzahl weiterer Schemen und Nährmedien zum Nachweis von *Cronobacter* entwickelt. Dabei handelt es sich unter anderem um eine Methode von Guillaume-Gentil, in der *Cronobacter* aus Umfeldproben mit Hilfe des Anreicherungsmediums mLST, dem Nährmedium TSA und durch die α -Glucosidaseaktivität und den API 20E-Test identifiziert werden [GUILLAUME – GENTIL et al., 2005]. Des Weiteren wird durch die DFI-Methode ein neues chromogenes Medium, der sogenannte Druggan-Forsythe-Iversen Agar (DFI) evaluiert. Im Vergleich zur FDA – Methode erhielt man die Ergebnisse um 2 Tage schneller. [IVERSEN et al., 2004b]. Überdies erfolgte durch die Methode nach R & F die Testung eines weiteren chromogenen Mediums, dem sogenannten ChromID™ sakazakii Agar (ESPM) [RESTAINO et al., 2006].

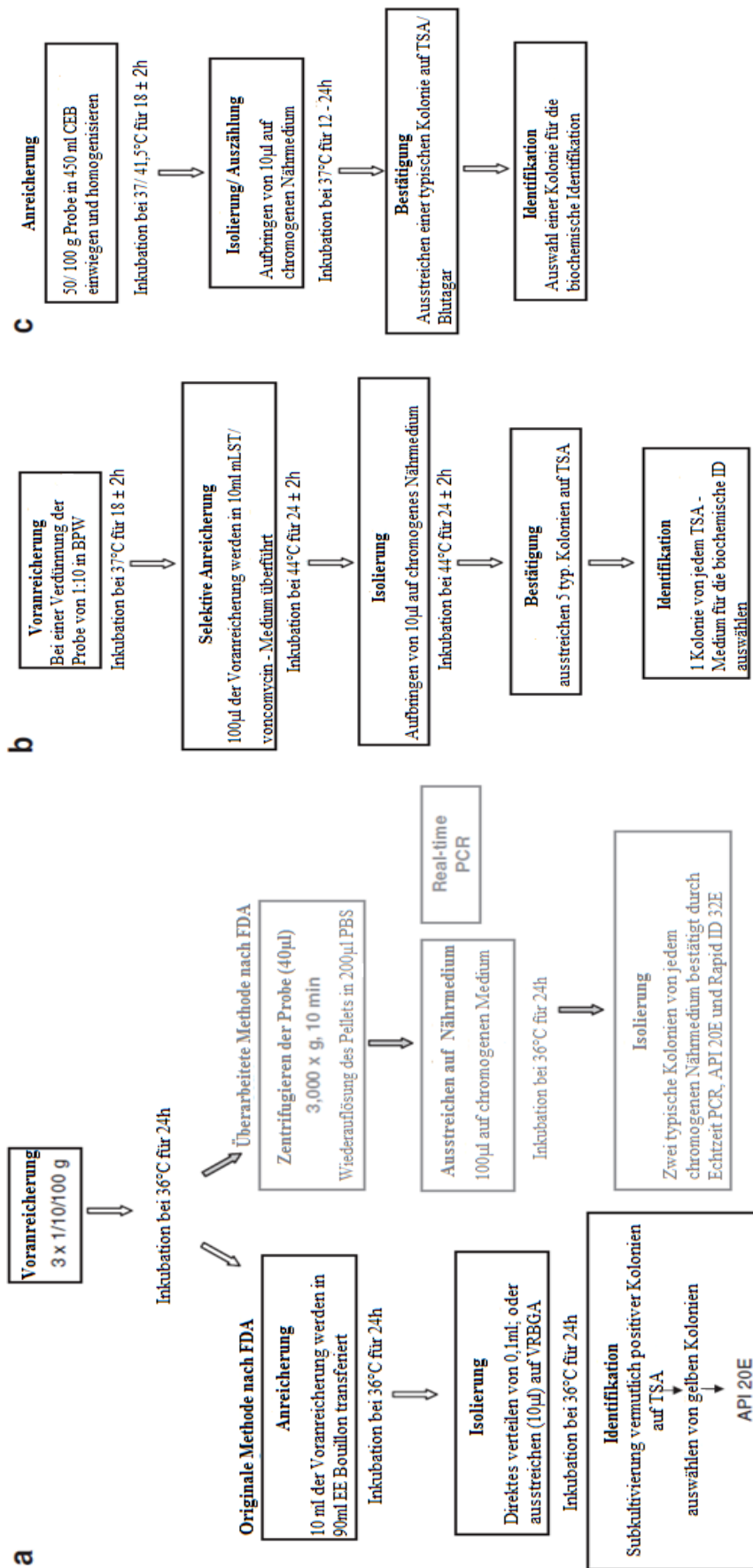


Abbildung 6 Mikrobiologische Schemen zur Detektion von Cronobacter spp. (a) Originale und modifizierte Methode nach FDA; (b) ISO/TS 22964; (c) CEB – Methode

2.5.3. Fortschritte bei der Entwicklung von Anreicherungsmedien

Im Anreicherungsprozess, besonders ab der Stufe der Voranreicherung, sollte die Spezifität verbessert und somit falsche Ergebnisse verhindert werden [DRUGGAN und IVERSEN, 2009]. Das in der FDA-Methode für die Voranreicherung verwendete sterile destillierte Wasser ist für die Anwendung auf dehydrierte Säuglingsanfangsnahrung auf Milchbasis beschränkt [FDA, 2002]. Im Gegensatz dazu ist das in der neueren ISO/TS 22964 verwendete gepufferte Peptonwasser (BPW) für eine Isolierung von *Cronobacter* spp. sowohl aus Säuglingsnahrungen als auch aus Milchprodukten einsetzbar [ANANYMOUS, 2006]. Die darauffolgende selektive Anreicherung sollte die Spezifität der Methode vergrößern, doch sie hat auch das Potential, die Sensitivität zu reduzieren [DRUGGAN und IVERSEN, 2009].

Da sich in selektiven Anreicherungsmedien wie der Laurylsulfat-Tryptose-Bouillon (LST) [IVERSEN et al., 2004a] oder der *Enterobacteriaceae* Anreicherungsbouillon (EEB) nicht alle Stämme von *Cronobacter* spp. vermehren können, wurden in einer Studie verschiedene Anreicherungsmedien miteinander verglichen. Dabei geht hervor, dass der Keim in einer sucrose- anstelle von lactose- oder dextrosehaltigen Bouillon am besten wächst [IVERSEN und FORSYTHE, 2007]. Die Verwendung der EE-Bouillon im Verfahren nach FDA bedeutet einen Schwachpunkt für die Methode, da das Medium für alle *Enterobacteriaceae* eingesetzt werden kann und so die Spezifität für *Cronobacter* nicht steigert [DRUGGAN und IVERSEN, 2009]. Bei dem in einer Studie überprüften Wachstumsvergleich von 177 *Cronobacter* spp. erzielt die *Enterobacter sakazakii* Anreicherungsbouillon (ESE) mit einem Wachstum aller überprüften Stämme das beste Ergebnis. Das Wachstum in den Medien modifizierte Laurylsulfat-Tryptose-Bouillon (mLST), selektive *Enterobacter sakazakii* Bouillon (ESSB) und *Enterobacteriaceae* Anreicherungsbouillon (EEB) schwankt in einem Bereich von 87 – 97%. Als selektivste Bouillon erweist sich dabei mLST [IVERSEN und FORSYTHE, 2007], welche durch die Modifikation von LST, die durch die Zugabe von Vancomycin, um gram-positive Bakterien zu hemmen [GUILLAUME – GENTIL et al., 2005],

und von Natriumchlorid, da eine Resistenz gegen hohe Osmolarität besteht [BREEUWER et al., 2003], erzielt wird. Seitdem das Medium ab 2006 bei der ISO/TS 22964 im Einsatz ist, wurden einige Mängel festgestellt. Deshalb kam es zur Entwicklung der Medien ESSB und ESE. Das größte Problem bei der Anreicherung des Keims stellt seine Sensitivität gegenüber antimikrobiellen Bestandteilen dar. Darum spielt bei der Anreicherung von *Cronobacter* bisher nur das Antibiotikum Vancomycin eine bedeutende Rolle [DRUGGAN und IVERSEN, 2009]. Um sowohl empfindliche Stämme als auch alle anderen anzureichern, wurde das Medium CSB (*Cronobacter* screening broth) entwickelt. Es fördert durch den Zusatz des Kohlenhydrates Sucrose und einer Inkubationstemperatur von 42°C das Wachstum von *Cronobacter*, ohne andere *Enterobacteriaceae* zu hemmen. In einer Kombination mit chromogenen Medien zeigt diese Bouillon eine verbesserte Sensitivität und Selektivität gegenüber anderen Nährmedien [IVERSEN et al., 2008a], [DRUGGAN und IVERSEN, 2009].

Darüber hinaus existiert eine Bouillon, welche die Voranreicherung und die Anreicherungsstufe erfolgreich kombiniert und somit eine Detektion in kürzerer Zeit ermöglicht. Dabei handelt es sich um die sogenannte CEB (*Cronobacter* Enrichment Broth) [O'BRIEN et al., 2009].

2.5.2. Fortschritte bei der Entwicklung von Isolationsmedien

Die Notwendigkeit von vereinfachten und selektiven Detektionsmethoden für *Cronobacter* hat zur Entwicklung von chromogenen und fluorogenen Medien geführt, da diese einen schnelleren und selektiveren Nachweis als andere Nährmedien ermöglichen [IVERSEN et al., 2004b]. So kann im letzten Jahrzehnt ein signifikantes Wachstum bei der Verwendung von chromogenen Substraten in Isolationsmedien beobachtet werden [MANAFI, 2000].

Es werden laufend neue Nährmedien ausgetestet und so gibt es Vorschläge, das bei der ursprünglichen Referenzmethode FDA verwendete Nährmedium VRBGA (Violet Red Bile Glucose Agar), auf dem *Cronobacter* spp. typische rote Kolonien bildet [FDA, 2002], durch die Nährmedien VRBA (Red Bile Agar) [KANDHAI et al, 2004a], MacConkey Agar [VAN ACKER et al., 2001] oder Sorbitol MacConkey Agar [MARCH und RATNAM, 1986] auszutauschen. Sie können sich aufgrund des Fehlens von bedeutend besseren Ergebnissen jedoch nicht durchsetzen [DRUGGAN und IVERSEN, 2009].

Für die Entwicklung der neueren selektiven fluorogenen und chromogenen Nährmedien nützt man die für den Keim typische α -Glucosidaseaktivität von *Cronobacter* spp. aus [FANNING und FORSYTHE, 2008].

Auf Basis dieser charakteristischen biochemischen Reaktion und des fluoreszierenden Substrates 4-Methylumbelliferyl- α -D-glucopyranosid (MU α Glc) wird das selektive Nachweismedium OK (Oh und Kang) hergestellt [OH und KANG, 2004]. Dadurch wird die Nachweiszeit für *Cronobacter* spp. im Vergleich zur Bezugsmethode FDA erheblich verringert [DRUGGAN und IVERSEN, 2009]. Ebenso beruht der Nachweis von *Cronobacter* mit dem nichtselektiven Differenzierungsmedium LB (Leuschner und Bew) auf Grundlage desselben Fluorogens. Die mutmaßlich positiven Kolonien zeigen dabei unter langwelligem ultraviolettem Licht (UV) helle blau-weiße Kolonien auf einem dunklen schwachblauen Hintergrund [LEUSCHNER und BEW, 2004]. Nachteile des Verfahrens sind die fehlende Hemmung gram-positiver Bakterien und die als Konsequenz folgende Überwucherung mit diesen Kolonien. Gegenüber der

Methode nach FDA dürfte sie trotz fehlenden direkten Vergleichs bessere Resultate erzielen [DRUGGAN und IVERSEN, 2009].

Fluorogene Nährmedien weisen Schwachstellen auf, die gelegentlich zu falsch positiven Ergebnissen führen können [OH und KANG, 2004], [IVERSEN et al., 2007]. Das vermeintliche Problem von Fluorogenen ist die resultierende diffuse Fluoreszenz. Dadurch ist die Bestimmung einer spezifischen Kolonie in einer gemischten Kultur schwer möglich. Im Gegensatz dazu bleiben Chromogene innerhalb der bakteriellen Biomasse, woraus sich die deutliche Färbung einzelner Kolonien ergibt [FANNING und FORSYTHE, 2008]. Des Weiteren ist Mu α Glc weniger spezifisch für *Cronobacter* spp. als die bei chromogenen Nährmedien als Substrat verwendete Indolylverbindung 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- α -D-glucopyranosid (X- α Glc) [IVERSEN et al., 2007].

Das erste kommerziell erhältliche chromogene Nährmedium für *Cronobacter* spp. ist der *Enterobacter sakazakii* Isolationsagar (ESIA) der Firma AES Chemunex, dessen Zusammensetzung im Rahmen der ISO/ TS 22964 publiziert wurde [ANONYMOUS, 2006], [DRUGGAN und IVERSEN, 2009].

Kurze Zeit später ist der bereits 2002 entwickelte Druggan-Forsythe-Iversen (DFI) Agar der Firma Oxoid im Handel erhältlich [DRUGGAN und IVERSEN, 2009]. Beide beinhalten das Substrat X- α Glc. Die Grenzen von ESIA und DFI führen zur Entwicklung des modifizierten Druggan-Forsythe-Iversen (mDFI) Agars [IVERSEN et al., 2008a], [DRUGGAN und IVERSEN, 2009], der gegenwärtig unter dem Namen CCI bekannt ist [OXOID, Stand: 18.6.2010].

Ein weiteres Selektivmedium, das *E. sakazakii* Wachstumsmedium (ESPM) wird von R&F Products Inc. entwickelt [RESTAINO et al., 2006]. An dessen Rezeptur ist ESPM von bioMérieux adaptiert [DRUGGAN und IVERSEN, 2009]. Es gibt noch einige weitere chromogene Nährmedien, die sich alle zumeist auf das Substrat X- α Glc stützen, jedoch von untergeordneter Bedeutung sind.

Bei dem Vergleich von vier Methoden für die Isolation von *Cronobacter* zeigt sich die Kombination der Nährmedien BPW für die Voranreicherung, gefolgt von EE für die Anreicherung und dem Ausstreichen auf DFI als sensitivste Variante. Bei dieser Analyse wird das Medium DFI als sensitivstes und das Medium ESIA als spezifischstes ermittelt [IVERSEN und FORSYTHE, 2007].

2.5.4. Chromogene Isolationsmedien zur Detektion

Enterobacter sakazakii isolation chromogenic agar (ESIA)

Wirkungsweise/ Beschreibung

Dieses Selektivmedium der Firma AES Chemunex wurde nach der ISO Norm 22964: 2006 zur Isolation von *Cronobacter* in Milchpulver und pulverförmiger Säuglingsnahrung empfohlen und ist im Handel als Granulat oder als gegossene Agarplatten von verschiedenen Firmen und unter unterschiedlichem Namen erhältlich. Im Gegensatz zu anderen Nährmedien, wie TSA, beinhaltet es eine niedrige Peptonkonzentration und enthält des Weiteren X- α Glc, Natrium-Deoxycholat sowie Kristallviolett. Das Medium weist gegenüber *Cronobacter* spp. eine ausgezeichnete Spezifität, jedoch eine limitierte Sensitivität auf, da durch die Inkubationstemperatur von 45°C und den Inhaltsstoff Kristallviolett einige Stämme gehemmt werden [DRUGGAN und IVERSEN, 2009], [ANANYMOUS, 2006].

Zusammensetzung (g/l)

Pankreatisch verdautes Casein	7,0
Hefeextrakt	3,0
α – X Glucosid	0,15
Agar	12,0– 18,0
Natriumchlorid	5,0
Natrium Desoxycholat	0,6
Kristallviolett	0,002
pH 7,0 $\pm$ 0,2 bei 25°C	



Tabelle 2 Zusammensetzung ESIA [ANANYMOUS, 2006]

Abbildung 7 ESIA

Zubereitung

Um das Medium herzustellen, werden 30,7g des Granulats in einem Liter destillierten Wasser aufgelöst, gut gemischt und eine Minute gekocht. Im Anschluss erfolgt die Sterilisation im Autoklav für 15 min bei 121°C, eine Kühlung auf 44 – 47°C und das Gießen in Petrischalen. Der Agar ist bei einer Temperatur von 0° – 5°C bis zu 14 Tage lagerbar [ANANYMOUS, 2006] [CONDALAB, Stand 19.6.2010].

Auswertung

Bevor es zum Aufbringen auf das Nährmedium kommt, werden die Proben in einer Bouillon vorangereichert. Die Bebrütung erfolgt für 24 ± 2 h bei 44°C [ANANYMOUS, 2006].

<i>Cronobacter</i> (ATCC 29544)	Blau-grün bis grünliche Kolonien
<i>E. coli</i> (ATCC 25299)	Transparent bis rot/violette Kolonien
<i>E. coli</i> (ATCC 8739)	Transparent bis rot/violette Kolonien
<i>S. aureus</i> (ATCC 25923)	inhibiert
<i>S. aureus</i> (ATCC 29212)	inhibiert

Tabelle 3 Wachstum auf ESIA [CONDALAB, Stand 19.6.2010]

Chromocult® *Enterobacter sakazakii* Agar (CES)

Beschreibung

Dieses selektive und chromogene Nährmedium der Firma Merck weist ein gutes Wachstum sowie eine intensive Farbgebung der *Cronobacter*-Kolonien auf und bietet damit einen deutlichen und sicheren Nachweis.

Der Agar wird nach der ISO 22964 empfohlen und findet Verwendung, um *Cronobacter* in Milchpulver und pulverförmiger Säuglingsnahrung zu analysieren.

Durch den Zusatz von Inhibitoren und einer Inkubationstemperatur von 44°C wird das Wachstum einer gram-positiven als auch einer gram-negativen

Begleitflora unterdrückt. Die Bebrütungstemperatur hat einen wesentlichen Einfluss auf die Selektivität und die Empfindlichkeit der Methode, denn die Hemmwirkung auf Begleitbakterien würde bei einem Absinken der Temperatur unter 43°C unterdrückt werden und das Wachstum von *Cronobacter* wäre bei Temperaturen über 45°C gehindert. Der Inhaltsstoff 5-Brom-4-chloro-3-indolyl- α -D-glucopyranosid im Medium erlaubt die Unterscheidung von α -D-Glucosidase-positiven, wie *Cronobacter* und α -D-Glucosidase-negativen Bakterien [MERCK, Stand 24.05.2010], [MERCK, Stand 25.05.2010].

Zusammensetzung (g/l)

Pepton	6,0
Natriumchlorid	5,0
Gallensalzmischung	1,5
5-Brom-4-chlor-3-indolyl- α -D-glucopyranosid	0,1
Agar - Agar	12,0
pH 7,0 $\pm$ 0,2 bei 25°C	

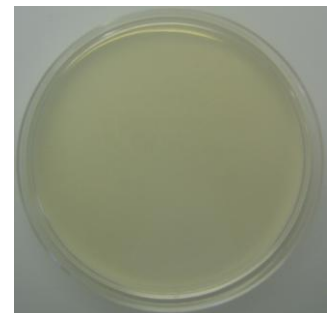


Tabelle 4 Zusammensetzung CES [MERCK, Stand 25.05.2009]

Abbildung 8 CES

Zubereitung

Für die Untersuchung wird dieses Medium selbst gegossen. Dafür werden 24,6 g des gelieferten Granulats in 1l demineralisiertem Wasser durch Erhitzen im siedenden Wasserbad vollständig gelöst und im Anschluss für 15 min bei 121°C autoklaviert [MERCK, Stand 25.05.2009].

Auswertung

Die pulverförmigen Proben werden vor dem Beimpfen des Nährmediums in einer Bouillon angereichert. Die Agarplatten müssen dafür trocken sein. Die Inkubation erfolgt für 24 $\pm$ 2 h bei 44 $\pm$ 1°C [MERCK, Stand 25.05.2009].

<i>Cronobacter</i> (ATCC 29544)	türkisfarbene Kolonien
<i>Cronobacter</i> (ATCC 29004)	türkisfarbene Kolonien
<i>E. cloacae</i> (ATCC 29941)	weiße Kolonien
<i>P. mirabilis</i> (ATCC 29906)	weiße Kolonien
<i>E. coli</i> (ATCC 11775)	weiße Kolonien
<i>E. faecalis</i> (ATCC 11700)	-
<i>S. saprophyticus</i> (ATCC 15305)	-

Tabelle 5 Wachstum auf CES [MERCK, Stand 24.05.2009].

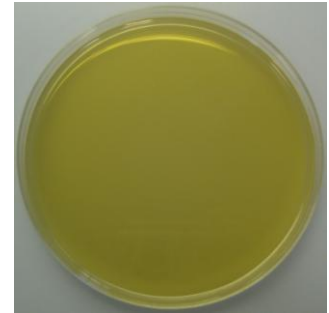
Brilliance™ *Enterobacter sakazakii* Agar (DFI)

Wirkungsweise/ Beschreibung

Beim Brilliance™ *Enterobacter sakazakii* Agar handelt es sich um ein selektives Nährmedium der Firma Oxoid, welches zur Bestätigung von *Cronobacter* in Säuglingsnahrung als auch in anderen Lebensmitteln dient [OXOID, Stand 15.05.2010]. DFI hydrolisiert das Substrat X- α Glc durch das Enzym α -Glucosidase und setzt 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl frei. Dieses bildet in Anwesenheit von Sauerstoff den Farbstoff Bromochloroindigo, was eine Bildung von blau-grün gefärbten Kolonien zur Folge hat. Somit wird der Nachweis von *Cronobacter* erbracht. Neben dem Substrat ist zusätzlich ein Hydrogensulfid-Indikator (NaCl-Thiosulfat und Ammonium-Eisen-Citrat) im Nährmedium enthalten, um Organismen mit schwacher α -Glucosidaseaktivität und H₂S positive Organismen wie *Proteus vulgaris* von *Cronobacter* zu differenzieren. Zur Hemmung einer gram-positiven Begleitflora findet Natrium-Deoxycholat Einsatz. Durch die Testung von 95 Stämmen wird die Sensitivität von DFI mit 100% und die Spezifität mit 87,2% bestimmt [IVERSEN et al., 2004a]. Gegenüber empfindlichen Stämmen ist die Sensitivität aufgrund der Gallensalze im Medium oder wegen etwaiger schwacher α -Glucosidaseaktivität reduziert. Durch die Anlehnung des Agars an TSA kann die Produktion eines gelben Pigments auf DFI zum Wachstum von grünen anstelle von blau-grünen Kolonien führen [DRUGGAN und IVERSEN, 2009].

Zusammensetzung (g/l)

Trypton	15,0
Soja-Pepton	5,0
Natriumchlorid	5,0
Ammoniumeisen(III)-citrat	1,0
Natriumdesoxycholat	1,0
Natriumthiosulfat	1,0
Chromogen	0,1
Agar	15,0
pH 7,3 ± 0,2 bei 25°C	

**Tabelle 6** Zusammensetzung DFI [OXOID, Stand 15.05.2010]**Abbildung 9** DFIZubereitung

Für die Zubereitung des Mediums werden 43,1g des Granulats in 1l demineralisiertem Wasser aufgelöst und gut gemischt. Im Anschluss erfolgt das Autoklavieren für 15 min bei 121°C. Das Medium wird danach auf 50°C abgekühlt und selbst in Petrischalen gegossen [OXOID, Stand 15.05.2010].

Auswertung

Vor dem Beimpfen des Nährmediums werden die Proben in einer Bouillon angereichert. Die Inkubation erfolgt für 24 h bei 35 – 37 °C [OXOID, Stand 15.05.2010].

<i>Cronobacter</i> (ATCC 29004)	Blau-grüne Kolonien
<i>E. coli</i> (ATCC 25922)	Strohfarbene Kolonien
<i>S. aureus</i> (ATCC 25923)	inhibiert

Tabelle 7 Wachstum auf DFI [OXOID, Stand 15.05.2010]

ChromID™ *sakazakii* Agar (ESPM)

Wirkungsweise/ Beschreibung

Dieses selektive Nährmedium der Firma bioMérieux basiert auf dem R&F® Chromogenen *Enterobacter sakazakii* Agar. Es enthält im Gegensatz zu anderen chromogenen Medien zwei chromogene Substrate. Dabei handelt es sich um X-αGlc und 5-Bromo-4-chloro-3-Indolyl-β-D-Cellobiosid, wodurch eine Detektion der Keime mit schwacher α-D Glucopyran-Oxidase-Aktivität möglich ist. Das und der Zusatz von Antibiotika, welche Hefen, gram-positive und gram-negative Keime unterdrückt, führt zu einer Erhöhung der Sensitivität des Mediums gegenüber *Cronobacter*. Eine gesteigerte Spezifität wiederum soll durch den Zusatz eines pH-Indikators sowie Phenolrot und den Kohlenstoffquellen D-Arabitol, Sorbitol und Adonitol erzielt werden. Die Anwendung des Mediums stößt auf Grenzen, wenn es zur Untersuchung von Proben mit einer großen Anzahl von Enterobacteriaceae kommt. Es findet Einsatz, um Proben aus der Umwelt sowie Säuglingsnahrungen zu überprüfen [RESTAINO et al., 2006], [bioMérieux, Stand 19.6.2010]

Zusammensetzung (g/l)

Nutritive Grundbestandteile (Schwein/ Rind)	16,0
Hefeextrakt	6,0
Adonitol	8,0
Arabitol	5,0
Sorbitol	10,0
Natriumchlorid	5,0
Agar	14,0
Farbindikator	0,1
Antibiotische Mixtur	20
Substrate	0,25
pH 6,9	



Tabelle 8 Zusammensetzung ESPM [bioMérieux, Stand 19.06.2010]

Abbildung 10 ESPM

Zubereitung

Das Medium wird in bereits zur Anwendung bereiten Petrischalen geliefert und kann bis zum Ablaufdatum bei 2 – 8°C gelagert werden. Eine Lichtexposition ist zu vermeiden [bioMérieux, Stand 19.6.2010].

Auswertung

Vor dem Beimpfen des Nährmediums werden die Proben in einer Bouillon angereichert. Die Inkubation erfolgt für 24 h bei 35 – 37 °C oder bei 41,5°C [bioMérieux, Stand 19.6.2010].

<i>Cronobacter</i>	Blau-graue/ blau-schwarze Kolonien
--------------------	------------------------------------

Tabelle 9 Wachstum auf ESPM

Chromogener *Cronobacter* Isolationsagar (CCI)

Wirkungsweise/ Beschreibung

Die Grenzen in der Anwendung von ESIA und DFI führen zur Entstehung des modifizierten Druggan-Forsythe-Iversen (mDFI) Agars durch die Firma Oxoid [IVERSEN et al., 2008a], [DRUGGAN und IVERSEN, 2009]. Die Zusammensetzung des Agars lässt darauf schließen, dass es sich dabei um das gegenwärtig als CCI bekannte kommerziell erhältliche Nährmedium handelt. Die fortschreitende Entwicklung einer neuen horizontalen CEN-ISO Standardmethode verlangt Verbesserungen der bisher vorhandenen Nährmedien, wodurch es durch die Optimierung von DFI zur Entwicklung des chromogenen Nährmediums CCI kommt, welches zur Untersuchung von Lebensmittel- und Umweltproben in Verbindung mit CSB verwendet wird.

Die Peptonkonzentration wird verändert, um die Ausprägung einer gelben Pigmentierung zu verhindern und die X-αGlc-Konzentration wird erhöht, um auch Stämme mit schwacher α- Glucosidaseaktivität durch eine intensivere blau-grün Färbung besser zu erfassen. Durch Natriumdesoxycholat findet die Unterdrückung einer unerwünschten gram-positiven Begleitflora statt und

Natriumthiosulphat sowie Ammoniumeisen(III)-Citrat dienen zur Differenzierung von hydrogensulfid-produzierenden *Enterobacteriaceae* [OXOID, Stand 18.6.2010].

Zusammensetzung (g/l)

Hefeextrakt	3,0
Natriumchlorid	5,0
Trypton	7,0
Natriumthiosulfat	1,0
Natriumdesoxycholat	0,25
Ammoniumeisen(III)-citrat	1,0
5-Brom-4-chlor-3-indolyl- α -D-glucopyranosid	0,15
Agar - Agar	13,2
pH 7,3 $\pm$ 0,2 bei 25°C	



Tabelle 10 Zusammensetzung CCI und mDFI
[OXOID, Stand 18.6.2010], [IVERSEN et al., 2008a]

Abbildung 11 mDFI (CCI)
[JOOSTEN und IVERSEN, Stand 10.03.2010]

Zubereitung

Es werden 30,6g in einem Liter sterilem Wasser aufgelöst und zum Kochen gebracht. Im Anschluss erfolgt das Autoklavieren bei 121°C für 15 min, unmittelbar darauf wird es auf 50°C abgekühlt, gemischt und in Petrischalen gegossen

Auswertung

Nach Anreicherung der Keime in einer Bouillon erfolgt die Inkubation bei 44°C $\pm$ 1°C für 24h $\pm$ 2h.

<i>C. sakazakii</i> ATCC 12868	Blau-grüne Kolonien
<i>C. sakazakii</i> ATCC 290041	Blau-grüne Kolonien
<i>C. muytjensii</i> ATCC 51329	Blau-grüne Kolonien
<i>E. coli</i> ATCC 25922	Strohfarbene Kolonien
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	Inhibiert oder kein Wachstum

Tabelle 11 Wachstum auf CCI [OXOID, Stand 18.6.2010]

3. MATERIAL UND METHODEN

3.1. UNTERSUCHUNGSMATERIAL

3.1.1. Referenzstämme

3.1.1.1. *Cronobacter* Referenzstämme

Für diese Arbeit werden 12 verschiedene Referenzstämme von *Cronobacter* des Instituts für Hygiene und angewandte Immunologie der Abteilung Lebensmittelhygiene, Medizinische Universität Wien, herangezogen. Ihre Morphologie wird im Vorfeld auf den drei in dieser Untersuchung verwendeten Nährmedien getestet.

Nummer	Art	Bezeichnung
1	<i>Cronobacter</i>	FSM 327
2	<i>Cronobacter</i>	FSM 311
3	<i>Cronobacter</i>	FSM 274
4	<i>Cronobacter</i>	FSM 266
5	<i>Cronobacter</i>	FSM 493
6	<i>Cronobacter</i>	FSM 269
7	<i>Cronobacter</i>	FSM 423
8	<i>Cronobacter</i>	FSM 302
9	<i>Cronobacter</i>	FSM 323
10	<i>Cronobacter</i>	FSM 292
11	<i>Cronobacter</i>	FSM 271
12	<i>Cronobacter</i>	FSM 265

Tabelle 12 *Cronobacter* Referenzstämme

3.1.1.2. Weitere Referenzstämme

Um das Erscheinungsbild von *Cronobacter* in Farbe und Wachstum mit anderen Bakterien direkt vergleichen zu können wird die vorhandene Stammsammlung der gram-positiven sowie der gram-negativen Bakterien des Instituts für Hygiene und angewandte Immunologie auf den drei verwendeten Selektivmedien morphologisch untersucht.

Nummer	Art	Bezeichnung
1	<i>Escherichia coli</i>	ATCC 11775
2	<i>Citrobacter freundii</i>	ATCC 8090
3	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ATCC 13883
4	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	ATCC 23055
5	<i>Kluyvera ascorbata</i>	ATCC 33433
6	<i>Enterobacter cloace</i>	ATCC 13047
7	<i>Enterobacter cloace</i>	ATCC 49141
8	<i>E. coli</i> 0157:H7 (EHEC)	ATCC 43894
9	<i>Salmonella typhimurium</i>	ATCC 14028
10	<i>Salmonella enteritidis</i>	ATCC 13076

Tabelle 13 Stammsammlung gram - negativ

Nummer	Art	Bezeichnung
1	<i>Bacillus cereus</i>	ATCC 11778
2	<i>Bacillus pumilus</i>	ATCC 27142
3	<i>Bacillus subtilis</i>	ATCC 6051
4	<i>Enterococcus faecium</i>	
5	<i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC 29212
6	<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25923
7	<i>Staphylococcus aureus</i>	NCTC 1803
8	<i>Staphylococcus caprae</i>	
9	<i>Staphylococcus lentus</i>	

Tabelle 14 Stammsammlung gram - positiv

3.1.2. Lebensmittelproben

Im Rahmen der durchgeführten Untersuchung werden insgesamt 50 Lebensmittelproben auf das Vorhandensein von *Cronobacter* untersucht. Bei den getesteten Proben handelt es sich um pulverförmige Milchbreie, Anfangsnahrung sowie Folgenahrung. Die Proben wurden in Geschäften in Wien und Rom in den handelsüblichen Verpackungsgrößen gekauft, beziehungsweise als Probepackungen von verschiedenen Firmen zugesandt. Die Analyse erfolgt auf Basis der 2006 veröffentlichten internationalen Norm ISO/TS 22964, welche als Referenzverfahren zum qualitativen Nachweis von *Cronobacter* eingesetzt wird. Ziel des Anreicherungsschemas ist es, das Wachstum von *Cronobacter* auf den drei verwendeten chromogenen Selektivmedien Chromocult® *Enterobacter sakazakii* Agar (CES), Brillance™ *Enterobacter sakazakii* Agar (DFI) und ChromID™ *sakazakii* Agar (ESPM) zu evaluieren.

3.1.3. Wiederfindungsraten

Die Wiederfindungsrate wird häufig als quantitative Prüfung bei der Kontrolle von Nährmedien angewendet. Sie wird auf ein Referenzmedium bezogen und nach der Bebrütung und Keimzählung als Prozentzahl angegeben. Der Erwartungswert liegt dabei bei nicht selektiven Nährböden um 100%, bei Selektivmedien darunter.

Im Rahmen der Untersuchung werden die Wiederfindungsraten von fünf Stämmen *Cronobacter* auf CES, DFI und ESPM bestimmt. Als Referenzmedium dient Columbia Schafblutagar (COS).

Nummer	Art	Bezeichnung
1	<i>Cronobacter</i>	FSM 327
3	<i>Cronobacter</i>	FSM 274
6	<i>Cronobacter</i>	FSM 269
8	<i>Cronobacter</i>	FSM 302
12	<i>Cronobacter</i>	FSM 265

Tabelle 15 verwendete Referenzstämmе

3.2. VERWENDETE METHODE UND NÄHRMEDIEN

3.2.1. Geeignete Methode

Neben einer Vielzahl von publizierten Nachweisverfahren auf kultureller und molekularbiologischer Basis gilt die 2006 veröffentlichte Internationale Norm (Technische Spezifikation) zum qualitativen Nachweis von *Cronobacter* in Milchpulver und Säuglingsnahrung auf Milchpulverbasis (ISO/TS 22964) als Referenzverfahren. Der internationale Standard findet ebenso Anwendung bei der Überprüfung von Proben aus Betrieben, welche Säuglingsnahrung und Milchpulver herstellen [ANANYMOUS, 2006]. Die vorliegende Untersuchung erfolgt auf Basis dieser Referenzmethode.

Dieser internationale Standard, der als vorübergehende Lösung zur Erleichterung der Einhaltung der Vorschriften eingeführt wurde, befindet sich seit 2006 in Überarbeitung, um die Identifikation von *Cronobacter* zu verbessern und Mängel der ISO/TS 22964:2006 zu beheben. Eine Verbesserung der Detektion soll unter anderem durch den Austausch des zu selektiven Voranreicherungsmediums mLST durch CSB sowie der Ablösung des Isolationsagars ESIA durch den modifizierten Selektivagar DFI erzielt werden [JOOSTEN und IVERSEN, Stand 3.2010], [MARLER, Stand 3.2010].

3.2.2. Geeignete Nährmedien

Im Rahmen dieser Arbeit werden die drei Selektivmedien Chromocult® *Enterobacter sakazakii* Agar (CES), Brillance™ *Enterobacter sakazakii* Agar (DFI) und ChromID™ *sakazakii* Agar (ESPM) evaluiert. Das üblicherweise verwendete Selektivmedium ESIA (*[E.] sakazakii* Isolation Agar) kann aufgrund von Lieferschwierigkeiten nicht eingesetzt werden.

Die drei eingesetzten Nährmedien werden mit Hilfe der vorhandenen Referenzstämme durch Vorversuche überprüft. Da bezüglich ihrer Morphologie die erwarteten Ergebnisse erzielt werden, wird die Untersuchung im Anschluss auf allen drei Medien durchgeführt.

3.2.3. Verwendete Nährbouillon/-agar

Medium	Hersteller	Artikelnummer
Gepuffertes Peptonwasser (BPW)	Merck, Darmstadt	1.07228.0500
Columbia Agar + 5% Hammelblut (COS)	bioMérieux	REF 43041
Columbia Agar (COL)	Merck, Darmstadt	1.10455.0500
Modifizierte Laurylsulfat Tryptose Bouillon/Vancomycin Medium (mLST/Vancomycin)*:		
+ Lauryl Sulfate Tryptose Broth (LST)	Oxoid	CM 0451
+ Natriumchlorid (NaCl)	Merck, Darmstadt	1.06404.1000
+ Vancomycin CP 500mg	HIKMA Pharma GmbH	
chromID™ <i>Sakazakii</i> Agar (ESPM)	bioMérieux	REF 43741
Chromocult® <i>Enterobacter sakazakii</i> Agar (CES)	Merck, Darmstadt	1.00873.0500
Brilliance™ <i>Enterobacter sakazakii</i> Agar (DFI)	Oxoid	CM 1055
Trypton Soya Agar (TSA)	Merck, Darmstadt	1.05458.0500

* mLST/Vancomycin Medium wurde im Labor durch Vereinigung der 3 Komponenten zusammengemischt

Tabelle 16 Verwendete Nährbouillon/-agar

3.3. PROBENUNTERSUCHUNGEN

3.3.1. Voruntersuchung der Referenzstämmen

Die Referenzstämmen des Instituts für Hygiene und angewandte Immunologie werden vorerst, um das Wachstum in Farbe und Form zu überprüfen und zu vergleichen, auf die drei zu evaluierenden chromogenen Nährmedien CES, DFI und ESPM überimpft.

Im Anschluss erfolgt durch die Durchführung weiterer Tests eine exakte Identifikation des Keims.

3.3.2. Lebensmitteluntersuchung

3.3.2.1. Verwendete Nährmedien und Geräte

NÄHRMEDIEN:

- ✓ Gepuffertes Peptonwasser (BPW)
- ✓ Columbia Schafblutagar (COS)
- ✓ Columbia Agar (COL)
- ✓ Modified Lauryl Sulfat Tryptose Broth (mLST)
- ✓ Selektivmedien (CES, DFI, ESPM)
- ✓ Trypton Soja Agar (TSA)

GERÄTE:

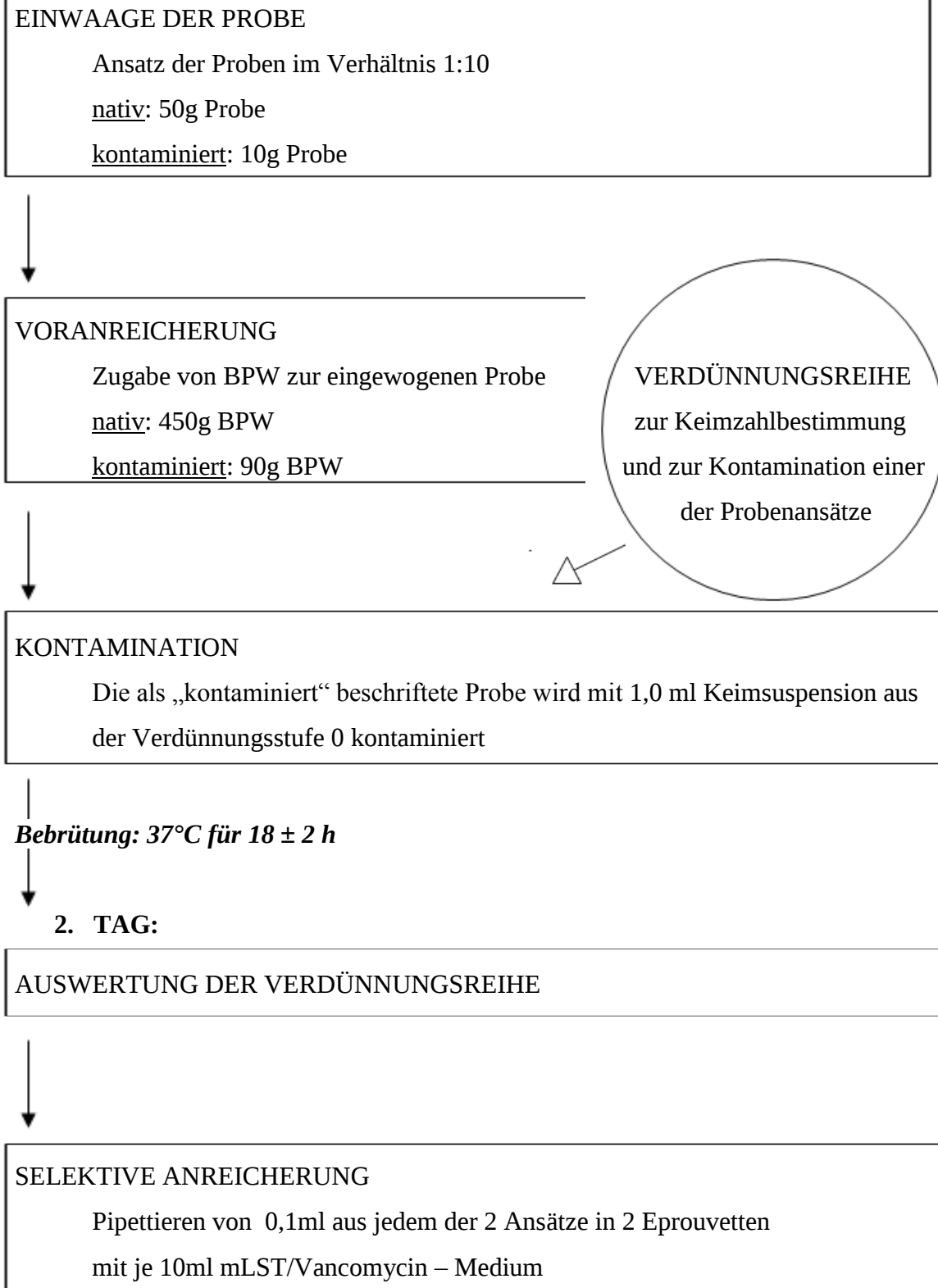
- ✓ Brutschrank (30°C, 37°C, 44°C)
- ✓ Waage
- ✓ Bunsenbrenner
- ✓ Impfösen
- ✓ Sterile Wattestäbchen
- ✓ Steriles Besteck
- ✓ Sterile Glasflaschen (250ml + 1000ml)
- ✓ Glaspipetten (1ml, 10ml, 50ml)
- ✓ Einkanalpipetten (BIOHIT Proline: 5 – 100 µl und 50 – 1200 µl)
- ✓ Pasteurpipetten
- ✓ Pileusball
- ✓ Epruvetten + Epruvettenständer
- ✓ Glasspatel
- ✓ Lichtmikroskop
- ✓ Objektträger
- ✓ Immersionsöl
- ✓ Vortex

REAGENZIEN:

- ✓ API Test- Kit (20E)
- ✓ Vancomycin
- ✓ Oxidaseteststreifen
- ✓ Flächendesinfektionsmittel
- ✓ Aqua dest.
- ✓ Gram-Farbstoffe

3.3.2.2. Schema der Untersuchungsmethode

1. TAG



FORTSETZUNG:

↓
Bebrütung: 44°C für 24 ± 2 h

↓
3. TAG:

KULTIVIERUNG

Fraktionierter Ausstrich mit Öse auf drei Selektivmedien
 CES (nativ + kontaminiert)
 DFI (nativ + kontaminiert)
 ESPM (nativ + kontaminiert)

↓
Bebrütung: 44°C für 24 h (CES)
37°C für 24 h (ESPM + DFI)

↓
4. TAG:

BEURTEILUNG DER FÄRBUNG für *Cronobacter*

CES: türkisfarbene Kolonien
 DFI: blau – grüne Kolonien
 ESPM: blau – grüne bis blau – schwarze Kolonien

↓
VORLÄUFIGE BESTÄTIGUNG

Bei positiver nativer Probe fraktionierter Ausstrich von fünf Kolonien typischen Wachstums auf TSA sowie Ausstrich auf Columbia zur Kolonieentnahme für die Gramfärbung, den Oxidasetest sowie das API 20E

↓
Bebrütung: 30°C für 24 – 48 h (TSA)
37°C für 24 h (COL)

↓

FORTSETZUNG:**5. TAG:****BESTÄTIGUNG**

Wachstum gelb pigmentierter Kolonien bei *Cronobacter spp.*

Identifikation mit Hilfe von Gramfärbung, Oxidasetest und API 20E

↓
Bebrütung: 37°C für 18 – 24 h (API 20E)

**6. TAG:****AUSWERTUNG**

Interpretation der Resultate

Abbildung 12 Schema der Untersuchungsmethode

3.3.2.3. Versuchsdurchführung

Der Untersuchungsablauf der Säuglingsnahrungen gliedert sich in mehrere Stufen und dauert vom Ansatz bis zur Bestätigung sechs Tage.

1. EINWAAGE UND VOR-ANREICHERUNG

Der erste Schritt besteht darin, die Säuglingsnahrungen mittels sterilen Bestecks in sterile Glasflaschen einzuwiegen. Je Probennummer werden zwei Glasflaschen benötigt, da ein Teil der Probe im nachfolgenden Schritt kontaminiert, der andere Teil jedoch nativ weiterbehandelt wird. Das Verhältnis der Probenmenge zum Voranreicherungsmedium ist durch die ISO/TS 22964:2006 mit dem Verhältnis 1:10 vorgegeben.

Um dieses Mischverhältnis zu erzielen, wird zum jeweiligen Ansatz die entsprechende Menge gepuffertes Peptonwasser (BPW) hinzugefügt. Die nun mit Probe und Voranreicherungsmedium befüllten Flaschen werden bis nach

Ausführung der im Anschluss durchgeführten Verdünnungsreihe für die teilweise zu erfolgende Kontamination beiseite gestellt.

Der Sinn des Voranreicherungsschritts in einem nicht-selektiven Nährmedium liegt darin, gestressten Zellen die Möglichkeit zu geben, sich von Verletzungen während der Herstellung oder Zubereitung zu erholen. Dadurch reagieren sie leicht auf selektive Wirkstoffe [DRUGGAN und IVERSEN, 2009].

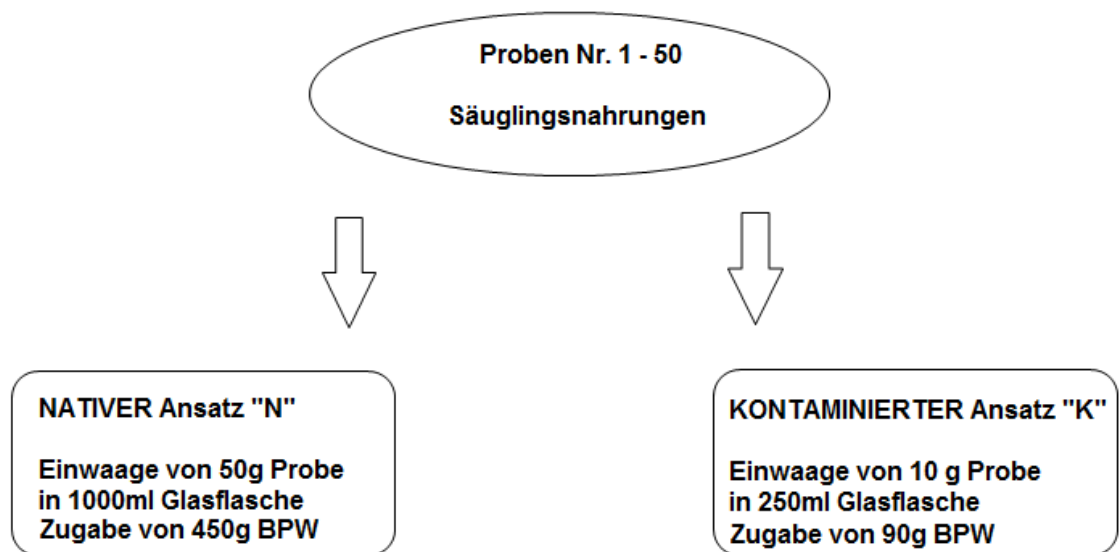


Abbildung 13 Einwaage und Voranreicherung

Herstellung des gepufferten Peptonwassers:

16,1 g des Mediums werden in einem Liter demineralisierten Wassers suspendiert und gut gemischt. Wenn die vollständige Lösung des Mediums erreicht ist, erfolgt das Autoklavieren für 15 min bei 121 °C. Das zubereitete Medium hat eine hellgelbe / beige Farbe und wird allgemein zur Verdünnung und Homogenisierung von Proben zur mikrobiologischen Analyse von Nahrungsmitteln verwendet.

2. ERSTELLEN EINER VERDÜNNUNGSREIHE

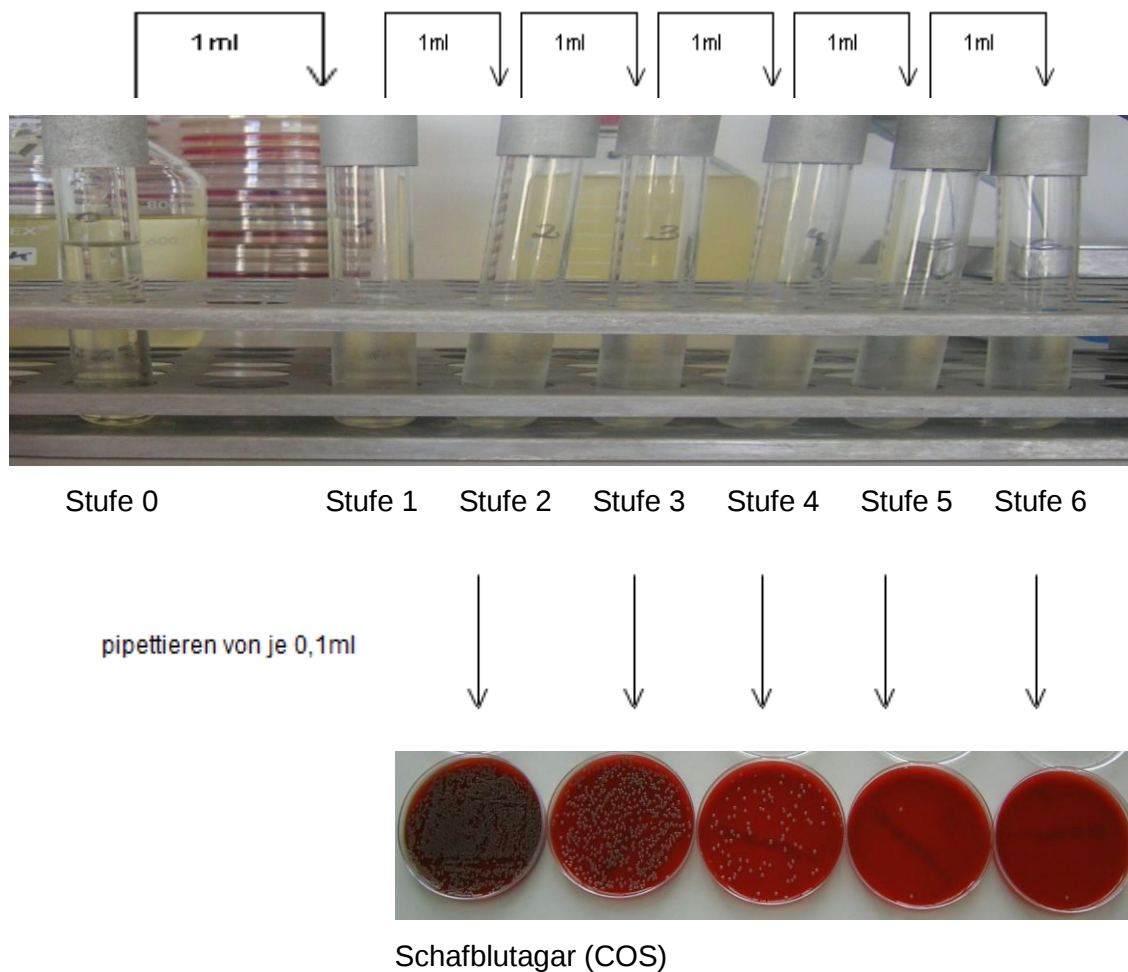


Abbildung 14 Verdünnungsreihe

Das Anlegen einer Verdünnungsreihe ist bei Lebensmitteluntersuchungen unumgänglich. Dadurch werden bei späterer Kultivierung auszählbare Koloniezahlen auf dem Agar erhalten.

Es wird eine dezimale Verdünnungsreihe bis 10^{-6} erstellt. Die Verdünnung der Originalprobe erfolgt im Verhältnis 1:10.

Die Verdünnungsreihe wird mit fünf Referenzstämmen (1, 3, 6, 8, 12) abwechselnd durchgeführt. Bei der Ausgangsstufe (Stufe 0) der Verdünnungsreihe handelt es sich um eine kontaminierte Keimsuspension. Zu ihrer Herstellung wird ein Referenzstamm auf ein Kollektivmedium, in diesem Fall COS, ausgestrichen. Nach eingehaltener Inkubationszeit von 24h bei 37°C erfolgt durch eine ausgeglühte Öse die Zugabe einer größeren Kolonie von

Cronobacter, zu dem sich in der Eprovette zur Herstellung der Stufe 0 befindenden 10 ml Verdünnungsmedium. Nach dem Mischen der nun erzeugten Stufe 0 auf dem Vortex erfolgt die Herstellung von Stufe 10^{-1} durch das Pipettieren von 1 ml aus der Stufe 0 in 9 ml Verdünnungsmedium, welches sich in der Eprovette der Stufe 10^{-1} befindet. Die Erstellung jeder weiteren Verdünnungsstufe erfolgt nach Durchmischung der jeweils zuletzt hergestellten Stufe durch Pipettieren von 1 ml in die jeweils nächste Stufe. Dieses Schema dient der Erzeugung einer immer stärkeren Verdünnung der Originalprobe.

Nachdem alle sechs Verdünnungsstufen hergestellt wurden, erfolgt nach vorheriger Durchmischung ein Pipettieren von 0,1 ml der Stufen 10^{-3} bis 10^{-6} auf Schafblutagar. Die Stufen 10^{-1} und 10^{-2} werden nicht berücksichtigt, da sich nach Vorversuchen zeigt, dass die Konzentration sehr hoch und somit ein Auszählen unmöglich ist.

Unter Anwendung des Oberflächenspatelverfahrens wird die Keimsuspension mit Drigalski-Spateln gleichmäßig auf der Oberfläche des Nährmediums verteilt. Nach einer Inkubationszeit von 24h bei 37°C erfolgen die Auswertung und die Dokumentation der Koloniezahlen.

3. KONTAMINATION

Die Probe und das Voranreicherungsmedium in den im ersten Schritt vorbereiteten Flaschen, welche mit einem „K“ für kontaminiert beschriftet sind, werden nun mit 1,0 ml der Keimsuspension aus der Verdünnungsstufe 0 kontaminiert. Bei den verwendeten Keimen handelte es sich um zuvor definierte Referenzstämme.

Die Flaschen, die mit einem „N“ für nativ versehen sind, werden nicht weiterbehandelt.

Diese Kontamination erfolgt nur auf Stufe der Voranreicherung mit gepuffertem Peptonwasser (BPW), um den Vergleich zwischen den verwendeten unterschiedlichen Nährmedien zu erleichtern.

Beide Ansätze werden bei 37°C für 18 ± 2 h inkubiert.

4. SELEKTIVE ANREICHERUNG

Nach der Inkubationszeit des Voranreicherungsmediums erfolgt die Überführung von 0,1 ml des angereicherten gepufferten Peptonwassers in das modifizierte Laurylsulfat-Tryptose-Bouillon/ Vancomycin-Medium, welches der selektiven Anreicherung dient. Die Inkubationszeit dieses Mediums beträgt 24 ± 2 h bei 44°C .

Zweck der Voranreicherung ist die Vermehrung des Pathogens im Verhältnis zur konkurrierenden Mikroflora [DRUGGAN und IVERSEN, 2009].

Herstellung des mLST/ Vancomycin Mediums

Laurylsulfat-Tryptose-Bouillon (LST) + NaCl:

35,6g des Granulats werden in einem Liter demineralisierten Wassers suspendiert und gut gemischt. Zur Herstellung der modifizierten Laurylsulfat-Tryptose-Bouillon müssen noch 29g Natriumchlorid beigemischt werden. Nach vollständigem Auflösen der Granulate erfolgt die Verteilung des hergestellten Mediums zu jeweils 10ml in Epporovetten. Im Anschluss wird die Lösung für 15 min bei 121°C autoklaviert.

Vancomycin CP 500mg

10 mg des Pulvers werden eingewogen und in 10ml sterilem Wasser aufgelöst. Die Sterilisation der hergestellten Lösung erfolgt durch eine Sterilfiltration. Die Lösung muss im Laufe der Versuchsdurchführung mehrmals hergestellt werden, da die Haltbarkeit in gekühltem Zustand, versetzt mit Wasser, nur 15 Tage beträgt.

Zur letztendlichen Herstellung des mLST/ Vancomycin Mediums werden zu je 10ml der hergestellten modifizierten Laurylsulfat-Tryptose-Bouillon durch Einkanalpipetten je 0,1ml der Vancomycin-Lösung pipettiert. Diese nun vollständig hergestellte Lösung wird sofort verwendet, da sie in gekühltem Zustand nur einen Tag haltbar ist.

5. KULTIVIERUNG AUF SELEKTIVMEDIUM

Nach der Inkubationszeit wird das mLST/ Vancomycin Medium aus dem zweiten Anreicherungs-schritt mit Hilfe einer sterilen Öse auf die zu untersuchenden Nährmedien aufgebracht und fraktioniert ausgestrichen.

Ziel dieses Isolierungsschritts, der das Aufbringen auf ein selektives Nährmedium beinhaltet, ist die Differenzierung des gesuchten Pathogens gegenüber der überlebenden Mikroflora. [DRUGGAN und IVERSEN, 2009].

Folgende Selektivmedien werden verwendet:

Chromocult® *Enterobacter sakazakii* Agar (CES)

Cronobacter: türkisfarbene Kolonien

Begleitbakterien: farblose Kolonien

Inkubation bei 44°C für 24 h

Brilliance™ *Enterobacter sakazakii* Agar (DFI)

Cronobacter: blau-grüne Kolonien

Inkubation bei 37°C für 24 h

ChromID™ *sakazakii* Agar (ESPM)

Cronobacter: blau-grüne bis blau-schwarze Kolonien

Inkubation bei 37°C für 24 h

6. VORLÄUFIGE BESTÄTIGUNG

Nach der Inkubationszeit werden die Nährmedien auf Keimwachstum kontrolliert und bei Wachstum von verdächtigen Kolonien bei nativen Proben erfolgt ein fraktionierter Ausstrich auf Trypton Soja Agar (TSA) zur vorläufigen Bestätigung. Die Inkubation erfolgt bei 30°C für 24 – 48 h. *Cronobacter* sind in den meisten Fällen als typisch gelb pigmentierte Kolonien zu erkennen. Da es sich jedoch in vielen Studien gezeigt hat, dass nicht alle Arten dieses Merkmal aufweisen, erfolgt auch bei negativer Beurteilung dieses gelb pigmentierten Koloniewachstums eine weitere Identifizierung.

7. BESTÄTIGUNG UND AUSWERTUNG

Nach dieser vorläufigen Bestätigung erfolgt ein Aufbringen auf das Kollektivmedium Columbia-Agar und eine Identifizierung durch die Gramfärbung, den Oxidasetest sowie das API 20E.

Die Bedeutung dieses Identifizierungsschrittes, in dem biochemische Methoden meist in Kombination mit serologischen und molekularen Verfahren eingesetzt werden, liegt in der vermutlichen Identifizierung des Pathogens [DRUGGAN und IVERSEN, 2009].

3.3.3. Verwendete Identifikationsmethoden

Im Vorfeld wird das morphologische Erscheinungsbild der verwendeten Referenzstämmen des Instituts für Hygiene und angewandte Immunologie auf CES, DFI und ESPM kontrolliert.

Zur weiteren Überprüfung der Stämme werden eine Gram-Färbung, ein Oxidase-Test sowie ein API 20E durchgeführt.

3.3.3.1. Gram - Färbung

Das Gram-Verhalten der Referenzstämmen sowie verdächtiger Kolonien auf den verwendeten Selektivnährmedien (CES, DFI, ESPM) wird analysiert. Das Ziel der Gram-Färbung ist es, Bakterien in der Lichtmikroskopie zu differenzieren. Die Färbung der Zellwände erlaubt die genauere Klassifikation ihres Aufbaus als auch ihrer Morphologie. Durch die unterschiedliche Zellwandstruktur, im speziellen durch die unterschiedliche Dicke der Mureinschicht, ist eine Differenzierung zwischen gram-positiven (bläulich) und gram-negativen (rötlich), sowie zwischen Kokken und Stäbchen möglich.

Durchführung der Gram-Färbung:

Mit Hilfe einer Pasteurpipette wird ein Tropfen destilliertes Wasser auf einen entfetteten Objektträger pipettiert. Im Anschluss folgen die Entnahme einer Einzelkolonie von einem Kollektivmedium (COS) mit einer sterilen Öse und das Einrühren der Kolonie in den Wassertropfen. Nach Lufttrocknung des Wassertropfens mit dem eingemischten Keim erfolgt die Hitzefixierung des Untersuchungsmaterials, indem der Objektträger dreimal durch die Flamme des Bunsenbrenners gezogen wird. Nach der Hitzefixierung, die nötig ist, um ein Abschwemmen zu verhindern, erfolgt das Färben auf einer Färbewanne.

Anleitung der Färbung:

1. 1 Minute mit Kristallviolett bedecken (Blaufärbung)
2. Abspülen mit Acqua dest.
3. 1 Minute mit Lugolscher Lösung bedecken (Differenzierung)
4. Abspülen mit Acqua dest.
5. Entfärben mit Alkohol
6. Abspülen mit Acqua dest.
7. 1 Minute mit Safraninrot bedecken (Rotfärbung)
8. Abspülen mit Acqua dest.

Es folgt eine lichtmikroskopische Identifizierung. Auf den gefärbten Keim wird ein Tropfen Immersionsöl für die Lichtbrechung geträufelt. Im Anschluss folgt die Betrachtung unter dem Lichtmikroskop bei 100facher Vergrößerung mit Hilfe von Immersionsöl für die Lichtbrechung.

Cronobacter ist ein gram-negatives Stäbchen. Die Weiteridentifikation dieses Keims erfolgte mit Hilfe des Oxidasetests und der Durchführung des API 20 E Identifikationssystems. Dafür wurde der Keim auf Columbia-Agar ausgestrichen und 24h bei 37°C bebrütet.

3.3.3.2. Oxidase-Test

Vor der Durchführung des API 20 E Systems wird ein Oxidase-Test eingesetzt um festzustellen, ob es sich um ein Oxidase-positives oder Oxidase-negatives Bakterium handelt. Generell wird bei Oxidase-negativen Bakterien das API 20 E Testsystem angewandt, während bei Oxidase-positiven das API 20 NE Testsystem verwendet wird.

Da es sich bei *Cronobacter* um ein Oxidase-negatives Bakterium handelt, wird das API 20 E Testsystem durchgeführt. Dieses Testsystem verlangt nach Angaben des Herstellers generell als 21. Reaktionsergebnis zur Identifikation einen Oxidase-Test.

Der Oxidase - Test wird mit speziellen Oxidase - Teststäbchen der Firma Merck durchgeführt.

Das Prinzip des Tests liegt in der Reduktion von organischen Substanzen und der Bildung des dabei entstehenden Kondensationsproduktes Indophenolblau. Diese Reduktion geschieht durch das Cytochromoxidase/ Cytochrom c-System in Anwesenheit von molekularem Sauerstoff.

Die Zusammensetzung der Reaktionszone eines Teststreifens besteht aus 1-Naphthol 1,0 µmol und N,N-Dimethyl-1,4-phenylendiammoniumchlorid 0,1 µmol. Unter Zuhilfenahme einer sterilen Öse wird eine Kolonie vom Kollektivnährmedium (COL) auf den Teststreifen übertragen.

Verfärbt sich der Teststreifen innerhalb von 30 sek blau, so weist dies auf ein Oxidase-positives Bakterium hin.

Spätere Blau-Verfärbungen weisen auf Oxidase-negative Bakterien, wie z.B. *E.coli* hin, da sich diese auch noch nach ca. 30 min blau verfärben können. Diese späten Verfärbungen müssen als negativ gewertet werden.

3.3.3.3. API 20 E Identifikationssystem

Um den Identifikationsvorgang abzuschließen, wird das Testsystem API 20 E der Firma BioMérieux verwendet. Es handelt sich um ein miniaturisiertes, standardisiertes Testsystem für gram-negative und Oxidase-negative Stäbchen durch biochemische Reaktionen. Die Bestandteile eines Testkits sind eine Inkubationswanne mit Deckel, ein Teststreifen, ein Ergebnisblatt und die Reagenzien VP1, VP2, Indol- und TDA-Reagenz, die zur Auswertung des Systems benötigt werden.

TESTDURCHFÜHRUNG:

1. Vorbereitung einer feuchten Kammer

Zur Herstellung einer feuchten Kammer wird in die Näpfchen der Inkubationswanne destilliertes Wasser eingefüllt und im Anschluss wird der Streifen mit den Mikroröhrchen hineingelegt und wie unter Punkt zwei beschrieben beimpft. Die Bebrütung erfolgt nach Beimpfung des Streifens in dieser nun geschlossenen feuchten Wanne.

2. Beimpfen des Teststreifens

Der Teststreifen des API 20 E setzt sich aus 20 Mikroröhrchen zusammen, die Substrate in dehydratisierter Form beinhalten, welche zum Nachweis von Enzymaktivität oder Kohlenhydratfermentation herangezogen werden. Durch die Beimpfung mit einer Keimsuspension werden die Substrate gelöst.

Die Herstellung der Keimsuspension erfolgt folgendermaßen: Mithilfe eines sterilen Wattestäbchens werden Kolonien von einem Kollektivmedium, vorzugsweise COL, entnommen und in 0,85% NaCl-Wasser (steril) überführt und durch Rühren vermischt, bis eine milchig-trübe Suspension entstanden ist. Nach McFarland ist die angerührte Suspension umgehend zu verwenden.

Das Beimpfen der Mikroröhrchen mit der gut gemischten Keimsuspension erfolgt möglichst ohne Luftbläschen mit Hilfe einer Pasteurpipette. Die Befüllung der Röhrchen ist unterschiedlich. Zumeist werden nur die Röhrchen selbst

befüllt. Bei CIT, VP und GEL erfolgt jedoch sowohl die Befüllung der Röhren als auch der Bechergläser. Des Weiteren erfolgt bei den Reaktionen ADH, LDC, ODC, H₂S, URE die Befüllung der Bechergläser mit Paraffinöl, sodass anaerobe Bedingungen entstehen. Nach Beimpfung erfolgt das Verschließen und Bebrüten der Inkubationswanne für 24h bei 37°C.

3. Auswertung

Die Stoffwechselprodukte, die während der Inkubation entstehen, bewirken Farbumschläge, entweder direkt oder nach Reagenzzugabe.

Die biochemischen Reaktionen werden anhand von Farbumschlägen, zum Teil nach Reagenzzugabe (VP1+VP2 Reagenz in VP, James- Reagenz in IND, TDA – Reagenz in TDA), visuell abgelesen und in das Ergebnisblatt eingetragen. Letztlich erfolgt die Auswertung der biochemischen Reaktionen mit einer Software (<https://apiweb.biomerieux.com/>).

3.3.4. Durchführung der Wiederfindungsraten

Die Wiederfindungsraten für die verwendeten Selektivnährmedien CES, DFI und ESPM wurden im Verhältnis zum Referenznährmedium COS, das mit einer Wiederfindungsrate von 100% angenommen wird, mittels Oberflächenspatelverfahren bestimmt.

Vorher wird für die fünf zu testenden Referenzstämme je eine Verdünnungsreihe angelegt. Dafür wird je Stamm eine größere Kolonie von dem dafür bebrüteten Schafblutagar entnommen und in 10ml steriles Wasser überführt. Ausreichende Durchmischung dieser und aller anderen Stufen der Verdünnungsreihe erfolgt am Vortex. Danach wird eine dezimale Verdünnungsreihe bis 10^{-6} erstellt. Im Anschluss erfolgt das Pipettieren von 0,1ml aus den Verdünnungsstufen 10^{-3} bis 10^{-6} auf die vier zu testenden Nährmedien. Die Stufen 10^{-1} und 10^{-2} werden dabei nicht berücksichtigt, da sich in Vorversuchen zeigt, dass sie nicht auszählbar sind. Für jede Verdünnungsstufe eines jeden Stammes werden nun vier verschiedene Nährmedien beimpft. Die Verteilung der Suspension auf den Platten erfolgt mittels Oberflächenspatelverfahren. Nach Bebrütung der Nährmedien bei den jeweiligen Inkubationszeiten erfolgt die Auswertung.

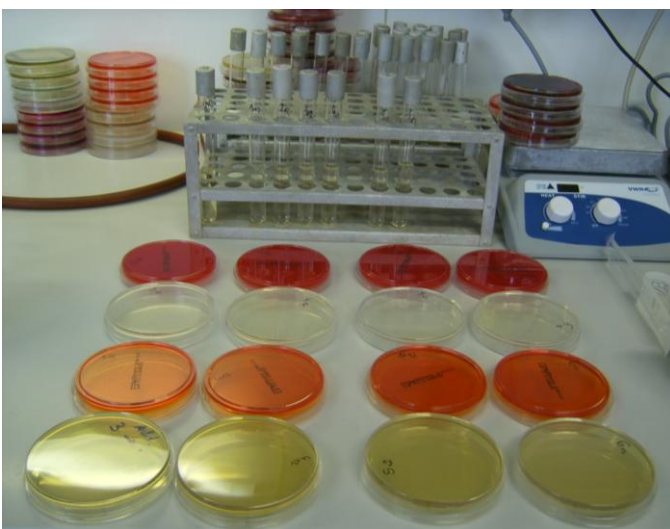


Abbildung 15 Verdünnungsreihe, Wiederfindungsrate und Nährmedien

4. ERGEBNISSE

Im Rahmen dieser Studie werden 50 Lebensmittelproben auf ihre morphologischen und biochemischen Aspekte hin untersucht. Ebenfalls werden Referenzstämme für die Durchführung herangezogen.

4.1. Auswertung der Referenzstämme

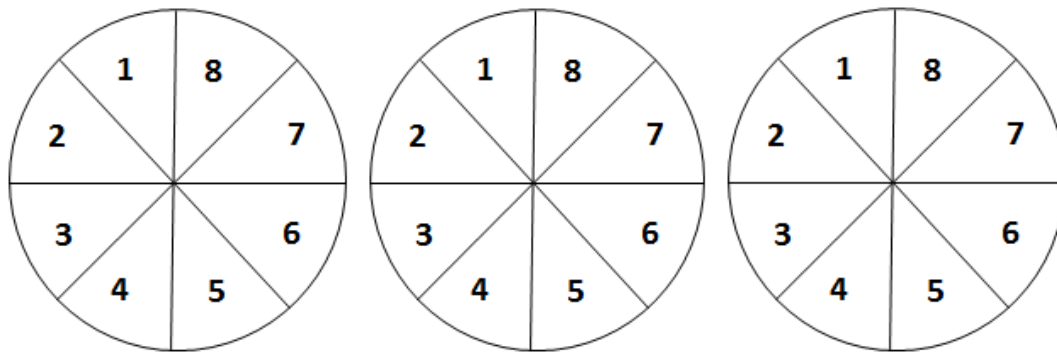
4.1.1. *Cronobacter* Referenzstämme

Die verwendeten Referenzstämme von *Cronobacter* aus der Stammsammlung zeigen folgendes Erscheinungsbild auf den Selektivmedien DFI, ESPM und CES:

Nummer	Art	Bezeichnung	DFI	ESPM	CES
1	<i>Cronobacter</i>	FSM 327	blau - grün	blau – schwarz*	türkis
2	<i>Cronobacter</i>	FSM 311	blau - grün	blau - schwarz*	türkis
3	<i>Cronobacter</i>	FSM 274	blau - grün	blau - schwarz*	türkis
4	<i>Cronobacter</i>	FSM 266	blau - grün	blau - schwarz*	türkis
5	<i>Cronobacter</i>	FSM 493	blau - grün	blau - schwarz*	türkis
6	<i>Cronobacter</i>	FSM 269	blau - grün	blau - schwarz*	türkis
7	<i>Cronobacter</i>	FSM 423	blau - grün	blau - schwarz*	türkis
8	<i>Cronobacter</i>	FSM 302	blau - grün	blau - schwarz*	türkis
9	<i>Cronobacter</i>	FSM 323	blau - grün	blau - schwarz*	türkis
10	<i>Cronobacter</i>	FSM 292	blau - grün	blau - schwarz*	türkis
11	<i>Cronobacter</i>	FSM 271	blau - grün	blau - schwarz*	türkis
12	<i>Cronobacter</i>	FSM 265	blau - grün	blau - schwarz*	türkis

* Der Agar hat sich von der Ausgangsfarbe orange nach pink verfärbt

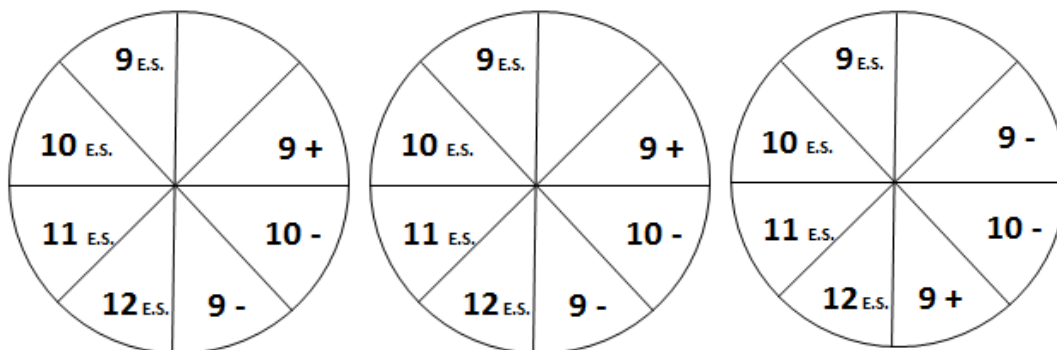
Tabelle 17 *Cronobacter* auf DFI, ESPM und CES



DFI

ESPM

CES



DFI

ESPM

CES

Abbildung 16 *Cronobacter*, gram-negative und gram-positive Stämme auf DFI, ESPM und CES

4.1.1.1. Erscheinungsbild auf DFI

Die getesteten Referenzstämme zeigen auf Brillance™ *Enterobacter sakazakii* Agar das für *Cronobacter* typische blau-grüne Koloniewachstum.

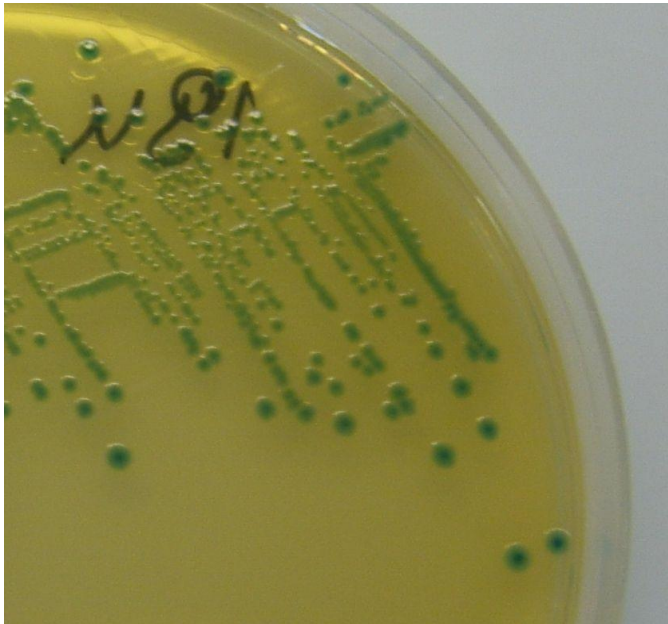


Abbildung 17 *Cronobacter* auf DFI

4.1.1.2. Erscheinungsbild auf ESPM

Das charakteristische blau-schwarze Wachstum auf dem ChromID™ *Sakazakii* Agar (ESPM) ist deutlich erkennbar.



Abbildung 18 *Cronobacter* auf ESPM

4.1.1.3. Erscheinungsbild auf CES

Die intensive türkise Farbreaktion von *Cronobacter* ist auf dem Chromocult® *Enterobacter sakazakii* Agar (CES) gut sichtbar.

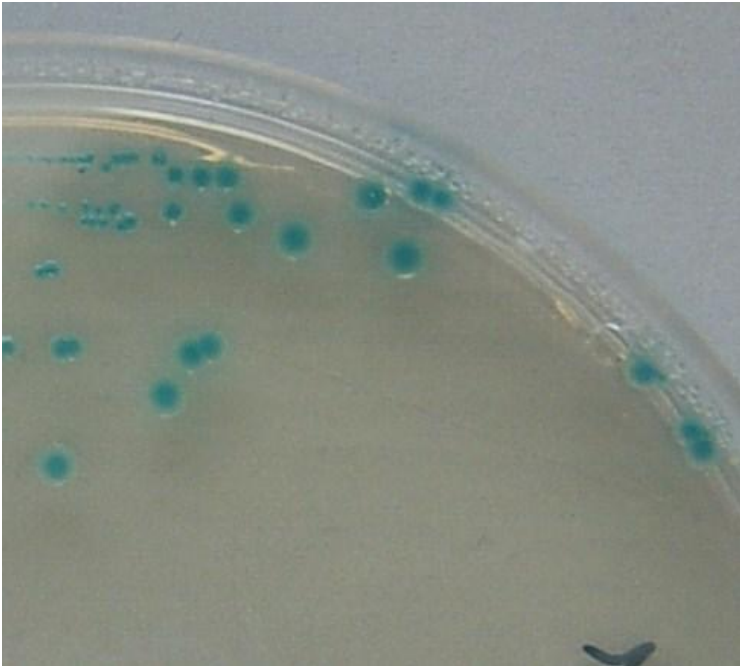


Abbildung 19 *Cronobacter* auf CES

Um das Erscheinungsbild der verwendeten Referenzstämmen von *Cronobacter* zu testen, werden die Referenzstämmen auf die zu verwendenden Selektivmedien DFI, ESPM und CES ausgestrichen. Alle Stämme zeigen ein sehr gutes Wachstum und die erwartete Farbe der Kolonien ist gut zu erkennen.

4.1.2. Weitere Referenzstämme

Die gram - negativen Stämme aus der Stammsammlung zeigen folgendes Erscheinungsbild auf den Selektivmedien DFI, ESPM und CES:

Nummer	Art	Bezeichnung	DFI	ESPM	CES
1	<i>Escherichia coli</i>	ATCC 11775	Weiß-gelb pigmentiert	weiß – gelb pigmentiert*	grün pigmentiert
2	<i>Citrobacter freundii</i>	ATCC 8090	schwarz u. weißer Hof	weiß – gelb pigmentiert*	weiß
3	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ATCC 13883	Weiß-gelb pigmentiert	weiß – gelb pigmentiert*	weiß
4	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	ATCC 23055	kein Wachstum	Kein Wachstum	kein Wachstum
5	<i>Kluyvera ascorbata</i>	ATCC 33433	Weiß-grün pigmentiert	Dunkelblau +	weiß
6	<i>Enterobacter cloace</i>	ATCC 13047	Weiß-gelb pigmentiert	weiß – gelb pigmentiert*	grün pigmentiert
7	<i>Enterobacter cloace</i>	ATCC 49141	Weiß-gelb pigmentiert	weiß – gelb pigmentiert*	leicht grün pigmentiert
8	<i>E. coli</i> 0157:H7	ATCC 43894	Weiß-gelb pigmentiert	Weiß +	leicht grün pigmentiert
9	<i>Salmonella typhimurium</i>	ATCC 14028	schwarz u. weißer Hof	weiß – gelb pigmentiert*	weiß
10	<i>Salmonella enteritidis</i>	ATCC 13076	schwarz u. weißer Hof	weiß – gelb pigmentiert*	weiß

* Der Agar hat sich von der Ausgangsfarbe orange nach gelb verfärbt

+ Der Agar hat sich von der Ausgangsfarbe orange nach pink verfärbt

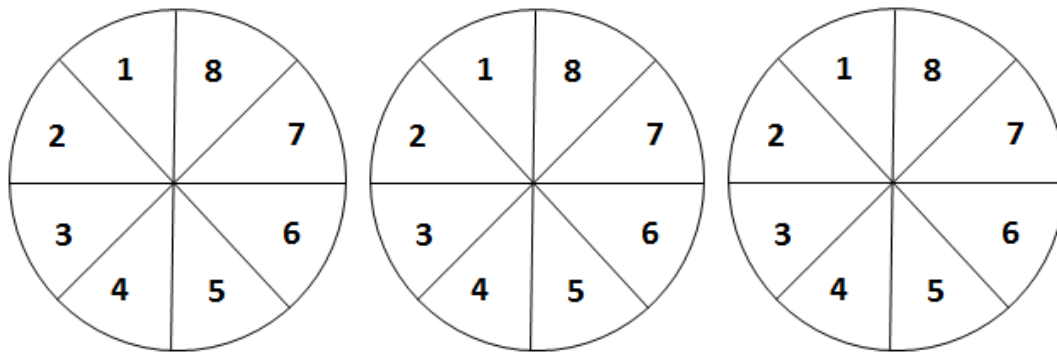
Tabelle 18 gram - negative Stämme auf DFI, ESPM und CES

Die gram - positiven Stämme aus der Stammsammlung zeigen folgendes Erscheinungsbild auf den Selektivmedien DFI, ESPM und CES:

Nummer	Art	Bezeichnung	DFI	ESPM	CES
1	<i>Bacillus cereus</i>	ATCC 11778	k.W.	k.W	k.W
2	<i>Bacillus pumilus</i>	ATCC 27142	k.W	k.W	k.W
3	<i>Bacillus subtilis</i>	ATCC 6051	k.W	k.W	k.W
4	<i>E. faecium</i>		k.W	k.W	k.W
5	<i>E. faecalis</i>	ATCC 29212	k.W	türkis	k.W
6	<i>S. aureus</i>	ATCC 25923	k.W	k.W	k.W
7	<i>S. aureus</i>	NCTC 1803	k.W	k.W	k.W
8	<i>S. caprae</i>		türkis	türkis	leicht türkis
9	<i>S. lentus</i>		weiß	k.W	leicht weiß

k.W. = kein Wachstum

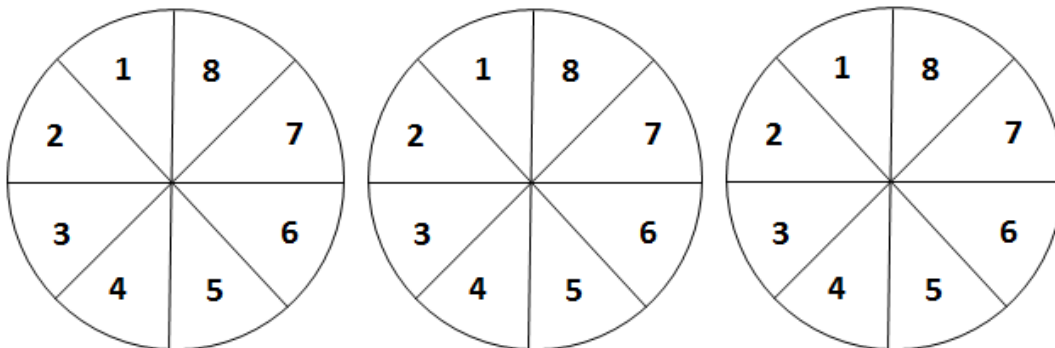
Tabelle 19 gram - positive Stämme auf DFI, ESPM und CES



DFI

ESPM

CES

Abbildung 20 gram-negative Stämme auf DFI, ESPM und CES

ESPM

DFI

CES

Abbildung 21 gram-positive Stämme auf DFI, ESPM und CES

Um einen Vergleich zwischen *Cronobacter* und anderen gram-negativen und gram-positiven Bakterienstämmen der Stammsammlung zu erstellen, werden diese ebenfalls auf den Selektivmedien ausgestrichen. Es zeigten sich auf den Nährmedien keine Ähnlichkeiten in Wachstum und Farbgebung mit Ausnahme von *Kluyvera ascorbata* auf dem Nährmedium ESPM, was ein falsch positives Ergebnis bedeutet.

4.2. Auswertung der Lebensmittelproben

4.2.1. Verteilung der Proben

Bei der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Lebensmitteluntersuchung, die sich auf die Methode des internationalen Standards ISO/TS 22964: 2006 - IDF/RM 210 stützt, werden durchwegs Säuglingsnahrungen untersucht. Dabei handelt es sich zu 40% (n = 20) um Milchbrei, zu 30% (n = 15) um Anfangsnahrung und zu 30% (n = 15) um Folgenahrung. Die Proben wurden in Wien und Rom in den handelsüblichen Verpackungsgrößen gekauft beziehungsweise als Probepackungen von verschiedenen Firmen zugesandt.

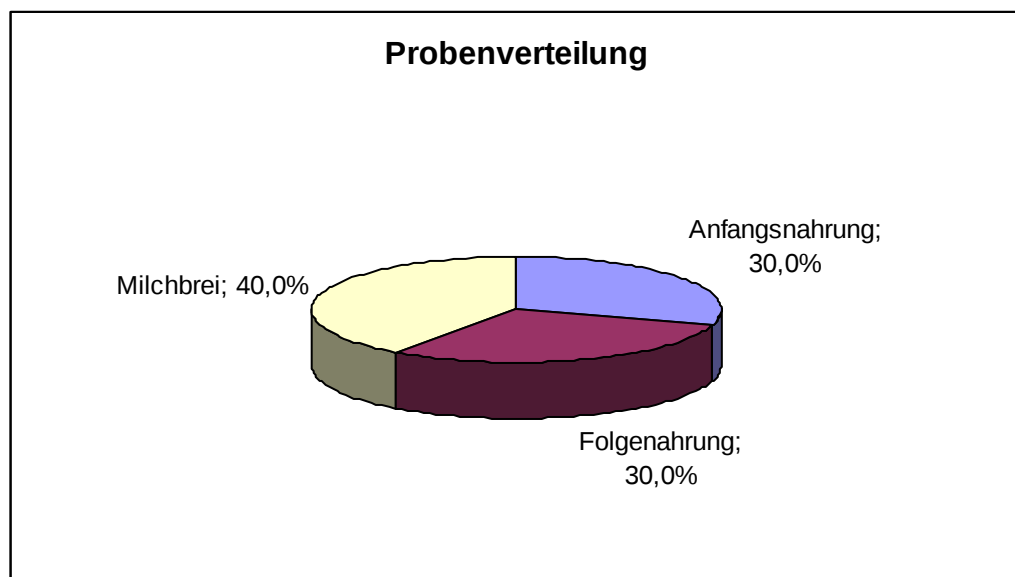


Abbildung 22 Probenverteilung in Prozent

4.2.2. Beurteilung der Proben

Eine Lebensmittelprobe wird in dieser Untersuchung dann als positiv bewertet, wenn *Cronobacter* auf mindestens einem Nährmedium als positiv identifiziert wird. Von den untersuchten Säuglingsnahrungen kann jedoch keine als richtig positiv bewertet werden und nur eine Probe zeigt auf sämtlichen Selektivmedien ein richtig negatives Ergebnis.

Säuglingsnahrungen gelten im Allgemeinen als keimarm, dennoch wurde in den letzten Jahren immer wieder *Cronobacter* nachgewiesen.

4.2.3. Beurteilung der nativen Proben

4.2.2.1. Gesamtbeurteilung

Nach erfolgter Voranreicherung und selektiver Anreicherung wird das angereicherte flüssige Medium auf die Selektivmedien DFI, ESPM und CES fraktioniert ausgestrichen. Nur 2% der Proben ($n = 1$) zeigen dabei ein richtig negatives Wachstum eines gram-negativen Keimes. Die restlichen 98% ($n = 49$) der untersuchten Säuglingsnahrungen zeigen weder Wachstum von *Cronobacter* noch für einen anderen Keim.

	richtig positiv	falsch positiv	richtig negativ	falsch negativ
Summe	0	0	1	0

Tabelle 20 Gesamtbeurteilung

Im Normalfall sollten mit Hilfe der identifizierten Keime die Sensitivität, die Spezifität als auch die Effizienz berechnet werden, da aber keine richtig positiven, falsch positiven und falsch negativen Ergebnisse erzielt werden, kann die Berechnung nicht durchgeführt werden.

THEORETISCHER RECHENWEG:

$$\text{Sensitivität (\%)} = \frac{\text{richtig positiv} \times 100}{\text{richtig positiv} + \text{falsch negativ}}$$

$$\text{Spezifität (\%)} = \frac{\text{richtig negativ} \times 100}{\text{richtig negativ} + \text{falsch positiv}}$$

$$\text{Effizienz (\%)} = \frac{(\text{richtig positiv} + \text{richtig negativ}) \times 1000}{\text{Probenanzahl}}$$

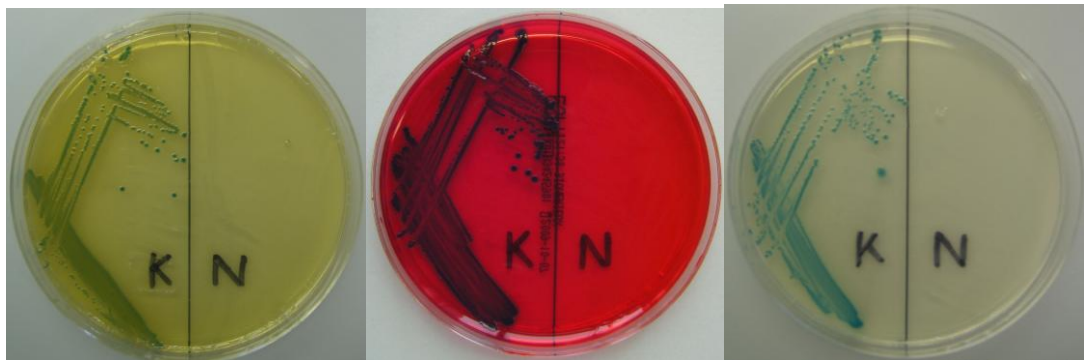


Abbildung 23 DFI, ESPM und CES; „K“ = kontaminiert, „N“ = nativ

4.2.2.2. Beurteilung der Milchbreie

Es erweisen sich auf allen drei verwendeten Selektivmedien von 20 getesteten Milchbreien lediglich 5% (n = 1) als falsch positiv. Die restlichen 95% (n = 19) zeigen keinerlei Keimwachstum. Bei diesem positiven Resultat handelt es sich um das Bakterium *Serratia ficaria* aus einem Früchtemilchbrei der Firma BEBIVITA.

	richtig positiv	falsch positiv	richtig negativ	falsch negativ
Summe	0	0	1	0

Tabelle 21 Beurteilung der Milchbreie

4.2.2.3. Beurteilung der Anfangsnahrungen

Von den 15 getesteten Anfangsnahrungen kann bei keiner einzigen ein Keimwachstum festgestellt werden. Das bedeutet 100% (n = 15) sind als nicht nachweisbar zu werten.

	richtig positiv	falsch positiv	richtig negativ	falsch negativ
Summe	0	0	0	0

Tabelle 22 Beurteilung der Anfangsnahrungen

4.2.2.4. Beurteilung der Folgenahrungen

Die 15 getesteten Folgenahrungen zeigen dasselbe Ergebnis wie die Anfangsnahrungen. Die gesamten 100% (n = 15) zeigen kein Wachstum und werden daher nicht in die Wertung mit einbezogen.

	richtig positiv	falsch positiv	richtig negativ	falsch negativ
Summe	0	0	0	0

Tabelle 23 Beurteilung der Folgenahrungen

4.2.4. Beurteilung der kontaminierten Proben

Der Teil der Proben, die absichtlich kontaminiert wurden zeigten durchwegs ein Wachstum von *Cronobacter*. Das bedeutet, dass bei 100% (n = 50) der kontaminierten Säuglingsnahrungen ein richtig positives Ergebnis erzielt wird.

	richtig positiv	falsch positiv	richtig negativ	falsch negativ
Summe	50	0	0	0

Tabelle 24 Beurteilung der kontaminierten Proben

4.3. Auswertung der Identifikationsmethoden

Da keine einzige der untersuchten Säuglingsnahrungen ein richtig positives Ergebnis zeigt, können nur die Referenzstämme nachgewiesen werden.

4.3.1. Gram – Färbung

Die Färbung der Referenzstämme weist das zu erwartende Ergebnis auf. Unter dem Lichtmikroskop ist das gram-negative Stäbchenbakterium gut erkennbar.

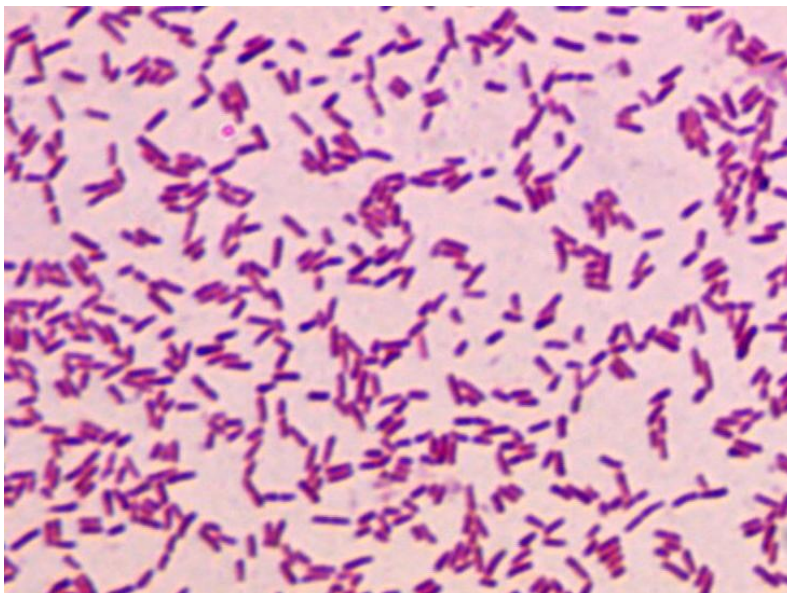


Abbildung 24 Gram-Färbung *Cronobacter*

4.3.2. Oxidase-Test

Zur weiteren Identifikation der Stämme wird der Oxidase-Test mit Hilfe spezieller Teststreifen durchgeführt. Alle getesteten Referenzstämme weisen innerhalb von 30 sek eine blaue Verfärbung des Streifenteils auf, auf dem die Kolonien aufgetragen sind. Sie können somit wie angenommen als Oxidase-positiv identifiziert werden.

4.3.3. API 20 E Identifikationssystem

Eine weitere Überprüfung findet durch das API 20 E Testsystem statt, welches als 21. Reaktionsergebnis den Oxidase-Test verlangt.

Die verwendeten Referenz-*Cronobacter*-Stämme können durch die biochemischen Reaktionen des API 20 E Identifikationssystems mit Hilfe einer Software (<https://apiweb.biomerieux.com/>) zu Prozentsätzen zwischen 54,3% und 99,9% bestätigt werden.

Der etwas niedrigere Prozentsatz von 54,3% ist auf die negative ODC-Reaktion zurückzuführen. Diese Reaktion ist in der Regel bei 91% von *Cronobacter* positiv.

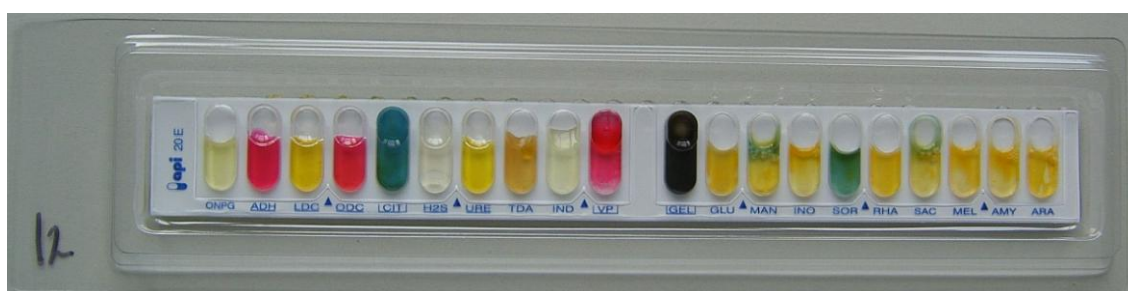


Abbildung 25 API 20 E Streifen (Referenzstamm 12)

 A photograph of the API 20 E result sheet for reference strain 12. The sheet contains a grid of 20 wells, each with a handwritten result. The results are: 1. +, 2. +, 3. -, 4. +, 5. +, 6. -, 7. -, 8. -, 9. +, 10. +, 11. +, 12. +, 13. +, 14. +, 15. +, 16. +, 17. +, 18. +, 19. +, 20. -. The sheet is labeled 'API 20 E' and '12' is handwritten on the left. The results are summarized as: 3, 3, 0, 7, 3, 7, 3. The sheet also contains a table of tests and their results, and a section for identification.

Test	Result
ONPG	+
ADH	+
LDC	-
ODC	+
LCIT	+
H ₂ S	-
URE	-
TDA	-
IND	-
LVP	+
GEL	+
GLU	+
MAN	+
INO	+
SOR	+
RHA	+
SAC	+
MEL	+
AMY	+
ARA	+
OX	-
NO ₂	-
N ₂	-
MOB	-
McC	-
OF-O	-
OF-F	-

Autres tests / Other tests / Andere Tests /
Otras pruebas / Altri test / Outros testes /
Άλλες εξετάσεις / Andra tester /
Andre tests / Inne testy :

Ident. / Ταυτοποίηση : *E. sakazakii* 12 Oxd. ⊖
% APIWEB : 99,9%

Abbildung 26 API 20 E Ergebnisblatt (Referenzstamm 12)

4.4. Auswertung der Wiederfindungsraten

Nach der Bebrütung der Selektivmedien CES, DFI, ESPM und des Referenzmediums COS zu den jeweiligen Inkubationszeiten erfolgt die Auswertung und Angabe der Ergebnisse.

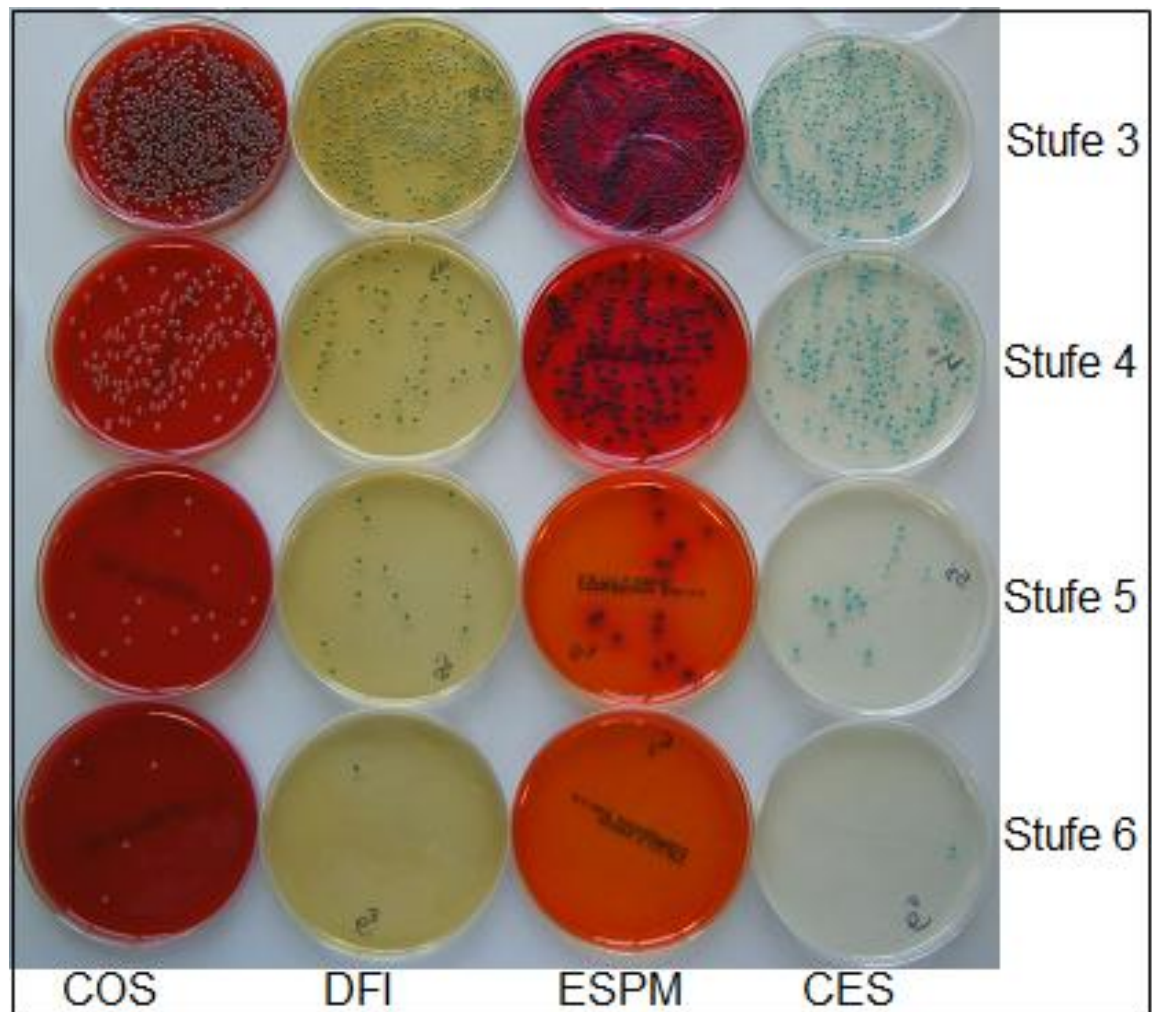


Abbildung 27 Wiederfindungsrate von Referenzstamm 3

Die Angabe der Ergebnisse erfolgt in Prozent, welche sich aus den berechneten Mittelwerten der fünf verwendeten Referenzstämme im Bezug auf COS (100%) ergeben.

4.4.1. Durchschnittswerte aller Wiederfindungsraten

Bei der Berechnung des Mittelwerts der Wiederfindungsraten für jedes Nährmedium im Vergleich zu COS mit 100% zeigt ESPM mit 70,9%, gefolgt von DFI mit 68,5% und CES mit 66,4% die beste Wiederfindungsrate.

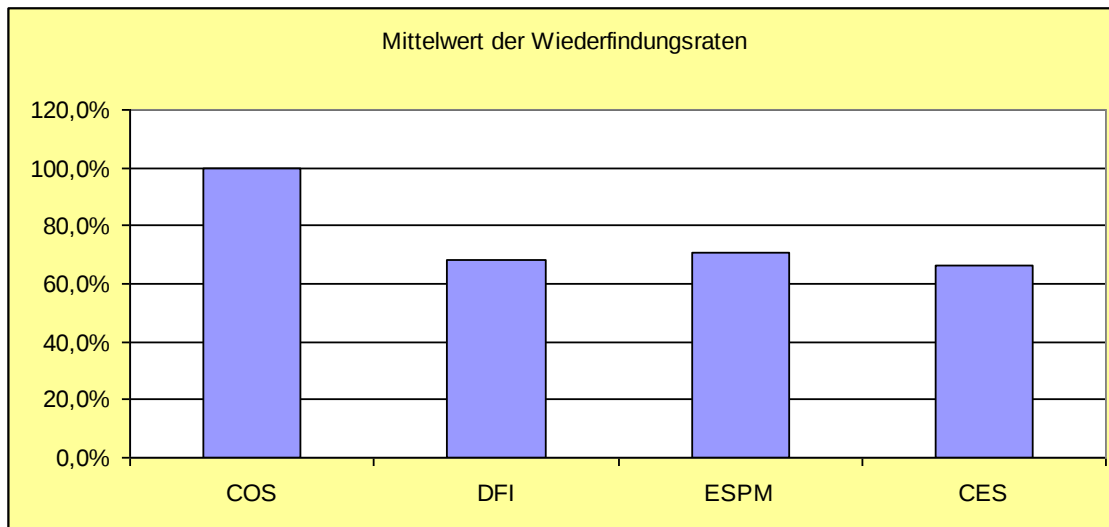


Abbildung 28 Prozentuelle Angabe des Mittelwerts der Wiederfindungsraten von *Cronobacter*; Selektivmedien im Verhältnis zum Referenzmedium

	COS	DFI	ESPM	CES
Mittelwert KBE	$116,38 \times 10^5$	$79,72 \times 10^5$	$82,48 \times 10^5$	$77,24 \times 10^5$
Mittelwert KBE %	100,0%	68,5%	70,9%	66,4%

Tabelle 25 Mittelwerte der KbE

4.4.2. Wiederfindungsrate auf CES

Die für die Wiederfindungsrate relevante Koloniebildung von *Cronobacter* wird auf dem Chromocult® Enterobacter *sakazakii* Agar nach einer Bebrütungszeit von 24h bei 44°C ausgewertet.

Im Vergleich zum Referenzmedium COS (= 100%) zeigt CES Agar eine Wiederfindung zwischen 53,6% (*Cronobacter* Stamm Nr. 6) und 91,0% (*Cronobacter* Stamm Nr. 12). Diese berechneten Werte der Selektivmedien liegen wie erwartet unter den angenommenen 100% des Kollektivmediums. Im Durchschnitt ergibt sich durch die Auswertung der Selektivmedien eine Wiederfindungsrate von 66,4%.

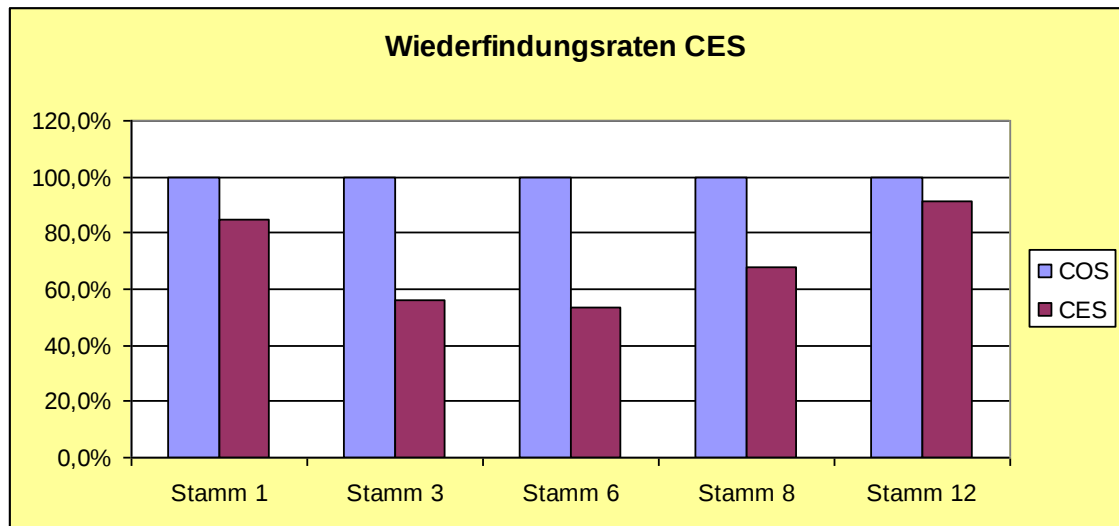


Abbildung 29 Wiederfindungsraten verschiedener *Cronobacter* –Stämme bei 44°C für 24h auf CES im Vergleich zu COS.

	COS	COS %	CES	CES %
Stamm 1	94,20 x 10 ⁵	100,0%	79,70 x 10 ⁵	84,6%
Stamm 3	218,90 x 10 ⁵	100,0%	122,80 x 10 ⁵	56,1%
Stamm 6	127,50 x 10 ⁵	100,0%	68,40 x 10 ⁵	53,6%
Stamm 8	57,00 x 10 ⁵	100,0%	38,60 x 10 ⁵	67,7%
Stamm 12	84,30 x 10 ⁵	100,0%	76,70 x 10 ⁵	91,0%

Tabelle 26 Tatsächlich ausgezählte KbE und KbE in %; CES im Vergleich zu COS

4.4.3. Wiederfindungsrate auf DFI

Die Wiederfindungsraten auf Brillance™ *Enterobacter sakazakii* Agar nach einer Bebrütung von 24 h bei 37°C liegen zwischen 40,6% (*Cronobacter* Stamm Nr. 3) und 131,4% (*Cronobacter* Stamm Nr. 8).

Im Durchschnitt ergibt sich aus den Werten eine Wiederfindungsrate von 68,5%.

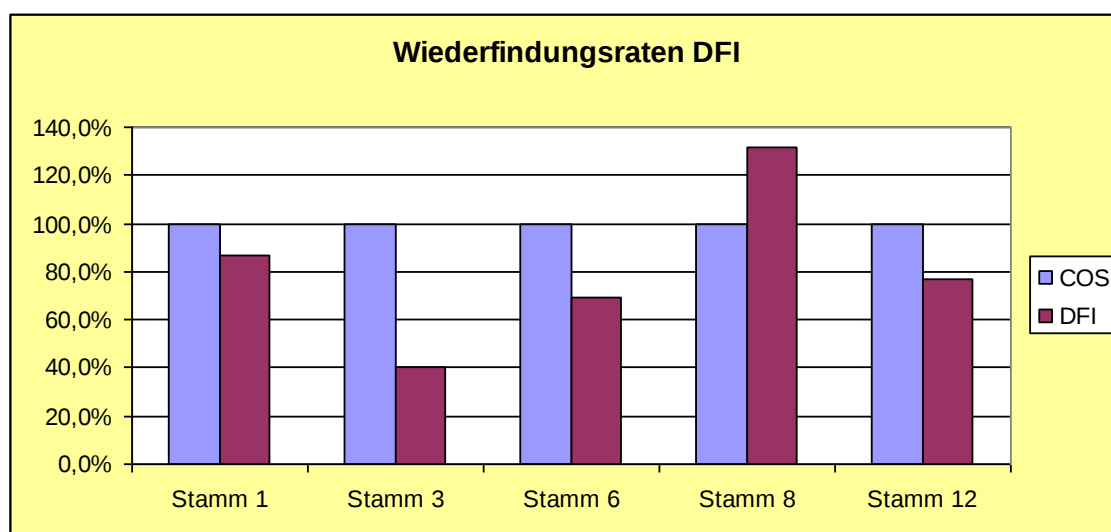


Abbildung 30 Wiederfindungsraten verschiedener *Cronobacter* –Stämme bei 37°C für 24h auf DFI im Vergleich zu COS

	COS	COS %	DFI	DFI %
Stamm 1	94,20 x 10 ⁵	100,0%	81,70 x 10 ⁵	86,7%
Stamm 3	218,90 x 10 ⁵	100,0%	88,80 x 10 ⁵	40,6%
Stamm 6	127,50 x 10 ⁵	100,0%	88,30 x 10 ⁵	69,3%
Stamm 8	57,00 x 10 ⁵	100,0%	74,90 x 10 ⁵	131,4%
Stamm 12	84,30 x 10 ⁵	100,0%	64,90 x 10 ⁵	77,0%

Tabelle 27 Tatsächlich ausgezählte KbE und KbE in %; DFI im Vergleich zu COS

4.4.4. Wiederfindungsrate auf ESPM

Nach einer Inkubationszeit von 24h und 37°C schwanken die Wiederfindungsraten auf ChromID™ *sakazakii* Agar zwischen 51,2% (*Cronobacter* Stamm Nr. 12) und 108,1 % (*Cronobacter* Stamm Nr. 8). Die im Durchschnitt berechnete Wiederfindungsrate für ESPM beläuft sich auf einen Wert von 70,9 %.

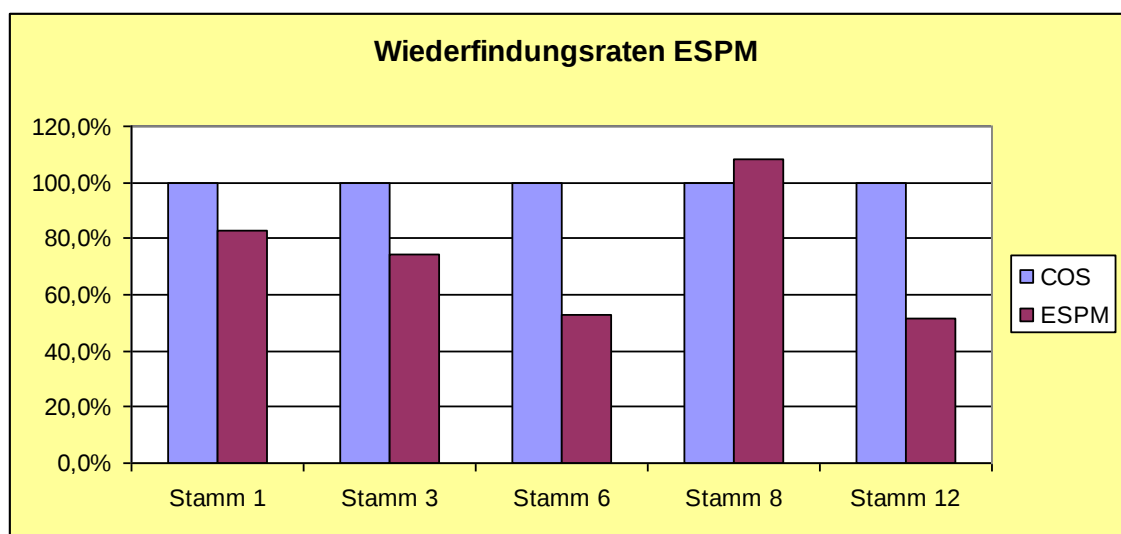


Abbildung 31 Wiederfindungsraten verschiedener *Cronobacter* –Stämme bei 37°C für 24h auf ESPM im Vergleich zu COS

	COS	COS %	ESPM	ESPM %
Stamm 1	94,20 x 10 ⁵	100,0%	77,90 x 10 ⁵	82,7%
Stamm 3	218,90 x 10 ⁵	100,0%	162,70 x 10 ⁵	74,3%
Stamm 6	127,50 x 10 ⁵	100,0%	67,00 x 10 ⁵	52,5%
Stamm 8	57,00 x 10 ⁵	100,0%	61,60 x 10 ⁵	108,1%
Stamm 12	84,30 x 10 ⁵	100,0%	43,20 x 10 ⁵	51,2%

Tabelle 28 Tatsächlich ausgezählte KbE und KbE in %; ESPM im Vergleich zu COS

5. DISKUSSION

Bei keiner der im Rahmen dieser Untersuchung getesteten, auf Milchpulver basierenden, pulverförmigen Breien, Anfangsnahrungen sowie Folgenahrungen kann der positive Nachweis von *Cronobacter* erbracht werden.

Aufgrund der Abwesenheit des Keims in den analysierten Säuglingsnahrungen fehlt in der vorliegenden Studie eine Aussage über die Sensitivität, Spezifität und Effizienz der chromogenen Selektivmedien Chromocult® *Enterobacter sakazakii* Agar (CES), Brillance™ *Enterobacter sakazakii* Agar (DFI) und ChromID™ *sakazakii* Agar (ESPM).

5.1. Voruntersuchung

Bei dem zu Beginn der Studie durchgeführten Wachstumstest der Stammsammlung von *Cronobacter* auf den Selektivmedien wird das erwartete Ergebnis bezüglich des morphologischen Verhaltens erzielt.

Bei einer weiteren Überprüfung, um einen Vergleich der Referenzstämme zur gram-positiven als auch zur gram-negativen Stammsammlung zu erhalten, kann nur bei einem Stamm ein ähnliches Farbverhalten festgestellt werden. Dabei handelt es sich um die Art *Kluyvera ascorbata* (ATCC 33433), welche auf dem Nährmedium ESPM dasselbe dunkelblaue Wachstum wie *Cronobacter* aufweist. Alle anderen gram-negativen Stämme zeigen ein anderes morphologisches Verhalten und fast sämtliche gram-positiven Stämme weisen aufgrund von Zusätzen zu den Nährmedien, die eine Begleitflora unterdrücken sollen, wie erwartet kein Wachstum auf.

5.2. Probenuntersuchung

Nahrungsmittel für Säuglinge in Form von Trockenmilchprodukten sind zwar keimarm, aber nicht steril. Durch die große Gefahr, die *Cronobacter* für Säuglinge darstellt, kommt einfachen, schnellen und selektiven Detektionsmethoden eine große Bedeutung zu.

Die ursprünglichen, allgemein für *Enterobacteriaceae* verwendeten Nachweismethoden, haben ihre Limitierung im Bezug auf hohe Temperaturbereiche, Pigmentproduktion und Identifizierung nach phänotypischen Schemata. Darum wurden die ursprünglichen Methoden verbessert, wobei die derzeit international angewendeten Verfahrensweisen das Ergebnis von Ringversuchen und eines immer fundierteren Wissens über das Bakterium sind. Die physiologischen Charakterzüge von *Cronobacter*, wie zum Beispiel seine bemerkenswerte Resistenz gegenüber osmotischem Stress werden in der Entwicklung von selektiven Nährmedien ausgenutzt. So beinhalten die Nährmedien mLST 0,5M NaCl, da *Cronobacter* resistenter gegen osmotischen Stress ist als andere *Enterobacteriaceae* oder CSB 10% Sucrose, wobei festgestellt wurde, dass die meisten α -Glucosidase-positiven Nicht-*Cronobacter*-Stämme nicht fähig sind, Sucrose zu verwerten.

Der Einsatz, die Entwicklung und Verbesserung von fluorogenen, insbesondere aber von chromogenen Nährmedien hat die Leistungsfähigkeit von neuen Methoden durch erhöhte Spezifität und Sensitivität um ein Vielfaches erhöht.

Gleichzeitig mit der Modifikation der Nährmedien findet auch eine Optimierung der Nachweisschemata statt. Die Annahme neuerer Prozeduren ist jedoch nicht immer einfach. So ist es schwer, Firmen von einem aus der Notwendigkeit einer internationalen Nachweismethode entwickelten, unausgereiften und verbesserungsbedürftigen Detektionsverfahren nach FDA wieder abzubringen. Der Grund ist, dass dieses Schema sehr zeitaufwändig (~7Tage) und wegen der großen Probenzahl sehr aufwändig ist (3x100g, 3x10g, 3x1g). Es gewährleistet keinen sicheren fehlerfreien Nachweis und durch die Bildung von gelben Pigmenten der Kolonien ist die Spezifität, Sensitivität und Genauigkeit herabgesetzt.

Eine enorme Zeitersparnis kann bereits durch die modifizierte Methode nach FDA erzielt werden, da hier zum Nachweis nur 24 – 48h nötig sind.

Trotz Einarbeitung mehrerer moderner mikrobiologischer Nachweismethoden besteht die Notwendigkeit der Optimierung auch für das in der vorliegenden Untersuchung verwendete, zurzeit als kulturelle Referenzmethode geltende Verfahren nach ISO/TS 22964:2006. Gründe sind vor allem der auf den Nahrungsmittelbestandteil Milchpulver eingeschränkte Anwendungsbereich sowie die Gelbpigmentierung, welche nicht länger als Identifikationsmerkmal verwendet wird. In manchen Fällen ist nicht einmal der Nachweis aus Milchpulver gewährleistet. Insbesondere soll der Anwendungsbereich der Methode auf andere Lebensmittel ausgedehnt werden. Die derzeit verwendeten Nährmedien mLST und ESIA sind zu selektiv, darum werden Alternativen gesucht. Weiters soll die Zeitspanne, die für die Nachweisprozedur nötig ist, verkürzt werden. Nach einer offiziellen Validierung soll der zurzeit in Überarbeitung befindliche verbesserte neue Standard zur Untersuchung von *Cronobacter* 2012 eingeführt werden.

Bei genauer Betrachtung bisher veröffentlichter mikrobiologischer Methoden sind die vorhergesehenen Zeitspannen, die zur Prozedur des Nachweises nötig sind, immer noch langwierig, besonders im Vergleich zu molekularen Methoden. Obwohl es Optimierungen der kommerziell erhältlichen Detektionssysteme gibt, sind weitere Verbesserungen für die Differenzierung und Identifizierung unumgänglich.

Im Lauf der vorliegenden Untersuchung kann *Cronobacter* in keiner einzigen Probe nachgewiesen werden und nur eine native Probe zeigt das Wachstum eines anderen Bakteriums. Das bedeutet ein richtig negatives Ergebnis. Bei dem aufgefundenen Keim handelt es sich um *Serratia ficaria*, einem gram-negativen Stäbchenbakterium der Familie *Enterobacteriaceae* aus einem Fruchtemilchbrei der Firma BEBIVITA. Da der bevorzugte Lebensraum der *Serratia* – Arten die Darmflora ist, könnte es sich um eine Fäkalverunreinigung durch inadäquate Handhabung der betroffenen Säuglingsnahrung handeln.

Das allgemeine Fehlen von *Cronobacter* lässt auf ein gut funktionierendes Pasteurisierungsverfahren, sowie adäquate Hygiene-, Kontroll- und Gegenmaßnahmen bei einer Kontamination bei der Herstellung von Säuglingsnahrungsmitteln schließen. Ein besonderes Augenmerk ist dabei auf die Handhabung und Abfüllung der Produkte zu legen, da es vor allem hier zur Rekontamination kommen kann. Die Trennung von Zwischenprodukten, eine strenge Zutatenkontrolle und eine Zertifizierung der Rohstoffe durch die Lieferanten spielt dabei eine wichtige Rolle.

Ein weiterer kritischer Punkt, der bei der Infektionsvermeidung hilfreich sein kann, ist die Aufklärung der Verbraucher. Bei der Zubereitung soll genau auf die Gebrauchsanweisung geachtet werden, denn eine unsachgemäße Zubereitung kann zu einem Wachstum von *Cronobacter* und anderen unerwünschten Keimen führen. Die Folge kann eine gesundheitliche Beeinträchtigung sein.

Die in der vorliegenden Studie verwendeten Nährmedien machen sich den Besitz des Enzyms α -Glucosidase, das *Cronobacter* im Gegensatz zu anderen *Enterobacteriaceae* besitzt, zu Nutze.

Brilliance™ *Enterobacter sakazakii* Agar (DFI)

Dieses kommerziell erhältliche Medium ist das erste, welches das Enzym X- α Gluc als chromogenes Substrat beinhaltet. Bei einem Vergleich und dem Austausch zweier Nährmedien der FDA Methode und Ersatz durch DFI zeigt sich eine erhöhte Wiederfindung von *Cronobacter* aus Säuglingsnahrung und anderen Lebensmittelproben sowie ein um zwei Tage schnellerer Nachweis des Bakteriums.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit zeigt keine einzige der untersuchten Säuglingsnahrungen das Wachstum blau-grüner Kolonien. Das ausbleibende Keimwachstum bedeutet das Fehlen eines richtig – positiven Ergebnisses.

Aufgrund des nicht vorhandenen Keimwachstums kann weder die Spezifität noch die Sensivität des Mediums ermittelt werden. In anderen Studien zeigt das Medium im Vergleich mit weiteren Selektivmedien jedoch eine sehr hohe Sensitivität.

Zur Ausdehnung seines Anwendungsbereichs wurde das Nährmedium für den in Bearbeitung befindlichen CEN – ISO – Standard modifiziert und Tests des neuen als CCI bekannten Nährmediums zeigen bessere Resultate als DFI.

Um ein positives Wachstum von *Cronobacter* abzusichern, werden verdächtige Kolonien von DFI durch biochemische Tests überprüft.

ChromID™ sakazakii Agar (ESPM)

Bei diesem auf dem Markt als dual chromogen erhältlichen Medium soll durch Einschluss eines zweiten chromogenen Substrats und anderer Inhaltsstoffe die Sensitivität und die Spezifität deutlich erhöht werden. Durch die Hydrolyse der Substrate zeigen die Keime eine deutliche blaue-schwarze Färbung.

Wie schon beim DFI Agar kann auch hier in keiner der untersuchten Proben der Keim *Cronobacter* detektiert werden, dadurch fehlt auch bei diesem Medium die Aussage zur Spezifität und Sensitivität.

Bei der Austestung der *Cronobacter*-Referenzstämme zeigt das Medium eine Farbveränderung von der Ausgangsfarbe orange nach pink und bei einigen gram-negativen Referenzstämmen kann eine Verfärbung des Nährmediums von orange nach gelb beobachtet werden. Es besteht die Möglichkeit das aufgrund von speziellen Bedürfnissen, wie Temperatur, nicht alle *Cronobacter*-Stämme ein Wachstum auf dem Medium zeigen.

Für Kolonien typischen Wachstums folgt im Anschluss durch biochemische Tests, wie das API – ID32E eine weitere Bestätigung.

Chromocult® *Enterobacter sakazakii* Agar (CES).

Da dieses chromogene Nährmedium der Firma Merck auf dem Substrat α -D-Glucosidase basiert, zeigt einzig *Cronobacter* im Gegensatz zu anderen Keimen, welche eine farblose Färbung aufweisen, ein türkises Wachstum.

Die Inkubationstemperatur hat einen enormen Einfluss auf die Selektivität der Methode, denn bei 45°C ist die Entwicklung von *Cronobacter* unterdrückt und bei Temperaturen unter 43°C ist die Hemmung unerwünschter Bakterien gemindert.

Ebenso wie bei den zwei anderen Nährmedien kann auch hier aufgrund fehlenden Keimwachstums keine Aussage über die Sensitivität und Spezifität gemacht werden.

Im Gegensatz zu den anderen in dieser Untersuchung verwendeten Nährmedien ist kein weiterer Bestätigungsschritt mehr notwendig. So ist durch diesen Agar eine sehr schnelle (24h) und zuverlässige Überprüfung des Bakterienvorkommens möglich.

Einer Vielzahl von Studien zufolge weisen chromogene Nährmedien im Vergleich zu anderen Selektivmedien gute Resultate für die Auffindung von *Cronobacter* auf. Dennoch gibt es Schwachstellen der Nährmedien und der mikrobiologischen Testschemata, die zum Nachweis des Bakteriums herangezogen werden. Aus diesem Grund ist noch viel Arbeit in die Modifikation neuer Methoden und Nährmedien zu investieren. Das wird rezent auch durchgeführt.

Da kein Keim als richtig -positiv bestätigt werden kann, bedeutet dies, dass mit den Resultaten dieser Arbeit das Ziel, eine Aussage über die Spezifität als auch die Sensitivität und die Effizienz der Selektivmedien zu machen, nicht erreicht wird.

Bei einem richtig-positiven Nachweis durch die Selektivmedien wären die Identifizierungsmaßnahmen damit nicht zu Ende. Wird seine Anwesenheit durch richtige Koloniefärbung vermutet, sind weitere Tests, wie API, Gramfärbung oder Oxidasetest nötig, um eine sichere Aussage über das Vorhandensein des Keims treffen zu können.

Als biochemisches Analyseverfahren wird im vorliegenden Fall das API 20E herangezogen. Im Vergleich zum API-ID32E System Version 3.0 ist die Sensitivität niedriger, aber der Prozentsatz der identifizierten *Cronobacter* – Stämme höher. Die eingeschränkte Anzahl der Tests beim API 20E könnte im Vergleich zu anderen APIs zu falsch – negativen Ergebnissen führen.

5.3. Wiederfindungsrate

Das beste Resultat der verwendeten Oberflächenspatelverfahren in Bezug auf die Wiederfindungsraten zeigt ChromID™ *sakazakii* Agar (ESPM) mit 70,9%, während Chromocult® *Enterobacter sakazakii* Agar (CES) mit 66,4% das schlechteste Ergebnis aufweist. Brillance™ *Enterobacter sakazakii* Agar (DFI) liegt mit einem Wert von 68,5% genau zwischen den zwei anderen Nährmedien. Alle Nährmedien werden mit dem Kollektivmedium COS, dessen Wert als 100% angenommen wird, verglichen.

Innerhalb der Wiederfindungsrate der fünf untersuchten Stämme sinkt der Prozentsatz ein einziges Mal unter 50% und die höchsten Werte von über 100% zeigt Stamm 4 auf ESPM und DFI.

Alle evaluierten Werte werden in die Berechnung des Mittelwerts mit einbezogen.

6. ZUSAMMENFASSUNG

Das Ziel der vorliegenden Untersuchung besteht darin, die im Jahr 2007 als *Cronobacter* definierte Gattung mithilfe der drei chromogenen Nährmedien Chromocult® *Enterobacter Sakazakii* Agar (CES), Brillance™ *Enterobacter Sakazakii* Agar (DFI) und ChromID™ *Sakazakii* Agar (ESPM) aus 50 Säuglingsnahrungen zu detektieren und eine Aussage über ihre Sensitivität, Spezifität und Effizienz zu treffen.

Zur Austestung der verwendeten Agar werden im Rahmen der Versuchsdurchführung gram-positive, gram-negative und *Cronobacter* - Referenzstämme auf den Nährmedien ausgestrichen. Sie alle zeigen erwartetes Wachstum sowie Farbgebung.

Bei den untersuchten Produkten zeigen von 20 getesteten Milchbreien 95% (n = 19), 15 getesteten Anfangsnahrungen 100% (n = 15) sowie 15 getesteten Folgenahrungen 100% (n = 15) auf den Selektivmedien kein als *Cronobacter* zu identifizierendes Wachstum.

Daher kann keine Berechnung durchgeführt und die Bewertung der Ergebnisse nicht ausgeführt werden. Das bedeutet, dass in dieser Studie *Cronobacter* aus keiner der Proben isoliert werden kann und dadurch weder über die Sensitivität, noch über Spezifität oder die Effizienz eine Aussage gemacht werden kann. In nur 2% der Proben (n = 1) wird ein nicht der Gattung *Cronobacter* angehörender, gramnegativer-Keim isoliert. Durch diesen aus einem Früchtemilchbrei detektierten Fäkalkeim *Serratia ficaria* liegt ein richtig-negatives Ergebnis vor.

Bei den Wiederfindungsraten, die auf allen drei Selektivmedien im Vergleich zum Referenzmedium COS durchgeführt werden, zeigt ESPM mit einer durchschnittlichen Wiederfindungsrate von 70,9%, gefolgt von DFI mit 68,5% und CES mit 66,4%, die besten Werte.

Die für diese Studie herangezogene Nachweismethode ISO/TS sowie Nährmedien befinden sich auf Basis von neuen Erkenntnissen rund um das Bakterium zur Gewährleistung eines bestmöglichen Nachweises in Überarbeitung.

7. SUMMARY

The aim of this study was to detect the in 2007 reclassified genus *Cronobacter*. Therefore the three chromogenic planting media Chromocult® *Enterobacter Sakazakii* Agar (CES), Brilliance™ *Enterobacter Sakazakii* Agar (DFI) and ChromID™ *Sakazakii* Agar (ESPM) were compared for their ability to evaluate the presence of *Cronobacter* in 50 products of powdered infant formula.

A clear statement about the sensitivity, specificity and efficiency should be made.

For the analysis of the agar used in this study the gram – positive, gram – negative as well as *Cronobacter* reference strains were tested by streaking them onto the media. All of them showed the expected results regarding the coloring and the growth.

Within the frame of the test execution 20 of the tested milk puddings 95% (n = 19), 15 powdered infant formula 100% (n = 15) as well as 15 tested follow – on formula 100% (n = 15) did not show any growth of *Cronobacter* on the evaluated media.

Because of the missing growth it is not possible to make a calculation and an evaluation of the results. Statements about sensitivity, specificity and efficiency are missing.

The only result of this study is that a gram – negative rod is recovered in 2% of the food samples (n = 1). The meaning of the detection of the non - *Cronobacter* faecal germ *Serratia ficaria* is a correct – negative result.

ESPM proved to be the most efficient media in matter of the recovery rate with 70,9% followed by DFI with 68,5% and CES with 66,5%. As reference medium sheep – blood agar was used.

As the knowledge on the germ has significantly improved, the used method ISO/TS as well as the used media is under revision to prove the best method for the detection of *Cronobacter*.

8. LITERATURVERZEICHNIS

ALONSO JL, SORIANO A, CARBAJO O, AMOROS I, GARELICK H. Comparison and recovery of *Escherichia coli* and thermotolerant *coliforms* in water with a chromogenic medium incubated at 41 and 44,5°C. Applied and Environmental Microbiology 1999; 65:3746–3749.

ANONYMOUS. Milk and Milk Products—Detection of *Enterobacter sakazakii*. Technical Specification ISO/TS 22964. ISO/TS 22964:2006(E) and IDF/RM 210:2006(E), 1st edition. Geneva, Switzerland: International Organization for Standardization, 2006.

BAR – OZ B, PREMINGER A, PELEG O, BLOCK C, ARAD I. *Enterobacter sakazakii* infection in the newborn. Acta Paediatrica (Oslo, Norway: 1992) 2001; 90: 356–358.

BAUMGARTNER A, GRAND M, LINIGER M, IVERSEN C. Detection and frequency of *Cronobacter* spp. (*Enterobacter sakazakii*) in different categories of ready – to – eat foody other than infant formula. International Journal of food Microbiology 2009. In press.

BERSETH C, FERGUSON P, KINDER J, HUTSLER M. Delivery and bedside management of infant feedings. Infant Feedings: Guidelines for Preparation of Formula and Breast Milk in Health Care Facilities. In: American Dietetic Association, Chicago, IL, 2004; pp. 88–95.

bioMérieux: chromID™ *Sakazakii* Agar (ESPM). Internet: <http://www.biomerieux-usa.com/upload/chromID-Sakazakii-Technical-Sheet-2.pdf> (Stand: 19.06.2010).

BLOCK C., PELEG O, MINSTER N, BAR-OZ B, SIMHON A, ARAD I, SHAPIRO M. Cluster of Neonatal Infections in Jerusalem due to unusual Biochemical Variant of *Enterobacter sakazakii*. European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases 2002; 21: 613 – 616.

BOWEN AB, BRADEN CR. Invasive *Enterobacter* disease in infants. Emerging Infectious Diseases 2006; 12: 1185 – 1189.

BOWEN AB, BRADEN CR. *Enterobacter Sakazakii* Disease and Epidemiology. In: *Enterobacter sakazakii* (Farber JM, Forsythe SJ, Hrsg). Blackwell Publishers, Washington, 2008; 27 – 59.

BREEUWER P, LARDEAU A, PETERZ M, JOOSTEN HM. Desiccation and heat tolerance of *Enterobacter sakazakii*. Journal of Applied Microbiology 2003, 95: 967–973.

BRENNER DJ, FARMER III JJ. Order XIII. *Enterobacteriales* Family I. *Enterobacteriaceae*. In: Bergey`s manual of Systematic Bacteriology Part B The Gammaproteobacteria (Garrrity GM, Hrsg). Springer Science, New York, 2005; 587.

CAUBILLA - BARRON J, FORSYTHE SJ. Dry stress and survival time of *Enterobacter sakazakii* and other *Enterobacteriaceae* in dehydrated powdered infant formula. Journal of food protection 2007; 70(9): 2111-7.

CHAVES – LOPEZ C, DE ANGELIS M, MARTUSCELLI M, SERIO A, PAPARELLA A, SUZZI G. Characterization of the *Enterobacteriaceae* isolated from an artisanal Italian ewe's cheese (Pecorino Abruzzese). Journal of Applied Microbiology 2006; 101: 353–360.

CHEN Y, HAMMACK TS, SONG KY, LAMPEL KA. Evaluation of a revised U.S. Food and Drug Administration for the detection and isolation of *Enterobacter sakazakii* in powdered infant formula: precollaborative study. Journal of AOAC (Association of Official Analytical Chemists) International. 2009; 92: 862–872.

CHENU JW, COX JM. *Cronobacter* (*Enterobacter sakazakii*): current status and future prospects. Letters in Applied Microbiology 2009; 49: 153 – 159.

CONDALAB: Dehydrated Culture Media, *Enterobacter sakazakii* Isolation chromogenic agar (ESIA) ISO22964. Internet: <http://www.condalab.com/pdf/1446.pdf> (Stand: 19.06.2010).

DANCER GI, MAH JH, KANG DH. Influences of milk components on biofilm formation of *Cronobacter* spp. (*Enterobacter sakazakii*). Letters in Applied Microbiology 2009; 48: 718 – 725.

DINSMORE JE, JACKSON RJ, SMITH SD. The protective role of gastric acidity in neonatal bacterial translocation. Journal of Pediatric Surgery 1997; 32: 1014–1016.

DRUGGAN P, IVERSEN C. Culture media for the isolation of *Cronobacter* spp. International Journal of Food Microbiology 2009; 136: 169 – 178.

EDELSON – MAMMEL S, 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: 201 – 207.

EDELSON – MAMMEL SG, BUCHANAN RL. Thermal inactivation of *Enterobacter sakazakii* in rehydrated infant formula. Journal of Food Protection 2004; 67: 60 – 63.

EFSA, 2004, European Food Safety Authority. Microbiological risks in infant formulae and follow – on – formulae. The EFSA Journal 2004; 113: 1 – 35.

FANNING S, FORSYTHE S. Isolation and Identification of *Enterobacter Sakazakii*. In: *Enterobacter sakazakii* (Farber JM, Forsythe SJ, Hrsg). Blackwell Publishers, Washington, 2008; 27 – 59.

FARMER JJ III. *Enterobacter Sakazakii* – personal perspectives and Reminiscences from a 32 – year History. In: *Enterobacter sakazakii* (Farber JM, Forsythe SJ, Hrsg). Blackwell Publishers, Washington, 2008; 255 – 264.

FARMER JJ, ASBURY MA, HICKMAN 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: 569 – 584.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION – WORLD HEALTH ORGANIZATION (FAO – WHO). *Enterobacter sakazakii* and other microorganisms in powdered infant formula: meeting report. Microbiological Risk Assessment Series 6. World health Organization – Food and Agriculture Organization of the United Nations, Geneva and Rome. WHO Press, Geneva, Switzerland. 2004. <http://www.who.int/foodsafety/publications/micro/es.pdf> .

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION – WORLD HEALTH ORGANIZATION (FAO – WHO). *Enterobacter sakazakii* and *salmonella* in powdered infant formula: meeting report. Microbiological Risk Assessment Series 10. World health Organization – Food and Agriculture Organization of the United Nations, Geneva and Rome. WHO Press, Geneva, Switzerland. 2006. <http://www.who.int/foodsafety/publications/micro/mra10.pdf> .

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION – WORLD HEALTH ORGANIZATION (FAO – WHO). Safe Preparation, Storage and Handling of Powderd Infant Milk Formula: Guidelines. World health Organization – Food and Agriculture Organization of the United Nations, Geneva and Rome. WHO Press, Geneva, Swizerland. 2007. http://www.who.int/foodsafety/publications/micro/pif_guidelines.pdf .

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION – WORLD HEALTH ORGANIZATION (FAO – WHO). *Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter* spp.) in powdered follow – up formula: meeting report. Microbiological Risk Assesment Series 15. World health Organization – Food and Agriculture Organization of the United Nations, Geneva and Rome. WHO Press, Geneva, Swizerland. 2008.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION U.S. (FDA). Isolation and Enumeration of *Enterobacter sakazakii* from Dehydrated Powdered Infant Formula. U.S.Food and Drug Administration 2002, Gaithersburg,Md.
<http://www.fda.gov/Food/ScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm114665.htm>
(Stand 15. März 2010)

FOX EM, JORDAN KN. Towards a one-step *Enterobacter sakazakii* enrichment. Journal of Applied Microbiology 2008;105:1091–1097.

FRIEDEMANN M. *Enterobacter sakazakii* in food and beverages (other than infant formula and milk powder). International Journal of Food Microbiology 116: 1–10.

GAKUYA FM, KYULE MN, GATHURA PB, KARIUKI S. Antimicrobial resistance of bacterial organisms isolated from rats. East African Medical Journal 2001; 78:646–649.

GIRLICH D, POIREL L, LEELAPORN A, KARIM A, TRIBUDDHART C, FENNEWALD M, NORDMANN P. Molecular epidemiology of the integron located VEB-1 extended-spectrum beta-lactamase in nosocomial enterobacterial isolates in Bangkok, Thailand. *Journal of Clinical Microbiology* 2001; 39:175–82.

GOSNEY MA, MARTIN MV, WRIGHT AE, GALLAGHER M. *Enterobacter sakazakii* in the mouths of stroke patients and its association with aspiration pneumonia. *European Journal of Internal Medicine* 2006; 17: 185 – 188.

GOULLET P, PICARD B. Characterization of *Enterobacter cloacae* and *E. sakazakii* by Electrophoretic Polymorphism of Acid Phosphatase, Esterase, and Glutamate, Lactate and Malate Dehydrogenases. *Journal of General microbiology* 1986; 132: 3105 – 3112.

GRIMM M, STEPHAN R, IVERSEN C, MANZADO GG, RATTEI T, RIEDEL K, RUEPP A, FRISHMAND D, LEHNER A. Cellulose as an extracellular matrix Component present in *Enterobacter sakazakii* biofilms. *Journal of Food Protection* 2008; 71:13 – 8.

GRIMONT PAD, GRIMONT F. Order XIII. *Enterobacteriales* Family I. *Enterobacteriaceae* Genus XII. *Enterobacter*. In: Bergey's manual of Systematic Bacteriology Part B The Gammaproteobacteria (Garrrity GM, Hrsg). Springer Science, New York, 2005; 661.

GUILLAUME-GENTIL O, SONNARD V, KANDHAI MC, MARUGG JD, JOOSTEN H. A simple and a rapid cultural method for detection of *Enterobacter sakazakii* in environmental samples. *Journal of Food Protection* 2005; 68: 64-69.

GURTLE JB, KORNACKI JL, BEUCHAT LR. *Enterobacter sakazakii*: A coliform of increased concern to infant health. International Journal of Food Microbiology 2005; 104: 1-34.

HAMILTON VJ, LEHANE JM, BRAIG RH. Isolation of *Enterobacter sakazakii* from midgut of *Stomoxys calcitrans*. Emerging Infectious Diseases 2003;9:1355–1356.

HAMMERMAN C, KAPLAN M. Probiotics and neonatal intestinal infection. Current Opinion in Infectious Diseases 2006; 19: 277–282.

HARRIS LS., ORIEL PJ. Heteropolysaccharide produced by *Enterobacter sakazakii*. United States Patent 1989; 4.806.636.

HEALY B, COONEY S, O'BRIEN S, IVERSEN C, WHYTE P, NALLY J, CALLANAN JJ, FANNING S. *Cronobacter (Enterobacter sakazakii)*: An opportunistic Foodborne pathogen. Foodborne Pathogens and Disease 2010; 7: 339 – 350.

HIMELRIGHT I, HARRIS E, LORCH V, ANDERSON M. *Enterobacter sakazakii* infections associated with the use of powdered infant formula – Tennessee, 2001. The Journal of the American Medical Association 2002; 287: 2204 – 2205.

ICMSF, International Commission on Microbiological Specifications for Foods. Microorganisms in foods 7: Microbiological testing in Food Safety management, Kapitel 8. Selection of Cases and Attribute plans. Kluwer Academic/ Plenum Publishers, New York, 2002.

IVERSEN C, DRUGGAN P, FORSYTHE S. A selective differential medium for *Enterobacter sakazakii*, a preliminary study. International Journal of Food Microbiology 2004b; 96: 133–139.

IVERSEN C, DRUGGAN P, SCHUMACHER S, LEHNER A, FEER C, GSCHWEND K, JOOSTEN H, STEPHAN R. Development of a Novel Screening Method for the Isolation of „*Cronobacter*“ spp. (*Enterobacter sakazakii*). Applied and Environmental Microbiology 2008a; 74: 2550 – 2553.

IVERSEN C, FORSYTHE S. Isolation of *Enterobacter sakazakii* and other *Enterobacteriaceae* from powdered infant formula milk and related products. Food microbiology 2004; 21: 771 – 777.

IVERSEN C, FORSYTHE S. Risk profile of *Enterobacter sakazakii*, an emergent pathogen associated with infant milk formula. Trends in Food Science & Technology 2003; 14: 443–454.

IVERSEN C, FORSYTHE SJ. Comparison of Media for the Isolation of *Enterobacter sakazakii*. Applied and Environmental Microbiology 2007; 73: 48 – 52.

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 2004a; 38: 378–382.

IVERSEN C, LEHNER A, MULLANE N, BIDLAS E, CLEENWERCK I, MARUGG J, FANNING S, STEPHAN R, JOOSTEN H. The taxonomy of *Enterobacter sakazakii*: proposal of a new genus *Cronobacter* gen. nov. and descriptions of *Cronobacter* comb. nov. *Cronobacter* subsp. *Sakazakii*, comb. nov., *Cronobacter* subsp. *malonaticus* subsp. nov., *Cronobacter turicensis* sp. nov., *Cronobacter muytjensii* sp. nov., *Cronobacter dublinensis* sp. nov. and *Cronobacter genomospecies* 1. BMC Evolutionary Biology 2007a; 7: 64.

IVERSEN C, LEHNER A, MULLANE N, MARUGG J, FANNING S, STEPHAN R, JOOSTEN H. Identification of “*Cronobacter*” spp. (*Enterobacter sakazakii*). Journal of Clinical Microbiology 2007; 45: 3814 – 3816.

IVERSEN C, MULLANE N, MCCARDELL B, TALL BD, LEHNER A, FANNING S, STEPHAN R, JOOSTEN H. *Cronobacter* gen. nov., a new genus to accommodate the biogroups of *Enterobacter sakazakii*, and proposal of *Cronobacter* gen. nov., comb. nov., *Cronobacter malonaticus* sp. nov., *Cronobacter turicensis* sp. nov., *Cronobacter muytjensii* sp. nov., *Cronobacter dublinensis* sp. nov., *Cronobacter genomospecies* 1, and of three subspecies, *Cronobacter dublinensis* subsp. *dublinensis* subsp. nov., *Cronobacter dublinensis* subsp. *lausannensis* subsp. nov. and *Cronobacter dublinensis* subsp. *lactaridi* subsp. nov. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 2008; 58: 1442 – 1447.

IVERSEN C, WADDINGTON M, FARMER JJ III, FORSYTHE S. The biochemical differentiation of *Enterobacter sakazakii* genotypes. BMC Microbiology 2006; 6: 94.

IVERSEN C, WADDINGTON M, ON SL, FORSYTHE S. Identification and phylogeny of *Enterobacter sakazakii* relative to *Enterobacter* and *Citrobacter* species. Journal of Clinical Microbiology 2004; 42: 5368-5370.

JIMENEZ E, GIMENEZ C. Septic shock due to *Enterobacter sakazakii*. Clinical Microbiology Newsletter 1982; 4: 30.

JIMENEZ SM, TIBURZI MC, SALSI MS, PIROVANI ME, MOGUILEVSKY MA. The role of visible faecal material as a vehicle for generic *Escherichia coli*, coliform, and other enterobacteria contaminating poultry carcasses during slaughtering. Journal of Applied microbiology 2003; 95: 451–456.

JOOSTEN H, IVERSEN C. Development of a CEN – ISO standard method for detection of *Cronobacter*. <http://civersen.tripod.com/joosten.pdf>; Stand 20. März 2010.

KANDHAI MC, BREEUWER P, GORRIS LG, ZWIETERING MH, REIJ MW. Growth of *Cronobacter* spp. Under dynamic temperature conditions occurring during cooling of reconstituted powdered infant formula. Journal of food protection 2009; 72 (12): 2489 – 98.

KANDHAI MC, REIJ MW, GORRIS LG, GUILLAUME - GENTIL O, VAN SCHOTHORST M. Occurrence of *Enterobacter sakazakii* in food production environments and households. The Lancet 2004; 363: 39–40.

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: 2721–2729.

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 2004a; 67: 1267 – 1270.

KHAN AA, JONES RA, CERNIGLIA CE. Rapid method for the detection of genetically engineered microorganisms by polymerase chain reaction from soil and sediments. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology 1998; 20:90–94.

KIM H, RYU JH, BEUCHAT LR. Attachment of and biofilm formation by *Enterobacter sakazakii* on Stainless Steel and Enteral feeding products. Applied and Environmental microbiology 2006; 72: 5846 – 5856.

LAI KK. *Enterobacter sakazakii* infections among neonates, infants, children, and adults: case reports and a review of the literature. Medicine (Baltimore) 2001; 80:113–22.

LAMBERT RJW, BIDLAS E. A study of the Gamma hypothesis: Predictive modelling of the growth and inhibition of *Enterobacter sakazakii*. International journal of Food microbiology 2007; 115: 204 – 213.

LAMPEL KA, CHEN Y. Method for the isolation and detection of *Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter*) from powdered infant formula. International Journal of Food Microbiology 2009, 136: 179 – 184.

LEHNER A, NITZSCHE S, BREEUWER P, DEIP B, THELEN K, STEPHAN R. Comparison of two chromogenic media and evaluation of two molecular based identification systems for *Enterobacter sakazakii* detection. BMC Microbiology 2006;6:15.

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: 2287 – 2294.

LEHNER A, STEPHAN R. Microbiological, epidemiological, and food safety aspects of *Enterobacter sakazakii*. Journal of Food Protection 2004; 67: 2850 – 2857.

LEHNER A, TASARA T, STEPHAN R. 16S rRNA gene based analysis of *Enterobacter sakazakii* strains from different sources and development of a PCR assay for identification. BMC Microbiology 2004; 4: 43.

LEUSCHNER RG, BEW J. A medium for the presumptive detection of *Enterobacter sakazakii* in infant formula: interlaboratory study. Journal of the AOAC International 2004; 87: 604 – 613.

LIN LC, BEUCHAT LR. Survival of *Enterobacter sakazakii* in infant cereal as affected by composition, water activity, and temperature. Food microbiology 2007; 24: 767 – 777.

MANAFI M. New developments in chromogenic and fluorogenic culture media. International Journal of Food Microbiology 2000; 60: 205 – 218.

MANGE JP, STEPHAN R, BOREL N, WILD P, KIM SK, POSPISCHIL A, LEHNER A. Adhesive properties of *Enterobacter sakazakii* to human epithelial and brain microvascular endothelial cells. BMC Microbiology 2006; 6: 58.

MARCH SB, RATNAM S. Sorbitol – MacConkey medium for the detection of *Escherichia coli* O157: H7 associated with hemorrhagic colitis. Journal of Clinical microbiology 1986; 23: 869 – 872.

MARLER B. Development of a CEN – ISO standard method for detection of *Cronobacter*. <http://www.enterobactersakazakiiblog.com/2009/06/articles/e-sakazakii-information/development-of-a-ceniso-horizontal-standard-method/>; Stand: 20. März 2010.

MEHALL JR, NORTHROP R, SALTZMAN DA, JACKSON RJ, SMITH SD. Acidification of formula reduces bacterial translocation and gut colonization in a neonatal rabbit model. Journal of Pediatric Surgery 2001; 36: 56–62.

MENSAH P, YEBOAH – MANU D, OWUSU – DARKO K, ABLORDEY A. Street foods in Accra, Ghana: how safe are they? Bulletin of the World – Health – Organization 2002; 80: 546–554.

MERCK: Chromocult *Enterobacter Sakazakii* Agar. Merck Microbiology Manual 12th edition. Internet: http://www.mibius.de/out/oxbaseshop/html/0/images/wysiwigpro/Chromocult_E_Sakazakii_100873_De.pdf (Stand: 25.05.2009).

MERCK: Merck's New Chromogenic Medium for the Detection of *Enterobacter sakazakii*. Internet: <http://www.rapidmicrobiology.com/news/1054h11.php> (Stand: 24.05.2009).

MITTAL R, WANG Y, HUNTER CJ, GONZALEZ – GOMEZ I, PRASADARAO NV. Brain damage in newborn rat model of meningitis by *Enterobacter sakazakii*: a role for outer membrane protein A. Laboratory investigation 2009; 89: 263 – 277.

MOHAN NAIR MK, VENKITANARAYANAN K. Role of bacterial OmpA and host cytoskeleton in the invasion of human intestinal epithelial cells by *Enterobacter sakazakii*. Pediatric Research 2007; 62: 1 – 6.

MOKRACKA J, KOCZURA R, KAZNOWSKI A. Yersiniabactin and other siderophores produced by clinical isolates of *Enterobacter* spp. and *Citrobacter* spp. FEMS Immunology and Medical Microbiology 2004; 40: 51 – 55.

MOSSO MA, DE LA ROSA MC, VIVAR C, MEDINA MR. Heterotrophic bacterial populations in the mineral waters of thermal springs in Spain. The Journal of Applied Bacteriology 1994; 77: 370 – 381.

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; 74:5913 – 5917.

MULLANE NR, IVERSEN C, HEALY B, WALSH C, WHYTE P, WALL PG, QUINN T, FANNING S. *Enterobacter sakazakii* an emerging bacterial pathogen with implications for infant health. Minerva Pediatrica 2007; 59: 137 – 148.

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: 743–746.

MUYTJENS HL, VAN DER ROS - VAN DE REPE J, VAN DRUTEN HAM. Enzymatic Profiles of *Enterobacter sakazakii* and Related Species with Special Reference to the ox-Glucosidase Reaction and Reproducibility of the Test System. Journal of Clinical microbiology 1984; 20: 684 – 686.

NAIR MKM, JOY J, VENKITANARAYANAN KS. Inactivation of *Enterobacter sakazakii* in Reconstituted Infant Formula by monocaprylin. Journal of Food Protection 2004; 67: 2815 – 2819.

NAZAROWEC – WHITE M FARBER JM. Incidence, Survival and Growth of *Enterobacter sakazakii* in infant Formula. Journal of Food Protection 1997a; 60: 226 – 230.

NAZAROWEC – WHITE M, FARBER JM. *Enterobacter sakazakii*: a review. International Journal of Food Microbiology 1997; 34: 103 – 113.

NAZAROWEC – WHITE M, FARBER JM. Phenotypic and genotypic typing of food and clinical Isolates of *Enterobacter sakazakii*. Journal of Medical microbiology 1999a; 48: 559 – 567.

NAZAROWEC – WHITE M, FARBER JM. Thermal resistance of *Enterobacter sakazakii* in reconstituted dried-infant formula. Letters in Applied Microbiology 1997b; 24: 9-13.

NAZAROWEC – WHITE M, MC KELLAR M, PIYASENA P. Predictive modelling of *Enterobacter sakazakii* inactivation in bovine milk during high – temperature short - time pasteurization. Food research international 1999; 31: 375 – 379.

NO HK, PARK NY, LEE SH, HWANG HJ, MEYERS SP. Antibacterial activities of chitosanes and chitosan oligomers with different molecular weights on spoilage bacteria isolated from tofu. *Journal of Food Science* 2002; 67: 1511 – 1514.

O'BRIEN S, HEALY B, NEGREDO C, ANDERSON W, FANNING S, IVERSEN C. Prevalence of *Cronobacter* species (*Enterobacter sakazakii*) in follow – on infant formulae and infant drinks. *Letters in Applied Microbiology* 2009a; 48: 536 – 541.

O'BRIEN S, HEALY B, NEGREDO C, FANNING S, IVERSEN C. Evaluation of a new one – step enrichment in conjunction with a chromogenic medium for the detection of *Cronobacter* spp. (*Enterobacter sakazakii*) in powdered infant formula. *Journal of Food Protection* 2009; 72: 1472 – 1475.

OH SW, KANG DH. Fluorogenic selective and differential medium for isolation of *Enterobacter sakazakii*. *Applied and Environmental microbiology* 2004; 70: 5692 – 5694.

OSAILI T, FORSYTHE S. Desiccation resistance and persistence of *Cronobacter* species in infant formula. *International Journal of food Microbiology* 2009; 136: 214 - 220.

OSAILI TM, SHAKER RR, AL – HADDAQ MS, AL – NABULSI AA, HOLLEY RA. Heat resistance of *Cronobacter* species (*Enterobacter sakazakii*) in milk and special feeding formula. *Journal of Applied Microbiology* 2009; 107: 928 – 935.

OXOID: Brilliance *Enterobacter sakazakii* Agar (DFI Formel). Internet: http://www.oxid.com/UK/blue/prod_detail/prod_detail.asp?pr=CM1055&org=66&c=UK&lang=EN (Stand: 15.05.2010).

OXOID: Dehydrated Culture Media, Chromogenic *Cronobacter* Isolation Agar (CCI). Internet: http://www.oxid.com/au/blue/prod_detail/prod_detail.asp?pr=CM1122&org=65&c=au&lang=EN (Stand: 18.6.2010).

PAGOTTO F, FARBER JM, LENATI R. Pathogenicity of *Enterobacter sakazakii*. In: *Enterobacter sakazakii* (Farber JM, Forsythe SJ, Hrsg). Blackwell Publishers, Washington, 2008; 127 – 144.

PAGOTTO FJ, FARBER JM. *Cronobacter* spp. (*Enterobacter sakazakii*): Advice, policy and research in Canada. International Journal of Food microbiology 2009; 136: 238 – 245.

PAGOTTO FJ, NAZAROWEC – WHITE M, BIDAVID S, FARBER JM. *Enterobacter sakazakii*: infectivity and enterotoxin production in vitro and in vivo. Journal of Food Protection 2003; 66: 370 – 375.

PANGALOS G. Sur un bacille chromogène isolé par hémoculture. Comptes rendus seances Soc Biol, 1929; 100: 1097 – 1098.

PITOUT JD, MOLAND ES, SANDERS CC, THOMSON KS, FITZSIMMONS SR. Beta-lactamases and detection of beta-lactam resistance in *Enterobacter* spp. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 1997; 41:35–9.

RESTAINO L, FRAMPTON EW, LIONBERG WC, BECKER RJ. A Chromogenic Planting Medium for the Isolation and Identification of *Enterobacter sakazakii* from Foods, Food Ingredients, and Environmental Sources. Journal of Food Protection 2006; 69: 315 – 322.

SCHINDLER PR, METZ H. Coliform bacteria in rinsed beer mugs – identification with the API 20E system and resistance behavior. Das Öffentliche Gesundheitswesen 1990; 52: 592 – 597.

SCHINDLER PRG, METZ H. Coliform bacteria in drinking water from South Bavaria: Identification by the API 20E-system and resistance patterns. *Water Science & Technology* 1991;24:81–84.

SEE KC, THAN HA, TANG T. *Enterobacter sakazakii* bacteraemia with multiple splenic abscesses in a 75 – year – old woman: a case report. *Age and ageing* 2007; 36: 595 – 596.

SHAKER R, OSAILI T, AL – OMARY Z, JARADAT Z, AL – ZUBY M. Isolation of *Enterobacter sakazakii* and other *Enterobacter* sp. From food and food production environments. *Food control* 2007. 18: 1241 – 1245.

SONDHEIMER J, CLARK D, GERVAISE E. Continuous gastric pH measurement in young and older healthy preterm infants receiving formula and clear liquid feedings. *Journal of Pediatric Gastroenterology Nutrition* 1985; 4 (3): 352–355.

SORIANO JM, RICO H, MOLTO JC, MANES J. Incidence of microbial flora in lettuce, meat and Spanish potato omelette from restaurants. *Food Microbiology* 2001; 18: 159 – 163.

STOCK I, WIEDEMANN B. Natural antibiotic susceptibility of *Enterobacter amnigenus*, *Enterobacter cancerogenus*, *Enterobacter gergoviae* and *Enterobacter sakazakii* strains. *Clinical Microbiology and infection* 2002; 8:564 – 578.

TOWNSEND SM, HURRELL E, GONZALEZ GOMEZ, LOWE L, FRYE JG, FORSYTHE S, BADGER JL. *Enterobacter sakazakii* invades brain capillary endothelial cells, persists in human macrophages influencing cytokine secretion and induces severe brain pathology in the neonatal rat. *Microbiology* 2007; 153: 3538 – 3547.

URMENYI AM, FRANKLIN AW. Neonatal death from pigmented coliform infection. *The Lancet*, 1961; 1 (7172): 313 – 315.

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; 58: 293 – 297.

ZOGAIJ X, BOKRANZ W, NIMTZ M, ROMLING U. Production of cellulose and curli fimbriae by members of the family *Enterobacteriaceae* isolated from the human gastrointestinal tract. *Infection and immunity* 2003; 71: 4151 – 4158.

9. ABBILDUNGS-, TABELLEN & ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Nummer	Titel	Seite
Abb. 1	Unterschiede in der Morphologie der Kolonien von <i>Cronobacter</i> auf TSA nach 48h Inkubation bei 25°C. Stamm 33 zeigt den etwas größeren Typ A (ca. 3 mm Durchmesser) mit rauer Oberfläche und den kleineren Typ B mit glatter Oberfläche. [FARMER et al., 1980]	8
Abb. 2	Kolonisation, Symtome und Vorkommenshäufigkeit von <i>Cronobacter</i> – Infektionen bei Säuglingen und Kindern, in Prozenten angegeben [HEALY et al., 2010]	19
Abb. 3	Kolonisation, Symtome und Vorkommenshäufigkeit von <i>Cronobacter</i> – Infektion bei Erwachsenen, in Prozenten angegeben [HEALY et al., 2010]	20
Abb. 4	Vorgeschlagenes Modell für die Pathogenese einer <i>Cronobacter</i> – Infektion, Wirt ist der Mensch [PAGOTTO und FARBER, 2009], [IVERSEN et al., 2004], [MUYTJENS et al., 1988], [BERSETH et al., 2004], [SONDHEIMER et al., 1985], [DINSMORE et al., 1997], [MEHALL et al., 2001], [HAMMERMAN und KAPLAN, 2006]	22
Abb. 5	Risikofaktoren in rekonstituierter Säuglingsnahrung durch <i>Cronobacter</i>	23
Abb. 6	Mikrobiologische Schemen zur Detektion von <i>Cronobacter</i> spp. (a) Originale und modifizierte Methode nach FDA; (b) ISO/TS 22964; (c) CEB – Methode [HEALY et al., 2010]	26

Nummer	Titel	Seite
Abb. 7	ESIA	31
Abb. 8	CES	33
Abb. 9	DFI	35
Abb. 10	ESPM	36
Abb. 11	mDFI (CCI) [JOOSTEN und IVERSEN, Stand 10.03.2010]	38
Abb. 12	Schema der Untersuchungsmethode	46 - 48
Abb. 13	Einwaage und Voranreicherung	49
Abb. 14	Verdünnungsreihe	50
Abb. 15	Verdünnungsreihe, Wiederfindungsrate und Nährmedien	60
Abb. 16	<i>Cronobacter</i> , Gram - negative und Gram - positive Stämme auf DFI, ESPM und CES	62
Abb. 17	<i>Cronobacter</i> auf DFI	63
Abb. 18	<i>Cronobacter</i> auf ESPM	63
Abb. 19	<i>Cronobacter</i> auf CES	64
Abb. 20	Gram - negative Stämme auf DFI, ESPM und CES	66
Abb. 21	Gram - positive Stämme auf DFI, ESPM und CES	66
Abb. 22	Probenverteilung in Prozent	67
Abb. 23	DFI, ESPM und CES; „K“ = kontaminiert, „N“ = nativ	69
Abb. 24	Gram – Färbung <i>Cronobacter</i>	71
Abb. 25	API 20 E Streifen (Referenzstamm 12)	72

Nummer	Titel	Seite
Abb. 26	API 20 E Ergebnisblatt (Referenzstamm 12)	72
Abb. 27	Wiederfindungsrate von Referenzstamm 3	73
Abb. 28	Prozentuelle Angabe des Mittelwerts der Wiederfindungsraten von <i>Cronobacter</i> ; Selektivmedien im Verhältnis zum Referenzmedium	74
Abb. 29	Wiederfindungsraten verschiedener <i>Cronobacter</i> - Stämme bei 44°C für 24h auf CES im Vergleich zu COS.	75
Abb. 30	Wiederfindungsraten verschiedener <i>Cronobacter</i> – Stämme bei 37°C für 24h auf DFI im Vergleich zu COS	76
Abb. 31	Wiederfindungsraten verschiedener <i>Cronobacter</i> – Stämme bei 37°C für 24h auf ESPM im Vergleich zu COS	77

„Ich habe mich bemüht, sämtliche Inhaber der Bildrechte ausfindig zu machen und ihre Zustimmung zur Verwendung der Bilder in dieser Arbeit eingeholt. Sollte dennoch eine Urheberrechtsverletzung bekannt werden, ersuche ich um Meldung bei mir.“

TABELLENVERZEICHNIS

Nummer	Titel	Seite
Tab. 1	<i>Cronobacter</i> in tierischen und pflanzlichen Lebensmitteln	14
Tab. 2	Zusammensetzung ESIA [ANANYMOUS, 2006]	31
Tab. 3	Wachstum auf ESIA [CONDALAB,Stand 19.6.2010]	32
Tab. 4	Zusammensetzung CES [MERCK,Stand 25.05.2009]	33
Tab. 5	Wachstum auf CES [MERCK MICROBIOLOGY MANUAL 12th edition]	34
Tab. 6	Zusammensetzung DFI [OXOID, Stand 15.05.2010]	35
Tab. 7	Wachstum auf DFI [OXOID, Stand 15.05.2010]	35
Tab. 8	Zusammensetzung ESPM [bioMérieux, Stand 19.06.2010]	36
Tab. 9	Wachstum auf ESPM	37
Tab. 10	Zusammensetzung CCI und mDFI [OXOID, Stand 18.6.2010], [IVERSEN et al., 2008]	38
Tab. 11	Wachstum auf CCI [OXOID, 18.6.2010]	38
Tab. 12	<i>Cronobacter</i> Referenzstämme	39
Tab. 13	Stammsammlung Gram – negativ	40
Tab. 14	Stammsammlung Gram – positiv	40
Tab. 15	verwendete Referenzstämme	41
Tab. 16	Verwendete Nährbouillon/-agar	43
Tab. 17	<i>Cronobacter</i> auf DFI, ESPM und CES	61

Nummer	Titel	Seite
Tab. 18	Gram – negative Stämme auf DFI, ESPM und CES	65
Tab. 19	Gram – positive Stämme auf DFI, ESPM und CES	65
Tab. 20	Gesamtbeurteilung	68
Tab. 21	Beurteilung der Milchbreie	69
Tab. 22	Beurteilung der Anfangsnahrungen	70
Tab. 23	Beurteilung der Folgenahrungen	70
Tab. 24	Beurteilung der kontaminierten Proben	70
Tab. 25	Mittelwerte der KbE	74
Tab. 26	Tatsächlich ausgezählte KbE und KbE in %; CES im Vergleich zu COS	75
Tab. 27	Tatsächlich ausgezählte KbE und KbE in %; DFI im Vergleich zu COS	76
Tab. 28	Tatsächlich ausgezählte KbE und KbE in %; ESPM im Vergleich zu COS	77

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

%	Prozent
µm	Mikrometer
µmol	Mikromol
α	alpha
β	beta
C	Grad Celsius
Abb.	Abbildung
API 20E	Analytical Profile Index 20 Enterobakterien
ATCC	American Type Culture Collection
aW	Activity of water
BPW	Buffered Peptone Water
<i>C. freundii</i>	<i>Citrobacter freundii</i>
<i>C. muytjensii</i>	<i>Cronobacter muytjensii</i>
CCI	Chromogener <i>Cronobacter</i> Isolationsagar
CEB	<i>Cronobacter</i> Enrichment Broth
CES	Chromocult® <i>Enterobacter sakazakii</i> Agar
CEN	European Committee for Standardization
COL	Columbia Agar
comb.	combinatio
COS	Columbia Schafblutagar
CSB	<i>Cronobacter</i> screening broth
dest.	destilliertem
DFI	Brilliance™ <i>Enterobacter sakazakii</i> Agar
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>deoxyribonucleic acid</i>)
D – Wert	Dezimale Reduktionszeit
<i>E. cloaceae</i>	<i>Enterobacter cloaceae</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EHEC	Enterohämorrhagische <i>Escherichia coli</i>
<i>E. sakazakii</i>	<i>Enterobacter sakazakii</i>
EEB	Enterobacteriaceen-Anreicherungsbouillon nach MOSSEL
EFSA	European Food Safety Authority
ESE	<i>Enterobacter sakazakii</i> Anreicherungsboillon
ESIA	Chromogener <i>Enterobacter sakazakii</i> Isolierungsagar
ESPM	ChromID™ <i>Sakazakii</i> Agar
ESSB	Selektive <i>Enterobacter sakazakii</i> Bouillon
et al.	Et alii (und Mitarbeiter)
f - AFLP	Fluorescent amplified fragment length polymorphism
FAO	Food and Agriculture Organization of the United Nations
FDA	Food and Drug Administration
g	Erdbeschleunigung oder Gramm
h	hora (Stunde)
HIV	Humanes Immundefizienz Virus
hsp	Hitzeschockprotein
H ₂ S	Schwefelwasserstoff
IDF	International Dairy Federation (Internationale Milchvereinigung)
ISO	International Organization for Standardization (Internationale Organisation für Standardisierung)
ISO/TS 22964	Internationale Norm/ Technische Spezifikation

KbE	Kolonie bildende Einheiten
l	Liter
LB	Leuschner und Bew
log	Logarithmus
LST	Lauryl Sulfate Tryptose Broth
mDFI	Modifizierter Brilliance™ <i>Enterobacter sakazakii</i> Agar
min	Minute(n)
ml	Milliliter
mLST	modified Lauryl Sulfate Tryptose Broth
MPN	Most probable number
MuαGlc	4 – Methylumbelliferyl – α-D – glucopyranosid
MW	Mittelwert
n	Anzahl der untersuchten Proben /Isolate
NaCl	Natriumchlorid
NCTC	National Collection of Type Cultures
nov.	nova
OK	Oh und Kang
Omp A	Outer membrane protein
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
pH	pondus Hydrogenii oder potentia Hydrogenii
<i>P. mirabilis</i>	<i>Proteus mirabilis</i>
RM	Reference model
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
S	Svedberg
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>S. saprophyticus</i>	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>
sek	Sekunden
sp.	Species (Singular)
spp.	Species (Plural)
subsp.	subspecies
Tab.	Tabelle
TSA	Trypton Soja Agar
TS	Tecnicl Specification
UV	Ultraviolett
VRBA	Violet Red Bile Agar Kristallviolett – Galle – Agar
VRBGA	Violet Red Bile Glucose Agar (Kristallviolett – Galle – Glucose – Agar)
WHO	Word Health Organization (Weltgesundheitsorganisation)
X-αGlc	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- α-D-glucopyranosid

10. ANHANG

ANHANG I	Auswertung der Lebensmittelproben – DFI/ ESPM/ CES
ANHANG II	Bezugsquellennachweis Milchbrei
ANHANG III	Bezugsquellennachweis Anfangsnahrung
ANHANG IV	Bezugsquellennachweis Folgenahrung
ANHANG V	Erscheinungsbild der Referenzstämme auf DFI
ANHANG VI	Erscheinungsbild der Referenzstämme auf ESPM
ANHANG VII	Erscheinungsbild der Referenzstämme auf CES
ANHANG VIII	Erscheinungsbild Stammsammlung gram negativ auf DFI
ANHANG IX	Erscheinungsbild Stammsammlung gram negativ auf ESPM
ANHANG X	Erscheinungsbild Stammsammlung gram negativ auf CES
ANHANG XI	Erscheinungsbild Stammsammlung gram positiv auf DFI
ANHANG XII	Erscheinungsbild Stammsammlung gram positiv auf ESPM
ANHANG XIII	Erscheinungsbild Stammsammlung gram positiv auf CES
ANHANG XIV	Lebenslauf

VERWENDETE ABKÜRZUNGEN

k.W.	kein Wachstum
n.a.	nicht auswertbar
n.d.	nicht durchgeführt
n.n.	nicht nachweisbar

THEORETISCH ZU VERWENDENDE RECHNUNGEN

$$\text{Sensitivität (\%)} = \frac{\text{richtig positiv} \times 100}{\text{richtig positiv} + \text{falsch negativ}}$$

$$\text{Spezitivität (\%)} = \frac{\text{richtig negativ} \times 100}{\text{richtig negativ} + \text{falsch positiv}}$$

$$\text{Effizienz (\%)} = \frac{(\text{richtig positiv} + \text{richtig negativ}) \times 1000}{\text{Probenanzahl}}$$

ANHANG I

Auswertung der Lebensmittelproben – DFI/ ESPM/ CES

Interne Nummer	Farbe auf DFI	Farbe auf ESPM	Farbe auf CES	Gramfärbung	Ergebnis	Beurteilung
1	k.W.	k.W.	k.W.	n.d.	n.a.	n.n.
2	k.W.	k.W.	k.W.	n.d.	n.a.	n.n.
3	k.W.	k.W.	k.W.	n.d.	n.a.	n.n.
4	weiße Kolonien	gelbe Kolonien mit Gelbfärbung des Agar	weiße Kolonien	gramnegative Stäbchen	Serratia ficaria	richtig negativ
5	k.W.	k.W.	k.W.	n.d.	n.a.	n.n.
6	k.W.	k.W.	k.W.	n.d.	n.a.	n.n.
7	k.W.	k.W.	k.W.	n.d.	n.a.	n.n.
8	k.W.	k.W.	k.W.	n.d.	n.a.	n.n.
9	k.W.	k.W.	k.W.	n.d.	n.a.	n.n.
10	k.W.	k.W.	k.W.	n.d.	n.a.	n.n.
11	k.W.	k.W.	k.W.	n.d.	n.a.	n.n.
12	k.W.	k.W.	k.W.	n.d.	n.a.	n.n.
13	k.W.	k.W.	k.W.	n.d.	n.a.	n.n.
14	k.W.	k.W.	k.W.	n.d.	n.a.	n.n.
15	k.W.	k.W.	k.W.	n.d.	n.a.	n.n.
16	k.W.	k.W.	k.W.	n.d.	n.a.	n.n.
17	k.W.	k.W.	k.W.	n.d.	n.a.	n.n.
18	k.W.	k.W.	k.W.	n.d.	n.a.	n.n.
19	k.W.	k.W.	k.W.	n.d.	n.a.	n.n.
20	k.W.	k.W.	k.W.	n.d.	n.a.	n.n.
21	k.W.	k.W.	k.W.	n.d.	n.a.	n.n.

Interne Nummer	Farbe auf DFI	Farbe auf ESPM	Farbe auf CES	Gramfärbung	Ergebnis	Beurteilung
22	k.W.	k.W.	k.W.	n.d.	n.a.	n.n.
23	k.W.	k.W.	k.W.	n.d.	n.a.	n.n.
24	k.W.	k.W.	k.W.	n.d.	n.a.	n.n.
25	k.W.	k.W.	k.W.	n.d.	n.a.	n.n.
26	k.W.	k.W.	k.W.	n.d.	n.a.	n.n.
27	k.W.	k.W.	k.W.	n.d.	n.a.	n.n.
28	k.W.	k.W.	k.W.	n.d.	n.a.	n.n.
29	k.W.	k.W.	k.W.	n.d.	n.a.	n.n.
30	k.W.	k.W.	k.W.	n.d.	n.a.	n.n.
31	k.W.	k.W.	k.W.	n.d.	n.a.	n.n.
32	k.W.	k.W.	k.W.	n.d.	n.a.	n.n.
33	k.W.	k.W.	k.W.	n.d.	n.a.	n.n.
34	k.W.	k.W.	k.W.	n.d.	n.a.	n.n.
35	k.W.	k.W.	k.W.	n.d.	n.a.	n.n.
36	k.W.	k.W.	k.W.	n.d.	n.a.	n.n.
37	k.W.	k.W.	k.W.	n.d.	n.a.	n.n.
38	k.W.	k.W.	k.W.	n.d.	n.a.	n.n.
39	k.W.	k.W.	k.W.	n.d.	n.a.	n.n.
40	k.W.	k.W.	k.W.	n.d.	n.a.	n.n.
41	k.W.	k.W.	k.W.	n.d.	n.a.	n.n.
42	k.W.	k.W.	k.W.	n.d.	n.a.	n.n.
43	k.W.	k.W.	k.W.	n.d.	n.a.	n.n.
44	k.W.	k.W.	k.W.	n.d.	n.a.	n.n.
45	k.W.	k.W.	k.W.	n.d.	n.a.	n.n.
46	k.W.	k.W.	k.W.	n.d.	n.a.	n.n.
47	k.W.	k.W.	k.W.	n.d.	n.a.	n.n.
48	k.W.	k.W.	k.W.	n.d.	n.a.	n.n.

Interne Nummer	Farbe auf DFI	Farbe auf ESPM	Farbe auf CES	Gramfärbung	Ergebnis	Beurteilung
49	k.W.	k.W.	k.W.	n.d.	n.a.	n.n.
50	k.W.	k.W.	k.W.	n.d.	n.a.	n.n.

ANHANG II

Bezugsquellennachweis Milchbrei

Interne Nummer	Probenname	Herkunft	Charge	Ablaufdatum
1	BABYLOVE Milchbrei Grieß - Banane	DM 1200 Wien Handelskai	L61556N002 17:21	09.2010
2	BABYLOVE Milchbrei Grieß mit Boubon Vanille	DM 1200 Wien Handelskai	LL08D-10.2010 -21102955-01- 15:00-009434	10.2010
3	BEBIVITA Milchbrei Schoko	MÜLLER 1060 Wien Mariahilferstr.	6009029 19:25 064A	05.2010
4	BEBIVITA Milchbrei Frucht	MÜLLER 1060 Wien Mariahilferstr.	6033068 19:53 266 B	09.2009
5	MELLIN Pappa Lattea Frutta Mista	AUCHAN 00177 Rom Via Collatina/ G.B. Valente	LR095	05.04.11
6	MELLIN Pappa Lattea Biscotti	AUCHAN 00177 Rom Via Collatina/ G.B. Valente	LR030	30.01.11
7	LASANA Grieß Milchbrei mit Bourbon Vanille	SCHLECKER 1090 Wien Liechtensteinstr	2207D -21102790-02- 04:43 - 010790	10.2010
8	LASANA Früchte Milchbrei	SCHLECKER 1090 Wien Liechtensteinstr	2229A -21091070-02- 04:23 - 010790	07.2010
9	MILUPA Schlaf Gut Milchbrei Vollkorn Früchte	MERKUR 1200 Wien Handelskai	00030121 03:44	29.08.09
10	MILUPA Milchbrei Stracciatella	MERKUR 1200 Wien Handelskai	41547 11:23	23.07.10
11	MILUPA APTAMIL Milchbrei Grieß	MILUPA Gesellschaft M.B.H. 5412 Puch	Mat.Nr. 0103150 115282	28.05.10
12	MILUPA APTAMIL Milchbrei Weizen – Hirse - Hafer	DM 1200 Wien Handelskai	42893 08:01	02.04.10
13	GITTIS BABY Bio Milchbrei Banane	BIPA 1090 Wien Nussdorferstr.	CL 08:06	02.03.10
14	GITTIS BABY Bio Milchreisbrei	BIPA 1200 Wien Hellwagstr.	AL 14:33	01.03.10

Interne Nummer	Probenname	Herkunft	Charge	Ablaufdatum
15	NESTLE ALETE Feiner Milchbrei - Grieß	NESTLE Österreich GmbH 1120 Wien	L82800742A 23:20	12.2009
16	NESTLE ALETE Milchbrei Starte Gut Honig & Flakes	MERKUR 1200 Wien Handelskai	L83370742A 05:30	03.2010
17	ALNATURA Dinkel Milchbrei	DM 1200 Wien Handelskai	L62823N053 06:27	30.03.10
18	HOLLE Bio Milchbrei Hirse	BIO MARAN 1070 Wien Lindengasse	L62015N025 07:26	30.05.10
19	HUMANA Milchbrei mit Prebiotik und Banane	MÜLLER 1060 Wien Mariahilferstr.	II116-10.2009- 21056483-02- 03:46-09053	10.2009
20	HIPP Milchbrei Erdbeere Probiotisch	MÜLLER 1060 Wien Mariahilferstr.	6038029 12:50 093A	03.2010

ANHANG III

Bezugsquellennachweis Anfangsnahrung

Interne Nummer	Probenname	Herkunft	Charge	Ablaufdatum
21	BABYLOVE Bio Anfangsmilch 1	DM 1200 Wien Handelskai	L61551N002 02:34 E	07.2010
22	BEBIVITA Anfangsmilch PRE	MÜLLER 1060 Wien Mariahilferstr.	L9047 11:35 5	30.07.10
23	SICURA BEBILAC Latte in polvere per lattanti 1	AUCHAN 00177 Rom Via Collatina/ G.B. Valente	CFL 101.24/ 01.12.2008 21:44	01.12.10
24	NIPOL Latte in polvere per lattanti 1	AUCHAN 00177 Rom Via Collatina/ G.B. Valente	1 9141030002 GR.800 13:55:58	31.05.11
25	PLASMON Primigiorni Latte in polvere per lattanti 1	AUCHAN 00177 Rom Via Collatina/ G.B. Valente	1 9072030001 GR.800 10:44:23	31.03.11
26	GITTIS BABY Bio Anfangsmilch 1	BIPA 1090 Wien Nussdorferstr.	BL 08:06	02.03.10
27	MILUPA MILUMIL PRE	BIPA 1200 Wien Hellwagstr.	L: 1111413 VP1	21.10.10
28	MILUPA MILUMIL 1	MERKUR 1200 Wien Handelskai	L: 1182216 VP1	28.07.10
29	MILUPA APTAMIL PRE	BIPA 1200 Wien Hellwagstr.	F 063 21:41 001262	04.09.10
30	HOLLE Bio Säuglingsmilchnahrung 1	BIO MARAN 1070 Wien Lindengasse	L 62102N042	30.07.10
31	NESTLE Alete PRE	MÜLLER 1060 Wien Mariahilferstr.	90910346BA 19:06 NWB018-3	10.2010
32	NESTLE Beba Sensitive von Geburt an	ÄRZTEGEMEIN- SCHAFT 9500 Villach Richard- Wagner Str. 18	L 902707421D 15:36	11.2009
33	HUMANA Anfangsmilch PRE	MÜLLER 1060 Wien Mariahilferstr.	II28M-05.2010 - 21077835-02- 02:44-008069	05.2010

Interne Nummer	Probenname	Herkunft	Charge	Ablaufdatum
34	HIPP PRE	Hipp Shop 05500 Ingolstadt Regensburger- str.	II 05N 21078908 01 19:46	06.03.10
35	LASANA Dauermilch 1	MÜLLER 1060 Wien Mariahilferstr.	LL27A-07.2010 -21090601- 01- 22:29-002928	07.2010

ANHANG IV

Bezugsquellennachweis Folgenahrung

Interne Nummer	Probenname	Herkunft	Charge	Ablauf - datum
36	BABYLOVE Bio Folgemilch 3	DM 1200 Wien Handelskai	L61553N006 00:42 I	30.11.10
37	BEBIVITA Folgemilch 3	MÜLLER 1060 Wien Mariahilferstr.	LL17B 21093944-01- 11:12-020064	19.05.10
38	SICURA BEBILAC Latte in polvere di proseguimento 2	AUCHAN 00177 Rom Via Collatina/ G.B. Valente	CFL 111.20/ 18.12.2008 19:25	18.12.10
39	NIPOL Latte in polvere di proseguimento 2	AUCHAN 00177 Rom Via Collatina/ G.B. Valente	9037 15:01	28.02.11
40	PLASMON Transilat Latte in polvere di proseguimento 2	AUCHAN 00177 Rom Via Collatina/ G.B. Valente	9111030001 GR. 800 09:16:49	30.04.11
41	GITTIS BABY Folgemilch 2	BIPA 1090 Wien Nussdorferstr.	RK GFM 2 826663 13:41	26.02.10
42	MILUPA Folgemilch Milumil 2	Milupa Gesellschft M.B.H. 5412 Puch	L: 1040732	14.04.10
43	MILUPA Folgemilch Milumil 3	MERKUR 1200 Wien Handelskai	L: 1110020	21.07.10
44	MILUPA APTAMIL Folgemilch 3	MÜLLER 1060 Wien Mariahilferstr.	F 140 00:08 000940	20.05.11
45	HOLLE Bio Säuglingsfolgemilch 3	BIO MARAN 1070 Wien Lindengasse	L62030N026 12:06 G	30.09.10
46	NESTLE ALETE Folgemilch 3	MÜLLER 1060 Wien Maria Hilferstr.	9078080612 21:07 06.2010 B	06.2010
47	NESTLE Beba Folgemilch PRO 2	Nestle Österreich GmbH 1120 Wien	9063080651 2	03.2010
48	HUMANA Folgemilch 3 Banane - Vanille	MÜLLER 1060 Wien Mariahilferstr.	LL04D-10.2010 -21102213-02- 00:28-010177	10.2010

Interne Nummer	Probenname	Herkunft	Charge	Ablaufdatum
49	HIPP Folgemilch 2	SCA Service Center 85055 Ingolstadt Regensburger- str.	II 19M 21076019 01 19:42	19.02.10
50	LASANA Folgemilch 3	SCHLECKER 1090 Wien Liechtensteinstr	LL01B – 21091342-01- 20:30-011317	07.2010

ANHANG V

Erscheinungsbild der Referenzstämmе auf DFI

Nummer	Art	Bezeichnung	DFI
1	<i>Cronobacter</i>	FSM 327	blau - grün
2	<i>Cronobacter</i>	FSM 311	blau - grün
3	<i>Cronobacter</i>	FSM 274	blau - grün
4	<i>Cronobacter</i>	FSM 266	blau - grün
5	<i>Cronobacter</i>	FSM 493	blau - grün
6	<i>Cronobacter</i>	FSM 269	blau - grün
7	<i>Cronobacter</i>	FSM 423	blau - grün
8	<i>Cronobacter</i>	FSM 302	blau - grün
9	<i>Cronobacter</i>	FSM 323	blau - grün
10	<i>Cronobacter</i>	FSM 292	blau - grün
11	<i>Cronobacter</i>	FSM 271	blau - grün
12	<i>Cronobacter</i>	FSM 265	blau - grün

ANHANG VI

Erscheinungsbild der Referenzstämme auf ESPM

Nummer	Art	Bezeichnung	ESPM
1	<i>Cronobacter</i>	FSM 327	blau – schwarz*
2	<i>Cronobacter</i>	FSM 311	blau - schwarz*
3	<i>Cronobacter</i>	FSM 274	blau - schwarz*
4	<i>Cronobacter</i>	FSM 266	blau - schwarz*
5	<i>Cronobacter</i>	FSM 493	blau - schwarz*
6	<i>Cronobacter</i>	FSM 269	blau - schwarz*
7	<i>Cronobacter</i>	FSM 423	blau - schwarz*
8	<i>Cronobacter</i>	FSM 302	blau - schwarz*
9	<i>Cronobacter</i>	FSM 323	blau - schwarz*
10	<i>Cronobacter</i>	FSM 292	blau - schwarz*
11	<i>Cronobacter</i>	FSM 271	blau - schwarz*
12	<i>Cronobacter</i>	FSM 265	blau - schwarz*

* Der Agar hat sich von der Ausgangsfarbe orange nach pink verfärbt

ANHANG VII

Erscheinungsbild der Referenzstämme auf CES

Nummer	Art	Bezeichnung	CES
1	<i>Cronobacter</i>	FSM 327	türkis
2	<i>Cronobacter</i>	FSM 311	türkis
3	<i>Cronobacter</i>	FSM 274	türkis
4	<i>Cronobacter</i>	FSM 266	türkis
5	<i>Cronobacter</i>	FSM 493	türkis
6	<i>Cronobacter</i>	FSM 269	türkis
7	<i>Cronobacter</i>	FSM 423	türkis
8	<i>Cronobacter</i>	FSM 302	türkis
9	<i>Cronobacter</i>	FSM 323	türkis
10	<i>Cronobacter</i>	FSM 292	türkis
11	<i>Cronobacter</i>	FSM 271	türkis
12	<i>Cronobacter</i>	FSM 265	türkis

ANHANG VIII

Erscheinungsbild Stammsammlung gram negativ auf DFI

Nummer	Art	Bezeichnung	DFI
1	<i>Escherichia coli</i>	ATCC 11775	weiß – gelb pigmentiert
2	<i>Citrobacter freundii</i>	ATCC 8090	schwarz mit weißem Hof
3	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ATCC 13883	weiß – gelb pigmentiert
4	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	ATCC 23055	kein Wachstum
5	<i>Kluyvera ascorbata</i>	ATCC 33433	weiß – grün pigmentiert
6	<i>Enterobacter cloace</i>	ATCC 13047	weiß – gelb pigmentiert
7	<i>Enterobacter cloace</i>	ATCC 49141	weiß – gelb pigmentiert
8	<i>E. coli</i> 0157:H7 (EHEC)	ATCC 43894	weiß – gelb pigmentiert
9	<i>Salmonella typhimuriun</i>	ATCC 14028	schwarz mit weißem Hof
10	<i>Salmonella enteritidis</i>	ATCC 13076	schwarz mit weißem Hof

ANHANG IX

Erscheinungsbild Stammsammlung gram negativ auf ESPM

Nummer	Art	Bezeichnung	ESPM
1	<i>Escherichia coli</i>	ATCC 11775	weiß – gelb pigmentiert*
2	<i>Citrobacter freundii</i>	ATCC 8090	weiß – gelb pigmentiert*
3	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ATCC 13883	weiß – gelb pigmentiert*
4	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	ATCC 23055	Kein Wachstum
5	<i>Kluyvera ascorbata</i>	ATCC 33433	Dunkelblau +
6	<i>Enterobacter cloace</i>	ATCC 13047	weiß – gelb pigmentiert*
7	<i>Enterobacter cloace</i>	ATCC 49141	weiß – gelb pigmentiert*
8	<i>E. coli</i> 0157:H7 (EHEC)	ATCC 43894	Weiß +
9	<i>Salmonella typhimuriun</i>	ATCC 14028	weiß – gelb pigmentiert*
10	<i>Salmonella enteritidis</i>	ATCC 13076	weiß – gelb pigmentiert*

* Der Agar hat sich von der Ausgangsfarbe orange nach gelb verfärbt

+ Der Agar hat sich von der Ausgangsfarbe orange nach pink verfärbt

ANHANG X

Erscheinungsbild Stammsammlung gram negativ auf CES

Nummer	Art	Bezeichnung	CES
1	<i>Escherichia coli</i>	ATCC 11775	grün pigmentiert
2	<i>Citrobacter freundii</i>	ATCC 8090	weiß
3	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ATCC 13883	weiß
4	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	ATCC 23055	kein Wachstum
5	<i>Kluyvera ascorbata</i>	ATCC 33433	weiß
6	<i>Enterobacter cloace</i>	ATCC 13047	grün pigmentiert
7	<i>Enterobacter cloace</i>	ATCC 49141	leicht grün pigmentiert
8	<i>E. coli</i> 0157:H7 (EHEC)	ATCC 43894	leicht grün pigmentiert
9	<i>Salmonella typhimuriun</i>	ATCC 14028	weiß
10	<i>Salmonella enteritidis</i>	ATCC 13076	weiß

ANHANG XI

Erscheinungsbild Stammsammlung gram positiv auf DFI

Nummer	Art	Bezeichnung	DFI
1	<i>Bacillus cereus</i>	ATCC 11778	kein Wachstum
2	<i>Bacillus pumilus</i>	ATCC 27142	kein Wachstum
3	<i>Bacillus subtilis</i>	ATCC 6051	kein Wachstum
4	<i>E. faecium</i>		kein Wachstum
5	<i>E. faecalis</i>	ATCC 29212	kein Wachstum
6	<i>S. aureus</i>	ATCC 25923	kein Wachstum
7	<i>S. aureus</i>	NCTC 1803	kein Wachstum
8	<i>S. caprae</i>		türkis
9	<i>S. lentus</i>		weiß

ANHANG XII

Erscheinungsbild Stammsammlung gram positiv auf ESPM

Nummer	Art	Bezeichnung	ESPM
1	<i>Bacillus cereus</i>	ATCC 11778	kein Wachstum
2	<i>Bacillus pumilus</i>	ATCC 27142	kein Wachstum
3	<i>Bacillus subtilis</i>	ATCC 6051	kein Wachstum
4	<i>E. faecium</i>		kein Wachstum
5	<i>E. faecalis</i>	ATCC 29212	türkis
6	<i>S. aureus</i>	ATCC 25923	kein Wachstum
7	<i>S. aureus</i>	NCTC 1803	kein Wachstum
8	<i>S. caprae</i>		türkis
9	<i>S. lentus</i>		kein Wachstum

ANHANG XIII

Erscheinungsbild Stammsammlung gram positiv auf CES

Nummer	Art	Bezeichnung	CES
1	<i>Bacillus cereus</i>	ATCC 11778	kein Wachstum
2	<i>Bacillus pumilus</i>	ATCC 27142	kein Wachstum
3	<i>Bacillus subtilis</i>	ATCC 6051	kein Wachstum
4	<i>E. faecium</i>		kein Wachstum
5	<i>E. faecalis</i>	ATCC 29212	kein Wachstum
6	<i>S. aureus</i>	ATCC 25923	kein Wachstum
7	<i>S. aureus</i>	NCTC 1803	kein Wachstum
8	<i>S. caprae</i>		leicht türkis
9	<i>S. lentus</i>		leicht weiß

ANHANG XIV

Lebenslauf

Sandra Eisenwagen
 Handelskai 78-86/7/916
 1200 Wien, ÖSTERREICH
 eisenwagen_sandra@hotmail.com

Geburtstag und – ort: 08.02.1985, Klagenfurt
 Nationalität: Österreich
 Familienstand: ledig

AUSBILDUNG

BG / BRG Perau Villach	09/1995 – 06/2003
Reifezeugnis: Matura, 16.06.2003	
Universität Wien Ernährungswissenschaften Schwerpunkt: Lebensmitteltechnologie	10/2003 – gegenwärtig

SPRACHEN

Deutsch	Muttersprache
Englisch	Höhere Mittelstufe
Italienisch	Fließend

PRAKTIKA

LUA Lebensmitteluntersuchungsanstalt Klagenfurt Abteilung für Molekular- u. Mikrobiologie	08/2005 – 09/2005
Kärntnermilch reg.Gen.m.b.H. Spittal/ Drau Betriebslabor	09/ 2006
Universität Campus Biomedico Rom Labor für Biochemie und Ernährungswissenschaften	08/2008 – 09/2008

ARBEITSERFAHRUNG

ÖGE – Österreichische Gesellschaft für Ernährung 11/2005 – 10/2007
 und Magistrat Wien MA38
 Assistenz beim Projekt“ Ernährungsakademie”

Universität Wien 10/2006 – 02/2010
 Tutorin in den “Übungen zur Mikrobiologie und
 Hygiene”

Universität Wien 02/2008 – 02/2010
 Tutorin in den “Übungen Wasser-, Lebensmittel- und
 Betriebshygiene“

AUSLANDSAUFENTHALT

“Università degli Studi Roma Tre” 02/2007 – 07/2007
 Rom, Italien
 Erasmus

Wien, 01.09.2010