

Aus dem Institut für Lebensmittelhygiene des
Fachbereiches Veterinärmedizin der
Freien Universität Berlin und dem
Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin (BgVV)

**Untersuchungen zum Vorkommen von Listerien,
Salmonellen, Campylobacter und Staphylokokken in
Rohmilch im Land Brandenburg**

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin
an der
Freien Universität Berlin

vorgelegt von
MARCUS SPECKER
Tierarzt aus Düsseldorf

Berlin 1996
Journal-Nr. 2008

GEDRUCKT MIT GENEHMIGUNG
DES FACHBEREICHES VETERINÄRMEDIZIN
DER FREIEN UNIVERSITÄT BERLIN

Dekan:
Erster Gutachter:
Zweiter Gutachter:

Univ.-Prof. Dr. K. Hartung
Univ.-Prof. Dr. G. Hildebrandt
a. Pl.- Prof. Dr. W. Heeschen

Tag der Promotion:

13.12.1996

Inhalt

1 Einleitung.....	2
2 Literaturübersicht.....	4
2.1 Gesetzliche Anforderungen an die Milchqualität	6
2.2 Aerobe Gesamtkeimzahl und Coliforme Keime.....	11
2.3 Listeria monocytogenes	13
2.4 Salmonellen	20
2.5 Campylobacter	24
2.6 Staphylokokken.....	32
3 Eigene Untersuchungen	36
3.1 Material und Methodik	36
3.1.1 Material	36
3.1.2 Methodik	38
3.1.2.1 Aerobe Gesamtkeimzahl	39
3.1.2.2 Coliforme Keime.....	41
3.1.2.3 Listeria monocytogenes.....	42
3.1.2.4 Salmonellen.....	48
3.1.2.5 Campylobacter	52
3.1.2.6 Koagulase-positive Staphylokokken	56
3.1.2.7 Statistische Methoden	59
3.2 Ergebnisse und Diskussion	60
3.2.1 Aerobe Gesamtkeimzahl und Coliforme Keime.....	60
3.2.2 Listeria monocytogenes.....	65
3.2.3 Salmonellen.....	70
3.2.4 Campylobacter	71
3.2.5 Koagulase-positive Staphylokokken.....	74
3.2.6 Statistische Ergebnisse.....	78
4 Schlußfolgerungen.....	80
5 Zusammenfassung	84
6 Summary.....	86
7 Schrifttum	88
8 Anhang.....	102

1 Einleitung

Im Jahre 1993 wurden in Deutschland knapp 26 Millionen Tonnen Rohmilch an die Molkereien geliefert, um pasteurisierte Trinkmilch und Milchprodukte herzustellen (SCHÄFER, 1994). Diese Rohmilch muß seit 1985 gemäß der Richtlinie 85/397/EWG der Europäischen Gemeinschaft und seit 1989 entsprechend der Milchverordnung besondere hygienische Voraussetzungen erfüllen, wenn sie zur Herstellung von pasteurisierter Milch und Milchprodukten dienen soll.

Mit Umsetzung der Richtlinie 92/46/EWG vom 16. Juni 1992 zum 1. Januar 1994 und dem Inkrafttreten der darauf basierenden neuen Milchverordnung vom 24. April 1995 wurden zum ersten Mal über diese hygienischen Voraussetzungen hinaus auch definierte Schwellen-, Richt- und Grenzwerte für die mikrobiologische Beschaffenheit von Rohmilch, wärmebehandelter Milch sowie von Milchprodukten gesetzlich verankert.

Gemäß Milchverordnung muß Rohmilch zur Herstellung von Trinkmilch einem Wärmebehandlungsverfahren unterzogen werden. Gegen diese gesetzlich vorgeschriebene Erhitzung von Rohmilch steht häufig der Wunsch der Verbraucher nach naturbelassenen und unbehandelten Lebensmitteln im Rahmen eines sogenannten „gesunden Ernährungsplanes“, weshalb ein bestimmter Personenkreis den Genuß von Rohmilch und aus Rohmilch hergestellten Produkten bevorzugt.

Ausgenommen von der Pflicht zur Wärmebehandlung sind lediglich die Rohmilch-ab-Hof-Abgabe und Vorzugsmilch. Letztere darf nur in Erzeugerbetrieben unter besonderen Auflagen gewonnen werden und muß strenge mikrobiologische Kriterien erfüllen, die über denen von Rohmilch, die zur Herstellung von pasteurisierter Trinkmilch verwendet wird, liegen. Bei der Milch-ab-Hof-Abgabe besteht insoweit eine besondere Situation, da an der Verkaufsstelle ein Hinweis angebracht sein muß, daß diese Milch vor Verzehr abzukochen ist.

Trotz dieser Vorschriften bleibt es nicht aus, daß Rohmilch vielfach unkontrolliert an den Verbraucher gelangt. So ist über das Vorkommen von Enteritis infectiosa-Ausbrüchen, bei denen Milch oder Milchprodukte den Vektor der Infektion darstellen, immer wieder berichtet worden. In derartigen Fällen handelte es sich überwiegend um nicht erhitzte, aufgrund technischer Fehler nicht korrekt erhitzte oder nachträglich mit Rohmilch vermischte wärmebehandelte Milch.

Um einen Überblick über das Vorkommen von Krankheitserregern in Rohmilch zu erhalten, wurden in der vorliegenden Arbeit Rohmilchproben aus Brandenburg auf ausgewählte humanpathogene Bakterien-Spezies, die häufig im Zusammenhang mit Lebensmittelinfektionen beziehungsweise -intoxikationen in Erscheinung treten, untersucht. Diese Erhebung erstreckte sich auf Salmonellen, Campylobacter, Listeria monocytogenes und Koagulase-positive Staphylokokken, insbesondere Staphylococcus aureus. Neben der Häufigkeit dieser Keime sollte

auch die Höhe der Kontamination erfaßt werden. Zusätzlich wurden die aerobe Gesamtkeimzahl und der Gehalt an coliformen Keimen ermittelt, um einen Überblick über die hygienische Beschaffenheit der einzelnen Milchproben zu erhalten.

Bei den untersuchten Rohmilchproben handelte es sich um Bestandssammelmilchproben, die von der Meierei-Zentrale emzett GmbH Berlin-Brandenburg aus dem betriebseigenen Labor zur Verfügung gestellt wurden, wo sie der Meierei für eigene Kontrollen dienten. Die Bestände, aus denen die Rohmilchproben stammten, liegen in Brandenburg, südlich der topographischen Linie von Brandenburg über Berlin nach Frankfurt an der Oder.

Die beprobten Rohmilchchargen waren nicht zur direkten Abgabe an den Verbraucher bestimmt, sondern für die Wärmebehandlung und den Vertrieb als Konsummilch vorgesehen.

Die Untersuchung wurde zwischen Juni 1993 und Juni 1994 im Labor des Fachgebietes Milchhygiene des Fachbereiches Hygiene der Lebensmittel und Bedarfsgegenstände des Bundesinstitutes für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin (BgVV) durchgeführt.

2 Literaturübersicht

Begriffsbestimmung „Risiko“ und „Qualität“

Lebensmittel, die an den Verbraucher abgegeben werden, sollen einen vergleichbaren Standard in ihrer geweblichen und chemischen Zusammensetzung aufweisen, unter ernährungsphysiologischen Gesichtspunkten gesund sein, zu keiner Übervorteilung des Verbrauchers Anlaß geben und eine gesundheitliche Unbedenklichkeit sowie hygienisch einwandfreie Beschaffenheit aufweisen. Eine entsprechende Untersuchung von Lebensmitteln kann diese Anforderungen überprüfen und absichern.

Während bei Lebensmitteln, die im bearbeiteten Zustand an den Verbraucher gelangen, oft technologische Verfahren wie Wärmebehandlung, Trocknung und Fermentation die Sicherheit hinsichtlich der hygienischen Beschaffenheit und des Gesundheitsschutzes verbessern beziehungsweise gewährleisten, ist bei unbehandelten Lebensmitteln, die direkt vom Verbraucher verzehrt werden, ein **Risiko** bezüglich des Vorkommens pathogener Mikroorganismen weit weniger auszuschließen. Der Begriff „**Risiko**“ bedeutet nach HEESCHEN et al. (1988) in diesem Zusammenhang das Eintreten seltener, unerwünschter und auch bei Einhaltung aller erforderlicher Sorgfalt nicht zu verhindernder Ereignisse. Das Gefährdungspotential kann durch Maßnahmen zur Verbesserung der hygienischen **Qualität** im Erzeugerbetrieb und auf allen Behandlungsstufen sowie durch verstärkte Untersuchungstätigkeit und Kontrolle verringert, aber als Restrisiko nicht ausgeschlossen werden.

Der Terminus „**Qualität**“ wird nicht nur im allgemeinen Sprachgebrauch, sondern auch in der Literatur sehr unterschiedlich verwendet und bedarf einer Konkretisierung. Die DIN ISO-Norm 8402 definiert die Gesamtheit von Merkmalen einer Einheit bezüglich ihrer Eignung, festgelegte und vorausgesetzte Erfordernisse zu erfüllen als **Qualität**. Praxisbezogener umfaßt **Qualität** nach HEESCHEN et al. (1988):

die Vermeidung wertmindernder oder unerwünschter Stoffe (Mikroorganismen, Rückstände und Kontaminanten)

den Eignungs- und Verbrauchswert (Haltbarkeit und Frische)

den Genußwert.

In der vorliegenden Arbeit soll der Begriff **Qualität** ausschließlich auf die hygienische **Qualität** beschränkt werden. Konkret ergibt er sich aus der bakteriologischen Beschaffenheit, dargestellt anhand der aeroben Gesamtkeimzahl und der coliformen Bakterien. Die Untersuchung auf das Vorhandensein ausgewählter pathogener Mikroorganismen, wie sie sich in der Milch vorfinden lassen, wurde dagegen zur Charakterisierung des **Restrisikos** durchgeführt. Auf diese Weise

kann das Gefährdungspotential, welches sich bei unsachgemäßer Behandlung der Milch ergibt, abgeschätzt werden.

Dabei verdienen „**Risikogruppen**“ besondere Beachtung. Hierunter wird ein Personenkreis verstanden, der aufgrund individueller Gegebenheiten bei Kontakt mit einem Infektionserreger häufiger erkrankt als die übrige Bevölkerung. Zu den Betroffenen zählen vor allem Schwangere, sehr junge und alte Menschen sowie Personen, die durch Medikamente, HIV-Infektion oder andere Ursachen immunsupprimiert sind.

2.1 Gesetzliche Anforderungen an die Milchqualität

Um Milch und Milchprodukte von einwandfreier Qualität zu erzeugen und diese Beschaffenheit auch bis zum Verbraucher zu erhalten, besteht seit langem das Bestreben, von der Ebene der Milcherzeuger an, über den Be- und Verarbeitungsbetrieb sowie den Einzelhandel bis hin zum Konsumenten einen möglichst einwandfreien Zustand des Rohstoffes und der daraus hergestellten Produkte zu gewährleisten. Gesetzliche Vorschriften unterstützen dieses Ziel, indem sie Regeln zur Einhaltung der Hygieneanforderungen formulieren.

Es existierten folgende einschlägigen Gesetzesvorschriften:

- 1.) Verordnung über die Güteprüfung und Bezahlung der Anlieferungsmilch (Milch-Güteverordnung) vom 9. Juli 1980, in der Fassung vom 27.12.1993;
- 2.) Milchhygienerichtlinie 85/397/EWG des Rates der Europäischen Gemeinschaften vom 24.8.1985, abgelöst durch die Milchhygienerichtlinie 92/46/EWG des Rates der Europäischen Gemeinschaften vom 16. Juni 1992 mit Hygienevorschriften für die Herstellung und Vermarktung von Rohmilch, wärmebehandelter Milch und Erzeugnissen auf Milchbasis und
- 3.) Verordnung über Hygiene- und Qualitätsanforderungen an das Gewinnen, Behandeln und Inverkehrbringen von Milch (Milchverordnung) vom 23.6.1989, in der Fassung vom 27.4.1993, abgelöst durch die Verordnung über Hygiene- und Qualitätsanforderungen an Milch und Erzeugnisse auf Milchbasis (Milchverordnung) vom 24.4.1995.

Diese Vorschriften stellen kodifizierte Normen für die Bezahlung, das Gewinnen, Behandeln und Inverkehrbringen von Milch und aus Milch hergestellten Produkten.

Als Grundvoraussetzung für die Gewährleistung der Qualität von wärmebehandelter Konsummilch galt bis zum 1. Januar 1994 nach § 5 (2) der Milchverordnung (1989), daß sie neben anderen Bedingungen nur aus Rohmilch hergestellt werden durfte, die gemäß § 3 (1) der Milch-Güteverordnung in Klasse 1 eingestuft worden war. Mithin durfte die Rohmilch einen mittleren Keimgehalt bis 100.000 pro Milliliter (als geometrisches Mittel über zwei Monate, bei der Untersuchung von mindestens zwei Proben pro Monat) nicht überschreiten. Diese Beschränkung bezog sich bisher nur auf Rohmilch zur Herstellung von wärmebehandelter Konsummilch und nicht grundsätzlich auf Anlieferungsmilch, aus der andere Milcherzeugnisse hergestellt werden sollten.

Außerdem mußte Rohmilch, die zur Abgabe an andere bestimmt war, von Rindern stammen, die nach Anlage 1 zur Milchverordnung von 1989:

- amtlich anerkannt tuberkulosefrei waren,
- amtlich anerkannt brucellosefrei waren,
- keine Anzeichen von ansteckenden, durch die Milch auf den Menschen übertragbaren Krankheiten aufwiesen,
- keine Allgemeinerkrankungen aufwiesen,
- von erkrankten Tieren abgesondert wurden,
- keine Wunden am Euter aufwiesen und
- mindestens zwei Liter Milch pro Tag gaben.

Darüber hinaus mußten auch Anforderungen an die Hygiene beim Stallbau, Melken und Lagern der Milch sowie an die persönliche Hygiene des Melkpersonals erfüllt sein.

Die aufgeführten Bedingungen für die Tiergesundheit und die Bestandshygiene wurden in der neuen Milchverordnung von 1995 analog übernommen. Diese juristische Norm setzte die seit dem 1. Januar 1994 geltende Richtlinie 92/46/EWG des Rates der Europäischen Gemeinschaften (Amtsblatt der Europäischen Gemeinschaften, 1992) in nationales Recht um. Hier wurden über die bisherigen Regelungen hinaus detaillierte und strengere hygienische Anforderungen an die Verarbeitungsqualität von Rohmilch gestellt. Nach Anlage 4 der Milchverordnung von 1995 darf Rohmilch zur Herstellung von wärmebehandelter Konsummilch, fermentierter Milch, Milch mit Labzusatz, geliertes Milch, aromatisierter Milch und Rahm höchstens eine mesophile aerobe Gesamtkeimzahl von 100.000 pro Milliliter (als geometrisches Mittel über zwei Monate, bei mindestens zwei Untersuchungen pro Monat) aufweisen. Bei der Herstellung von anderen als den genannten Erzeugnissen auf Milchbasis wird bis zum 31.12.1997 noch eine Keimzahl bis 400.000 pro Milliliter Rohmilch toleriert. Nach dieser Frist wird generell nur noch Rohmilch mit höchstens 100.000 koloniebildenden Einheiten pro Milliliter zur Verarbeitung zugelassen.

Diese Vorschriften gelten, wie bereits dargelegt, für Rohmilch, die zur Herstellung von wärmebehandelten Produkten verwendet werden soll.

Die Wärmebehandlungsverfahren unterliegen ebenfalls den gesetzlichen Regelungen und sind entsprechend der Anlage 6 Nr. 2 zur Milchverordnung (1995) wie folgt definiert:

- Pasteurisierung:

Dauererhitzung:	62 bis 65 °C für 30 bis 32 Minuten
Kurzzeiterhitzung:	72 bis 75 °C für 15 bis 30 Sekunden
Hoherhitzung:	85 bis 127 °C für eine Dauer, die zu einem negativen Peroxidasenachweis führt
- Ultrahoherhitzung: mindestens 135 °C und Abfüllen unter aseptischen Bedingungen
- Sterilisierung: mindestens 110 °C in luftdicht verschlossenen Behältnissen
- Kochen: Erhitzung bis zum wiederholten Aufkochen der Milch.

Über die wärmebehandelte Trinkmilch hinaus sind zum direkten Bezug durch den Verbraucher nur die Milch-ab-Hof-Abgabe und die Vorzugsmilch vorgesehen. In beiden Fällen handelt es sich um Rohmilch.

Zwar gelangt Milch-ab-Hof nach § 8 der Milchverordnung (1995) unmittelbar und unbehandelt vom Erzeuger an den Verbraucher, doch muß an der Abgabestelle der Hinweis „Rohmilch, vor dem Verzehr abkochen“ gut sicht- und lesbar angebracht sein. Weiterhin muß die Milch-ab-Hof-Abgabe der zuständigen Behörde angezeigt werden, und das Lebensmittel darf nur am Tage der Gewinnung oder einen Tag danach verkauft werden.

In den USA und anderen Ländern wird dem Verbraucher eine zertifizierte Rohmilch angeboten, was in diesem Zusammenhang bedeutet, daß Betriebe eine Zulassung besitzen müssen, Rohmilch an den Verbraucher abzugeben. Sowohl an die Milch als auch die Bestände werden dabei gezielte hygienische Anforderungen gestellt. Als besondere Form der Zertifizierung läßt sich in Deutschland die Erzeugung von Vorzugsmilch interpretieren.

So enthalten der § 7 sowie Anlage 9 der Milchverordnung (1995) Anforderungen an die hygienische Beschaffenheit von Vorzugsmilch. Tabelle 1 listet die Kriterien für Vorzugsmilch nach Anlage 9 der Milchverordnung (1995) auf.

Tabelle 1: Hygienische Anforderungen an Vorzugsmilch nach Anlage 9 der Milchverordnung (1995)

	m¹	M²	n³	c⁴
Aerobe Keimzahl pro ml bei + 30 °C	30.000	50.000	5	2
Coliforme Keime / ml bei + 30 °C	20	100	5	1
Staphylococcus aureus / ml	100	500	5	2
Streptococcus agalactiae / 0,1 ml	0	10	5	2
Anzahl somatischer Zellen / ml	300.000	400.000	5	2
Salmonellen in 25 ml	0	0	5	0
Pathogene Mikroorganismen oder deren Toxine dürfen nicht in Mengen vorhanden sein, die die Gesundheit des Verbrauchers beeinträchtigen können.				
Sensorische Kontrolle	keine Abweichung			
Phosphatasenachweis	positiv			

¹ m = Schwellenwert; das Ergebnis gilt als ausreichend, wenn die einzelnen Proben diesen Wert nicht überschreiten.

² M = Höchstwert; das Ergebnis gilt als nicht ausreichend, wenn die Werte einer oder mehrerer Proben diesen Wert überschreiten.

³ n = Anzahl der Proben.

⁴ c = Anzahl der Proben mit Wert zwischen m und M; das Ergebnis gilt als akzeptabel, wenn die Werte der übrigen Proben den Wert m erreichen.

Die Vorgaben für Rohmilch-ab-Hof und Vorzugsmilch wurden unverändert aus der Milchverordnung von 1989 übernommen.

Weiterhin bestehen auch noch Vorschriften, welche die Beurteilung einzelner pathogener Mikroorganismen regeln.

So existieren obligate Kriterien für das Vorhandensein von *Listeria monocytogenes* in Erzeugnissen auf Milchbasis. Nach der Richtlinie 92/46/EWG (Anhang C, Kapitel II A 1.) und der Milchverordnung von 1995 (Anlage 6 Nr. 3.3.1.1) dürfen in Erzeugnissen auf Milchbasis in 1 g beziehungsweise in Käse - außer Hartkäse - in 25 g keine *Listeria monocytogenes*-Keime enthalten sein.

Ogleich genaue Kenntnisse über die minimale Infektionsdosis von *Listeria monocytogenes* für den Menschen fehlen, erließ das Bundesgesundheitsamt (heute Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin, BgVV) aus Gründen des vorbeugenden Verbraucherschutzes für rohe verzehrsfertige Lebensmittel und rohe nichtverzehrsfertige Lebensmittel, die vor dem Verzehr wärmebehandelt werden, folgende Empfehlung:

bei Keimzahlen von über 10^3 *Listeria monocytogenes* pro Milliliter ist das Lebensmittel nach § 8 LMBG geeignet, die Gesundheit zu schädigen und das Inverkehrbringen ist zu verbieten (ANONYM, 1991; TEUFEL, 1994).

Weitere Regelungen betreffen die Salmonellen. Sie dürfen nach Anlage 4 Nr. 1.3 zur Milchverordnung von 1995 bei Rohmilch, die zur Herstellung von Rohmilcherzeugnissen bestimmt ist, in $n = 5$ Proben in 25 ml nicht nachweisbar sein. Gemäß Anhang C, Kapitel II, B. 1. der Richtlinie 92/46/EWG wird Nulltoleranz auch in Konsummilch, die zum Verzehr in rohem Zustand bestimmt ist, nach der Umhüllung bei $n = 5$ Unterproben von 25 g vorgegeben.

In Anhang A, Kapitel IV A. 3. b) der Richtlinie 92/46/EWG, umgesetzt durch die Milchverordnung von 1995 (Anlage 4 Nr. 1.3), ist festgeschrieben, daß in roher Kuhmilch, die zur Herstellung von Rohmilcherzeugnissen ohne Wärmebehandlung bestimmt ist, bei $n = 5$ Proben ein Grenzwert von $M = 2.000$ *Staphylococcus aureus*-Keimen pro Milliliter nicht überschritten werden darf. Weiterhin sollen nicht mehr als $c = 2$ der $n = 5$ Proben einen *Staphylococcus aureus*-Gehalt zwischen $m = 500$ und $M = 2.000$ Keimen pro Milliliter Milch aufweisen. Werte unterhalb des Schwellenwertes $m = 500$ sind akzeptabel.

Die gleichen Kriterien gelten auch für Konsummilch nach der Umhüllung, wenn sie zum Verzehr in rohem Zustand bestimmt ist (Anhang C, Kapitel II, B. 1. der Richtlinie 92/46/EWG).

Zur Bewertung des Vorkommens von *Campylobacter* in Milch gibt es noch keine spezifische Strategie. Es gilt jedoch allgemein, daß gemäß Anhang C, Kapitel II, B. 1. der Richtlinie 92/46/EWG sowie nach Anlage 4 Nr. 1.3 der Milchverordnung von 1995 in für den Verzehr in unverändertem Zustand bestimmte roher Kuhmilch nach der Umhüllung und nach Anhang C, Kapitel II, B. 2. der Richtlinie 92/46/EWG sowie Anlage 6 Nr. 3.1.1 der Milchverordnung von 1995 in pasteurisierter Milch pathogene Mikroorganismen in 25 g/ml nicht nachweisbar und

Krankheitserreger und ihre Toxine nicht in Mengen vorhanden sein dürfen, welche die Gesundheit der Verbraucher beeinträchtigen.

Analog dazu darf Rohmilch, die zur Herstellung von Rohmilcherzeugnissen bestimmt ist, nach Anlage 4, Nr. 1.3 zur Milchverordnung von 1995 Krankheitserreger oder deren Toxine nicht in Mengen enthalten, welche die Gesundheit der Verbraucher gefährden können.

2.2 Aerobe Gesamtkeimzahl und Coliforme Keime

Aerobe Gesamtkeimzahl

Die aerobe Gesamtkeimzahl stellt neben dem Gehalt an somatischen Zellen einen wesentlichen Parameter zur Bewertung der hygienischen Beschaffenheit und Qualität von Milch dar. In den rechtlichen Vorschriften (EG-Richtlinie, Milchverordnung) wird demgemäß die Qualität der Milch auch an der Einhaltung eines bestimmten Grenzwertes für die aerobe Gesamtkeimzahl gemessen.

Bei einer stichprobenartigen Erhebung, die zwischen 1986 und 1990 in Deutschland stattfand, wurden Rohmilchproben neben anderen Merkmalen auch auf die aerobe Makrokoloniezahl untersucht. Bei den insgesamt 4.563 Proben unterschritten 2.079 Einheiten den Wert 100.000 pro Milliliter (= 45,6 %) (SUHREN und HEESCHEN, 1992).

Andere Ergebnisse erhielten REA et al. (1992) bei einer Erhebung zur Milchqualität in Irland. Dabei wurden Sammelmilchproben von 70 Milcherzeugerbetrieben über einen Zeitraum von Juni 1989 bis Juli 1990 alle sechs bis sieben Wochen auf Listerien, Salmonellen, coliforme Keime, *Staphylococcus aureus* und den Gesamtkeimgehalt überprüft. Von den 386 auf ihre aerobe Gesamtkeimzahl untersuchten Proben enthielten 63 % (= 243 Proben) weniger als 30.000 pro Milliliter, während in 113 Proben (= 18,5 %) Keimzahlen von über 100.000 pro Milliliter festgestellt wurden.

Coliforme Keime

Als weiterer Hygieneparameter gilt die Höhe einer Kontamination mit coliformen Keimen, zumal sie auch einen Indikator für eine fäkale Verunreinigung darstellt. Unter coliformen Keimen werden alle Bakterien der Gattung *Enterobacteriaceae* zusammengefaßt, die mit der Analytik gemäß Amtlicher Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 35 LMBG (Nr. L 01.00-2) nachgewiesen werden, das heißt, Laktose unter Gasbildung verstoffwechseln. Die Kontamination mit coliformen Bakterien gibt Hinweise über Mängel bei der Melktechnik sowie bei der Reinigung und Desinfektion der Gerätschaften.

Die Coliformen-Flora der Milch setzt sich überwiegend aus *Escherichia coli*, *Enterobacter*, *Klebsiella* und *Citrobacter*-Spezies zusammen (ANONYM, 1993).

Im Rahmen der bereits erwähnten Studie von SUHREN und HEESCHEN (1992) wurden bei 1.211 Proben auch Untersuchungen auf den Gehalt an coliformen Keimen durchgeführt. Ihr mittlerer Gehalt betrug 347 pro Milliliter Rohmilch (Vergleiche Tabelle 2). Besonderes Interesse verdient die Tatsache, daß der Gehalt an coliformen Keimen parallel zur Gesamtkeimzahl anstieg:

Tabelle 2: Ergebnisse der von SUHREN und HEESCHEN durchgeführten Untersuchung bezüglich coliformer Keime

Makrokoloniezahl (in 1000 /ml)	n	\tilde{x} (coliforme Keime)	s (coliforme Keime)
≤ 50	248	34	8,24
51-100	236	100	9,89
101-300	309	362	11,14
301-800	189	1352	15,86
≥ 800	229	5445	21,06
Total	1.211	347	21,67

REA et al. (1992) isolierten bei ihren Untersuchungen in Irland aus allen Rohmilchproben coliforme Keime. Allerdings enthielten ungefähr 70 % der Proben weniger als 100 coliforme Keime pro Milliliter Milch.

2.3 *Listeria monocytogenes*

2.3.1 Morphologie

Nach SEELIGER und JONES in BERGEY's Manual of Systematic Bacteriology (1984, S. 1235 ff.) sind Listerien nicht sporenbildende, etwa 0,4-0,5 x 0,5-2 µm große, grampositive Stäbchen, die aufgrund peritricher Begeißelung Beweglichkeit besitzen. Sie wachsen aerob und fakultativ anaerob. Listerien produzieren Katalase und können Aeskulin hydrolysieren. Auf Nähragar bilden sie 0,5-1,5 mm große, durchscheinende, leicht konvexe, blaugraue Kolonien mit leicht rauher Oberfläche und glattem Rand. Je älter die Kolonie ist, desto rauher wird die Oberfläche, der Rand erhabener und das Zentrum erniedrigt.

Zum Genus *Listeria* gehören folgende Spezies: *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *L. murrayi* (nunmehr *L. grayi*), *L. ivanovii*, *L. seeligeri* und *L. welshimeri*. Gesicherte humanpathogene Eigenschaften besitzt jedoch nur *Listeria monocytogenes*. Aber auch *Listeria ivanovii* wird als möglicher Krankheitserreger beim Menschen angesehen (World Health Organization, WHO, 1988).

Listeria monocytogenes wächst auf Blutagar unter Ausbildung einer β-Hämolyse. Mit *Staphylococcus aureus*, nicht jedoch mit *Rhodococcus equi* zeigt sie ein CAMP-Phänomen. *Listeria seeligeri* entwickelt nur eine schwache Hämolyse, allerdings verhält auch sie sich CAMP-positiv mit *Staphylococcus aureus* und nicht mit *Rhodococcus equi*. Die β-Hämolyse von *Listeria ivanovii* prägt sich deutlich mit mehreren Zonen aus, und diese Spezies weist mit *Rhodococcus equi*, nicht jedoch mit *Staphylococcus aureus* eine positive CAMP-Reaktion auf.

Bei Zimmertemperatur zeigt *Listeria monocytogenes* typische, taumelnde, sich überschlagende Bewegungen (MAYR et al., 1984, S. 834f).

Listerien können sich noch bei + 4 °C vermehren (MAYR et al., 1984, S. 834f). Hieraus resultiert auch ihre lebensmittelhygienische Bedeutung, da die meisten Haushaltskühlschränke auf höhere Temperaturen eingestellt sind.

Eine serologische Differenzierung der Listerien läßt sich anhand von Oberflächenantigenen vornehmen. Es werden die 13 in der Zellwand befindliche O-Antigene I bis XIII und die 5 in den Geißeln befindliche H-Antigene A bis E unterschieden. Eine Zuordnung der Antigen-Faktoren zu den Listerien wird anhand des PATERSON-Schema, modifiziert nach SEELIGER und DONKER-VOET (1987), vorgenommen. Als epidemiologisch wichtigster Typ beim Menschen erwies sich *Listeria monocytogenes* 4b.

2.3.2 Erkrankungen bei Mensch und Tier

HYSLOP und OSBORNE (1959) beschrieben die Listeriose als eine sporadische oder eher seltene, epidemische Erkrankung, die bei Menschen und größeren Tieren hauptsächlich Symptome zentralnervösen Ursprungs hervorruft und bei Geflügel oder Kleintieren (Nagern) meist septikämisch verläuft.

Die Erregeraufnahme erfolgt beim Menschen in der Regel oral durch kontaminierte Nahrungsmittel oder durch Schmutz- und Schmierinfektionen (MAYR et al., 1984, S. 838f).

Bei gesunden Erwachsenen läuft die Erkrankung in der Regel als latente Infektion ab, die unter bestimmten Umständen, wie zum Beispiel Immunsuppression oder Schwangerschaft, mit grippeähnlichen Symptomen ausbrechen kann. Weiterhin kommt es oft zur Ausbildung von Meningoenzephalitiden (PSCHYREMBEL, 1985, S. 677; FERNANDEZ GARAYZABAL et al., 1987). Bei Schwangeren ist eine diaplazentare Übertragung der Listerien möglich, die Früh-, Totgeburten oder Meningoenzephalitiden bei Neugeborenen zur Folge haben kann (FLEMING et al., 1985; PSCHYREMBEL, 1985, S. 677). Für Infektionen mit *Listeria monocytogenes* wird eine Mortalitätsrate von bis zu 30 % beschrieben (World Health Organization, 1988). Von der gleichen Institution wurde die Erkrankungsrate aufgrund eines Überwachungssystems in den USA auf 10 bis 50 Fälle von Listeriose pro eine Million Personen geschätzt (0,001 - 0,005 %).

In Deutschland besteht für die angeborene Listeriose beim Menschen nach dem Bundesseuchengesetz Meldepflicht. Die Zahl der bekannt gewordenen Fälle betrug 1993 23 Erkrankungen und 1994 20 Erkrankungen. Da die Dunkelziffer in Deutschland insgesamt mit dem Faktor 3 angesetzt wird, ergibt sich eine Zahl an Listeriosefällen für die gesamte Bevölkerung für 1993 von 70 und für 1994 von etwa 60 (TEUFEL und BENDZULLA, 1995).

2.3.3 Vorkommen und Häufigkeit in der Milch

Über das Vorkommen von Listerien in Milch liegt eine Vielzahl von Erhebungen vor. So wiesen HYSLOP und OSBORNE schon 1959 darauf hin, daß sowohl Rohmilch von klinisch an Listeriose erkrankten Tieren als auch von Keimträgern für Menschen eine Gefahr darstellt. Sie beschrieben den Nachweis von *Listeria monocytogenes* bei einem Krankheitsausbruch unter Rindern in Nordwest-Somerset (Großbritannien) im Jahre 1958. Dabei gelang es, den Erreger aus der Milch einer Kuh zu isolieren, die als klinische Symptome geringgradigen Torticollis, Schwellung der Augenlider und Strabismus zeigte. Eine Mastitis war nicht festzustellen. Die Isolierung von *Listeria monocytogenes* aus unverdächtig erscheinender Milch oder aus Eutern wurde auch von anderen Autoren beschrieben (SCHULZ, 1967).

Andererseits gelang es STAJNER (1971) nur bei sechs von zehn experimentell infizierten Kühen *Listeria monocytogenes* aus der Milch zu isolieren, wobei sich in den ausscheidenden Eutervierteln zwar Sekretionsstörungen entwickelten, die Tiere aber keine weiteren klinischen Symptome zeigten. Die Ausscheidung von Listerien erfolgte mit Unterbrechung über den gesamten Untersuchungszeitraum von zwölf Monaten.

WRAMBY (1944), POTEL (1953-1954), DE VRIES und STRICKWERDA (1956), STAJNER (1971), JENSEN und ERREBO LARSEN (1973), ERREBO LARSEN und JENSEN (1979) und GITTER et al. (1980) berichteten, daß *Listeria monocytogenes* die Ursache für eine Euterentzündung darstellen kann.

DOMINGUEZ RODRIGUEZ et al. (1985) untersuchten 1982-1983 über einen Zeitraum von 16 Monaten insgesamt 95 Rohmilchproben aus West- und Zentralspanien. Sie isolierten aus 85 Proben *Listeria grayi* (= 89,5 %), aus 43 *Listeria monocytogenes* (= 45,3 %), aus 15 *Listeria innocua* (= 15,8 %), aus drei *Listeria welshimeri* (= 3,1 %) und aus einer Probe *Listeria seeligeri* (= 1,05 %). So hoch diese Prozentsätze auch erscheinen mögen, stimmen sie doch mit den Ergebnissen aus der Region Madrid überein. Dort enthielten 30 von 67 (= 44,78 %) Rohmilchproben, die während eines Jahres untersucht wurden, *Listeria monocytogenes* (FERNÁNDEZ GARAYZABAL et al., 1987). Die Autoren stellten gleichzeitig fest, daß bei Erhöhung der aeroben Gesamtkeimzahl der prozentuale Anteil der Listerienisolate abnahm, führten diesen Befund aber auf die Schwierigkeit zurück, aus stark kontaminierten Proben Listerien zu isolieren.

FLEMING et al. (1985) identifizierten zum ersten Mal pasteurisierte Milch als wahrscheinlichen Vektor eines Listeriose-Ausbruchs, bei dem 14 Menschen starben. Zwischen dem 30. Juni und dem 30. August 1983 erkrankten in Massachusetts (USA) 49 Personen an Listeriose mit den Symptomen Meningitis, Septikämie oder Abort, wobei in sieben Fällen Foeten oder Säuglinge betroffen waren. Bei den übrigen 42 Personen handelte es sich um Erwachsene, die aufgrund vorher bestehender Erkrankungen oder anderer Gründe (wie zu Beispiel durch Medikamente), immunsupprimiert waren. Von den erkrankten Patienten starben 14 (= 29 %). Als Erreger dieses Ausbruchs konnte in 32 Fällen *Listeria monocytogenes* Typ 4b von den Patienten isoliert werden. Als kontaminiertes Lebensmittel identifizierten FLEMING et al. (1985) aufgrund epidemiologi-

scher Erhebungen pasteurisierte Vollmilch beziehungsweise Milch mit 2 % Fett einer Meierei. Bis drei Wochen nach dem Ende der Epidemie wurden pasteurisierte Milchproben untersucht, doch ließ sich *Listeria monocytogenes* in keinem Fall nachweisen. Dagegen gelang die Isolierung bei 15 von 124 Proben (= 12 %), die vor der Pasteurisierung überprüft wurden, und in zwei von 14 Milchfiltern (= 14 %). Die Autoren vertraten daher die Auffassung, daß die in Leukozyten persistierenden Listerien während der Pasteurisierung nicht vollständig inaktiviert werden und somit bei der Zerstörung der weißen Blutkörperchen infektiös werden können.

Diese Theorie wurde experimentell durch DOYLE et al. (1987) erhärtet, die feststellten, daß der nach künstlicher Infektion eines Rindes gefundene Listeriengehalt in der Milch zwei- bis fünf-fach höher ausfiel, wenn diese Milch vor der Untersuchung homogenisiert oder mit Ultraschall (sonicator) behandelt wurde. Der mechanische Streß führte zu einer Leukozytenzerstörung und setzte die intrazellulären Listerien frei. Eine weitere Studie mit kontaminierter Milch, die listerienhaltige Leukozyten enthielt, führte zu dem Ergebnis, daß sich nach einem in den USA vorgeschriebenen Pasteurisierungsverfahren (71,7 °C für 15 Sekunden) immer noch Listerien nachweisen ließen.

GREENWOOD et al. (1991) fanden in England und Wales zwischen November 1988 und Oktober 1989 in elf von 1.039 (= 1,1 %) untersuchten Proben von pasteurisierter Milch *Listeria monocytogenes*. Fünf dieser elf positiven Isolate stammten allerdings aus derselben Molkerei und fielen innerhalb einer Zeitspanne von nur vier Tagen an. Andere Listerien-Spezies wurden aus fünf Proben isoliert (= 0,5 %).

Um nicht wärmebehandelte Milch als mögliche Infektionsquelle mit *Listeria monocytogenes* für den Menschen zu bestätigen, untersuchten HAYES et al. (1986) 121 Rohmilchproben. Neun Proben stammten aus Tanks von Beständen, in denen vorher schon Listeriose bei den Rindern diagnostiziert worden war. Von den 121 Proben erwiesen sich 15 (= 12 %) als *Listeria monocytogenes*-positiv.

Bei der Untersuchung von 650 Rohmilchproben zwischen August 1984 und Oktober 1985 in verschiedenen Regionen der USA enthielten 78 Proben Listerien (= 12,6 %), darunter 27 Proben (= 4,2 %) *Listeria monocytogenes* (LOVETT et al., 1987).

In den Niederlanden wurden aus 137 Rohmilchproben sechs *Listeria monocytogenes*-Stämme isoliert (= 4,4 %) (BECKERS et al., 1987). Alle positiven Proben wiesen weniger als 100 Listerien pro Milliliter Milch auf.

In Ontario (Canada) erbrachten 1986 sechs von 445 untersuchten Rohmilchproben (= 1,3 %) beim Nachweis von *Listeria monocytogenes* ein positives Resultat (FARBER et al., 1988).

Zwischen Sommer 1987 und Winter (Februar) 1988 überprüften FENLON und WILSON (1989) jeweils 180 Rohmilchproben aus Nord-Ost-Schottland im Hinblick auf jahreszeitliche Unterschiede zu drei verschiedenen Zeitpunkten (vergleiche Seite 18). Bei den insgesamt 540 Proben konnte *Listeria monocytogenes* in 14 Fällen nachgewiesen werden (= 2,59 %).

SLADE et al. (1989) untersuchten 315 Rohmilchproben auf das Vorhandensein von *Listeria*-Spezies in Canada. 36 Proben enthielten *Listerien* (= 11,4 %), wobei für diesen Teil der Studie keine Angaben darüber vorliegen, um welche *Listeria*-Spezies es sich handelte. Zur Charakterisierung der Häufigkeit und der Regelmäßigkeit des Vorkommens von *Listerien* wurden 34 der positiven Bestände nach jeweils etwa sechs Wochen dreimal erneut untersucht. Nur bei 21 Proben konnten *Listerien* wiedergefunden werden, darunter in 13 *Listeria monocytogenes*. In 16 Fällen ließen sich *Listerien* nur bei einer und in fünf Fällen mit Unterbrechung bei mehr als einer Nachuntersuchung ermitteln, wobei allerdings bei einem negativen Ergebnis auf weitere Nachuntersuchungen in der Regel verzichtet wurde. Es fiel auf, daß sowohl ein intermittierendes Auftreten von *Listeria* als auch eine Variation der einzelnen Subspezies vorkamen. Bei der ersten Untersuchung wurde dabei *Listeria monocytogenes*, bei der späteren Beprobung nur *Listeria innocua* nachgewiesen.

In Italien konnten aus 40 Rohmilchproben keine *Listerien* isoliert werden (MASSA et al., 1990).

Von 982 in der Transvaal-Region von Südafrika 1989 untersuchten Rohmilchproben enthielten 67 (= 6,8 %) *Listeria monocytogenes*, 68 (= 6,9 %) *Listeria innocua*, 41 (= 4,2 %) *Listeria grayi*, 16 (= 1,6 %) *Listeria welshimeri* und zwei (= 0,2 %) *Listeria seeligeri* (WNOROWSKI, 1990).

Zwischen Oktober 1989 und September 1990 untersuchten MOURA et al. (1993) in Brasilien insgesamt 220 Rohmilchproben auf das Vorhandensein von *Listerien*. Das Kontingent bestand zu gleichen Teilen aus den Rohmilchsorten B und C, einem in Brasilien gebräuchlichen Klassifizierungssystem, wobei die Sorte B eine bessere hygienische Beschaffenheit mit niedrigeren Keimzahlen aufweist als Sorte C. Dem mikrobiologischen Status entsprechend verteilten sich die *Listerien*-Isolate auf die Sorte B mit neun (= 8,2 %) und die Sorte C mit 19 (= 17,3 %) der jeweils 110 untersuchten Proben. Aus Milch der Sorte B ließen sich *Listeria monocytogenes* in sieben (= 6,4 %), *Listeria innocua* in sechs (= 5,4 %) und *Listeria grayi* in einem Fall (= 0,9 %) nachweisen. Bei Milch der Sorte C wurden *Listeria monocytogenes* in 14 (= 12,7 %), *Listeria innocua* in 15 (= 13,6 %), *Listeria welshimeri* in zwei (= 1,8 %) und *Listeria grayi* in einer (= 0,9 %) der Proben gefunden. Demnach enthielten insgesamt 28 Proben (= 12,7 %) *Listerien*-Spezies. In jeweils 21 Proben (= 9,5 %) wurden *Listeria monocytogenes* beziehungsweise *Listeria innocua*, in zwei Proben (= 0,9 %) *Listeria welshimeri* und in einer Probe (= 0,04 %) *Listeria grayi* nachgewiesen.

GREENWOOD et al. (1991) untersuchten zwischen November 1988 und Oktober 1989 in England und Wales außer den bereits erwähnten Proben von pasteurisierter Milch auch 361 Rohmilchproben auf das Vorkommen von *Listerien*. *Listeria monocytogenes* wurden in 13 Fällen (= 3,6 %), andere *Listerien*-Spezies in 20 Fällen (= 5,5 %) nachgewiesen.

In Nordirland führten HARVEY und GILMOUR (1992) zwischen Dezember 1988 und 1989 eine Statusanalyse über das Vorkommen von *Listerien* in Rohmilch durch. Von 63 Proben, die in vier Milchverarbeitungsbetrieben gezogen wurden, ließen sich in 34 Proben (= 54 %) *Listerien* nachweisen, davon 21 mal *Listeria monocytogenes* (= 33,3 %). Zehn von 113 aus Milchviehbeständen stammenden Rohmilchproben enthielten *Listerien* (= 8,8 %), einschließlich sechs

(= 5,3 %) *Listeria monocytogenes*-Isolaten. Insgesamt ergab sich somit bei 176 Rohmilchproben eine Listerienrate von 25 % (44) und eine *Listeria monocytogenes*-Quote von 15,3 % (27).

Bei der von REA et al. (1992) zwischen Juni 1989 und Juli 1990 durchgeführten Untersuchung in Irland enthielten 49 von 589 Proben Listerien (= 8,3 %), wobei es sich 29 mal (= 4,9 %) um *Listeria monocytogenes* und 20 mal (= 3,4 %) um *Listeria innocua* handelte.

Von 30 in Marokko untersuchten Rohmilchproben enthielten drei (= 10 %) *Listeria monocytogenes* (EL MARRAKCHI et al., 1993).

FENLON et al. (1995) führten in Großbritannien eine Erhebung über Häufigkeit und Kontaminationshöhe von *Listeria monocytogenes* in Tankmilch durch. Über einen Zeitraum von einem Jahr wurden Sammelmilchproben von insgesamt 160 Beständen in dreimonatigen Intervallen untersucht. Dabei wurde *Listeria monocytogenes* bei 25 Beständen mindestens einmal isoliert (= 15,6 %). Die in der Milch enthaltenen Keimzahlen lagen zwischen 1 und 35 Listerien pro Milliliter.

Als hauptsächliche Infektionsquelle für Rinder (und auch andere Nutztiere) wird vor allem verdorbene Silage angesehen. FENLON (1986) fand bei der Untersuchung von natürlich kontaminierter Silage *Listeria monocytogenes*-Gehalte von über 12.000 Keimen pro Gramm, was bei der dort angewandten MPN-Methode der obersten Nachweisgrenze entsprach. Allerdings erwies sich die Silage in den Partien mit diesen hohen Keimgehalten bereits grobsinnlich verändert. Die Silage war vorher an 25 Kälber verfüttert worden, von denen drei mit Listeriose-Symptomen erkrankten und eines sogar starb.

FARBER et al. (1988) sowie FENLON und WILSON (1989) stellten bei ihren epidemiologischen Studien aber fest, daß der Anteil der *Listeria monocytogenes*-positiven Rohmilchproben während der Winterzeit, also während der hauptsächlichen Silagefütterungsperiode, nicht höher, sondern geringer ausfiel. Aus 98 Rohmilchproben, die während Februar und März 1986 untersucht wurden, konnten FARBER et al. (1988) *Listeria monocytogenes* nicht isolieren, während in den übrigen drei Jahreszeiten jeweils zwei positive Resultate in 100, 123 beziehungsweise 124 Rohmilchproben auftraten.

Bei der Erhebung von FENLON und WILSON (1989) verteilten sich die insgesamt 14 positiven Proben auf den Sommer mit sieben (= 3,89 % der im Sommer untersuchten Proben), den Herbst mit zwei (= 1,11 %) und den Winter mit fünf positiven Proben (= 2,78 %).

Obwohl im Januar mehr Listerien isoliert wurden, konnten FENLON et al. (1995) bei der von ihnen in dreimonatigen Abständen durchgeführten Untersuchung einen jahreszeitlichen Einfluß auf die Nachweishäufigkeit nicht eindeutig dokumentieren.

Dagegen war bei den 1989 bis 1990 in Irland untersuchten Rohmilchproben (REA et al., 1992) ein signifikanter Anstieg der Listerienisolate in den Wintermonaten zu beobachten. Während bei 0 bis 5 % der Proben in den Monaten Juni bis November Listerien vorkamen, stieg die Isolati-

onsrate während der Monate Dezember bis April auf ungefähr 35 % an, um dann wieder auf 0 bis 5 % zu fallen.

Auf mögliche Kontaminationsquellen überprüften FEDIO und JACKSON (1992) vier Milcherzeugerbetriebe, bei denen *Listeria monocytogenes* in der Rohmilch vorkam. Während nur eine von 262 unter aseptischen Bedingungen gezogene Viertelgemelksproben (= 0,4 %) *Listeria monocytogenes* enthielt, wurde aus zehn von 69 (= 14,5 %) Kotproben *Listeria monocytogenes* isoliert. Eine vergleichende Untersuchung von drei anderen Betrieben, bei denen *Listeria monocytogenes* nicht in der Rohmilch auftrat, ergab allerdings, daß auch hier 15 von 114 Kotproben (= 13,2 %) positiv ausfielen.

Ursachen für das Vorhandensein von *Listeria monocytogenes* in Rohmilch bilden nach SANAA et al. (1993) vor allem Silage von schlechter Qualität (pH-Wert über 4,0), mangelnde Hygiene in den Räumen sowie bei der Tierhaltung, ungenügende Beleuchtung im Melkraum, den Ställen sowie unzureichende Reinigung und Desinfektion der Melkanlage.

Tabelle 3 faßt die in der Literatur angegebenen Untersuchungsergebnisse bezüglich des Vorkommens von *Listeria monocytogenes* in Rohmilch zusammen.

Tabelle 3: Zusammenfassung der Untersuchungsergebnisse über das Vorkommen von *Listeria monocytogenes* in Rohmilch

Rohmilchproben	<i>Listeria monocytogenes</i>	Land	Jahr der Untersuchung	Referenz
1.004	10 (1 %)	DDR		SCHULZ 1967
95	43 (45,3 %)	Spanien	1982-1983	DOMINGUEZ RODRIGUEZ 1985
124	15 (12 %)	USA	1983	FLEMING 1985
121	15 (12 %)	USA	1983	HAYES 1985
650	27 (4,2 %)	USA	1984 - 1985	LOVETT 1987
137	6 (4,4 %)	Niederlande	1986	BECKERS 1987
67	30 (44,48 %)	Spanien	1986	FERNÁNDEZ GARAYZABAL 1987
445	6 (1,3 %)	Canada	1986	FARBER 1988
540	14 (2,59 %)	Schottland	1987-1988	FENLON 1989
315	≥ 13 (4,1 %) (s. Text)	Canada	80'er Jahre	SLADE 1989
40	0	Italien	1987-1988	MASSA 1990
361	13 (13,6 %)	England/Wales	1988-1989	GREENWOOD 1991
176	27 (15,3 %)	Nordirland	1988-1989	HARVEY 1992
982	67 (6,8 %)	Südafrika	1989	WNOROWSKI 1990
589	29 (4,9 %)	Irland	1989-1990	REA 1992
220	21 (9,5 %)	Brasilien	1989-1990	MOURA 1993
30	3 (10 %)	Marokko	90' er Jahre	EL MARRAKCHI 1993
Total: 5.896	349 (5,92 %)			

2.4 Salmonellen

2.4.1 Morphologie

Die Gattung *Salmonella* mit einer Spezies und etwa 2.000 Subspezies gehört nach LE MINOR in BERGEY's Manual of Systematic Bacteriology (1984, S. 427 ff.) zur Familie der Enterobacteriaceae. Salmonellen sind 0,7-1,5 x 2-5 µm große, gramnegative, sporenlose, in der Regel bewegliche, peritrich begeißelte Stäbchen. Sie bilden Kolonien mit einem Durchmesser von etwa 2-4 mm. Wegen der wenig aussagekräftigen kulturellen Morphologie müssen Salmonellen durch biochemische Reaktionen (Abbau verschiedener Kohlenhydrate) in der „Bunten Reihe“ oder mittels Selektivmedien von anderen Enterobacteriaceae abgegrenzt werden. Innerhalb der Familie *Salmonella* erfolgt die Differenzierung durch den Nachweis von unterschiedlichen Zellwandantigenen (O-Antigene) und Geißelantigenen (H-Antigene), was gleichzeitig der endgültigen Salmonellen-Verifizierung dient. Zur Aufschlüsselung der über 2.000 Serotypen dient das KAUFFMANN-WHITE-Schema.

2.4.2 Erkrankungen bei Mensch und Tier

Neben den nur für den Menschen pathogenen Typen *Salmonella typhi* und *paratyphi* und den auf einige Tierarten angepaßten Arten, wie zum Beispiel *Salmonella gallinarum-pullorum*, *Salmonella abortus equi*, *Salmonella cholerae-suis* und anderen, findet sich die Mehrzahl der über 2.000 *Salmonella*-Spezies sowohl beim Mensch als auch beim Tier.

Tierseuchenrechtlich wird die Salmonellose des Rindes in Deutschland auf Grundlage der „Verordnung zum Schutz gegen die Salmonellose der Rinder in der Fassung vom 14.11.1991“ bekämpft. Danach muß die Milch von Salmonellen-verdächtigen Rindern unschädlich beseitigt werden oder darf nach Aufkochen in den betreffenden Betrieben an die übrigen Rinder verfüttert werden. Eine Tötung der Tiere kann angeordnet werden.

Etwa 93 % der Salmonellosen der Kälber und 70 % der Salmonellosen der Rinder werden durch *Salmonella typhimurium* und *Salmonella dublin* hervorgerufen; letztere sind zu ca. 30 % für die Erkrankungen der Kälber verantwortlich. Die Infektion erfolgt oral, hauptsächlich über kontaminiertes Futter oder Trinkwasser. Die Erreger vermehren sich zunächst im Verdauungskanal und werden bei subklinischen Infektionen mit dem Kot, bei klinischen Infektionen auch mit Harn, Milch und Gebärmutterausfluß ausgeschieden (MAYR et al., 1984 S. 737 ff; SANDER, 1993).

Obwohl Futter eine Kontaminationsquelle für Salmonellosen darstellt, gibt BISPING (1993) an, daß die bei Mensch und Tier am häufigsten Erkrankungen auslösenden Serovare, wie *Salmonella*

typhimurium und *Salmonella enteritidis*, nur selten beziehungsweise nie in Futtermehlen, die in Deutschland hergestellt werden, vorkommen.

Aus epidemiologischer Sicht kommen beim Menschen vor allem *Salmonella typhimurium* und seit etwa einem Jahrzehnt dem beim Geflügel weit verbreiteten Serotyp *Salmonella enteritidis* besondere Bedeutung zu. Diese beiden *Salmonella*-Serovaren sind zusammen für etwa 95 % der *Salmonellen*infektionen beim Menschen verantwortlich (KÜHN, 1993; SANDER, 1993; ERICHSEN und ULLMANN, 1994).

Die Infektion beim Menschen erfolgt in der Regel oral über kontaminierte Lebensmittel und das klinische Erscheinungsbild wird überwiegend von gastrointestinalen Störungen wie Durchfall und Erbrechen, oftmals begleitet von Fieber geprägt. Immer häufiger werden septikämische, dem Typhus ähnliche Verlaufsformen mit lang andauernden Fieberschüben beobachtet. Aufgrund des massiven Durchfalls besteht die Gefahr eines großen Wasser- und Elektrolytverlustes mit der Folge eines hypovolämischen Schockes, der zum Tod führen kann (SANDER, 1993).

Durch den Verzehr von Milch verursachte *Salmonellen*osen des Menschen sind in der Literatur verschiedentlich dokumentiert. So wurden zwischen 1980 und 1982 in Schottland insgesamt 21 durch Rohmilchkonsum hervorgerufene *Salmonellose*-Epidemien beobachtet, die insgesamt 1.090 Personen betrafen, von denen acht starben (= 0,7 %) (REILLY et al., 1983).

TACKET et al. (1985) berichten von einem durch Rohmilchgenuß verursachten *Salmonellose*-Ausbruch 1983 in Arizona (USA), der ein Todesopfer forderte. Als Erreger konnte *Salmonella typhimurium* identifiziert werden. Wie der Keim in die Milch gelangte, ließ sich nicht klären, da eine Untersuchung in der Molkerei unterblieb.

Der bisher größte *Salmonellose*-Ausbruch, welcher mindestens 16.284 Personen betraf, fand 1985 in der Region Chicago (USA) statt. Die Übertragung der Infektion erfolgte über fettarme Milch, die aufgrund eines Pasteurisierungsfehlers mit Milch vermischt wurde, welche mit *Salmonella typhimurium* kontaminiert war (LECOS, 1986).

2.4.3 Vorkommen und Häufigkeit in der Milch

Um einen Überblick der Salmonellenhäufigkeit in Bestandmilch zu erhalten, untersuchten MCEWEN et al. (1988) zwischen September 1986 und Februar 1987 insgesamt 1.837 Milchfilter von 813 verschiedenen Betrieben in Süd-West-Ontario (Canada). Zehn Proben (= 0,5 %) aus neun Betrieben (= 1,1 %) erwiesen sich als positiv. Bei den Isolaten handelte es sich in acht Fällen um *Salmonella muenster* und in zwei Fällen um *Salmonella mbandaka*.

Zwischen Februar 1986 und Mai 1987 wurden in Baden-Württemberg 385 Viertel- und Einzelgemelksproben, sowie 140 Hof- und Tankwagenmilchproben auf das Vorhandensein von Salmonellen untersucht. In keiner der insgesamt 525 Rohmilchproben ließen sich Salmonellen nachweisen (SCHEIRLE, 1988).

Von 1.138 Rohmilchproben, die zwischen Januar 1984 und Dezember 1987 in Großbritannien überprüft wurden (HUMPHREY und HART, 1988), enthielten zwei Proben *Salmonella agama* beziehungsweise *agona* (= 0,2 %).

REA et al. (1992) untersuchten von 1989 bis 1990 insgesamt 589 Rohmilchproben in Irland auf das Vorkommen von Salmonellen. Lediglich eine Probe fiel positiv aus (= 0,16 %), wobei keine Angabe über den Serotyp gemacht wurde.

Anhand einer umfangreichen Datenerhebung aus Veterinäruntersuchungsämtern, Landwirtschaftskammern, Schlachthöfen und Universitäten erfaßte HARTUNG (1993) das Vorkommen von Enteritis-Salmonellen in Lebensmitteln und Nutztieren in Deutschland für das Jahr 1991. Es wurden 101 Ausbrüche beim Menschen mit insgesamt 2.272 Erkrankungen gemeldet. Dabei kann es sich erfahrungsgemäß aber nur um einen geringen Anteil der tatsächlichen Salmonelleninfektionen handeln. In 92 % dieser 101 dokumentierten Ausbrüche erwies sich *Salmonella enteritidis* als Erreger, in 5 % *Salmonella typhimurium* und in 3 % *Salmonella infantis*.

Bei den durch *Salmonella enteritidis* hervorgerufenen Erkrankungen bildeten die Infektionsquellen in 46,5 % der Fälle Eier oder Eierspeisen, in 24,1 % Backwaren, in 9,8 % Fleisch und Fleischprodukte, in 5,2 % Milch und Milchprodukte und in 0,3 % Geflügel. Etwa 5 % der untersuchten Rinderkotproben enthielten Salmonellen (934 von 18.242).

In weiteren statistischen Erhebungen faßte HARTUNG (1994) die dem Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz (BgVV, vormals BGA) gemeldeten Salmonellen-Nachweise für 1993 zusammen. Aus den 18.727 in 31 Laboren untersuchten Rohmilchproben und Rohmilcherzeugnissen wurden nur in zwei Fällen Salmonellen isoliert (= 0,01 %). Dagegen wurden im Jahr 1994 bei 11.288 analysierten Rohmilch- und Rohmilch-Produkt-Proben in acht Fällen Salmonellen ermittelt (= 0,07 %) (HARTUNG, 1995).

Die Tabelle 4 faßt die in der Literatur angegebenen Untersuchungsergebnisse bezüglich des Vorkommens von Salmonellen in Rohmilch zusammen.

Tabelle 4: Zusammenfassung der Untersuchungsergebnisse über das Vorkommen von Salmonellen in Rohmilch

Untersuchungs- material	Salmonellen- positive Proben	Land	Jahr der Unter- suchung	Referenz
525 Rohmilchproben	0	Deutschland	1986-1987	SCHEIRLE 1988
1.837 Milchfilter	10 (0,5 %)	Canada	1986-1987	MCEWEN 1988
1.138 Rohmilchproben	2 (0,2 %)	Großbritannien	1984-1987	HUMPHREY 1988
589 Rohmilchproben	1 (0,16 %)	Irland	1989-1990	REA 1992
18.727 Rohmilch- und Rohmilch-Produkte- Proben	2 (0,01 %)	Deutschland	1993	HARTUNG 1994
11.288 Rohmilch- und Rohmilch-Produkte- Proben	8 (0,07 %)	Deutschland	1994	HARTUNG 1995
Total: 34.104	23 (0,07 %)		1986-1994	

2.5 Campylobacter

2.5.1 Morphologie

Campylobacter-Keime sind nach SWIBERT in BERGEY's Manual of Systematic Bacteriology (1984, S. 111 f.) gramnegative, 0,2-0,5 x 0,5-5 µm schlanke, nicht sporenbildende, schraubenartig gewundene Stäbchen. Im hängenden Tropfen bei Raumtemperatur führt Campylobacter typische, schnelle, korkenzieherartige Bewegungen aus. Campylobacter wächst auf Nährböden in zwei verschiedenen Formen:

- flache, graue, etwas durchscheinende Kolonien mit leicht rauher Oberfläche und unregelmäßigem Rand sowie Tendenz zum Schwarmwachstum
- runde, 1-2 mm große, erhabene, konvexe, glatte, glänzende, runde Kolonien mit durchscheinendem Rand und etwas dunklerem, schmutziggelbem, opakem Zentrum.

Der Keim wächst in mikroaerobem Milieu (5 % O₂), zum Teil auch anaerob, bildet Katalase und zeigt eine schwache Oxidase-Reaktion (MAYR et al., 1984, S. 682 ff; DOYLE, 1981).

Im Genus Campylobacter besitzen vor allem Campylobacter jejuni, Campylobacter fetus und beim Menschen zusätzlich Campylobacter coli besondere pathogene Bedeutung.

2.5.2 Erkrankungen bei Mensch und Tier

Beim Rind ist Campylobacter fetus subspezies fetus als Erreger des Enzootischen Campylobacter-Abortes bekannt. Auch beim Menschen werden neben Allgemeinerkrankungen Aborte hervorgerufen. Weiterhin kann Campylobacter jejuni bei Rind und Mensch zu Enteritiden führen. Zu den Symptomen der Erkrankung gehören Fieber, heftige abdominale Schmerzen und zum Teil blutige Diarrhoe. Ebenso kann Campylobacter coli Enteritiden, Kolitiden und Proktitiden auslösen (BLASER et al., 1979; DOYLE, 1981).

Die Differenzierung der einzelnen Arten erfolgt durch kulturelle und biochemische Verfahren (Katalase-Bildung, Wachstum bei 42 °C) sowie Serotypisierung.

Hauptsächliche Infektionsquelle für den Menschen bildet der Verzehr von ungenügend erhitzten oder rohen Fleischprodukten, besonders vom Geflügel. Campylobacter wird auch häufig in kontaminierten Oberflächengewässern gefunden (DOYLE, 1981; MAYR et al., 1984, S. 682 ff; PSCHYREMBEL, 1985, S. 254).

Die Bedeutung der durch Campylobacter hervorgerufenen Enteritis nimmt immer mehr zu. So bezeichnete SKIRROW (1982) die Campylobacter-Enteritis als häufigste Form der akuten bakteriellen Diarrhoe in Großbritannien. Ein großer Teil davon wird durch Milch übertragen. Im Jahre

1981 überstieg die in britischen Laboratorien isolierte Rate an *Campylobacter* Spezies sogar erstmals die der Salmonellen. Im folgenden sind einige konkrete Ausbrüche geschildert:

Im Jahr 1946 beschrieb LEVY wohl als erster eine Infektion, die vermutlich durch mit *Campylobacter* kontaminierte Rohmilch hervorgerufen wurde.

In der Region Los Angeles (USA), wo dem Verbraucher zertifizierte Rohmilch zur Verfügung steht, erkrankten 1976 drei Personen, welche diese Rohmilch tranken, an einer Infektion mit *Campylobacter jejuni* (TAYLOR et al., 1979).

In Nord-England erkrankten 1978 insgesamt 77 Personen bei zwei Ausbrüchen nach dem Genuß von Rohmilch an Enteritis. *Campylobacter jejuni* wurde zwar bei den Patienten nachgewiesen und in einem Fall in Kotproben der Milchherde, konnte jedoch nicht aus der Milch selbst isoliert werden (ROBINSON et al., 1979).

1979 wurde wiederum in den USA ein Fall von *Campylobacteriose* beschrieben, bei dem drei Familienmitglieder erkrankten, die Rohmilch ihrer eigenen Kuh getrunken hatten. Eine Milchuntersuchung dieses Tieres auf *Campylobacter* ergab zwar ein negatives Ergebnis, jedoch ließen sich *Campylobacter jejuni* sowohl in Stuhlproben der Patienten als auch der Kuh feststellen (BLASER et al., 1979).

Nach dem Genuß von Milch, die aufgrund eines Stromausfalls nicht korrekt pasteurisiert worden war, kam es 1979 in Schottland zu einem durch *Campylobacter jejuni* bedingten Ausbruch. Der Erreger konnte zwar in Milchfiltern, nicht aber in Kotproben der zu dem Farmbetrieb gehörenden Rinder nachgewiesen werden (PORTER und REID, 1980).

Epidemiologische Erhebungen wiesen darauf hin, daß die Ursache einer Masseninfektion mit *Campylobacter jejuni* in Großbritannien 1979, bei der insgesamt 2.500 Kinder betroffen waren, in kontaminierter Schulmilch zu suchen war. Obwohl die Untersuchungen auf den Erreger bei Milchfiltern, Milch und Milchflaschen in der Molkerei negativ verliefen, ließen sich in zwei von sechs Stuhlproben von Arbeitern der Molkerei *Campylobacter jejuni* nachweisen (JONES, P. H. et al., 1981).

JONES, D. M. et al. (1981) beschrieben zwei Ausbrüche von *Campylobacter jejuni*-Erkrankungen in Großbritannien. Während die Infektionsquelle im ersten Ausbruch unklar blieb, konnte bei dem zweiten Ausbruch aufgrund epidemiologischer Untersuchungen unpasteurisierte Rohmilch als Ursache angesehen werden.

Bei einem *Campylobacteriose*-Ausbruch 1981 in Kansas (USA), in dessen Verlauf mindestens 43 Personen erkrankten, stellte nach epidemiologischen Erhebungen Rohmilch aus einer Molkerei die Infektionsquelle dar. Obwohl Kotproben der Milchherde der Molkerei und zweier anderer Milchherden *Campylobacter jejuni* enthielten, gelang es nicht, den Erreger in der Milch selbst nachzuweisen (TOSH et al., 1981).

1983 kam es in Pennsylvania (USA) zu zwei Enteritis-Ausbrüchen nach Genuß von Rohmilch mit insgesamt 57 erkrankten Personen. Auch hier konnte *Campylobacter* aus den Stuhlproben der

Patienten angezuchtet werden, aber der Nachweis in Milch gelang nicht (BLESSING et al., 1983).

ROBINSON und JONES (1981) beschrieben in ihrer Veröffentlichung 13 Ausbrüche von Campylobacteriose mit mindestens 3.000 Patienten in Großbritannien zwischen 1978 und 1980. In allen Fällen wurde rohe oder ungenügend pasteurisierte Milch als Erregerreservoir vermutet. Bei der Untersuchung von Kotproben und Milchfiltern aus zwei Milcherzeugerbetrieben wurde festgestellt, daß Campylobacter zwar persistierende, symptomlose Infektionen bei den Rindern hervorrufen konnte, der Erreger aber dennoch in den Milchfiltern nicht nachgewiesen wurde.

JOSEPH et al. (1990) zählten in ihrer Übersicht der Infektionskrankheiten in Schulen in England und Wales zwischen 1979 und 1988 neun Campylobacteriose-Ausbrüche mit insgesamt 3.714 betroffenen Personen auf. In fünf Fällen wurde aufgrund epidemiologischer Untersuchungen kontaminierte oder unpasteurisierte Milch als Vektor angesehen.

Eine ähnliche Zusammenfassung stellten WOOD et al. (1992) für die USA auf. Dort erkrankten in den Jahren 1981 bis 1990 während 20 mit Rohmilch assoziierte Campylobacter-Epidemien in elf Staaten 458 (= 45,2 %) von insgesamt 1.013 Personen, die mit dem kontaminierten Lebensmittel in Kontakt kamen.

In einem Camp in Canada trat 1980 nach dem Verzehr von Rohmilch eine Enteritis auf, in deren Verlauf Campylobacter jejuni in humanen Stuhlproben und in einer Rohmilchprobe nachgewiesen werden konnte, obwohl Kotproben der Milchkühe und eine Probe aus dem Milchtank negativ ausfielen (McNAUGHTON et al., 1982).

1981 erkrankten 50 Personen in Georgia (USA) nachweislich an einer Campylobacter jejuni-Enteritis. Epidemiologische Untersuchungen deuteten auf den Konsum von zertifizierter Rohmilch als Infektionsquelle hin. Bei Nachforschungen im milcherzeugenden Betrieb wurden 262 Milchproben gezogen und ebenso wie Milchfilter und Kotproben von 131 Kühen auf Campylobacter jejuni untersucht. Keine der Milchproben beziehungsweise der Milchfilter enthielt Campylobacter, während 14 Kotproben (= 11 %) positive Befunde erbrachten (POTTER et al., 1983).

Auch bei einem Ausbruch, bei dem 25 Personen auf einem Schulausflug in den USA an Campylobacter-Enteritis erkrankten, war die Übertragung höchstwahrscheinlich durch den Konsum von Rohmilch verursacht worden, obwohl Untersuchungen von Milch, Geräten und Kotproben der Rinder auf Campylobacter jejuni negativ verliefen. Allerdings wurden diese Erhebungen erst elf Tage nach Verzehr des verdächtigen Lebensmittels eingeleitet (KORLATH et al., 1985).

KLEIN et al. (1986) stellten zum ersten Mal fest, daß auch Campylobacter fetus an einer durch Rohmilchkonsum hervorgerufenen Enteritis beteiligt war. Bei einem Festessen erkrankten 1982 in Wisconsin (USA) 15 von 38 Personen an Enteritis, wobei 12 der 15 Patienten Rohmilch getrunken hatten. In den Stuhlproben von sieben Personen konnten in vier Fällen Campylobacter jejuni und in drei Fällen Campylobacter fetus nachgewiesen werden.

Insgesamt wurden in den USA zwischen 1980 und 1982 23 durch Lebensmittel übertragene Campylobacteriose-Ausbrüche mit 748 erkrankten Personen an die Zentrale für die Kontrolle von Krankheiten (CDC) gemeldet. In 14 von diesen 23 Ausbrüchen (= 60,9 %) stellte aufgrund epidemiologischer Untersuchungen nachweislich oder vermutlich der Konsum von Rohmilch die Ursache dar, obwohl die Isolierung aus der Milch nicht gelang (FINCH und BLAKE, 1985).

HUTCHINSON et al. (1985) beschrieben einen Campylobacter jejuni-Fall aus dem Jahre 1983, bei dem die Erregerausscheidung mit der Milch erfolgte. Es erkrankten insgesamt 75 Personen an einer Campylobacter jejuni-Enteritis. Epidemiologische Untersuchungen wiesen auf die unpasteurisierte Milch eines Erzeugers hin. Eine Überprüfung des Betriebes zeigte eine deutliche Kontamination der Geräte mit Campylobacter, während die Keime in der Milch beziehungsweise den Milchfiltern nicht nachgewiesen werden konnten. Nach dem Auftreten weiterer Fälle und erneuter Untersuchung konnte Campylobacter jejuni dann in Milchfiltern und auch in Tankmilchen gefunden werden. Zwei der 40 laktierenden Kühe schieden diesen Keim mit der Milch aus.

In Bayern kam es im April 1993 nach dem Verzehr von Vorzugsmilch zu einem durch Campylobacter jejuni verursachten Enteritisausbruch, bei dem von 28 betroffenen Personen sechs erkrankten (World Health Organization, 1994).

Aufgrund eines Pasteurisierungsfehlers ereignete sich 1992 in Northamptonshire (Großbritannien) ein Ausbruch von durch Campylobacter jejuni verursachter Enteritis nach dem Genuß von unkorrekt erhitzter Milch. Es erkrankten mindestens 110 Personen (FAHEY et al., 1995).

ORR et al. (1995) berichteten, daß bei Routineanalysen von zum Verzehr bestimmter Rohmilch Campylobacter jejuni isoliert werden konnte. Zusätzliche Untersuchungen des betreffenden Erzeugerbetriebes führte zu Isolierungen von Campylobacter jejuni aus der Milch eines Rindes, ohne daß der Erreger in den Kotproben nachgewiesen werden konnte. Die von den Autoren verwendete mikrobiologische Methode bestand in einer Anreicherung der Milch in PRESTON-Bouillon und anschließender Subkultivierung auf Campylobacter Blood-free Selective Medium. Epidemiologische Nachforschungen ergaben, daß sich der gleiche Stamm auch aus Faeces von an Enteritis erkrankten Personen isolieren ließ, die Rohmilch des in Rede stehenden Erzeugerbetriebes konsumiert hatten.

Über eine Campylobacteriose in einem Kasseler Behindertenkinderheim, die sich im Oktober 1992 ereignete, referierte LOEWENHERZ (1995). Aus dem Stuhl der Patienten, der Verdachtsprobe Vorzugsmilch und einigen Milchproben aus dem Betrieb ließ sich der Erreger isolieren.

2.5.3 Vorkommen und Häufigkeit in der Milch

Um einen Überblick der Campylobacter-Raten in Rohmilch beziehungsweise in Rinderbeständen zu bekommen, wurden und werden immer wieder Statusanalysen durchgeführt. Da aber nur einigen Autoren die Isolierung von Campylobacter aus der Milch gelang, wird sofern verfügbar, die angegebene Nachweismethode kurz beschrieben.

Bei einer 200 Rohmilchproben umfassenden Erhebung in den USA ließ sich Campylobacter jejuni nicht nachweisen (CHRISTOPHER et al. 1982). Die verwendete Methode bestand aus einer Voranreicherung der Milch in Brucella-Bouillon und anschließende Anreicherung in mit Antibiotika versetzter Brucella-Bouillon für 48 Stunden unter mikroaeroben Bedingungen.

DOYLE und ROMAN (1982 a) fanden 1981 in Wisconsin (USA) in einer von 108 Rohmilchproben (= 0,9 %), die aus Bestandstanks stammten, Campylobacter jejuni. Die verwendete Nachweismethode war von DOYLE und ROMAN (1982 b) selbst entwickelt worden. Sie sieht den Einsatz von Brucella-Bouillon mit 7 % Pferdeblut, 0,3 % Natrium-Succinat, 0,01 % Cysteinhydrochlorid, 15 µg/ml Vancomycin, 5µg/ml Trimethoprim, 20 IE/ml Polymyxin B und 50 µg/ml Cycloheximid als Anreicherungsmedium vor. Nach Bebrütung für 16-18 Stunden bei 42 °C erfolgte der Ausstrich auf Selektivagar. Die universitätseigene Milchviehherde wurde mit diesem Verfahren ebenfalls auf das Vorkommen von Campylobacter untersucht, wobei dieser Keim bei 50 von 78 Rindern (64 %) im Enddarm nachweisbar war. Darüberhinaus wurde eine Studie zur Überlebensfähigkeit von acht Campylobacter jejuni-Stämmen in unpasteurisierter Milch durchgeführt. Je nach Isolat schwankte die Reduktion von unter zwei Zehnerpotenzen in 14 Tagen bis über sechs Zehnerpotenzen in sieben Tagen.

In den Niederlanden konnte mit der Methode des Direktausstriches auf Selektivnährböden Campylobacter jejuni zunächst weder in 200 Darminhaltsproben von geschlachteten Rindern, noch in 200 Rohmilchproben ermittelt werden. Unter Verwendung von zwei Anreicherungsverfahren mit Thioglyconat, 7 % gelöstem Pferdeblut, 40 µg/ml Vancomycin, 30 mg/ml Trimethoprim, 10 IE Polymyxin-B-Sulfat und 100 µg/ml Cycloheximid, beziehungsweise zusätzlich noch mit 1 mg/ml Laurylsulfat, wurden die Untersuchungen erneut durchgeführt. Campylobacter jejuni ließ sich nunmehr in elf von 200 Darminhaltsproben (= 6,5 %), aber wiederum in keiner von 200 Rohmilchproben nachweisen. Allerdings wurde die Anreicherung unter mikroaeroben Bedingungen nur für 24 Stunden und lediglich bei 37 °C durchgeführt (OOSTEROM et al., 1982).

In Norwegen wurden 1982 in 106 Rohmilchproben von Rindern, die an klinischer Mastitis litten, keine Campylobacter-Bakterien gefunden (ROSEF et al., 1983).

LOVETT et al. (1983) untersuchten 1982 insgesamt 195 verschiedene Tankmilchproben aus Kentucky, Ohio und Indiana (USA). Zum Nachweis von Campylobacter jejuni wurde die Rohmilch zunächst zentrifugiert, das Sediment dann angereichert (Brucella-Bouillon mit 0,1 % Pepton, jeweils 0,25 g/l Eisensulfat-Natriummetabisulfit und Pyruvat, sowie 15 mg/l Vancomycin, 7,5 mg/l Trimethoprim, und 5.000 Einheiten Polymyxin B-Zusatz) und durch eine

0,65 µm-Membran gefiltert. Sowohl gefilterte als auch ungefilterte Kulturen wurden anschließend auf Selektivagar (SKIRROW-Agar mit den oben aufgeführten Supplementen) ausgestrichen. Drei Proben (= 1,5 %) enthielten *Campylobacter jejuni*.

1983 beschäftigten sich DE BOER et al. (1984) mit dem Vorkommen von *Campylobacter jejuni* in niederländischer Rohmilch. Von 1.200 Bestandmilchproben erwiesen sich zwei als positiv (= 0,2 %). In 600 Milchkannenproben und 750 Milchproben von klinisch an Mastitis erkrankten Kühen konnte dagegen kein *Campylobacter*-Keim nachgewiesen werden. Die angewendete Methode bestand in einer Anreicherung für 48 Stunden bei 42 °C im mikroaeroben Milieu in PRESTON-Bouillon und anschließender Subkultivierung auf PRESTON-Agar.

In Großbritannien ließen sich *Campylobacter* in 1.501 Rohmilchproben nicht nachweisen (WATERMAN et al., 1984). Die Milchproben stammten von Kühen, die an klinischer Mastitis erkrankt waren oder deren Gemelk in irgendeiner Form verändert oder vermindert war. Die Autoren zogen aus den negativen Befunden die Schlußfolgerung, daß es sich bei mit *Campylobacter* kontaminierter Milch meistens um fäkale Verunreinigungen handelt, schlossen allerdings eine Ausscheidung über das Euter nicht grundsätzlich aus. Der Untersuchungsgang umfaßte eine Anreicherung in Thioglyconat-Bouillon unter Zusatz von 5 % defibriniertem Pferdeblut, 10 mg/l Rifampizin, 10.000 IE/l Polymyxin B (2.500 IE beim Agar), 20 mg/l Trimethoprim (5 mg beim Agar) und 100 mg/l Cycloheximid und eine anschließende Direktkultivierung auf Blutagar, der gleichfalls diese Supplemente enthielt. Die Anreicherung erfolgte bei 42 °C für 40 Stunden während der Kultivierung und für zwei bis vier Tage bei der Subkultivierung. Bei der Untersuchung von Rinderkotproben fiel die jahreszeitliche Schwankung auf. Zwischen August und Oktober 1981 enthielten acht von 74 (= 13 %¹) und zwischen Januar und Februar 1982 38 von 74 (= 51 %) Proben *Campylobacter*-Keime.

HUMPHREY und BECKETT (1987) untersuchten zwischen Oktober 1984 und Juni 1986 zwölf Milchviehbestände in Großbritannien auf das Vorkommen von *Campylobacter jejuni* in Kotproben und Milch. Bei zehn der zwölf Rindviehherden konnte *Campylobacter jejuni* im Kot einiger Tiere nachgewiesen werden, wobei die Infektionsrate in den Beständen zwischen 10 % und 72 % schwankte. Der mittlere Gehalt an *Campylobacter jejuni* in der Milch betrug 16 ± 30 Bakterien pro 100 Milliliter. Erwähnung verdient, daß alle positiven Bestände während des Weidegangs der Rinder Oberflächengewässer als Tränke benutzten. Hingegen verwendeten die beiden negativen Betriebe ausschließlich Trinkwasser. Von den 111 Milchtankproben, die aus fünf *Campylobacter*-positiven Beständen stammten, enthielten neun *Campylobacter jejuni* (= 8,1 %).

Die von HUMPHREY und BECKETT (1987) verwendete Nachweismethode bestand in einer Anreicherung sowohl der Milch als auch der Kotproben für 48 Stunden bei 43 °C, anschließendem Ausstreichen auf Selektivagar und erneuter Bebrütung. Die Zusammensetzung der Anreicherungsbouillon lautete: 25 g Nährlösung Nr. 2 (OXOID), 50 ml gelöstes Pferdeblut, 200 mg Natriumpyruvat, 200 mg Natriummetabisulfit, 500 mg Eisensulfat, 10 mg Trimethoprim, 10 mg

¹ 8 von 74 Proben sind 10,8 % (Anmerkung des Verfassers)

Rifampicin, 15 mg Cefoperazon, 2 mg Amphotericin und 4 mg Colistin. Der Selektivnährboden unterschied sich von dem Anreicherungsmedium durch die Verwendung von 10 mg Vancomycin anstatt des Rifampicins.

In Baden-Württemberg überprüfte SCHEIRLE (1988) 1986-1987 nicht nur 397 Viertel- und Einzelgemelksproben, sondern auch 140 Hof- und Tankwagenmilchproben auf das Vorkommen von Salmonellen und Campylobacter-Spezies. Letztere ließen sich in keiner der insgesamt 537 Rohmilchproben nachweisen.

Zwischen Januar 1984 und Dezember 1987 wurden in Exeter (Großbritannien) insgesamt 1.138 Rohmilchproben untersucht. 985 Proben stammten von Milch, die als Rohmilch zum Verkauf bestimmt war und die übrigen 153 Proben aus Tanks von 12 Milchviehbeständen (HUMPHREY und HART, 1988). Insgesamt waren in 67 Milchproben (= 5,9 %) Campylobacter nachweisbar. Von den zum Verkauf bestimmten 985 Proben zeigten sich 58 (= 5,9 %) positiv. Es wurde die von HUMPHREY und BECKETT (1987) beschriebene Nachweismethode verwendet, mit der Ausnahme, daß etwa 500 ml Milch durch Baumwolle gefiltert wurden und die Hälfte dieses Filters dann in das Anreicherungsmedium verbracht wurde. Die andere Hälfte wurde für den Nachweis von Salmonellen benutzt. In einem zweiten Versuch wurden von 50 positiven Milchproben 10 ml zu der gleichen Menge Anreicherungsmedium gegeben, was in keinem Fall ein positives Resultat erbrachte.

BEUMER et al. (1988) gelang die Isolierung von Campylobacter jejuni aus 41 von 904 in den Niederlanden untersuchten Einzelmilchproben (= 4,5 %). Die Anreicherungen der einzelnen Proben wurden dabei mit 1 molarer NaOH auf einen pH-Wert von 7,5 eingestellt, wodurch das Laktoperoxidase-System (LPS) inaktiviert wurde. Die weitere Nachweismethode umfaßte einen Anreicherungsschritt von 1 ml Milch in 10 ml Brain Heart Infusion, die mit PRESTON-Supplement versetzt war, anschließende Anhebung des pH-Wertes, Bebrütung für 48 Stunden bei 42 °C unter mikroaeroben Bedingungen, Subkultivierung auf Blut-Agar unter Zusatz von PRESTON-Supplement und erneute Bebrütung für 48 Stunden bei 42 °C unter mikroaeroben Bedingungen.

Bei Erhebungen im Raum Kassel fand LOEWENHERZ (1995) bei 25 Rohmilchproben in zwei Fällen Campylobacter jejuni, während in 70 Vorzugsmilchproben und zehn Einzelgemelken der Nachweis mißlang. Hierbei wurden jeweils 1 g Milch in 10 ml PRESTON-Bouillon unter mikroaeroben Bedingungen vorangereichert und nach Bebrütung für 24 Stunden bei 37 °C auf CCDA-Selektivagar (Kohle-Cefoperazon-Desoxycholatagar) ausgestrichen. Nach erneuter mikroaeroben Inkubation für 48 Stunden bei 37 °C wurden die Platten ausgewertet.

Verschiedene Autoren versuchen, einen Zusammenhang zwischen der Qualität der Milch und dem Vorkommen oder sogar der Zahl von Campylobacter -Keimen in diesem Substrat zu finden.

So konnten DOYLE und ROMAN (1982 a) feststellen, daß bei einer Reduktion der Campylobacter jejuni-Rate die aerobe Gesamtkeimzahl stieg und der pH-Wert der Milch sank. Statistisch ergab sich jedoch kein signifikanter Zusammenhang.

HUMPHREY und BECKETT (1987) konnten bei ihrer Untersuchung keine biometrisch gesicherte Beziehung zwischen dem aeroben Gesamtkeimgehalt und dem Gehalt an coliformen Keimen in der Rohmilch auf der einen Seite und dem Vorkommen von Campylobacter jejuni auf der anderen Seite feststellen. Eine Ausnahme bildete ein Betrieb, in dem es zu einem Ausbruch einer Campylobacter-Enteritis kam. Hier war auch der Gehalt an E. coli signifikant höher als in den anderen positiven Beständen.

Im Gegensatz dazu hoben HUMPHREY und HART (1988) hervor, daß bei ihren Untersuchungen von 1.138 Rohmilchproben die 67 Campylobacter-positive Proben auch überwiegend korrelierendes Wachstum von E. coli aufwiesen.

LARKIN et al. (1991) stellten in ihrer Untersuchung fest, daß die Milchqualität, ausgedrückt durch die aerobe Gesamtkeimzahl und den somatischen Zellgehalt, keine Indikatorfunktion für den Gehalt an Campylobacter beziehungsweise das Vorkommen von Campylobacter besaß. Von den untersuchten 41 Rohmilchproben enthielten zwei Campylobacter jejuni. Während die eine Probe einen Keimgehalt von 110.000 pro Milliliter und einen Zellgehalt von 640.000 pro Milliliter aufwies - eine subklinische Mastitis wurde mithin vermutet - betrug die Gesamtkeimzahl der anderen Probe 46.000 pro Milliliter bei einem Zellgehalt von 210.000 pro Milliliter. Hier war demnach zwar eine Zellzahlerhöhung, aber keine weitere Abweichung der Eutergesundheit zu diagnostizieren.

Die Tabelle 5 faßt die in der Literatur angegebenen Untersuchungsergebnisse bezüglich des Vorkommens von Campylobacter in Milch zusammen.

Tabelle 5: Zusammenfassung ausgewählter Untersuchungsergebnisse über das Vorkommen von Campylobacter in Rohmilch

Untersuchungs-material	Anzahl	Campylobacter-positive Proben	Land	Jahr	Referenz
Rohmilch	200	0	USA	1980	CHRISTOPHER et al. 1980
Rohmilch	108	1 (0,9 %)	USA	1981	DOYLE 1982 a
Rohmilch	200	0	Niederlande		OOSTEROM et al. 1982
Rohmilch	195	3 (1,5 %)	USA	1982	LOVETT et al. 1983
Rohmilch (Tank)	1.200	2 (0,2 %)	Niederlande	1983	DE BOER et al. 1984
Rohmilch (Kanne)	600	0	Niederlande	1983	DE BOER et al. 1984
„Mastitismilch“	750	0	Niederlande	1983	DE BOER et al. 1984
„Mastitismilch“	1.501	0	Großbritannien		WATERMAN et al. 1984
Rohmilch	1.138	67 (5,9 %)	Großbritannien	1984-87	HUMPHREY und HART 1988
Rohmilch	904	41 (4,5 %)	Niederlande		BEUMER et al. 1988
Rohmilch	246	1 (0,4 %)	Italien		PASTONI et al. 1992
Rohmilch	84	0	Indien		KHAN und KHANNA (1992)
Rohmilch	105	2 (1,9 %)	Deutschland	1991-92	LOEWENHERZ 1995
Total:	7.351	116 (1,6 %)		1980-92	

2.6 Staphylokokken

2.6.1 Morphologie

Nach KLOOS und SCHLEIFER in BERGEY's Manual of Systematic Bacteriology (1986, S. 1013 ff.) gehören die Staphylokokken zur Familie der Micrococcaceae. Staphylokokken sind 0,5-1,5 µm große, einzeln, in Paaren (Diplo-Form), Tetraden, Haufen oder Paketen angeordnete, grampositive, kugelförmige und unbewegliche Bakterien. Sie wachsen aerob sowie fakultativ anaerob und bilden in der Regel Katalase. Von den 26 Staphylokokken-Spezies besitzt aus lebensmittelhygienischer Sicht nur *Staphylococcus aureus* Bedeutung. Dieser Keim bildet glatte, erhabene, glänzende, runde, leicht durchscheinende Kolonien von weißlich-gelber bis goldener Farbe (aureus = golden) und 6-8 mm Durchmesser. Auf Blutagar zeigen fast alle *Staphylococcus aureus*-Stämme eine deutliche β-Hämolyse.

Im Gegensatz zu den meisten anderen Staphylokokken produziert *Staphylococcus aureus* Koagulase, die Blutplasma (Kaninchenplasma) durch die Umwandlung von Fibrinogen in Fibrin zum Gerinnen bringen. An der Oberfläche nahezu aller Koagulase-positiven Staphylokokken befindet sich außerdem der mit Fibrinogen direkt reagierende „clumping-factor“, wodurch sich dieses Merkmal in Form des Objektträgertests zur Schnellbestimmung dieser Keime und auch für die Bestätigung von *Staphylococcus aureus* einsetzen läßt. Desweiteren bildet letzterer häufig eine hitzestabile DNAase (Thermonuklease) sowie ebenfalls hitzestabile Enterotoxine. Diese können bei Anwesenheit in Lebensmitteln schwere Intoxikationen hervorrufen, auch wenn die Bakterien bereits inaktiviert sind (MAYR et al., 1984, S. 693 ff; KLOOS und SCHLEIFER in BERGEY's Manual of Systematic Bacteriology, 1986, S. 1013 ff.). Die von Staphylokokken produzierten Enterotoxine werden in sieben Typen (A, B, C1, C2, C3, D, E) sowie ein enterotoxin-like protein, das häufig als Enterotoxin F bezeichnete toxic shock toxin (TST), unterteilt (KLOOS und SCHLEIFER in BERGEY's Manual of Systematic Bacteriology, 1986, S. 1018). Mit gewisser Wirtsspezifität werden von den beim Menschen isolierten Staphylokokken-Stämmen vor allem Enterotoxin A und den beim Rind isolierten Staphylokokken-Stämmen Enterotoxin C produziert. Den Staphylokokkenenterotoxinen A und D (SEA, SED) wird im Zusammenhang mit Lebensmittelintoxikationen die größte Bedeutung zugeschrieben (HALPIN-DOHNALEK und MARTH, 1989; TRANTER, 1990; LOPES et al., 1993).

2.6.2 Erkrankungen bei Mensch und Tier

Staphylococcus aureus tritt bei Mensch und Tier vor allem als Verursacher von eitrigen Entzündungen auf und kann somit auch Septikämien auslösen. Dieser Keim kommt weiterhin sehr häufig in Eutern von an subklinischer oder klinischer Mastitis erkrankten Rindern vor (BRÜCKLER et al., 1981; MAYR et al., 1984, S. 698; WENDT et al., 1986, S. 363).

Staphylokokken-bedingte Lebensmittelerkrankungen werden allerdings nicht direkt durch die Bakterien in Form einer Infektion verursacht, sondern die von ihnen gebildeten Enterotoxine rufen eine Intoxikation hervor.

Hinweise auf durch Rohmilch oder wärmebehandelte Trinkmilch bedingte Staphylokokken-Intoxikationen konnten in der zugänglichen Literatur nicht gefunden werden. Für das geringe Risiko gibt es verschiedene Erklärungen:

- Die humanpathogenen Stämme mit einer A- oder D-Enterotoxinbildung kommen beim Rind nur vereinzelt vor (OLSVIK et al., 1981)
- *Staphylococcus aureus* muß sich in dem betreffenden Lebensmittel mindestens auf ein Niveau von 10^6 Keimen pro Gramm vermehren, um Enterotoxine in ausreichender Menge zu bilden. Diese Keimzahlen werden in Milch nur selten erreicht .
- Die Bildung von Staphylokokkenenterotoxinen erfolgt nur, wenn in dem betreffenden Lebensmittel das entsprechende Milieu herrscht. Als Voraussetzung für optimale Toxinbildung gelten eine Temperatur von 37-40 °C und ein pH-Wert von 5,3-7. Derartig hohe Temperaturen werden bei Milch üblicherweise vermieden.
- Eine kompetitive Hemmung der Staphylokokken durch die Begleitflora in der Milch verhindert ein starkes Wachstum dieser Keime und somit eine Toxinbildung (TOLLE, 1981). Die Tatsache, daß sowohl Rohmilch als auch pasteurisierte Milch seltener die Ursache von Lebensmittelvergiftungen bilden als Milchprodukte, bestätigt diese Vermutung (HALPIN-DOHNALEK und MARTH, 1989).

Bei der Frage nach den Ursachen für das Fehlen von Berichten über Staphylokokken-Intoxikationen durch Milchgenuß darf weiterhin nicht vergessen werden, daß die in der Literatur veröffentlichten Daten über diese Lebensmittelvergiftung generell sehr unterschiedlich ausfallen. Eine Ursache liegt sicherlich in der fehlenden Meldepflicht in den europäischen Ländern, weshalb häufig nur große Ausbrüche Beachtung finden.

Während in den USA zwischen 1983 und 1987 von den 600 durch Bakterien verursachten Lebensmittelvergiftungen 47 durch *Staphylococcus aureus* ausgelöst wurden (= 7,83 %) (BEAN et al., 1990), ließen sich im gleichen Zeitraum in England und Wales nur 54 von insgesamt 2.815 Ausbrüchen (= 1,92 %) *Staphylococcus aureus* zuschreiben (TRANTER, 1990).

Das seltene Auftreten von *Staphylococcus aureus*-Intoxikationen im Zusammenhang mit dem Konsum von Milch erhärtet auch die Erhebung von WIENEKE (1991). Die vergleichenden Studien über das Vorkommen von Staphylokokkenenterotoxinen umfaßte 18 Lebensmittel, welche

mit 15 zwischen 1984 und 1990 in Großbritannien aufgetretenen Lebensmittelvergiftungen in Zusammenhang standen und wahrscheinlich auf Staphylokokken zurückgingen. Milch oder Milchprodukte kamen in keinem der gemeldeten Ausbrüche als Ursache in Betracht.

2.6.3 Vorkommen und Häufigkeit in der Milch

Auch wenn *Staphylococcus aureus* in Milch ein geringes Gesundheitsrisiko für den Konsumenten darstellt, ist dieser Keim einer der bedeutendsten Erreger von klinischen und auch subklinischen Mastitiden und wird dementsprechend relativ häufig in Milch festgestellt.

Besonderes Interesse verdient das Enterotoxinbildungsvermögen der aus Milch isolierten *Staphylococcus aureus*-Stämme. So fanden NISKANEN und KOIRANEN (1977) bei der Untersuchung von 276 *Staphylococcus aureus*-Stämmen, die in Routineuntersuchungen, bei Lebensmittelvergiftungen und aus Mastitismilchen angezüchtet wurden, 142 Isolate (= 51 %), die Enterotoxine produzieren konnten. Alle untersuchten Stämme bildeten Thermonuklease und alle 142 enterotoxinproduzierenden Stämme Koagulase, während von den 134 nicht enterotoxinproduzierenden Stämmen Koagulase nur in 87 % der Fälle gebildet wurde.

Ein etwas höheres Toxinbildungsvermögen fanden OLSVIK et al. (1981), da sie Enterotoxinproduktion bei 104 von 170 (= 61,2 %) *Staphylococcus aureus*-Stämmen, die humanen und tierischen Ursprungs waren, nachwiesen. Dabei stellten die Autoren fest, daß die aus Milch und von Rindern stammenden *Staphylococcus aureus*-Stämme vor allem Enterotoxin C produzierten, während die bei einer Intoxikation von Menschen isolierten Stämme überwiegend Enterotoxin A erzeugten.

Von 300 in Kenia untersuchten Rohmilchproben enthielten 183 *Staphylococcus aureus* (= 61 %). 97 dieser Stämme wurden auf ihr Enterotoxinbildungsvermögen untersucht. 72 Stämme (= 74,2 %) waren in der Lage, Enterotoxin A, B, C oder D einzeln oder in Kombination zu bilden (OMBUI et al., 1992).

Bei einer Erhebung aus 78 Rohmilchproben in Brasilien zwischen Juli 1978 und Juni 1979 enthielten 46,9 % der Proben, die mit Tellurit-Polymyxin-Eigelb-Agar untersucht wurden, *Staphylococcus aureus* mit einem mittleren Gehalt von $10^{4,7}$ koloniebildenden Einheiten pro Milliliter. In 45,2 % der Proben, die simultan mit Toluidinblauhaltigem Plate-Count-Agar überprüft wurden, konnten *Staphylococcus aureus*-verdächtige Keime mit einem mittleren Gehalt von $10^{4,4}$ koloniebildenden Einheiten pro Milliliter nachgewiesen werden. Der aerobe Keimgehalt lag bei diesen Proben im Bereich von 10^4 bis $10^{7,2}$ koloniebildenden Einheiten pro Milliliter Milch, der Mittelwert belief sich auf $10^{5,6}$ (dos SANTOS et al., 1981).

REA et al. (1992) führten eine Stuserhebung auf Mastitis-Erreger durch, in die sie auch *Staphylococcus aureus* einbezogen. Es liegen keine Angaben über die genaue Anzahl der untersuchten Proben vor, jedoch betrug der mittlere Gehalt an *Staphylococcus aureus* 1.200-2.200 beziehungsweise 1.500-3.500 Keime pro Milliliter bei den Beständen, die zehn- beziehungsweise neunmal beprobt wurden.

3 Eigene Untersuchungen

3.1 Material und Methodik

3.1.1 Material

Im Rahmen der vorliegenden Erhebung wurden insgesamt 415 Rohmilchproben aus 82 verschiedenen Beständen untersucht. Die Milchproben wurden von der Meierei routinemäßig für eigene Untersuchungen genommen, wobei die Auswahl der Betriebe willkürlich seitens der Meierei erfolgte, bedingt durch den jeweils zur Verfügung stehenden Tankwagen.

Die Probenahme wurde wie folgt durchgeführt:

Während des Einfüllens der Hofmilch des einzelnen Bestandes in den Tankwagen, wurde automatisch und kontinuierlich eine Milchprobe in einen mit einem Gummistopfen verschlossenen Kunststoffbehälter gefüllt. Das Probengefäß war mit einem Barr-Code versehen, was später eine eindeutige Zuordnung der Probe zum Bestand garantierte. Der Entnahmehahn wurde zwischen den einzelnen Probenahmen nicht sterilisiert oder gereinigt. Am Ende der Tankwagentour wurde ein Computerausdruck erstellt, der folgende Daten enthielt:

- Anzahl der genommenen Proben
- Anzahl der Lieferanten
- Datum (Fahrtende)
- Zeit (Fahrtende)
- Tourmenge (Gesamtmilchmenge)
- Kilometer (bei Fahrtende)

sowie in Tabellenform für die einzelnen Bestände:

- Zeit (der Probenentnahme)
- Liefernummer (des Bestandes)
- Anlieferungsmenge in Liter (bei Probenentnahme)
- Temperatur (der Milch) und
- Probenflaschenkodierung (bestehend aus einer zehnstelligen Ziffer).

Außerdem waren Tournummer, Fahrernummer, Betriebsnummer, Datum (Fahrtbeginn), Zeit (bei Fahrtbeginn); Fahrzeugnummer und Kilometer (bei Fahrtbeginn) angegeben. Zusätzliche Informationen wie zum Beispiel die Bestandsgröße, die Haltungsform oder die Melktechnik lagen dagegen nicht vor.

Wurden an einem Tag mehr als eine Probe aus demselben Bestand untersucht, so stammten die Milchen aus verschiedenen Hofsammeltanks.

Die Proben wurden nach Ankunft in der Meierei im Kühlschrank bei 4 °C gelagert.

Da die eigenen Untersuchungen jeweils an einem Montag begannen, ergab sich je nach Entnahmetag (Freitag bis Montag) eine unterschiedliche Lagerdauer: 27 Proben wurden innerhalb von zwölf Stunden, 309 Proben innerhalb von 24 Stunden, 73 Proben innerhalb von 48 Stunden und sechs Proben innerhalb von 72 Stunden mikrobiologisch analysiert. Der Transport von der Meierei zum Labor erfolgte in einer mit Kühlelementen versehenen Kühlbox.

Die Proben mit einem Einzelvolumen von in der Regel 40 ml Rohmilch wurden vor der Untersuchung fortlaufend nummeriert. Da es sich bei den ersten sieben Untersuchungen um einen Probedurchlauf handelte, wurden für die statistischen Auswertungen, soweit nicht anders angegeben, nur die Proben 8 bis 422 herangezogen.

Die bei der Untersuchung auf die verschiedenen Bakterien verwendeten Nährmedien wurden in der Nährbodenküche des BgVV entsprechend den jeweiligen Vorschriften hergestellt. Die fertigen Nährmedien wurden im Kühlraum bei 4 °C gelagert und je nach Vorgabe beziehungsweise Haltbarkeit innerhalb von zwei Wochen verbraucht.

3.1.2 Methodik

Die Untersuchungen auf die verschiedenen Keimgruppen wurden nach den Methoden der Amtlichen Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 35 des Lebensmittel- und Bedarfsgegenstände-Gesetzes (LMBG) durchgeführt.

Da für die Untersuchung auf *Campylobacter* zur Zeit ein offizieller Standard nicht zur Verfügung steht, wurde hier die vom Nordic Committee on Food Analysis vorgeschlagene Methode für eine CEN (European Committee for Standardization; 1990) - Norm angewendet.

Die einzelnen Methodenstandards wurden zum Teil aufgrund spezifischer Bedürfnisse und Erfahrungen modifiziert. Die Abweichungen sind an den jeweiligen Stellen dargelegt.

Die verbliebenen Reste jeder Einzelprobe wurden bei -20 °C in Kunststoffgefäßen für Nachuntersuchungen eingefroren.

Unabhängig von der nachzuweisenden Keimart wurden die Proben zu Beginn jeder Untersuchung durch sorgfältiges Schütteln durchmischt. Nach dem Beimpfen wurden alle Platten mit dem Deckel nach unten inkubiert.

Die in der Methodenbeschreibung angegebenen Verdünnungsstufen ergaben sich aus den in den Vorversuchen angefallenen Ergebnissen. Dabei wurden die Verdünnungsstufen so gewählt, daß die zu erwartenden Keimzahlen auf den Platten oder in den Reagenzgläsern im Bereich auswertbarer Zählergebnisse lagen.

Um neben dem Nachweis pathogener Mikroorganismen einen orientierenden Überblick über die Keimflora zu erhalten, wurde jeweils eine Blutagarplatte im Drei-Ösen-Ausstrich beimpft. Die Platte wurde im Brutschrank bei 37 °C inkubiert und nach 24 sowie 48 Stunden abgelesen, wodurch ein Eindruck über die vorhandene Keimflora und die Keimmenge gewonnen wurde.

3.1.2.1 Aerobe Gesamtkeimzahl

Die Untersuchung der aeroben Gesamtkeimzahl erfolgte in Anlehnung an die Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 35 Lebensmittel- und Bedarfsgegenständegesetz (LMBG) (Nr. L 01.00-5: Untersuchung von Lebensmitteln - Bestimmung der Keimzahl in Milch und Milchprodukten (Referenzverfahren)) in der Fassung vom November 1983.

Von den einzelnen Milchproben wurden dezimale Verdünnungsstufen durch Beimpfen von 9 ml Ringerlösung mit jeweils 1 ml Rohmilch beziehungsweise 1 ml der vorherigen Verdünnungsstufe hergestellt. Im Doppelansatz wurden von den ausgewählten Verdünnungsstufen je 1 ml in eine leere Petrischale pipettiert. Aufgrund der zu erwartenden Keimzahlen wurden hier die Verdünnungsstufen 10^{-3} , 10^{-4} und 10^{-5} ausgewählt. Anschließend wurden die Petrischalen mit 12-15 ml flüssigem Plate-Count-Agar mit Magermilchpulverzusatz aufgefüllt sowie Probe und Nährboden gemischt. Nach dem Erstarren des Agars wurden die Platten bei $30\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ für 72 h im Brutschrank bebrütet.

Die Zusammensetzung des Hefeextrakt-Trypton-Glucose-Agars (Plate-Count-Agar) mit Magermilchzusatz lautet:

- 2,5 g Hefeextrakt
- 5,0 g Casein, tryptisch verdaut (Trypton)
- 1,0 g Glucose
- 1,0 g Magermilchpulver, hemmstofffrei
- 10 bis 15 g Agar, je nach Geliereigenschaften
- 1000 ml Wasser

Nach 72 h wurde die Anzahl der Kolonien pro Platte gezählt. Hierbei gelangten nur Platten zur Auswertung, die zwischen 10 und 300 Kolonien aufwiesen.

Der Gehalt an koloniebildenden Einheiten in der Probe wurde mit Hilfe des gewogenen arithmetischen Mittels berechnet:

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

- C Anzahl der koloniebildenden Einheiten je ml Rohmilch (Keimzahl)
- $\sum c$ Summe der Kolonien aller Petri-Schalen, die zur Auswertung kamen
- n_1 Anzahl der Petri-Schalen der niedrigsten ausgewerteten Verdünnungsstufe
- n_2 Anzahl der Petri-Schalen der nächsthöheren ausgewerteten Verdünnungsstufe
- d Faktor der niedrigsten ausgewerteten Verdünnungsstufe (bezogen auf n_1).

Für die Angabe des ermittelten Ergebnisses wurden - wie üblich - nur die ersten zwei Stellen herangezogen und das Resultat als Zehnerpotenz angegeben. Die dritte Stelle wurde demnach auf Null gerundet. Betrug der Wert fünf, so wurde einerseits abgerundet, wenn die ersten beiden Ziffern in der Quersumme eine gerade Zahl ergaben, und andererseits aufgerundet, sofern die ersten beiden Ziffern in der Quersumme eine ungerade Zahl ergaben.

3.1.2.2 Coliforme Keime

Die Untersuchung auf coliforme Keime erfolgte in Anlehnung an die Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 35 LMBG (Nr. L 01.00-2: Untersuchung von Lebensmitteln - Bestimmung der coliformen Keime in Milch, Milchprodukten, Butter, Käse und Speiseeis - Verfahren mit flüssigem Nährmedium) in der Fassung vom Dezember 1991. Es handelt sich hierbei um eine MPN-Technik (Most Probable Number), die einen groben Schätzwert für die coliforme Keimzahl liefert.

Für die Untersuchung auf coliforme Keime wurden dezimale Verdünnungsreihen von 10^0 bis 10^{-5} hergestellt.

Mit der Rohmilch beginnend wurden von jeder Verdünnungsstufe jeweils 1 ml in drei Reagenzgläser mit 10 ml Brillantgrün-Galle-Lactose-Nährmedium pipettiert. Zusätzlich befanden sich in den Reagenzgläsern Durham-Röhrchen zur Feststellung der Gasbildung.

Die Brila-Bouillon (Brillantgrün-Galle-Lactose-Bouillon) (MERCK) besaß folgende Zusammensetzung:

10,0	g	Pepton
10,0	g	Lactose
20,0	g	Ochsengalle, getrocknet
0,0133	g	Brillantgrün
1000	ml	Wasser

Die beimpfte Brila-Bouillon wurde bei 30 °C für 48 h bebrütet. Anschließend wurden die Durham-Röhrchen auf Gasbildung, verursacht durch den Lactose-Abbau, überprüft, wobei die Reaktion als positiv gewertet wurde, wenn sich eine deutlich erkennbare Gasblase zeigte.

Für die MPN-Schätzung wurden die drei höchsten Verdünnungsstufen berücksichtigt, die noch ein positives Ergebnis zeigten. Aus der Anzahl an Reagenzgläsern mit Gasbildung pro Verdünnungsstufe ergab sich eine dreistellige Index-Zahl. Mit Hilfe der MPN-Tabelle für den 3x3-Ansatz ließ sich anhand dieses Codes die wahrscheinlichste Anzahl (Most Probable Number) der Keime ermitteln. Durch Multiplikation mit dem Faktor der niedrigsten ausgewerteten Verdünnungsstufe wurde letztlich die Anzahl der coliformen Keime je Milliliter Rohmilch berechnet.

3.1.2.3 Listeria monocytogenes

Bei der Untersuchung auf *Listeria monocytogenes* wurde die in der Amtlichen Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 35 LMBG unter Nr. L 00.00-22: „Untersuchung von Lebensmitteln - Nachweis und Bestimmung von *Listeria monocytogenes* in Lebensmitteln“ - beschriebene Methode in der Fassung vom Dezember 1991 angewendet.

Zunächst wurde nur eine qualitative Prüfung der Milch auf Listerien durchgeführt (Anreicherung von 1 ml Probenmaterial). Die Proben, welche Listerien enthielten, wurden anschließend quantitativ nachuntersucht, wofür auf die eingefrorenen Rohmilchproben zurückgegriffen wurde. Fiel bei der Untersuchung in einem Bestand eine positive Rohmilchprobe an, so wurde bei der nächsten Untersuchung einer Probe aus diesem Bestand sofort ein quantitativer Ansatz durchgeführt.

Zunächst wurden jeweils 1 ml Rohmilch zu 9 ml Anreicherungsbouillon hinzugefügt. Als Anreicherungsmedium diente Trypton-Soja-Bouillon mit Hefeextrakt (Trypton-Soja-Yeast-Extract-Bouillon-TSYEB) (OXOID) mit folgender Rezeptur:

17,0	g	Casein, tryptisch verdaut
3,0	g	Sojapepton
5,0	g	NaCl
2,5	g	K ₂ HPO ₄
2,5	g	Dextrose
6,0	g	Hefeextrakt

Listeria-Anreicherungs-Selektiv-Supplement (OXOID); 2 Röhrchen pro 1000 ml:

40,0	mg	Nalidixinsäure
50,0	mg	Cycloheximid
15,0	mg	Acridflavin
1000	ml	Wasser

Die beimpfte Selektivanreicherung wurde im Brutschrank bei 30 °C 48 h bebrütet.

Nach zwei Tagen wurde aus jeder Anreicherung ein Drei-Ösen-Ausstrich auf den zwei selektiven Nährböden OXFORD- und PALCAM-Agar angefertigt.

Für die Zusammensetzung der Selektivnährböden gilt:

OXFORD-Agar

23,0	g	Spezialpepton
1,0	g	Stärke
5,0	g	Natriumchlorid
10,0	g	Agar
1,0	g	Äskulin
0,5	g	Eisen(III)-ammoniumcitrat
15,0	g	Lithiumchlorid
1000	ml	Wasser

Listeria-Selektiv-Supplement (OXFORD) (OXOID) 2 Röhrchen auf 1000 ml:

400,0	mg	Cycloheximid
20,0	mg	Colistin
5,0	mg	Acriflavin
2,0	mg	Cefotetan
10,0	mg	Fosfomycin

Der PALCAM-Listeria-Selektivagar (nach VAN NETTEN et al. (MERCK)) besitzt folgende Rezeptur:

23,0	g	Pepton
1,0	g	Stärke
5,0	g	Natriumchlorid
13,0	g	Agar
10,0	g	D(-)-Mannit
0,5	g	Ammoniumeisen(III)-citrat
0,8	g	Äskulin
0,5	g	Glucose
15,0	g	Lithiumchlorid
0,08	g	Phenolrot
1000	ml	Wasser

PALCAM-Listeria-Selektivsupplement (nach VAN NETTEN et al. (MERCK)) 2 Röhrchen auf 1000 ml:

10,0	mg	Polymyxin B-Sulfat
20,0	mg	Ceftazidim
5,0	mg	Acriflavin-HCl

Die beimpften Platten wurden für 48 h im Brutschrank bei 37 °C bebrütet und anschließend auf verdächtige Kolonien untersucht.

Listerien bilden auf OXFORD-Agar braungraue Kolonien mit einem Durchmesser von maximal 1,5 mm und einem schwarzen Hof (Äskulinspaltung), die meist rund, flach gewölbt und zentral eingezogen sind. Auf PALCAM-Agar erscheinen Listerien als grüngraue Kolonien mit schwarzem Hof (Äskulinspaltung) von höchstens 2 mm Durchmesser, die gleichfalls meist rund, flach gewölbt und zentral eingezogen sind.

Entfernt man die Kolonien von den Nährböden mit einer Öse, so bleibt im Medium eine kleine Vertiefung.

Die verdächtigen Kolonien wurden zunächst mikroskopisch untersucht. Listerien zeigen im hängenden Tropfen eine typische, taumelnde Bewegung. In der Färbung stellen sich Listerien als grampositive kurze Stäbchen dar.

Die Fähigkeit der Listerien, Katalase zu bilden, wurde im Objektträgertest überprüft. Dazu wurde eine Listerien-Kolonie in einem Tropfen Wasserstoffsuperoxid (H_2O_2 , 3 %ig) verrieben. Im positiven Fall wurde das Wasserstoffsuperoxid gespalten und der freigewordene Sauerstoff manifestierte sich durch die Ausbildung von Gasbläschen.

Für weitere biochemische Bestätigungsreaktionen wurden von den Platten der Listerienverdächtigen Milchprobe insgesamt zehn (sofern vorhanden) verdächtige Kolonien auf Trypton-Soja-Agar mit Hefeextrakt (Trypton-Soja-Yeast-Extract-Agar-TSYEA) (OXOID) überimpft. Dieses Medium besitzt folgende Rezeptur:

Listeria-Anreicherungslösung-Basis (OXOID):

17,0	g	Casein, tryptisch verdaut
3,0	g	Sojapepton
5,0	g	Natriumchlorid
2,5	g	Kaliumphosphat (K_2HPO_4)
2,5	g	Dextrose
6,0	g	Hefeextrakt
12-18	g	Agar, je nach Geliereigenschaften
1000	ml	Wasser

Die beimpften Platten wurden bei 37 °C bebrütet und nach 24 h im Schrägdurchlicht nach HENRY betrachtet. Prinzip dieser Untersuchung ist, daß eine externe Lichtquelle einen Spiegel beleuchtet, sodaß Licht in einem Winkel von 45° von unten auf die bewachsene Agarplatte trifft. Diese Platte wird mit einem Stereomikroskop betrachtet, wobei Listerien bläulich aufleuchten.

Hatte sich der Listerien-Verdacht soweit bestätigt, wurde je eine verdächtige Kolonie in jeweils 5 ml Trypton-Soja-Bouillon mit Hefeextrakt (TSYEB ohne Supplement) überführt. Die Bouillon wurde bei 37 °C für 4 h im Wasserbad bebrütet.

Aus dieser Bouillon wurden die Nährmedien für den Beweglichkeitstest, den Nachweis der Kohlenhydratspaltung und das CAMP-Phänomen beimpft. Diese drei Substrate besaßen folgende Zusammensetzung:

Beweglichkeitsnährboden (stichfest):

20,0 mg	Caseinpepton
6,1 g	Fleischpepton
3,5 g	Agar
1000 ml	Wasser

Kohlenhydrat-Nährmedien:

9 ml Purple Broth Base (PBB); 1000 ml enthalten:

10,0 g	Proteose Pepton
1,0 g	Fleischextrakt
5,0 g	Natriumchlorid
0,02 g	Bromkresolpurpur
1000 ml	Wasser

1 ml 5 %ige Rhamnoselösung für das Rhamnose-Nährmedien, beziehungsweise

1 ml 5 %ige Xyloسلösung für das Xylose-Nährmedien

Columbia-Rinderblutagar für das CAMP-Phänomen:

23,0 g	Pepton
1,0 g	Stärke
5,0 g	Natriumchlorid
10,0 g	Agar
1000 ml	Wasser
50 ml	gewaschene Erythrozyten

Für den Nachweis der Kohlenhydratspaltung wurde aus jeder TSYE-Bouillon eine Öse Material in 10 ml Rhamnose- und Xylose-haltige Nährmedien verbracht, welche dann bis zu einer Woche bei 37 °C bebrütet wurden. Eine Kohlenhydratspaltung zeigte sich durch einen Farbumschlag der Bouillon an, indem der Zuckerabbau zu einer pH-Senkung führte, was einen Farbumschlag der violetten Lösung nach gelb induzierte.

Mit einer Impfnadel wurde aus der TSYE-Bouillon eine Stichkultur in 5 ml des Beweglichkeitsagars angelegt. Der Agar wurde 48 bis 72 h bei 25 °C bebrütet. Waren die Bakterien beweglich, so zeigte sich ein schirmartiges Wachstum der Keime im Nährmedium.

Um die verdächtigen Keime auf das CAMP-Phänomen zu untersuchen, wurde aus den TSYEB-Nährmedien jeweils eine Öse senkrecht gegen einen β -hämolisierenden Staphylokokkenstamm auf eine Columbia-Agarplatte mit Rinderblut ausgestrichen. Die Platten wurden bei 37 °C für 24 h bebrütet. Verhielten sich die Keime CAMP-positiv, so bildete sich im „Schnittbereich“ der beiden Impfstriche eine vollständige Hämolysezone aus.

Tabelle 6 zeigt die biochemischen Reaktionen der verschiedenen Listerien-Spezies.

Tabelle 6: Reaktionen zur Identifizierung und Differenzierung von Listeria-Spezies

	L. monocytogenes	L. innocua oder murrayi	L. ivanovii
Gramfärbung	+	+	+
Äskulinspaltung	+	+	+
Beweglichkeit	+	+	+
HENRY-Beleuchtung	+	+	+
Rhamnose-Spaltung	+	±	-
Xylose-Spaltung	-	-	+
CAMP-Test (St. aureus)	+	-	-

Wenn in einer Milchprobe Listerien vorkamen, schloß sich eine quantitative Untersuchung der entsprechenden Probe an.

Dazu wurde eine dezimale Verdünnungsreihe hergestellt, indem 1 ml Rohmilch zu 9 ml Ringerlösung pipettiert wurden. Für die weiteren Verdünnungsstufen wurde jeweils 1 ml der vorhergehenden Verdünnungsstufe in 9 ml Ringerlösung pipettiert.

Anschließend wurde im Oberflächenverfahren mit den Selektivmedien OXFORD und PALCAM die Keimzahl für Listerien ermittelt.

Aufgrund der zu erwartenden Keimzahlen wurden die Verdünnungsstufen 10^{-1} (0,1 ml der 10^0 -Verdünnung) bis 10^{-4} (0,1 ml der 10^{-3} Verdünnung) angelegt. Die beiden beimpften Selektivplatten jeder Verdünnungsstufe wurden für 48 h bei 37 °C bebrütet. Nach zwei Tagen wurden die Listerien-verdächtigen Kolonien auf jeder Platte gezählt und anschließend wie oben beschrieben bestätigt.

Wuchsen auf der niedrigsten Verdünnungsstufe mehr als vier listerienverdächtige Kolonien und konnten davon 80 % als Listerien bestätigt werden, so erfolgte die Keimzahlberechnung nach der unter 3.1.2.1 angegebenen Formel für das gewogene arithmetische Mittel.

Ließen sich weniger als 80 % der Kolonien als Listerien verifizieren, so wurde die Koloniezahl entsprechend dem prozentualen Ergebnis der Bestätigungsreaktionen korrigiert.

Das Ergebnis wurde angegeben als Zahl zwischen 1,0 und 9,9, multipliziert mit der entsprechenden Zehnerpotenz. Die Ergebnisse wurden in drei Gruppen zusammengefaßt:

Fall 1: Wurden aus der Anreicherung keine Listerien isoliert, so lautete das Ergebnis:

Listeria nicht nachgewiesen in 1 ml Rohmilch.

Fall 2: Wurden zwar in der Anreicherung Listerien nachgewiesen, aber nicht im quantitativen Verfahren, oder

fanden sich beim quantitativen Nachweis weniger als vier bestätigte Kolonien, so hieß das Ergebnis:

Listeria nachgewiesen in 1 ml Rohmilch, aber weniger als 10^2 pro Milliliter.

Fall 3: Wurden in der Anreicherung Listerien nachgewiesen, und der quantitative

Nachweis ergab mehr als vier bestätigte Kolonien, so lautete das Ergebnis:

C (= gewichteter Mittelwert der Koloniezahlen) Listerien pro Milliliter Rohmilch.

Um eine serologische Bestätigung der mit dem kulturellen Nachweisverfahren und der biochemischen Differenzierung gewonnenen Ergebnisse zu erhalten, wurden die Listerienisolate auf Blut-schrägagar überimpft und im Fachbereich Diagnostik und Epidemiologie des BgVV serologisch untersucht. Hierzu wurden die Listerienstämme in einer Objektträgerpräzipitationsreaktion auf ihre antigenen Eigenschaften getestet. Bei den eingesetzten Antiseren handelte es sich um Antikörper, die gegen insgesamt 13 in der Zellwand (O-Antigene I bis XIII) und fünf in den Geißeln (H-Antigene A bis E) lokalisierte Antigene gerichtet sind. Die serologische Einteilung der Listerien wurde anhand der Oberflächenantigene entsprechend dem PATERSON-Schema, modifiziert und erweitert nach SEELIGER und DONKER-VOET (1987), vorgenommen. Als Beispiel seien aufgeführt:

- *Listeria monocytogenes* Typ 1/2a: O: I, II, (III, nicht immer entwickelt); H: A, B;
- *Listeria monocytogenes* Typ 4b: O: (III), (V), VII, IX; H: A, B, C;
- *Listeria innocua* Typ 6b: O: (III), (VI), (VII), IX, X, XI; H: A, B, C.

Bei der Untersuchung auf *Listeria monocytogenes* in den Rohmilchproben wurde bei jeder Untersuchung ein *Listeria monocytogenes*-Stamm als positive Kontrolle mitgeführt.

3.1.2.4 Salmonellen

Die in der Amtlichen Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 35 LMBG unter Nr. L 00.00-20: „Untersuchung von Lebensmitteln - Nachweis von Salmonellen“ - beschriebene Methode in der Fassung vom Juni 1990 kam für den Nachweis von Salmonellen zum Einsatz.

Beim Salmonellennachweis wurde zunächst nur auf das Vorhandensein in 1 ml Rohmilch untersucht, da:

- die von der Meierei zur Verfügung gestellten Probehgefäße nur ca. 40 ml Rohmilch enthielten, die für alle mikrobiologischen Untersuchungen reichen mußten und
- für quantitative Nachuntersuchungen von positiven Proben noch Material zur Verfügung stehen sollte.

Ab Untersuchungsnummer 310 wurde zum Vergleich auch ein paralleler Untersuchungsgang mit 25 ml Rohmilch durchgeführt, um das bis dahin erhaltene negative Ergebnis der Untersuchungen auf Salmonellen durch Einsatz einer größeren Probenmenge abzusichern. Zu diesem Zeitpunkt stand fest, daß der Bedarf für Nachuntersuchungen nur gering ausfiel und genügend Material für die 25 ml-Probe verblieb.

Insgesamt wurden 415 (8-422) Rohmilchproben von 1 ml und zusätzlich 113 (310-422) Rohmilchproben von 25 ml auf das Vorhandensein von Salmonellen überprüft.

Von jeder Milchprobe wurden 1 ml in 9 ml gepuffertes Peptonwasser als Voranreicherung pipettiert. Die Zusammensetzung des gepufferten Peptonwassers entsprach folgender Rezeptur:

10,0	g	Caseinpepton, tryptisch verdaut
5,0	g	Natriumchlorid
9,0	g	di-Natrium-hydrogenphosphat, $\text{Na}_2\text{HPO}_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$
1,5	g	Kalium-dihydrogenphosphat, KH_2PO_4
1000	ml	Wasser

Der pH-Wert des gepufferten Peptonwassers wurde so eingestellt, daß er nach dem Sterilisieren bei $7,0 \pm 0,1$ lag.

Bei der Untersuchung auf das Vorkommen von Salmonellen in 25 ml Rohmilch wurden 25 ml Milch zu 225 ml gepuffertem Peptonwasser pipettiert.

Die beimpften Voranreicherungen wurde bei 37°C für 24 h bebrütet.

Für die Anreicherung wurden 1 ml aus jeder Voranreicherung in 10 ml Selenit-Cystin-Bouillon und 0,1 ml aus jeder Voranreicherung in 10 ml Magnesiumchlorid-Malachitgrün-Medium nach RAPPAPORT-VASSILIADIS (RV-Medium) pipettiert.

Die Zusammensetzung des RAPPAPORT-VASSILIADIS-Nährmediums lautet:

1000 ml Lösung A:

5,0	g	Caseinpepton, tryptisch verdaut
8,0	g	Natriumchlorid
1,6	g	Kaliumdihydrogenphosphat, KH_2PO_4
1000	ml	Wasser

100 ml Lösung B:

400	g	Magnesiumchlorid · 6-Hydrat, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$
1000	ml	Wasser

10 ml Lösung C:

0,4	g	Malachitgrün-Oxalat
100	ml	Wasser

Für das Selenit-Cystin-Nährmedium gilt nachfolgende Rezeptur:

5,0	g	Caseinpepton, tryptisch verdaut
4,0	g	Lactose
10,0	g	di-Natrium-hydrogenphosphat, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$
4,0	g	Natrium-hydrogenselenit, NaHSeO_3
0,01	g	L-Cystin
1,5	ml	Natriumhydroxid-Lösung, $c=1 \text{ mol/l}$ (c =Stoffmengenkonzentration)
1000	ml	Wasser

Zum Nachweis von Salmonellen in 25 ml Rohmilch wurden 10 ml aus jeder Voranreicherung in 100 ml Selenit-Cystin-Bouillon und 0,1 ml aus jeder Voranreicherung in 10 ml RAPPAPORT-VASSILIADIS-Medium pipettiert.

Die beimpften RV-Medien wurden bei 42 °C und die Selenit-Cystin-Nährmedien bei 37 °C für 24 h bebrütet.

Als nächster Schritt wurden aus den Anreicherungen jeweils zwei Selektivnährböden beimpft. Gemäß Amtlicher Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 35 LMBG, Nr. L 00.00-20 ist der Brillantgrün-Phenolrot-Agar (BPLS) nach EDEL und KAMPELMACHER als ein Selektivnährboden für die Salmonellen-Identifizierung vorgeschrieben. In dieser Untersuchung kam weiterhin der Lackmus-Lactose-Agar nach DRIGALSKI (LLA) zum Einsatz. Salmonellen ver-

mögen Lactose nicht abzubauen und bewirken demnach keinen Farbumschlag der in den Nährmedien enthaltenen Indikatoren in den sauren Bereich.

Die Zusammensetzung des BPLS-Agars (Brillantgrün-Phenolrot-Lactose-Saccharose-Agar) (MERCK) ergibt sich wie folgt:

5,0	g	Pepton aus Fleisch
5,0	g	Pepton aus Casein
5,0	g	Fleischextrakt
3,0	g	Natriumchlorid
2,0	g	di-Natrium-hydrogenphosphat, Na ₂ HPO ₄
10,0	g	Lactose
10,0	g	Saccharose
0,08	g	Phenolrot
0,0125	g	Brillantgrün
12,0	g	Agar
1000	ml	Wasser

Für die Zusammensetzung des LL-Agars (Lackmus-Lactose-Agar nach DRIGALSKI) (MERCK) gilt:

7,0	g	Pepton aus Fleisch
5,0	g	Natriumchlorid
15,0	g	Lactose
1,2	g	Lackmus
13,0	g	Agar
1000	ml	Wasser

Sowohl aus der Selenit-Cystin-Bouillon als auch der RAPPAPORT-VASSILIADIS-Bouillon wurden jeweils eine BPLS- und eine LL-Agarplatte mit einem Drei-Ösen-Ausstrich beimpft. Ab Probe Nr. 310 wurde auch die Anreicherung von 25 ml Rohmilch in gleicher Weise behandelt.

Die beimpften Platten wurden bei 37 °C bebrütet und nach 24 h auf verdächtige Kolonien durchmustert. Salmonellen wachsen auf BPLS-Agar als rötliche bis rote Kolonien, wobei auch der Nährboden eine rote Farbe annimmt. Dagegen erscheinen Salmonellen auf LL-Agar als blaue Kolonien.

Mit einem polyvalenten Salmonellen-OH-Antiserum wurden verdächtige Kolonien auf ihre antigenen Eigenschaften geprüft. Dabei wurde die Kolonie auf einem Objektträger in einem Tropfen Antiserum mit einer Öse verrieben. Im positiven Fall reagierten Salmonellen als Antigen in einer Antigen-Antikörper-Reaktion, die sich als feine Agglutination darstellte.

Die Amtliche Methode nach § 35 LMBG sieht weitere Untersuchungen zur Bestätigung von Salmonellen vor, welche zwar aufgrund der negativen Ergebnisse nicht durchgeführt wurden, aber der Vollständigkeit halber hier angegeben werden.

So werden agglutinierende Kolonien auf einem Agar für die Identifizierung mittels Verdünnungsausstrich überimpft. Dieses unspezifische Substrat weist folgende Zusammensetzung auf:

- 3,0 g Fleischwasser
- 5,0 g Caseinpepton, tryptisch verdaut
- 10 bis 15 g Agar, je nach Gelieereigenschaften
- 1000 ml Wasser

Die beimpften Platten werden bei 37 °C für 24 h bebrütet und eine Kolonie anschließend mit dem Api-System (api 20E[®] bio Mérieux) biochemisch differenziert.

Salmonellen zeigen folgende Reaktionen:

- Glukose-, Mannit-, Sorbitol-, Inosit- und Rhamnose-, Melibioseabbau: überwiegend positiv;
- Amygdalin- und Saccharoseabbau: negativ;
- Arginin-, Lysin-, Ornithin-, Natriumcitratabbau und H₂S-Bildung: positiv;
- Urease-, Tryptophandesaminase-, Indol-, Acetoin-, Gelatinaseproduktion: negativ.

Im Rahmen dieser Tests wurde bei jedem Untersuchungsgang ein Stamm Salmonella dublin als positive Kontrolle mitgeführt.

3.1.2.5 Campylobacter

Da für die Untersuchung auf *Campylobacter jejuni* keine Methode in der Amtlichen Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 35 LMBG zur Verfügung stand, wurde hier das vom Nordic Committee on Food Analysis für das Europäische Komitee für Normung (European Committee for Standardization, CEN; 1990) vorgeschlagene Verfahren von 1990 angewendet. Aufgrund des besseren Wachstums eines mitgeführten *Campylobacter jejuni*-Stammes wurde bei der Untersuchung eine Bebrütungsdauer von 48 statt 24 h und ein mikroaerobes Milieu gewählt, welches in der angegebenen Methode als nicht unbedingt notwendig beschrieben wird.

Das mikroaerobe Milieu (5 % Sauerstoff) wurde im Anaerobier-Topf mit Anaerocult C® (MERCK) hergestellt.

Als selektiver Nährboden wurde nur der PRESTON-Agar verwendet.

Von jeder Rohmilchprobe wurde 1 ml Milch in Reagenzgläser mit 10 ml PRESTON-Bouillon pipettiert, die folgende Zusammensetzung aufwies:

PRESTON-Selektiv-Anreicherungs-Bouillon (OXOID):

10,0 g	Lab-Lemco-Pulver
10,0 g	Pepton
5,0 g	Natriumchlorid

Campylobacter-Selektiv-Supplement (PRESTON) (OXOID) 2 Röhrchen pro 1000 ml:

5000 IE	Polymyxin B
10,0 mg	Rifampicin
10,0 mg	Trimethoprim
100,0 mg	Cycloheximid
50,0 ml	gelöstes Pferdeblut
950 ml	Wasser

Die beimpfte Nährbouillon wurde im Anaerobier-Topf im mikroaeroben Milieu bei 42 °C für 48 h bebrütet. Anschließend wurde aus jeder Anreicherung eine PRESTON-Agar-Platte im Drei-Ösen-Ausstrich beimpft.

Die Zusammensetzung des PRESTON-Agars:

Campylobacter-Agar-Basis (OXOID):

10,0	g	Fleischextrakt „Lab-Lemco“ (OXOID)
10,0	g	Pepton
5,0	g	Natriumchlorid
12,0	g	Agar

Campylobacter-Selektiv-Supplement (PRESTON) (OXOID) 2 Röhrchen pro 1000 ml:

5000	IE	Polymyxin B
10,0	mg	Rifampicin
10,0	mg	Trimethoprim-Lactat
100,0	mg	Cycloheximid
50,0	ml	gelöstes Pferdeblut
950	ml	Wasser

Die beimpften Platten wurden im Anaerobier-Topf im mikroaeroben Milieu bei 42 °C 48 h bebrütet und anschließend ausgewertet. Campylobacter jejuni-Kolonien wachsen häufig flächendeckend. Die Färbung der Kolonien ist metallisch-grau mit einem rosafarbenen Schimmer.

Die hier verwendete CEN-Methode sieht weitere Untersuchungen zur Bestätigung von Campylobacter vor, wozu verdächtige Kolonien auf selektivem Campylobacternährmedium (Campylobacter blood-free selective medium CBFS) ohne Antibiotikazusatz im Drei-Ösen-Ausstrich aufgebracht werden.

Die Zusammensetzung des Campylobacter blood-free selective medium (CBFS) lautet:

10,0	g	Lab-Lemco-Pulver (OXOID)
10,0	g	Pepton
5,0	g	Natriumchlorid
4,0	g	bakteriologische Kohle
3,0	g	Casein-Hydrolysat
1,0	g	Natriumdesoxycholat
0,25	g	Eisensulfat
0,25	g	Natriumpyruvat
12,0	g	Agar
32,0	mg	Cefoperazon
10,0	mg	Amphotericin B
1000	ml	Wasser

Die beimpften Platten wurden im Anaerobier-Topf im mikroaeroben Milieu bei 42 °C 48 h bebrütet.

Mit den Kolonien dieser Platten wurden folgende Bestätigungsreaktionen vorgenommen:

- Der Motilitätstest wurde im hängenden Tropfen durchgeführt. *Campylobacter* zeigt eine typische, sehr schnelle, korkenzieherartige Bewegung.
- Für den Nachweis der Cytochrom-Oxidase wurde eine Kolonie auf einem Oxidase-Teststreifen (Bactident[®] Oxidase MERCK) verrieben. Eine positive Reaktion ist durch eine Blaufärbung der Reaktionsfläche gekennzeichnet.
- Für den Katalase-Test wurde eine Kolonie in einem Tropfen Wasserstoffsuperoxid (H₂O₂, 3 %ig) auf einem Objektträger verrieben. Eine positive Katalase-Reaktion äußert sich in einer deutlichen Bläschenbildung.
- In der Gram-Färbung stellen sich *Campylobacter*-Spezies als kommaförmige, kleine, gramnegative Stäbchen dar.

Um die *Campylobacter*-Stämme *jejuni* und *coli* voneinander zu unterscheiden, wird die Fähigkeit, Hippurat zu spalten, sowie die Nalidixinsäure-Empfindlichkeit geprüft. Dieser Untersuchungsschritt erübrigte sich in der vorliegenden Studie, da keine Keime als *Campylobacter* bestätigt werden konnten. Dennoch sind der Vollständigkeit halber im Folgenden die Untersuchungsschritte zur Keimdifferenzierung dargestellt.

Zum Test auf Hippurat-Spaltung wird eine Kolonie in 0,4 ml 1 %igem Natrium-Hippurat gelöst und für zwei Stunden bei 37 °C im Wasserbad bebrütet. Anschließend werden 0,2 ml einer Ninhydrin-Lösung ohne Vermischung hinzugefügt und die Lösung erneut bei 37 °C im Wasserbad für weitere zwei bis zehn Minuten bebrütet.

Für die Zusammensetzung der Ninhydrin-Lösung gilt:

- 3,5 g Ninhydrin
- 50 ml Aceton
- 50 ml Butanol

Eine dunkelblaue Farbe der Lösung zeigt eine positive Reaktion an.

Für den Test auf Nalidixinsäure-Empfindlichkeit wird eine Kolonie auf einem *Campylobacter*-Agar mit Nalidixinsäure im Drei-Ösen-Ausstrich überimpft. Nalidixin-empfindliche *Campylobacter*-Spezies wachsen auf diesem Nährboden nicht.

Die Zusammensetzung des Campylobacter-Agars mit Nalidixinsäure-Zusatz entspricht folgender Rezeptur:

10,0	g	Lab-Lemco-Pulver (OXOID)
10,0	g	Pepton
5,0	g	Natriumchlorid
12,0	g	Agar
30,0	mg	Nalidixinsäure (0,1 M NaOH)
50	ml	gelöstes Pferdeblut
1000	ml	Wasser

Die beimpften Nährböden werden im Anaerobier-Topf unter mikroaeroben Bedingungen bei 42 °C für 24 h bebrütet.

Alternativ können anstatt des Nalidixinsäurezusatzes im Nährboden Antibiotika-Plättchen verwendet werden. Das Ergebnis wird dann als positiv gewertet, wenn sich Hemmzonen mit einem Durchmesser über 5-7 mm ausbilden.

Die Auswertung der Ergebnisse erfolgt nach folgendem Schema:

Tabelle 7: Auswertungsschema für die Differenzierung der Campylobacter-Spezies

	Hippurat-Spaltung	Nalidixinsäure-Empfindlichkeit
Campylobacter jejuni	+	+
Campylobacter coli	-	+
Campylobacter laridis	-	-

Die Sensibilität dieser Untersuchungsmethode wird vom Nordischen Komitee für Lebensmittelanalysen mit 5 koloniebildenden Einheiten pro 10 g Probenmaterial angegeben.

3.1.2.6 Koagulase-positive Staphylokokken

Die ersten 158 Proben (von Nummer 8 bis einschließlich 177 ohne die Nummern 12 bis 22 und Nummer 80) sind von Frau Adelina MACHADO (1993) im Verlauf ihrer Master-Thesis „Prevalence of Staphylococcus aureus in raw milk and possibility of toxin production“ überprüft worden. Die Untersuchung der restlichen 233 Proben (190 bis 422) erfolgte im Rahmen dieser Arbeit, wobei allerdings ein Nachweis von Enterotoxinbildung nicht Gegenstand dieser Erhebung sein sollte. Für die eigenen Studien gilt:

Die bei der Untersuchung auf Staphylokokken angewendete Methode war durch die Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 35 LMBG vorgegeben. Sie findet sich unter der Nr. L 01.00-24: „Untersuchung von Lebensmitteln - Bestimmung Koagulase-positiver Staphylokokken in Milch und Milchprodukten - Koloniezählverfahren“ (Fassung vom März 1987).

Weil HARVEY und GILMOUR (1985) sowie OTSUKA et al. (1992) darauf hinwiesen, daß die positive Eigelbreaktion bei Verwendung von BAIRD-PARKER-Agar als alleiniges Kriterium für die Identifizierung von Staphylococcus aureus nicht ausreicht, wurden in der hier vorliegenden Untersuchung entsprechend der Methode nach § 35 LMBG auch die Eigelb-negativen Kolonien, sofern sie morphologisch wie Staphylokokken aussahen, als sogenannte atypische Kolonien zur Bestätigung mit herangezogen.

Zum quantitativen Nachweis Koagulase-positiver Staphylokokken wurden zunächst dezimale Verdünnungsreihen hergestellt indem 1 ml Rohmilch zu 9 ml Ringerlösung pipettiert wurde. Für die weiteren Verdünnungsstufen wurde jeweils 1 ml der vorhergehenden Verdünnungsstufe in 9 ml Ringerlösung pipettiert.

Aus der ersten Verdünnungsstufe (10^{-1}) einer Rohmilchprobe wurden jeweils 0,1 ml auf zwei Eigelb-Tellurit-Glycin-Pyruvat-Agarplatten (ETGPA) nach BAIRD-PARKER pipettiert und sofort mit sterilen Glasspateln verteilt. Diese Proben entsprachen somit bereits einer Verdünnung von 10^{-2} . Ebenso wurde mit den Verdünnungsstufen 10^{-2} und 10^{-3} verfahren, so daß Platten mit den Verdünnungen 10^{-3} und 10^{-4} entstanden.

Die Zusammensetzung des ETGP-Agars nach BAIRD-PARKER (OXOID) entspricht folgender Rezeptur:

10,0	g	Pepton (Casein, tryptisch verdaut)
1,0	g	Hefeextrakt
5,0	g	Fleischextrakt
12,0	g	Glycin
5,0	g	Lithiumchlorid
50	ml	Eigelb-Kaliumtellurit-Emulsion
10 bis 15	g	Agar, je nach Geliereigenschaften
1000	ml	Wasser

Die beimpften Platten wurden bei 37 °C für 48 h bebrütet und anschließend auf das Vorhandensein von Koagulase-bildenden Staphylokokken kontrolliert. Typische Kolonien erscheinen auf BAIRD-PARKER-Agar schwarz (Tellurit-Spaltung), glänzend und besitzen einen weißen Rand, den eine durchsichtige Zone umgibt (positive Eigelb-Reaktion). Hierfür ist die von den Staphylokokken gebildete Lecithinase, eine Phospholipase, verantwortlich. Sie baut das im Agar enthaltene Eigelb ab.

Als atypische Kolonien gelten auf BAIRD-PARKER-Agar schwarze Kolonien ohne Eigelb-Reaktion oder schwarze bis schwarzgraue Kolonien mit und ohne Eigelb-Reaktion.

Die typischen und die atypischen Kolonien wurden getrennt auf beiden Platten einer Verdünnungsstufe gezählt, wobei allerdings nur Platten mit einer Koloniezahl von insgesamt bis zu 150 in die Auswertung kamen.

Zur Bestätigung wurden von den ausgewerteten Platten - sofern möglich - fünf typische und fünf atypische Kolonien in Kulturröhrchen mit 5 ml Hirn-Herz-Bouillon überimpft. Es wurde außerdem noch eine Schafblutplatte im Drei-Ösen-Ausstrich beimpft.

Die Zusammensetzung der Hirn-Herz-Bouillon lautete:

10,0	g	Pepton (Casein, tryptisch verdaut)
12,5	g	Kalbshirnin fus (getrocknet)
5,0	g	Rinderherzinfus (getrocknet)
2,0	g	Glucose
5,0	g	Natriumchlorid
2,5	g	Dinatriumhydrogenphosphat (Na_2HPO_4)
1000	ml	Wasser

Der Schafblutagar wies folgende Zusammensetzung auf:

Standard-I-Nährbouillon (MERCK):

15,0 g	Pepton
3,0 g	Hefeextrakt
6,0 g	Natriumchlorid
1,0 g	D(+)-Glucose
12,0 g	Agar
1000 ml	Wasser
50 ml	Schafblut

Nach Bebrütung bei 37° C für 24 h wurde auf der Blutplatte geprüft, ob die Kolonien eine unvollständige α -Hämolyse oder eine vollständige β -Hämolyse ausbildeten.

Zur Durchführung des Clumping-factor-Tests wurde von jeder beimpften Blutplatte eine Kolonie in einem Tropfen Kaninchenplasma auf einem Objektträger verrieben. Kam es zur Agglutination, wurde die entsprechende Kolonie als Clumping-factor-positiv gewertet.

Bei Kolonien, die von ihrer Morphologie auf der Blutplatte die Zugehörigkeit zur Familie der Staphylokokken vermuten ließen und bei denen die Objektträgerreaktion fraglich oder negativ verlief, wurden aus der Hirn-Herz-Bouillon 0,05 ml Inokulat mit 0,15 ml Kaninchenplasma in ein Kulturröhrchen gegeben und für 4-6 h bei 37 °C bebrütet. Wenn die Flüssigkeit in dem Kulturröhrchen zu mindestens dreiviertel koagulierte, galt die Probe als Koagulase-positiv. Im negativen Fall wurde für weitere 4-6 h bebrütet und erneut ausgewertet. Stets wurde ein positiver Stamm als Kontrolle mitgeführt

Entsprechend dem prozentualen Anteil der verifizierten Koagulase-positiven, typischen Kolonien an den zur Bestätigung herangezogenen typischen Kolonien und dem prozentualen Anteil der verifizierten Koagulase-positiven atypischen Kolonien an den zur Bestätigung herangezogenen atypischen Kolonien wurde die Menge der insgesamt auf den BAIRD-PARKER-Platten vorhandenen Koagulase-positiven typischen und atypischen Kolonien berechnet.

Das Endergebnis wurde entsprechend der unter 3.1.2.1 aufgeführten Formel als gewogenes arithmetisches Mittel errechnet.

Für die Angabe des ermittelten Ergebnisses wurden - wie üblich - nur die ersten zwei Stellen herangezogen und das Ergebnis als Zehnerpotenz angegeben (vgl. 3.1.2.1).

Weiterführende Untersuchungen zur Abgrenzung von *Staphylococcus aureus* gegenüber anderen Koagulase-positiven Staphylokokken anhand des Stoffwechselverhaltens bei der Verwendung verschiedener Zucker sind in der Amtlichen Methode nicht vorgesehen.

Zur Kontrolle der einzelnen Untersuchungsschritte wurde jeweils ein *Staphylococcus aureus*-Stamm mitgeführt.

3.1.2.7 Statistische Methoden

Die Berechnung der üblichen statistischen Maßzahlen, wie Mittelwert, Median, Standardabweichung, Perzentile, Minimum und Maximum, erfolgte im Institut für Biometrie des Fachbereichs Veterinärmedizin der Freien Universität Berlin.

Um festzustellen, ob zwischen zwei Merkmalen Abhängigkeit besteht, wurde eine Korrelationsanalyse durchgeführt. Hierbei sollte zum Beispiel festgestellt werden, ob ein Absinken der aeroben Gesamtkeimzahl mit einem Abfall oder einem Anstieg der coliformen Keime einhergeht.

Zunächst wurde mit Hilfe von Punktdiagrammen ein orientierender Eindruck gewonnen, ob eine Korrelation bestehen könnte. War bereits optisch offensichtlich, daß kein Zusammenhang vorlag, wurde auf eine Berechnung des Korrelationskoeffizienten verzichtet.

Die Ermittlung des Produkt-Moment-Korrelationskoeffizienten r für lineare Zusammenhänge erfolgte mit Hilfe eines Statistikprogramms entsprechend folgender Formel (SACHS, 1992, S. 490 ff.):

$$r = \frac{\sum (x_i - \bar{x}) \cdot (y_i - \bar{y})}{\sqrt{\left(\sum (x_i - \bar{x})^2\right) \cdot \left(\sum (y_i - \bar{y})^2\right)}} = \frac{s_{xy}}{s_x \cdot s_y}.$$

3.2 Ergebnisse und Diskussion

Die Blutplatten zur orientierenden Floraanalyse der Rohmilch zeigten das Wachstum einer typischen Mischflora bestehend aus Streptokokken, Mikrokokken, Laktobazillen und Sporenbildnern. Teilweise fanden sich auch Enterobacteriaceen, Pseudomonaden und Schimmelpilze. Eine weitergehende Differenzierung erfolgte nicht.

3.2.1 Aerobe Gesamtkeimzahl und Coliforme Keime

3.2.1.1 Aerobe Gesamtkeimzahl

Es wurde bei insgesamt 415 Rohmilchproben die aerobe Gesamtkeimzahl ermittelt. Der arithmetische Mittelwert lag bei 937.234 Keimen pro Milliliter Rohmilch. Die große Streuung der Ergebnisse spiegelte sich in der Standardabweichung von 3.577.330 wieder, was gleichzeitig für die geringe Eignung dieses Streuungsmaßes sprach. Aussagekräftiger sind die mittleren 50 % (Q_1 - Q_3). Hier lautete der Wert $2,6 \times 10^4$ - $2,3 \times 10^5$. Der Median lag bei $\tilde{x} = 7,3 \times 10^4$ Keimen pro Milliliter. Das Minimum betrug 500 und das Maximum $3,6 \times 10^7$ koloniebildende Einheiten pro Milliliter.

Nur 241 Proben (= 58,1 %) wiesen einen Gesamtkeimgehalt ≤ 100.000 pro Milliliter auf und erfüllten somit die Anforderung an Rohmilch nach Anlage 4 Nr. 1.1 der Milchverordnung von 1995.

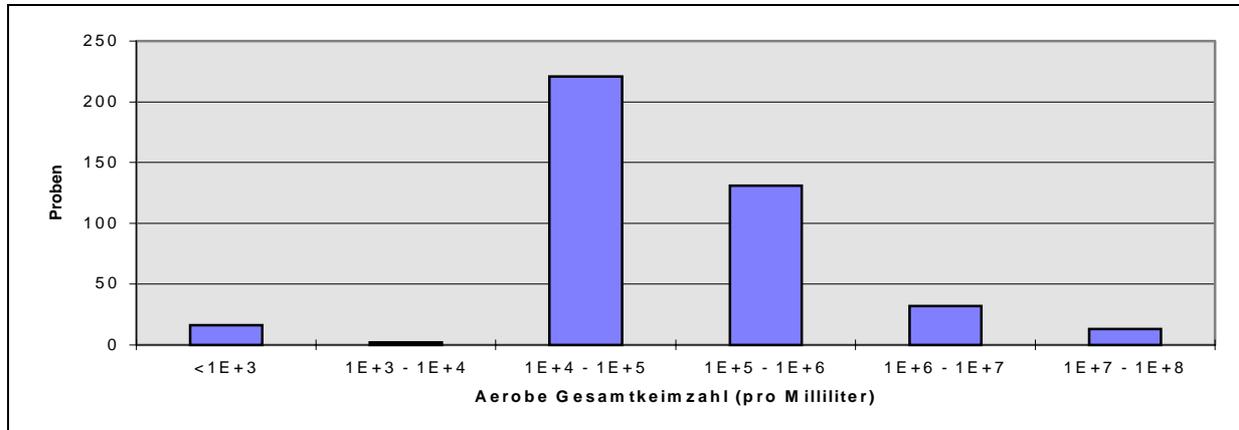
Die Tabelle 8 gibt einen Überblick über die Gesamtkeimzahl der untersuchten 415 Proben.

Tabelle 8: Aerobe Gesamtkeimzahl der untersuchten Rohmilchproben, sortiert nach Keimzahlbereichen

Keimzahlbereiche (in 1.000 / ml)	Anzahl der Proben	Prozentualer Anteil
≤ 100	241	58,1
101 - 1.000	131	31,6
1.001 - 10.000	30	7,2
> 10.000	13	3,1
Total:	415	100

Abbildung 1 zeigt die Häufigkeitsverteilung der Proben als Säulendiagramm. Die Angabe $< 1E+3$ muß dabei als $< 10^3$ Keime pro Milliliter Rohmilch interpretiert werden. Bei den anderen Beschriftungen auf der Abszisse ist entsprechend zu verfahren.

Abbildung 1: Häufigkeitsverteilung der aeroben Gesamtkeimzahl



Von insgesamt 82 untersuchten Beständen erbrachten 25 (= 30,5 %) ein- oder mehrmals Keimzahlen von über 10^6 . Von den elf Beständen, die mindestens zehnmals überprüft worden waren, fanden sich nur bei fünf Gesamtkeimzahlen, die regelmäßig unter 10^6 pro Milliliter Rohmilch lagen.

Lediglich 19 Betriebe (= 23,2 %) wiesen Gesamtkeimzahlen pro Milliliter auf, die stets 10^5 unterschritten, wovon aber zehn Bestände überhaupt nur einmal erfaßt worden waren. Fünf Bestände wurden zweimal, zwei dreimal, einer viermal und einer fünfmal untersucht.

41 Betriebe (= 50 %) erbrachten bei mindestens 50 % der Untersuchungen einen Keimgehalt von mehr als 10^5 und fünf Bestände bei mindestens 50 % der Erhebung sogar von über 10^6 koloniebildenden Einheiten pro Milliliter Rohmilch.

Wurden die Ergebnisse der aeroben Gesamtkeimzahlbestimmung entsprechend dem Untersuchungszeitpunkt vor und nach dem 1. Januar 1994 gruppiert, so entstand folgendes Bild (Tabelle 9):

Tabelle 9: Aerobe Gesamtkeimzahl gruppiert nach dem Zeitpunkt der Probenahme vor beziehungsweise nach Inkrafttreten der Richtlinie 92/46/EWG am 1. Januar 1994

	Vor dem 1. Januar 1994	Nach dem 1. Januar 1994
Anzahl der untersuchten Proben	242 (58,3 %)	173 (41,7 %)
Gesamtkeimzahl ≤ 100.000	134 (55,4 % der 242 Proben)	107 (61,9 % der 173 Proben)
Gesamtkeimzahl > 100.000	108 (44,6 % der 242 Proben)	66 (38,1 % der 173 Proben)
Mittelwert	1.176.355	602.740
Median	77.000	64.000
Mittlere 50 %	24.000 - 305.000	28.000 - 160.000

Die Statistik spricht für eine Verbesserung der Milchbeschaffenheit bezüglich der aeroben Gesamtkeimzahl nach Inkrafttreten der Richtlinie 92/46/EWG. Während vor dem 1. Januar 1994 der Median der untersuchten Proben bei 77.000 lag, betrug er danach nur noch 64.000. Der mitt-

lere 50 %-Bereich änderte sich von 24.000 - 305.000 auf 28.000 - 160.000, ein Resultat, das zwar teilweise immer noch über dem Limit von 100.000 Keimen pro Milliliter lag, aber doch eine sinkende Tendenz erkennen ließ. Ebenso verhielt es sich mit dem prozentualen Anteil der Rohmilchproben, die eine aerobe Gesamtkeimzahl von maximal 100.000 Keimen pro Milliliter aufwiesen. Vor dem 1. Januar 1994 unterschritten 55,4 % und nach diesem Zeitpunkt 61,9 % diesen Grenzwert. Somit zeichnete sich der Trend ab, daß mit der Umsetzung der Richtlinie 92/46/EWG eine Verbesserung der Milchqualität einherging.

Die Höhe der ermittelten Kontamination deckt sich nur annähernd mit den Resultaten von SUHREN und HEESCHEN (1992). Sie stellten bei den zwischen 1986 und 1990 in Deutschland untersuchten 4.563 Rohmilchproben fest, daß in 54,4 % der Fälle das Limit von 100.000 Keimen pro Milliliter Milch überschritten wurde. Der Mittelwert lag bei 153.000 Keimen pro Milliliter. Bei der hier durchgeführten Erhebung fiel der Anteil „einwandfreier“ Proben mit 41,9 % schon deutlich besser aus. Allerdings lag der mittlere aerobe Keimgehalt mit 937.234 Keimen pro Milliliter deutlich über dem Ergebnis von 1990.

Ein Limit von 100.000 koloniebildenden Einheiten pro Milliliter Rohmilch, die zur Herstellung von wärmebehandelter Konsummilch, von Sauermilch-, Joghurt-, Kefir-, Sahne- und Milchmischerzeugnissen bestimmt ist, muß nach Anlage 4 Nr. 1.1 zur Milchverordnung von 1995 eingehalten werden. Dieser Grenzwert, gemittelt über zwei Monate, wurde über den gesamten Untersuchungszeitraum nur von 26 Betrieben (= 31,7 %) eingehalten. Die restlichen Betriebe überschritten, auch bei Mittelung über zwei Monate, mindestens einmal diesen Wert.

Bei den hier untersuchten Beständen, in denen der Keimgehalt häufig oder auch regelmäßig über 10^6 koloniebildenden Einheiten pro Milliliter lag, läßt sich von einem Bestandsproblem sprechen. Folgende Fehler im Management können ursächlich dafür in Frage kommen:

- Hygienische Mängel des Betriebes: verschmutzte Stallräume und Melkanlagen
- Unzureichende Pflege des Tierbestandes: verschmutzte Kühe, insbesondere Euter
- Bestandsgröße: bei großen Tierzahlen wird ausreichend Personal benötigt, um Probleme überhaupt zu erkennen und zu beseitigen
- Stallbau: überaltete Ställe können Erkrankungen fördern, zum Beispiel durch vermehrte Verletzungen
- Melkanlagen: unmoderne Melkanlagen oder Installationen mit langem Rohrsystem lassen sich schlechter reinigen und desinfizieren
- Eutergesundheitsprobleme: mangelhafte Diagnose und Therapie subklinischer und klinischer Mastitiden.

3.2.1.2 Coliforme Keime

Es wurden insgesamt 374 Rohmilchproben auf das Vorhandensein von coliformen Keimen untersucht. Der aus der MPN-Schätzmethode errechnete Mittelwert betrug 33.350 coliforme Keime pro Milliliter Milch bei einer Standardabweichung von 129.330. Aussagekräftiger sind auch hier der Median mit $\tilde{x} = 9,3 \times 10^2$ und der zentrale 50 %-Bereich mit $Q_1 - Q_3 = 2,3 \times 10^2 - 7,5 \times 10^3$. Das Minimum belief sich auf $< 3,6$ Keime pro Milliliter Rohmilch (keine coliformen Keime isolierbar), bei einer Nachweisgrenze von 3,6 Keimen pro Milliliter. Das Maximum betrug $1,1 \times 10^6$ coliforme Keime pro Milliliter Rohmilch. Der Median von $9,3 \times 10^2$ pro Milliliter lag nahezu zwei Zehnerpotenzen unter dem Median von $7,3 \times 10^4$ für die aeroben Keime. Eine statistische Korrelation zwischen der aeroben Gesamtkeimzahl und den coliformen Keimen ließ sich allerdings nicht nachweisen.

Tabelle 10 gibt einen Überblick der nach Häufigkeitsklassen geordneten Analyseergebnisse für die coliformen Keime in den einzelnen Rohmilchproben.

Tabelle 10: Coliforme Keime der untersuchten 374 Rohmilchproben, sortiert nach Keimzahlbereichen

Coliforme Keime (1/ml)	Anzahl der Proben	Prozentualer Anteil
nicht nachweisbar < 3	3	0,8
3,6 - 100	62	16,6
101 - 1.000	133	35,6
1.001 - 10.000	100	26,7
10.001 - 100.000	45	12,0
100.001-1.000.000	26	7,0
$> 1.000.000$	5	1,3
Total:	374	100

Die drei Proben, bei denen coliforme Keime nicht nachgewiesen werden konnten, stammten mit Ausnahme des Bestandes 66, aus Beständen (61 und 68), die sowohl bei der aeroben Gesamtkeimzahl als auch bei den coliformen Keimen zwischen den einzelnen Untersuchungen große Schwankungen aufwiesen. Dagegen zeigten im Bestand 66 alle Untersuchungsergebnisse eine niedrige Keimkontamination an (vergleiche Tabelle 11).

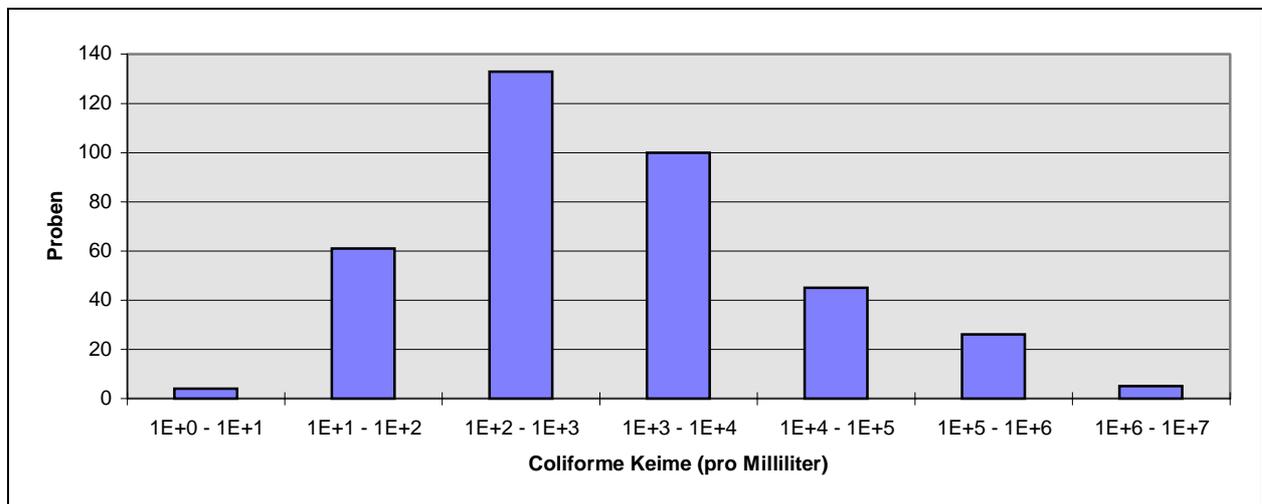
Tabelle 11: Vergleich der aeroben Gesamtkeimzahl mit den coliformen Keimen bei drei Beständen, für die bei einer Untersuchung coliforme Keime nicht nachgewiesen werden konnten

Bestandsnummer	Untersuchungsnummer	Aerobe Gesamtkeimzahl / ml	Coliforme Keime / ml
61	57	15.000.000	nicht durchgeführt
61	61	63.000	93
61	75	41.000	4.300
61	93	150.000	46.000
61	98	120.000	24.000
61	123	12.000	nicht nachgewiesen
61	147	500	240
61	394	240.000	93.0000
61	405	130.000	15
61	416	33.000	240
66	103	500	43
66	129	13.000	nicht nachgewiesen
66	135	15.000	64
68	100	170.000	21.000
68	126	4.000	nicht nachgewiesen
68	123	500	23
68	164	28.000	15

SUHREN und HEESCHEN (1992) fanden bei Erhebungen an 1.211 in Deutschland gezogenen Rohmilchproben einen mittleren Gehalt von 347 coliformen Keimen pro Milliliter. Dieser Wert wurde in der hier vorliegenden Untersuchung mit $\bar{x} = 33.350$ um zwei Zehnerpotenzen überschritten.

Abbildung 2 zeigt die Häufigkeitsverteilung der Proben als Säulendiagramm.

Abbildung 2: Häufigkeitsverteilung der coliformen Keime



3.2.2 *Listeria monocytogenes*

Von den untersuchten 415 Rohmilchproben wurden aus 44 Proben (= 10,6 %) Listerien isoliert. Die kulturelle und biochemische Speziesdifferenzierung ergab in 23 Fällen das Resultat *Listeria monocytogenes* (= 5,5 %) und in 21 Fällen *Listeria innocua* (= 5,1 %).

Die serologische Differenzierung von 42 der 44 isolierten Stämmen erbrachte ein etwas anderes Bild, denn es wurden 26 mal *Listeria monocytogenes* und 15 mal *Listeria innocua* identifiziert. Ein Stamm (Untersuchungsnummer 281) konnte nicht als *Listeria*-Spezies bestätigt werden (Vergleiche Anhang Tabelle). Die aufgrund des kulturellen Nachweises und der Bestätigungsreaktionen als *Listeria innocua* eingeordneten Stämme 401, 409 und 422 wurden serologisch als *Listeria monocytogenes* serovar 1/2a mit fraglichem Ergebnis bewertet, da bei der Bestimmung der H-Faktoren AB positiv und A allein negativ reagierten. Als Ursache für die unklare Reaktion kommt das Alter der Stämme in Betracht, das heißt, sie wurden zu häufig passagiert. Andererseits wurden die Stämme 401, 409 und 422 bereits innerhalb von zwei Wochen als relativ junge Kulturen getestet. Auch die Qualität des Antiserums besitzt einen entscheidenden Einfluß auf die Sensitivität.

Die in dieser Untersuchung ermittelte Anzahl an positiven Proben stimmt mit den in der Literatur dokumentierten Daten weitgehend überein. Die Isolationsraten der meisten publizierten Erhebungen lagen bei 1 % bis 15,3 %. Faßt man die Summe sämtlicher im Literaturteil dargestellten Ergebnisse aus verschiedenen Ländern zusammen, so wurden in 349 von 5.896 untersuchten Rohmilchproben *Listeria monocytogenes* (= 5,92 %) nachgewiesen (Vergleiche Tabelle 3).

Im Gegensatz zu FARBER et al. (1988) konnte bei den hier vorliegenden Ergebnissen kein statistischer Zusammenhang zwischen der aeroben Gesamtkeimzahl und dem Vorkommen von *Listeria monocytogenes* in Rohmilch festgestellt werden. Ebenso wenig vermochten FENLON und WILSON (1989) eine Korrelation zwischen dem Vorkommen von *Listeria monocytogenes* einerseits und der Hygiene oder der Fütterung von Silage andererseits nachzuweisen.

Von den 82 im Rahmen dieser Arbeit erfaßten Beständen wurden Listerien bei 28 (= 34,1 %) Betrieben nachgewiesen, wobei sich in zehn Beständen mehr als einmal Listerien fanden. In 15 Beständen (= 18,3 %) wurde *Listeria monocytogenes* isoliert, in 14 Beständen (= 17,1 %) *Listeria innocua*. In einem Betrieb (7) traten beide Spezies im Wechsel mit negativen Ergebnissen auf.

Es kam dabei zu folgender Ergebnisstruktur:

1. Untersuchung: negativ
2. Untersuchung: *Listeria monocytogenes*
3. Untersuchung: *Listeria innocua*
4. Untersuchung: *Listeria monocytogenes*
5. Untersuchung: negativ
6. Untersuchung: *Listeria monocytogenes*
7. Untersuchung: *Listeria innocua*.

Solche Beobachtungen stimmten mit dem Bericht von SLADE et al. (1989) überein. Die Autoren stellten ebenfalls Variationen im Vorkommen der einzelnen Spezies sowie intermittierendes Auftreten von Listerien in Bestandstanks fest. Die Ursache für derartige Befunde kann das simultane Vorkommen mehrerer Listerien-Spezies in der Milch sein, wobei jeweils nur eine Spezies nachgewiesen wird. Größere Wahrscheinlichkeit besitzt jedoch eine abwechselnde Kontamination der Milch mit diesen Keimen, wofür auch die zwischenzeitlich negativen Ergebnisse sprechen. Intermittierendes Auftreten von Listerien wurde bei vier weiteren Milcherzeugerbetrieben beobachtet.

Der in den 44 Rohmilchproben gefundene Listeriengehalt ist insgesamt als niedrig einzuschätzen. Zwei Proben aus einem Bestand (49) enthielten 100 beziehungsweise 550, zwei weitere aus verschiedenen Beständen (43 und 7) 200 beziehungsweise 550 Listerien pro Milliliter. Die übrigen 40 Proben wiesen weniger als 10^2 Listerien pro Milliliter Milch auf, was zwar den Nachweis der Keime mittels Anreicherung, nicht aber im Direktausstrich ermöglichte.

LOVETT et al. (1987) verwendeten bei den von ihnen untersuchten Proben eine MPN- (Most Probable Number) Methode zur Quantifizierung des Listeriengehaltes in Rohmilch. Sie kamen zu dem Ergebnis, daß die Keimkonzentration in der Größenordnung von einem Organismus pro Milliliter Milch oder sogar darunter lag. Auch BECKERS et al. (1987), GREENWOOD et al. (1991) und HARVEY und GILMOUR (1992) fanden in positiven Proben Listeriengehalte von unter 10^2 , unter 2×10^2 , beziehungsweise unter 10^0 Bakterien pro Milliliter Rohmilch.

Bei der von TEUFEL und BENDZULLA (1995) veröffentlichten Erhebung von insgesamt 353 zwischen 1989 und 1992 in Deutschland untersuchten Rohmilchproben ergaben sich vier positive Befunde (= 1,1 %). Dabei lag der Gehalt an *Listeria monocytogenes* unter 10^2 koloniebildende Einheiten pro Milliliter Milch.

Über die Herkunft der in den positiven Milchproben gefundenen Listerien lassen sich für das vorliegende Material keine konkreten Angaben machen. Es besteht die Möglichkeit, daß die Keime von Rindern mit der Milch aufgrund einer Allgemeininfektion oder aufgrund einer Listerien-Mastitis ausgeschieden werden. HYSLOP und OSBORNE (1959), SCHULZ (1967), STAJNER (1971) und GITTER et al. (1980) beschreiben die Ausscheidung von Listerien mit der Milch im Zusammenhang mit von diesen Mikroorganismen ausgelösten klinischen, aber auch subklinischen Euterentzündungen. STAJNER (1971) gelang sogar der Nachweis von Listerien in

der Milch einer Kuh, die keinerlei Sekretionsstörung zeigte. Bei experimentell mit *Listeria monocytogenes* infizierten Rindern fanden DOYLE et al. (1987) in Einzelmilchproben *Listeria monocytogenes* in einer Menge von unter 10^0 bis 10^5 koloniebildenden Einheiten pro Milliliter. Zieht man aber den Verdünnungseffekt bei der Untersuchung von Bestandssammelmilchen in Betracht, so ist dabei der Nachweis von Listerien, die über die Milchdrüse von Einzeltieren ausgeschieden werden, sehr unwahrscheinlich und erfolgt eher zufällig.

In der Literatur werden Fälle von *Listeria*-Mastitiden selten beschrieben. Da aber Rinder latente Träger dieser Keime sein können und diese auch mit dem Kot ausscheiden, und weil Listerien in der Umwelt häufig vorkommen, bildet eine Kontamination der Milch während oder nach dem Melken wesentlich häufiger die Ursache einer Besiedelung mit diesen Keimen. FEDIO und JACKSON (1992) fanden Listerien nur in einer von 262 aseptisch gewonnenen Viertelgemelksproben (= 0,4 %) in Betrieben, in denen *Listeria monocytogenes* in der Bestandsmilch vorkam, während zehn von 69 in diesen Beständen rektal entnommenen Kotproben (= 14,5 %) positiv ausfielen. Auch in den Kotproben von drei Kontrollbeständen, bei denen *Listeria monocytogenes* nicht in der Milch nachgewiesen werden konnte, ließ sich der Keim in 15 von 114 Fällen isolieren (= 13,2 %). Die Schlußfolgerung kann nur lauten, daß die Kontamination der Milch eher auf Verschmutzung als auf Erregerausscheidung basiert. Darüberhinaus muß jedoch zusätzlich ein Managementfehler vorgelegen haben, da in anderen Beständen mit ähnlicher Listerienausscheidung eine Verschmutzung der Milch offenbar verhindert wurde.

Listerien werden besonders häufig in Silage nachgewiesen, die somit eine Infektionsquelle für Rinder darstellt und eine maximale Kontamination in den Wintermonaten bedingt (FENLON, 1986; TERPLAN et al., 1986; REA et al., 1992; SANAA, 1993). Dagegen fanden weder FARBER et al. (1988) noch FENLON und WILSON (1989) Hinweise auf ein erhöhtes Listerienvorkommen in Milch während des Winters. Auch in der hier vorliegenden Untersuchung ließ sich kein Zusammenhang zwischen der Häufigkeit von Listerien in Rohmilch und der Jahreszeit herausarbeiten. Mit Ausnahme des Septembers und Oktobers, in denen 60 Rohmilchproben zur Untersuchung kamen, wurden in jedem Monat Listerien nachgewiesen.

Eine weitere Kontaminationsquelle für Milch stellt der Mensch dar. Bei einer Erhebung, die von KERR et al. (1993) an 99 Personen aus dem Lebensmittelbereich durchgeführt wurde, zeigten die Hände von zwölf Arbeitern (= 12 %) eine Besiedelung mit Listerien-Spezies. Bei immerhin sieben Personen (= 7 %) handelte es sich um *Listeria monocytogenes*.

Immer wieder ereignen sich durch Lebensmittel verursachte Infektionen mit Listerien, die in seltenen Fällen auch durch den Genuß von Milch ausgelöst werden. Wenn auch kein Ausbruch einer Listeriose nach Rohmilchkonsum in der Literatur dokumentiert ist, so doch zumindest ein Fall, der durch den Verzehr von wärmebehandelter Milch ausgelöst wurde (FLEMING et al., 1985).

Unter dem Aspekt der Risikoabschätzung erscheint jedoch bedeutsamer zu sein, daß eine Infektion mit *Listeria monocytogenes* durch den Verzehr von Rohmilch nie mit an Sicherheit grenzender Wahrscheinlichkeit auszuschließen ist, weshalb auf den Genuß von Rohmilch allgemein verzichtet werden sollte (ANONYM, 1987 a).

In den Beständen des Landes Brandenburg wurde *Listeria monocytogenes* mit einer relativen Häufigkeit von 14 % festgestellt. Die entsprechenden Keimzahlen für *Listeria monocytogenes* pro Milliliter waren aber nur gering. Dennoch fällt eine Aussage über das Gefährdungspotential schwer, da zum jetzigen Zeitpunkt keine gesicherten Informationen über die minimale Infektionsdosis existieren (World Health Organization, 1988; ANONYM, 1991).

Aus Gründen des vorbeugenden Verbraucherschutzes gab das Bundesgesundheitsamt (ANONYM, 1991; TEUFEL, 1994) zur Beurteilung roher verzehrsfertiger Lebensmittel und roher nicht verzehrsfertiger Lebensmittel, die vor dem Verzehr wärmebehandelt werden, die Empfehlung Lebensmittel, die Keimzahlen von über 10³ Listerien pro Milliliter enthalten, nach § 8 LMBG zu maßregeln. Sie sind geeignet, die Gesundheit zu schädigen, weshalb sich das Inverkehrbringen verbietet.

Darüberhinaus besagt Anlage 6 Nr. 3.1.1 der Milchverordnung von 1995, daß in pasteurisierter Milch pathogene Mikroorganismen in 25 g nicht nachweisbar sein dürfen. In für den Verzehr im unveränderten Zustand bestimmter roher Kuhmilch dürfen nach der Umhüllung Krankheitserreger und ihre Toxine nicht in Mengen vorhanden sein, welche die Gesundheit der Verbraucher beeinträchtigen können.

Nach dem gleichen Grundsatz dürfen in Rohmilch, die zur Herstellung von Rohmilcherzeugnissen bestimmt ist, sowie Vorzugsmilch nach Anlage 4, Nr. 1.3 und Anlage 9, Nr. 3 zur Milchverordnung (1995) Krankheitserreger oder deren Toxine nicht in Mengen enthalten sein, welche die Gesundheit der Verbraucher gefährden können.

Das Vorkommen von Listerien in Rohmilch stellt auch ein Risiko für das wärmebehandelte Erzeugnis dar. Bei einem der größten Listeriose-Ausbrüche, der sich 1983 in Massachusetts (USA) ereignete, erkrankten 49 Menschen, von denen 14 starben (FLEMING et al., 1985). Aufgrund epidemiologischer Untersuchungen wurde pasteurisierte Milch als Vektor angesehen, wobei die Autoren vermuteten, daß einige Keime den Pasteurisationsvorgang überlebt hatten. Für diese Hypothese sprach zum einen eine gewisse Hitzestabilität von *Listeria monocytogenes* und zum anderen das intrazelluläre Vorkommen des Mikroorganismus. In diesem konkreten Fall wurde die Milch nicht durch Separatoren von den festen Bestandteilen und somit auch von Leukozyten befreit, sondern lediglich filtriert, ohne die weißen Blutkörperchen zu entfernen. Durch ihre Lage in den Leukozyten geschützt, konnten die Listerien das Pasteurisieren überstehen. Diese Theorie fand insoweit Bestätigung, als DOYLE et al. (1987) bei Versuchen mit einem Plattenerhitzer bei sechs von neun Durchgängen *Listeria monocytogenes* in Milch nach der Pasteurisation nachweisen konnten. Die thermische Behandlung erfolgte bei 71,7 - 73,9 °C für 16,4 Sekunden. Aus drei Milchproben, die für 15,4 Sekunden auf 76,4 - 77,5 °C erhitzt wurden, ließ sich *Listeria monocytogenes* nicht mehr isolieren. In den USA entspricht eine Erwärmung auf 71,7 °C für 15 Sekunden den gesetzlichen Mindestanforderungen für die Kurzzeitpasteurisation (High-Temperature - Short-Time Pasteurisation). Bei den genannten Studien waren die Milchproben mit *Listeria monocytogenes*-Zahlen zwischen 10² und 10⁴ koloniebildenden Einheiten pro Milliliter inokuliert worden, was für natürlich kontaminierte Milch sehr hohe Werte darstellt.

TERPLAN et al. (1986) sowie BECKERS et al. (1987) berichteten dagegen, daß $9,0 \times 10^4$ bis $1,0 \times 10^5$ beziehungsweise $1,8 \times 10^4$ Listerien pro Milliliter Milch eine Erhitzung auf 63 °C für 30 Sekunden beziehungsweise 67 °C für 20 Sekunden nicht überlebten.

Bei den in Deutschland entsprechend Anlage 6 zur Milchverordnung vorgeschriebenen Erhitzungsverfahren von $62\text{-}65\text{ °C}$ für 30-32 Minuten, $72\text{-}75\text{ °C}$ für 15-30 Sekunden, über 85 °C für mindestens 4 Sekunden oder $135\text{-}150\text{ °C}$ für 1 Sekunde (MILCHVERORDNUNG, 1995) ist nach dem derzeitigen Stand der Wissenschaft von einer sicheren Inaktivierung der Listerien auszugehen.

3.2.3 Salmonellen

Es wurden insgesamt 415 Rohmilchproben auf das Vorkommen von Salmonellen in 1 ml und zusätzlich 113 Proben (Nr. 310-422) parallel auf das Vorhandensein von Salmonellen in 25 ml untersucht. In keinem Fall konnte Salmonella nachgewiesen werden. Gleichzeitig wurde auf den Nährmedien relativ häufig das Wachstum von Keimen beobachtet, die sich morphologisch als Pseudomonas-Spezies darstellten. Die Selenit-Cystin-Anreicherung und der BPLS-Agar wirkten weniger stark selektiv auf das Wachstum von Enterobacteriaceae als die RV-Anreicherung und der Lackmus-Laktose-Agar.

Daß sich keine Salmonellen isolieren ließen, entspricht den in der Literatur zugänglichen Untersuchungsergebnissen bezüglich Rohmilch, wonach die Kontaminationsquote zwischen 0,01 % und 0,5 % liegt (MCEWEN et al., 1988; HUMPHREY und HART, 1988; REA et al., 1992; HARTUNG, 1994; HARTUNG, 1995).

Wenn auch der Verzehr von Rohmilch nicht zu den Hauptursachen von Salmonelleninfektionen gehört, läßt sich aber nicht ausschließen, daß auch nach der Herstellung von wärmebehandelter Milch eine Rekontamination im Molkereibereich stattfindet. HARTUNG (1994, 1995) berichtet, daß sich 1993 immerhin 75 (= 0,23 %) von 32.831 und 1994 80 von 38.3251 (= 0,21 %) untersuchten Proben von wärmebehandelter Milch beziehungsweise daraus hergestellten Produkten als Salmonella-positiv erwiesen.

Einer der größten Salmonellose-Ausbrüche fand in den USA 1985 statt. Hier führte aufgrund eines Produktionsfehlers kontaminierte, pasteurisierte Milch zur Erkrankung von 16.284 Personen (LECOS, 1986). Ob die in Rede stehende Milch bereits von Anfang an infiziert war oder ob eine Rekontamination stattfand, ließ sich allerdings nicht klären.

Solche technischen Unfälle können indessen für die Bewertung des Risikos beim Verzehr von Milch oder Produkten aus Milch keine Berücksichtigung finden. Im Gegensatz dazu bleibt Rohmilch, auch wenn sie unter besonderen hygienischen Anforderungen gewonnen werden soll, immer mit einem Restrisiko behaftet.

3.2.4 Campylobacter

Es wurden insgesamt 415 Rohmilchproben auf das Vorhandensein von Campylobacter in 1 ml untersucht, wobei in keinem Fall dieser Keim nachgewiesen werden konnte.

Weil aber epidemiologische Studien auf gehäuftes Auftreten von Campylobacter-Infektionen im Zusammenhang mit dem Verzehr von Rohmilch oder ungenügend pasteurisierter Milch hinweisen, braucht nicht zwingend davon ausgegangen zu werden, daß die untersuchten Proben tatsächlich negativ waren. Eine Ursache für die unterschiedliche Sensitivität kann das hier angewendete Nachweisverfahren für Campylobacter bilden.

Da die Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 35 (LMBG) keine Anweisung für die Untersuchung von Campylobacter in Lebensmitteln oder in Milch enthält, wurde im Rahmen dieser Untersuchung auf die unter Material und Methodik (3.1.2.5) beschriebene CEN-Methode zurückgegriffen, wie sie vom Nordic Committee on Food Analysis für den Nachweis von Campylobacter in Lebensmitteln, entwickelt wurde. Zur direkten Isolierung von Campylobacter aus Milch wird diese Technik selten angewendet. Meist wird auf die Untersuchung von Milchfiltern ausgewichen.

Ein recht ähnliches Nachweisverfahren für Campylobacter schlug die International-Standard-Organization (ISO/DIS 10272) vor. Als Anreicherungsmedien dienen PRESTON- oder PARK und SANDERS-Bouillon mit anschließender Kultivierung auf KARMALI-Agar und einem weiteren Selektivnährboden, wie zum Beispiel modifizierter BUTZLER-, SKIRROW-, CCD- (Charcoal Cefaperazone Desoxycholate) oder PRESTON-Agar.

Auch DE BOER et al. (1984) hoben hervor, wie selten sich Campylobacter in Milch und sogar in Milchfiltern nachweisen läßt. Für die geringe Isolierungsrate stellen sie folgende Gründe zur Diskussion:

- Die Kontamination ist oft zu schwach
- Die in der Milch vorhandenen Campylobacter-Keime vermehren sich nicht und sterben nach kurzer Zeit ab, weshalb zwischen Probenahme und -untersuchung nur eine kurze Zeit vergehen darf
- Die Nachweismethoden besitzen keine ausreichende Sensitivität
- Bei durch Milch verursachten Campylobacter-Ausbrüchen kommt es nur zu einer kurzzeitigen, aber sehr hohen Belastung der Milch.

Zusätzlich weist LOEWENHERZ (1995) darauf hin, daß der Probentransport meist unter suboptimalen Bedingungen, insbesondere nicht im mikroaeroben Milieu, stattfindet.

Als eine weitere Komplikation nennen DE BOER et al. (1984) auch die häufige Kontamination der PRESTON-Platten mit Hefen. Dieses Problem stellte sich in der vorliegenden Untersuchung zwar nicht, jedoch wuchs auf den Platten oftmals *Pseudomonas aeruginosa*. Die kompetitive Hemmung der Begleitflora schien bei dem hier verwendeten PRESTON-Medium demnach nicht auszureichen.

Letzlich wäre auch das Wachstumsverhalten von *Campylobacter* in Rohmilch zu berücksichtigen. WEIK und KAUFMANN (1991) konnten einen *Campylobacter jejuni*-Stamm bei der üblichen Anreicherungstemperatur von 43 °C nur innerhalb von drei Stunden nachweisen.

Angesichts derartiger Schwierigkeiten darf es nicht verwundern, wenn auch bei Ausbrüchen durch *Campylobacter*, die aufgrund epidemiologischer Untersuchungen nach dem Verzehr von Milch entstanden, die Isolierung des Erregers aus dem Substrat nur sehr selten gelang, obgleich aus Kotproben der Milchkühe *Campylobacter* angezüchtet wurde (ROBINSON et al., 1979; BLASER et al., 1979; TOSH et al., 1981; BLESSING et al., 1983; McNAUGHTON et al., 1982; POTTER et al., 1983; KORLATH et al., 1985).

So beschreiben LOGAN et al. (1982) den Fall einer Mastitis, die durch einen aerotoleranten *Campylobacter*-Stamm ausgelöst wurde. In einem anschließenden Inokulationsversuch wurde jeweils ein Euterviertel von vier Rindern künstlich durch den Zitzenkanal mit 5 ml einer Nährlösung, welche diesen *Campylobacter*-Stamm enthielt, infiziert. Die eingesetzte Erregermenge betrug zwischen 4×10^5 und $4,5 \times 10^7$ koloniebildende Einheiten pro Milliliter. Obwohl bereits nach vier Stunden klinische Symptome sowohl einer Mastitis als auch einer Allgemeininfektion auftraten, konnten *Campylobacter*, trotz mehrfacher Untersuchungen, nur in einer Milchprobe wiedergefunden werden.

Da es auch bei einer schweizerischen Erhebung nicht gelang, *Campylobacter jejuni* in 496 Rohmilchproben nachzuweisen, wurde ein Wachstumsversuch mit einem *Campylobacter jejuni* ATCC 33292-Inokulat in Rohmilch durchgeführt. Der Keim konnte bei 5 °C und 22 °C für mindestens 48 Stunden nachgewiesen werden, während er bei 37 °C innerhalb von 24 Stunden und bei 43 °C innerhalb von drei Stunden abstarb (WEIK und KAUFMANN, 1991).

Durch PORTER und REID (1980) wurde *Campylobacter jejuni* zwar in Milchfiltern, nicht aber in der Milch nachgewiesen. Eine völlig andere Situation bestand jedoch, als JONES, P. H. et al. (1981) *Campylobacter* bei einem Enteritis-Ausbruch weder in Milchfiltern, Milch oder Milchflaschen einer Molkerei nachweisen konnten, dafür aber in zwei von sechs Stuhlproben von Angestellten des Betriebes. In diesem besonderen Fall, bei dem insgesamt 2.500 Personen erkrankten, dürfte eine Kontamination durch das Personal nach der Hitzebehandlung stattgefunden haben.

Eine verbesserte Diagnostik wird die Methode der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) bieten. Mit diesem Verfahren gelang es WEGMÜLLER et al. (1993), *Campylobacter jejuni* beziehungsweise *Campylobacter coli* in sechs von 93 Proben von Milch und Milchprodukten nachzuweisen (6,5 %), während der kulturelle Nachweis negativ verlief.

Trotz aller Einschränkungen läßt sich *Campylobacter* in Rohmilch auch mit kulturellen Verfahren erfassen. Bereits 1982 gelang DOYLE und ROMAN (1982 a) der Nachweis von *Campylobacter jejuni* in einer Rohmilchprobe unter Verwendung einer kulturellen Technik mit Brucella Bouillon unter Zusatz von 7 % gelöstem Pferdeblut, 0,3 % Natrium-Succinat, 0,01 % Cysteinhydrochlorid, 15 µg/ml Vancomycin, 5µg/ml Trimethoprim, 20 IE/ml Polymyxin B und 50 µg/ml Cycloheximid als Anreicherung und anschließendem Ausstrich auf Blut-Brucella-Agar mit Bebrütung für 16-18 Stunden bei 42 °C.

Während DE BOER et al. (1984) die auch hier verwendete PRESTON-Methode erfolgreich einsetzten, erzielten HUMPHREY und BECKETT (1987) ihre positiven Ergebnisse mit einer Anreicherungsbouillon bestehend aus 25 g Nährlösung Nr. 2 (OXOID), 50 ml gelöstes Pferdeblut, 200 mg Natriumpyruvat, 200 mg Natriummetabisulfit, 500 mg Eisensulfat, 10 mg Trimethoprim, 10 mg Rifampicin, 15 mg Cefoperazon, 2 mg Amphotericin und 4 mg Colistin. In gleicher Weise gingen HUMPHREY und HART (1988) vor, verwendeten aber die Milchfilter als Substrat.

BEUMER et al. (1988), die eine Nachweisquote von 4,5 % erzielten, stellten die Anreicherungen der einzelnen Proben mit 1 molarer NaOH auf einen pH-Wert von 7,5 ein, um das Laktoperoxidase-System (LPS) zu inaktivieren. Als in der Milchdrüse gebildetes Enzym wirkt Laktoperoxidase in Kombination mit ebenfalls in der Milch vorkommenden Thiocyanat (SCN⁻) und Wasserstoffsuperoxid (H₂O₂) durch Zerstörung enzymatischer SH-Gruppen der Mikroorganismen antibakteriell. In einem Parallelversuch wurden 250 Rohmilchproben mit *Campylobacter jejuni* beimpft, wobei in nur 125 Fällen die Laktoperoxidase durch 1 molare NaOH gehemmt wurde. Aus den 125 nicht inaktivierten Proben ließen sich *Campylobacter jejuni* lediglich 16 (= 13 %) und aus den inaktivierten Proben aber 103 mal (= 82 %) anzüchten. Die weitere Nachweismethode umfaßte einen Anreicherungsschritt von 1 ml Milch in 10 ml Brain Heart Infusion, die mit PRESTON-Supplement versetzt war, anschließender Anhebung des pH-Wertes, Bebrütung für 48 Stunden bei 42 °C unter mikroaeroben Bedingungen, Subkultivierung auf Blut-Agar unter Zusatz von PRESTON-Supplement und erneute Bebrütung für 48 Stunden bei 42 °C unter mikroaeroben Bedingungen. Besonderer Wert wurde dabei auf die Aussage gelegt, daß die Probenaufarbeitung möglichst schnell nach Gewinnung der Milch erfolgen sollte, damit sich die Wirkung des Laktoperoxidase-Systems nicht so stark entfaltet. Andernfalls muß das Laktoperoxidase-System gehemmt werden, um falsch negative Befunde zu vermeiden.

Eine Beeinträchtigung der Wiederfindungsraten dürfte bei den vorliegenden Untersuchungen in dem Umstand liegen, daß die Milchproben aus Brandenburg bis zu drei Tage alt waren, bevor sie in das Labor gelangten.

Bei Würdigung der vielfältigen methodischen Probleme kann trotz des negativen Ergebnisses der vorliegenden Arbeit nicht mit Sicherheit behauptet werden, daß die Rohmilch der untersuchten Bestände *campylobacter*frei war. Derartige Zweifel gelten jedoch für die meisten bisher publizierten Statusanalysen.

3.2.5 Koagulase-positive Staphylokokken

Es wurden insgesamt 403 Rohmilchproben auf das Vorkommen von Koagulase-positiven Staphylokokken qualitativ und quantitativ untersucht. Die Ergebnisse der Rohmilchproben Nummer 8 bis Nummer 177 (ohne die Nummern 12 bis 22 sowie Nummer 80) wurden der Studie von Frau Adelina MACHADO (1993) entnommen, welche diese Erhebung im Rahmen ihrer Master-Thesis „Prevalence of Staphylococcus aureus in raw milk and possibility of toxin production“ durchführte und veröffentlichte. Die Numerierung der Proben änderte sich allerdings, weshalb die hier aufgeführten Daten mit denen in dem Manuskript von Frau Machado zunächst nicht unmittelbar vergleichbar sind. Ab Untersuchungsnummer 118 stimmt die Numerierung wieder überein.

Von den 403 überprüften Rohmilchproben wurden in 349 Fällen (= 86,6 %) Koagulase-positive Staphylokokken nachgewiesen. Der Median der Keimzahl aller untersuchten 403 Milchproben lag bei $1,7 \times 10^3$ Keimen pro Milliliter Rohmilch. Der zentrale 50 %-Bereich erstreckte sich mit $6,3 \times 10^2$ - $4,4 \times 10^3$ über mehr als eine Zehnerpotenz. Das Minimum betrug $< 10^2$, das Maximum $1,5 \times 10^6$ koloniebildende Einheiten pro Milliliter Milch.

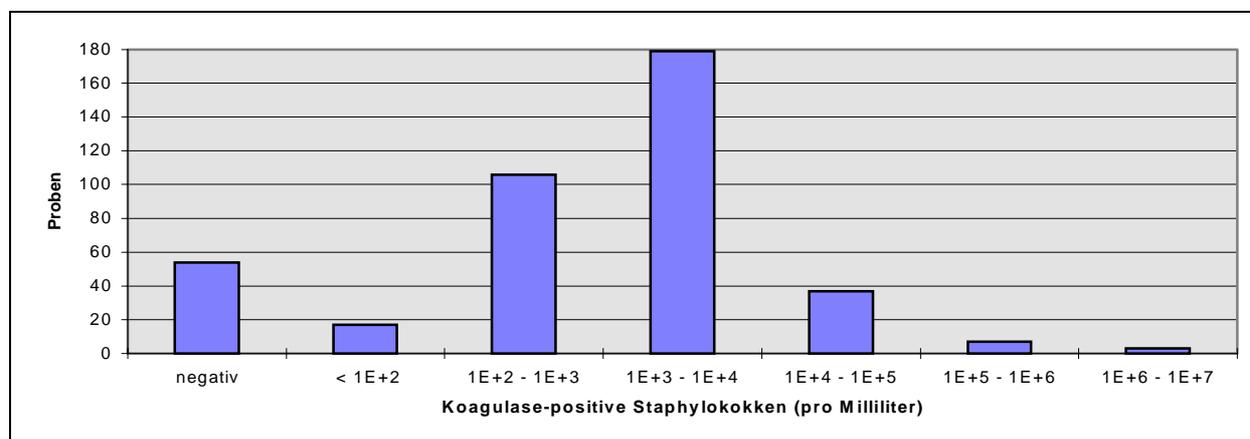
Tabelle 12 gibt einen Überblick über die Häufigkeit der Koagulase-positiven Staphylokokken, aufgelistet nach Keimzahlklassen in den positiven 349 Proben.

Tabelle 12: Häufigkeitsverteilung der Koagulase-positiven Staphylokokken in den 349 positiven Rohmilchproben

Keimzahlbereiche (in 1 / ml)	Anzahl der Proben	Prozentualer Anteil
≤ 100	17	5,2
101 - 1.000	106	30,1
1.001 - 10.000	179	51,3
10.001 - 100.000	37	10,6
100.001 - 1.000.000	7	2,0
$> 1.000.000$	3	0,9
Total:	349	100,1

Abbildung 3 zeigt das entsprechende Säulendiagramm.

Abbildung 3: Häufigkeitsverteilung der Koagulase-positiven Staphylokokken



Hierbei stellte die Klasse „negativ“ die Proben dar, die tatsächlich kein Wachstum von Staphylokokken aufwiesen, während die Klasse „ $< 10^2$ “ die Proben darstellt, die zwar Wachstum von Staphylokokken zeigten, deren Gehalt aufgrund der Bestätigungsreaktionen und der Berechnung unter 10^2 Keimen pro Milliliter lag.

In 78 (= 95,1 %) der insgesamt 82 untersuchten Beständen ließen sich bei mindestens einer der Probe Koagulase-positiven Staphylokokken nachweisen. Von den nur vier Beständen ohne positives Ergebnis wurden zwei Betriebe lediglich einmal und zwei Betriebe zweimal untersucht. Hierbei fiel auf, daß auch die aerobe Gesamtkeimzahl dieser Bestände niedrig war (Vergleiche Tabelle 13).

Tabelle 13: Aerobe Gesamtkeimzahl der Staphylokokken-negativen Bestände

Bestandsnummer	Untersuchungsnummer	Staphylokokken	Aerobe Gesamtkeimzahl
16	407	$< 10^2$	42.000
31	355	$< 10^2$	36.000
67	105	$< 10^2$	29.000
67	137	$< 10^2$	42.000
79	328	$< 10^2$	33.000
79	364	$< 10^2$	42.000

Bei der durchgeführten Untersuchung ergab sich, daß die typischen Kolonien häufiger eine positive Koagulasereaktion aufwiesen als atypische Kolonien.

Die Aufschlüsselung der 3.668 zur morphologisch-biochemischen Bestätigungsreaktionen herangezogenen Kolonien stellte sich dabei wie folgt dar (Tabelle 14).

Tabelle 14: Aufteilung der morphologischen und biochemischen Eigenschaften der differenzierten Kolonien

	Koagulase-positive Staphylokokken	Koagulase-negative Staphylokokken	Σ
typische Kolonien	1.130	434	1.564
atypische Kolonien	783	1.321	2.104
Σ	1.913	1.755	3.668

Die Richtlinie 92/46/EWG (AMTSBLATT DER EUROPÄISCHEN GEMEINSCHAFTEN, 1992) und auch die Milchverordnung von 1995 formulieren mikrobiologische Anforderungen für das Vorkommen von *Staphylococcus aureus* in Rohmilch, die zur Herstellung von Rohmilcherzeugnissen verwendet wird. Indessen sind Koagulase-positive Staphylokokken, wie sie in dieser Arbeit mit dem Amtlichen Untersuchungsverfahren nach § 35 LMBG bestimmt wurden, nicht unbedingt gleichzusetzen mit *Staphylococcus aureus*. So stellten HARVEY und GILMOUR (1985) fest, daß die von ihnen isolierten Staphylokokken-Stämmen lediglich zu 73 % *Staphylococcus aureus* zuzurechnen waren.

Weit praxisbezogener setzt der ISO (International Organization for Standardization) -Standard 6888 „Microbiology - General guidance for enumeration of *Staphylococcus aureus* - Colony count technique“ vom 15.5.1983, der analog wie die Methode nach § 35 LMBG arbeitet, Sta-

phylococcus aureus mit Koagulase-positiven Staphylokokken gleich. Zur Bewertung des rechtlichen Hintergrundes der Richtlinie und der Milchverordnung wurde diese Interpretation in der vorliegenden Arbeit bei der weiteren Auswertung der ermittelten Daten übernommen.

In Tabelle 15 wird eine Gruppierung der Untersuchungsergebnisse hinsichtlich der Keimzahlen an Koagulase-positiven Staphylokokken nach dem Kriterium vorgenommen, daß für Rohmilch zur Herstellung von Rohmilchprodukten ein Wert für $m = 500$ und für $M = 2.000$ Keimen pro Milliliter gilt. Bei Überschreitung von M in der Einzelprobe darf derart kontaminierte Milch nicht zur Weiterverarbeitung dienen. Außerdem enthält die Tabelle Angaben darüber, welcher Prozentsatz an Proben sich in dem kritischen Bereich zwischen Schwellen- (m) und Höchstwert (M) befand. Hierbei können allerdings keine Aussagen darüber getroffen werden, wieviele der positiven Milchproben mit Staphylokokkengehalten zwischen $m = 500$ und $M = 2.000$ Keimen pro Milliliter tatsächlich zu einem Ausschluß von der Verarbeitung führen würden, da pro Charge fünf Stichproben vorliegen müssen, um eine Beurteilung vornehmen zu können.

Tabelle 15: Untersuchungsergebnisse der 403 auf Koagulase-positive Staphylokokken untersuchten Rohmilchproben sortiert entsprechend den vorgegebenen Grenzwerten für die Herstellung von Rohmilcherzeugnissen

Keimzahlbereiche (in 1 / ml)	Anzahl der Proben	Prozentualer Anteil
$\leq 500 (\leq m)$	125	31,0
501 - 2.000 ($m - M$)	119	29,5
$> 2.000 (> M)$	159	39,5
Total:	403	100

Der Schwellenwert von 500 Keimen pro Milliliter Rohmilch wurde von 125 Proben (= 31,0 %) und der Grenzwert von 2.000 Keimen pro Milliliter von weiteren 119 Proben (= 29,5 %) eingehalten. Insgesamt wiesen 244 Rohmilchproben einen Gehalt von Koagulase-positiven Staphylokokken unter 2.000 pro Milliliter auf (= 60,5 %). Ein Anteil von knapp 40 % der Keimzahlresultate über dem Höchstwert erscheint doch recht bedenklich.

Zwischen dem Gehalt an Koagulase-positiven Staphylokokken auf der einen und der aeroben Gesamtkeimzahl oder den coliformen Keimen auf der anderen Seite konnte kein statistischer Zusammenhang mit den hier erhaltenen Untersuchungsergebnissen gefunden werden (siehe Anhang, Abbildung 5 und Abbildung 6). Auch nach BRAMLEY et al. (1984) sowie HARVEY und GILMOUR (1985) besteht keine Korrelation zwischen dem Gehalt an Staphylokokken beziehungsweise *Staphylococcus aureus* und der aeroben Gesamtkeimzahl in Rohmilch.

Die Höhe der Keimzahl für Koagulase-positive Staphylokokken in der Milch stimmt in etwa mit den Daten aus Studien von BRAMLEY et al. (1984) überein. Sie untersuchten in Süd-England 129 Sammelmilchproben von zehn Milchherden, in denen der durchschnittliche somatische Zellgehalt bei über 7×10^6 pro Milliliter lag. Mastitiserreger, zu denen auch *Staphylococcus aureus* gehört, wurden in unterschiedlichen Mengen mit der Milch ausgeschieden. Allerdings enthielten 116 Proben (= 89,9 %) weniger als 10.000 koloniebildende Einheiten an Mastitiserregern pro Milliliter. In 81 der 129 Proben ließ sich *Staphylococcus aureus* nachweisen (= 62,8 %), und in 3 weiteren betrug der Gehalt an *Staphylococcus aureus* über 20.000 pro Milliliter (= 2,3 %).

Bei den in Brasilien untersuchten 78 Rohmilchproben enthielten nur 46,9 % beziehungsweise 45,2 % der Proben *Staphylococcus aureus*. Dabei betrug der mittlere *Staphylococcus aureus*-Gehalt $48.978 (10^{4,7})$ koloniebildende Einheiten pro Milliliter Milch, ein Wert, der deutlich über den hier gefundenen Ergebnissen von $\bar{x} = 24.615$ Keimen liegt (dos SANTOS et al., 1981).

Die in der Milch vorhandenen Staphylokokken besitzen nicht nur wegen des gesundheitlichen Verbraucherschutzes Interesse. Bei Besiedlung des Eutergewebes rufen sie häufig Mastitiden hervor und verursachen schwere wirtschaftliche Schäden für den Milcherzeuger. Unter diesem Aspekt ist die Untersuchung einer Milchtankprobe, wie auch BARTLETT et al. (1991) bestätigen, als alleinige Methode nicht geeignet, eine Diagnose über mögliche Bestandsprobleme mit *Staphylococcus aureus* zu gestatten, zumal es sich bei einem positiven Befund durchaus um eine Rekontamination nach dem Melkvorgang handeln kann.

Aus lebensmittelhygienischer Sicht bildet *Staphylococcus aureus* ein Risiko für den Verbraucher eher bei Erzeugnissen aus Rohmilch, während sich dieses Problem wegen der kompetitiven Hemmung durch andere Bakterien weniger für den Konsum von Rohmilch stellt (TOLLE, 1981). DONELLY et al. (1968) konnten in ihrer Untersuchung über das Enterotoxinbildungsverhalten von *Staphylococcus aureus* in Milch feststellen, daß vor allem die Vermehrungsgeschwindigkeit der kompetitiven Keimflora entscheidend auf die Toxinbildung einwirkte. Vermehrten sich die anderen Mikroorganismen besonders schnell, wurde das Wachstum von *Staphylococcus aureus* gehemmt. Andererseits gelang bei einer Inokulation von 10^4 *Staphylococcus aureus*-Keimen pro Milliliter und einer Inkubationstemperatur von 30 °C bereits nach zwölf Stunden der Nachweis von Enterotoxin A und bei 35 °C sogar nach sechs Stunden, wenn sich der Gesamtkeimgehalt vor Beimpfung auf 10^4 bis 3×10^4 pro Milliliter belief. Fiel der aerobe Keimgehalt allerdings höher aus ($3\text{-}5 \times 10^6$ pro Milliliter), so wurde Enterotoxin A nur produziert, wenn der Gehalt an *Staphylococcus aureus* bei 10^6 Keimen pro Milliliter lag und eine Inkubationstemperatur von 35 °C herrschte.

Aufgrund dieser Ergebnisse ist das Vorhandensein von Enterotoxinen in Rohmilch nicht völlig auszuschließen, weil die Substanzen wegen ihrer Hitzestabilität das Pasteurisierungsverfahren überstehen und so Lebensmittelvergiftungen hervorrufen können. TOLLE (1984) gibt an, daß die Bildung von gesundheitlich bedenklichen Enterotoxinmengen mehr als 10^6 Staphylokokken pro Milliliter erfordert. Dieser Wert wurde in dieser Untersuchung immerhin noch von drei Proben (= 0,9 %) überschritten. Noch bedenklicher erscheinen die Resultate von LOPES et al. (1993), wonach bei einem Gehalt an 10^5 koloniebildenden Einheiten von Staphylokokken bereits Enterotoxine oberhalb der Erfassung von über 0,1 ng/g Lebensmittel nachgewiesen werden können. In diesem Zusammenhang verdient die Publikation von MACHADO (1993) Erwähnung, wonach 31 (= 34,1 %) von 91 untersuchten *Staphylococcus aureus*-Stämmen tatsächlich Enterotoxine produzierten. Diese Isolate gehörten zum gleichen Probenkontingent, an dem auch die vorliegende Studie durchgeführt wurde. Da die Wahrscheinlichkeit der Enterotoxinproduktion und vor allem auch die Menge des gebildeten Enterotoxins mit zunehmendem Gehalt an *Staphylococcus aureus* in der Milch steigt, sollte die Zahl der *Staphylococcus aureus*-Keime in Rohmilch möglichst niedrig liegen. Unterzieht man die Milch einem anerkannten Erhitzungsverfahren, wird dieser Keim abgetötet und damit auch eine weitere Enterotoxinbildung unterbunden.

3.2.6 Statistische Ergebnisse

Statistische Korrelationen zwischen den erfaßten Merkmalen ließen sich in dieser Untersuchung nicht aufzeigen. So waren Abhängigkeiten zwischen den einzelnen Keimen, wie der aeroben Gesamtkeimzahl, den coliformen Keimen und *Staphylococcus aureus* oder Beziehungen der Gehalte der einzelnen Keime und den äußeren Bedingungen, wie aerober Gesamtkeimzahl und Temperatur, Lagerdauer, Jahreszeit etc., statistisch nicht nachzuweisen.

Die Abbildungen Abbildung 4 bis Abbildung 9 (siehe statistischen Anhang) enthalten Punktdiagramme ausgewählter Merkmalspaare, die das Fehlen biochemischer Korrelationen visualisieren.

Tabelle 16 zeigt als zusammenfassende Darstellung die statistischen Ergebnisse der Untersuchung der Rohmilchproben auf die einzelnen Keimgruppen.

Tabelle 16: Statistische Parameter der Ergebnisse der Untersuchungen von 415 Rohmilchproben

Parameter	n	% positive Proben	\bar{x} (1/ml)	s	Minimum (1/ml)	1. Quartil (1/ml)	\tilde{x} (1/ml)	3. Quartil (1/ml)	Maximum (1/ml)
Aerobe Gesamtkeimzahl	415		937.234	3.577.330	500	$2,6 \times 10^4$	$7,3 \times 10^4$	$2,3 \times 10^5$	$3,6 \times 10^7$
Coliforme Keime	374	99,2	33.350	129.330	< 3,6	$2,3 \times 10^2$	$9,3 \times 10^2$	$7,5 \times 10^3$	$1,1 \times 10^6$
Listeria monocytogenes	415	5,5							
Salmonella	415	0							
Campylobacter	415	0							
Staphylococcus aureus	403 *	86,6	24.615	145.999	$<10^2$	$6,3 \times 10^2$	$1,7 \times 10^3$	$4,4 \times 10^3$	$1,5 \times 10^6$

* Die Angaben der statistischen Parameter der Untersuchung auf Staphylococcus aureus beziehen sich auf die 394 positiven Proben

4 Schlußfolgerungen

Beobachtungen in den USA Ende des 19. Jahrhunderts lenkten die Aufmerksamkeit auf gehäufte Erkrankungen durch den Genuß von unbehandelter Milch. Nachdem zunächst zwei Wege besprochen wurden, das Gesundheitsrisiko zu vermindern, setzte sich schließlich die Pasteurisation gegenüber der Zertifizierung von Milch durch (MAGRUDER, 1910).

Heutzutage gibt es immer mehr Menschen, die den Nährwert von behandelter Milch in Zweifel ziehen und zum Verzehr von Rohmilch zurückkehren.

Nach POTTER et al. (1984) lauten die Hauptargumente der Befürworter von unbehandelter Milch:

Rohmilch besitzt einen höheren Nährwert.

Rohmilch enthält wertvolle Enzyme und Antikörper.

Rohmilch weist eine Laktobazillen-Flora auf.

Der Verzehr von Rohmilch führt zu einer vermehrten Abwehrbereitschaft gegen Krankheiten.

Diese Thesen widerlegen die gleichen Autoren mit folgenden Argumenten:

Pasteurisierung führt nachweislich nur zu einem sehr geringen Verlust an fettlöslichen Vitaminen (Vitamine A, D und E), während eine negative Auswirkung auf andere Nährstoffe nicht nachgewiesen werden kann.

Enzyme und Antikörper werden durch Wärmebehandlung zwar inaktiviert, beziehungsweise denaturiert, doch stellt sich bei Rohmilchkonsum der gleiche Effekt durch die Proteinverdauung im Magen ein.

Mit Laktobazillen hergestellte Milchprodukte wie zum Beispiel Joghurt sind im Handel erhältlich.

Eine verbesserte Abwehrbereitschaft gegen Erkrankungen nach dem Verzehr von Rohmilch läßt sich in Ernährungsversuchen bei Menschen nicht dokumentieren.

Im Hinblick auf die Immunlage gilt nach KORLATH et al. (1985) allerdings für *Campylobacter jejuni* die Hypothese, daß sich durch regelmäßige Auseinandersetzung mit geringen Mengen von pathogenen Bakterien eine erhöhte Abwehrbereitschaft einstellen kann.

Eine sehr deutliche Meinung vertrat der Bundesgesundheitsrat 1974 in seinem Votum zum Thema „Ernährungsphysiologischer Wert von Rohmilch gegenüber den gesundheitlichen Risiken“. Die wesentliche Aussage lautet, daß „der Verzehr von Rohmilch ernährungsphysiologisch keine Vorteile bietet, daß er aber im Vergleich zum Verzehr von erhitzter Milch ein gesundheitliches Risiko für den Menschen darstellt. Dieses Risiko kann nur durch eine erhebliche, kostenaufwen-

dige Untersuchung und Überwachung der Rohmilchlieferebetriebe auf ein vertretbares Minimum beschränkt werden“ (ANONYM, 1987 a)

Im Gegensatz zu einem höchstens unbedeutenden ernährungsphysiologischen Vorteil des Verzehrs von Rohmilch gibt es in der Tat viele Berichte, bei denen Rohmilch als Quelle für Krankheitsausbrüche nachgewiesen wurde. Deshalb sieht auch D'AOUST (1989) aufgrund des Vorkommens pathogener Mikroorganismen wie Salmonellen, Campylobacter, Yersinia, Listerien und Escherichia coli in Milch, ihrer Vermehrungsfähigkeit in Milch und Milchprodukten und der Überlebensfähigkeit einiger Mikroorganismen auch in tiefgefrorenen Produkten die Gefahr gesundheitlicher Schäden bei der Verwendung von Rohmilch. Er hält die obligatorische Verwendung von pasteurisierter Milch für die Herstellung von Milchprodukten für die einzige Möglichkeit, sichere Erzeugnisse herzustellen.

Die hygienischen Probleme lassen sich bereits an der aeroben Gesamtkeimzahl erkennen. Aufgrund der - geographisch nicht deckungsgleichen - Gegenüberstellung einer in Deutschland durchgeführten und von SUHREN und HEESCHEN (1992) publizierten Untersuchung mit den vorliegenden Daten hat sich die hygienische Qualität seit Einführung der Richtlinie 92/46/EWG hinsichtlich des Grenzwertes für die aerobe Gesamtkeimzahl von 100.000 Keimen pro Milliliter Rohmilch tendenziell gebessert. Während die zwischen 1986 und 1990 in zwölf Milcheinzugsgebieten Deutschlands an 4.563 Rohmilchproben auf Erzeugerebene ermittelten Resultate einen Anteil der Proben von etwa 45 % unter der Makrokoloniegrenze von 100.000 pro Milliliter auswiesen, lagen in dieser Brandenburger Studie etwa 58 % der Proben unter diesem Limit. Bei den Proben mit höherer Kontamination wurde der Grenzwert allerdings häufig weit überschritten. So wiesen 43 Proben (= 10,3 %) einen aeroben Gesamtkeimgehalt von über 10^6 Keimen pro Milliliter Rohmilch auf.

Eine Verbesserung der Milchqualität seit dem 1. Januar 1994 ließ sich ebenfalls anhand der hier vorliegenden Ergebnisse erkennen. So stieg der prozentuale Anteil der Proben, die einen Keimgehalt von höchstens 100.000 Keimen pro Milliliter Rohmilch aufwiesen, von 55,4 % auf 61,9 %.

Während die Qualitätsanforderungen aus der Richtlinie 92/46/EWG von vielen Betrieben erfüllt wurden, vermochten andere Bestände ihre Hygieneprobleme nicht zu bewältigen. Bei Herden, die den vorgeschriebenen Grenzwert von 100.000 Keimen pro Milliliter nicht einhielten, wurde dieser Wert häufig deutlich und auch bei mehreren Untersuchungen überschritten. Ebenso fiel die Kontamination mit coliformen Keimen dann meist sehr intensiv aus. Trotz einer generellen Tendenz zu verbesserter mikrobiologischer Beschaffenheit kann auf keinen Fall gewährleistet werden, daß Rohmilch von pathogenen oder fakultativ pathogenen Keimen frei ist, zumal derartige Mikroorganismen auch bei niedriger Gesamtkeimzahl vorkommen können.

Diese Feststellung gilt beispielsweise für Listerien. Der in dieser Untersuchung ermittelte Anteil von 10,6 % positiven Rohmilchproben bei einer Häufigkeit von 5,5 % *Listeria monocytogenes* entsprach den in anderen Staaten gefundenen Ergebnissen (LOVETT et al., 1987; BECKERS et

al., 1987; REA et al., 1992 und andere). Beachtenswert erscheint weiterhin, daß sich immerhin bei einem Drittel (34,1 %) der überprüften Bestände mindestens einmal Listerien in der Rohmilch nachweisen ließen, wobei die Kontaminationszahlen mit <100 bis 550 Listerien pro Milliliter Rohmilch für eine akute Gefährdung vermutlich nicht ausreichen.

Obwohl keine durch Rohmilchkonsum verursachte Fälle von Listeriose in der Literatur vorliegen, sind Gesundheitsgefahren nicht grundsätzlich auszuschließen. Es besteht also auch in Brandenburg das - bisher nur theoretische - Risiko, sich durch den Verzehr von Rohmilch mit *Listeria monocytogenes* zu infizieren. Dagegen kann bei einem technisch ordnungsgemäß durchgeführten Pasteurisierungsverfahren mit ausreichender Sicherheit davon ausgegangen werden, daß Trinkmilch keine infektiöse vegetative Mikroorganismen wie *Listeria monocytogenes* mehr enthält.

Bezüglich der Salmonellen stellt Rohmilchkonsum im Vergleich zu anderen Lebensmitteln aufgrund der hier durchgeführten Untersuchung keine Gefahr dar. In 415 Rohmilchproben wurden Salmonellen nicht in 1 ml und in 113 Rohmilchproben zugleich nicht in 25 ml nachgewiesen. Weil auch das Schrifttum die Inzidenz der Salmonellen in Rohmilch niedrig einstuft, besteht nur ein ganz geringes Restrisiko.

Auch wenn *Campylobacter*-Spezies bei 415 Rohmilchproben in 1 ml unter den beschriebenen Versuchsbedingungen nicht nachzuweisen waren, ergibt sich hier eine grundsätzlich andere Gefahreneinschätzung. Denn dieses Ergebnis muß hinsichtlich seiner Aussagekraft als fraglich eingestuft werden, da einige Zweifel an der Empfindlichkeit der vom Nordic Committee on Food Analysis für das Europäische Komitee für Normung (CEN) vorgeschlagenen Untersuchungsmethode für *Campylobacter* bestehen und die Probenaufbewahrung zwischen Entnahme und Analyse ebensowenig den Optimalanforderungen entsprach.

Die noch ungelösten methodologischen Probleme gehen schon aus der Tatsache hervor, daß bei den in der Literatur beschriebenen Untersuchungen auf *Campylobacter* in Milch die unterschiedlichsten Anreicherungs- und Nachweisverfahren Anwendung fanden. Gleichzeitig schienen die Ergebnisse stark von der verwendeten Nachweisteknik abzuhängen.

Nach dem gegenwärtigen Kenntnisstand übertrifft bei den durch kontaminierte Lebensmittel hervorgerufenen Enteritis-Ausbrüchen *Campylobacter* inzwischen *Salmonella* als Ursache (SKIRROW, 1982) und das Lebensmittel Milch, insbesondere Rohmilch, spielt dabei eine bedeutende Rolle. Aus diesem Grund sollte vordringlich ein geeignetes Verfahren für den Nachweis von *Campylobacter* in Milch entwickelt und unter Praxisbedingungen überprüft werden. Die Konzeption dieser quantitativen Methode muß sich an der erwünschten Nachweiskante für *Campylobacter*, dem Einfluß der in der Rohmilch nicht zu vermeidenden Begleitflora und antibakteriell wirksamen Milchinhaltsstoffen, wie zum Beispiel dem Laktoperoxidase-System (BEUMER et al., 1988), orientieren. Diese Kriterien gewinnen unter dem Gesichtspunkt Bedeu-

tung, daß schon eine geringe Infektionsdosis von circa 500 Bakterien ausreicht, um Erkrankungen beim Menschen hervorzurufen (ROBINSON, 1981).

Der am häufigsten nachgewiesene (fakultativ) pathogene Keim war *Staphylococcus aureus*. Von den 403 untersuchten Rohmilchproben enthielten 86,6 % (= 349 Proben) Koagulase-positive Staphylokokken und der durchschnittliche Gehalt (Median) betrug $\tilde{x} = 1,7 \times 10^3$ koloniebildende Einheiten pro Milliliter. Die in der Milchverordnung (1995) niedergelegten Anforderungen für *Staphylococcus aureus* in roher Kuhmilch, die zur Herstellung von Rohmilcherzeugnissen bestimmt ist, von 2.000 Keimen pro Milliliter wurde nur von 244 Proben (= 60,5 %) eingehalten, wenn man unterstellt, daß es sich bei den hier nachgewiesenen Koagulase-positiven Staphylokokken überwiegend um *Staphylococcus aureus* handelte.

Zusammenfassend muß für die unkontrollierte Verbreitung von Rohmilch und ihrem Verzehr ein Restrisiko wegen möglicher Kontamination mit humanpathogenen Mikroorganismen unterstellt werden. Nach dem Ergebnis der vorliegenden Erhebung ist mit dem Vorkommen von *Listeria monocytogenes* und *Staphylococcus aureus* in Rohmilch zu rechnen. Aus diesem Grund sollten Risikogruppen grundsätzlich auf den Verzehr von Rohmilch verzichten. Diese Warnung ergibt sich insbesondere wegen der Infektionsgefahr mit *Listeria monocytogenes* und sie findet sich auch in einer Empfehlung im Bundesgesundheitsblatt zur Erkennung und Verhütung von Infektionen mit *Listeria monocytogenes*, in der zum Beispiel Schwangeren geraten wird, den Verzehr von rohen Nahrungsmitteln vollständig zu unterlassen (ANONYM, 1987 b). Für *Campylobacter* als weiteren Risikofaktor bleibt die Frage der tatsächlichen Häufigkeit noch offen. Mit der - eher theoretischen - Ausnahme des Vorkommens von Staphylokokken-Enterotoxinen lassen sich durch ein anerkanntes Hitzebehandlungsverfahren bei der Herstellung von Trinkmilch die mikrobiologischen Gefahren aber sicher ausschließen. Lediglich bei Fehlern in der Technik der Wärmebehandlung oder durch anschließende Rekontamination kann auch pasteurisierte Milch einen Auslöser von Infektionen bilden. Dabei handelt es sich allerdings um Unfälle, die in der modernen Molkereitechnologie zur Ausnahme zählen.

Auch der oftmals unbefriedigende hygienische Zustand der Rohmilch, der seinen Ausdruck in überhöhten aeroben Gesamtkeimzahlen und Gehalten an coliformen Keimen findet, legt einen Verzicht des unkontrollierten Konsums nahe. Ähnliche Bedenken lassen sich auch aus einer Studie des Staatlichen Tierärztlichen Untersuchungsamtes Stuttgart (FRIEDRICH, 1993) an 669 Vorzugsmilchproben ableiten, von denen 20,6 % die mikrobiologischen Anforderungen nicht erfüllten, ohne daß pathogene Keime vorkamen. Ein Verzicht auf Rohmilch mag um so leichter fallen, als das unerhitzte Lebensmittel aus ernährungsphysiologischer Sicht keinen Vorteil gegenüber wärmebehandelter Milch besitzt (POTTER et al., 1984).

5 Zusammenfassung

Untersuchungen zum Vorkommen von Listerien, Salmonellen, Campylobacter und Staphylokokken in Rohmilch im Land Brandenburg

Gerade in letzter Zeit werden die Vor- und Nachteile eines Verzehrs von Rohmilch verstärkt diskutiert. Auf der einen Seite gibt es in der Literatur immer wieder Berichte über das Auftreten von Enteritis infectiosa durch den Konsum von Rohmilch und aus Rohmilch hergestellten Milchzeugnissen, während wärmebehandelte Milch und Milchprodukte weniger häufig als Ursache für Infektionen und Intoxikationen in Betracht kommen. Auf der anderen Seite steht der Wunsch des Verbrauchers nach „naturbelassenen“, unbehandelten Lebensmitteln.

Aufgabe der vorliegenden Arbeit war es, im Bundesland Brandenburg eine Statuserhebung zur Kontamination der Rohmilch mit den wesentlichen humanpathogenen Mikroorganismen durchzuführen. Neben der aeroben Gesamtkeimzahl und dem Gehalt an coliformen Keimen als Hygieneparameter wurde auf das Vorkommen von Listerien, insbesondere *Listeria monocytogenes*, Salmonellen, Campylobacter und *Staphylococcus aureus* untersucht.

Bei den angewandten Untersuchungsverfahren handelte es sich um die in der Amtlichen Sammlung nach § 35 des Lebensmittel- und Bedarfsgegenständegesetz beschriebenen Standardmethoden, die zum Teil geringfügig abgeändert wurden. Für die Untersuchung auf Campylobacter wurde die vom Nordic Committee on Food Analysis für das European Committee for Standardization (CEN) vorgeschlagene Technik verwendet.

Die Erhebungen fanden im Zeitraum zwischen Juni 1993 und Juni 1994 statt und umfaßten insgesamt 415 Rohmilchproben (Bestandssammelmilchproben), die von der Meierei für eigene Untersuchungen gezogen worden waren, aus insgesamt 82 verschiedenen Betrieben. Diese Bestandmilch wurde zur Wärmebehandlung und Weiterverarbeitung an die Meierei geliefert und war nicht zum Verzehr im unerhitzten Zustand bestimmt.

Die mittlere mesophile Gesamtkeimzahl der Proben betrug $\bar{x} = 7,3 \times 10^4$ Keime pro Milliliter bei einem zentralen 50 %-Bereich von $2,6 \times 10^4$ bis $2,3 \times 10^5$ koloniebildenden Einheiten. 241 Rohmilchproben (= 58,1 %) wiesen eine Kontamination von weniger als 100.000 koloniebildenden Einheiten pro Milliliter auf. Vor Inkrafttreten der Richtlinie 92/46/EWG am 1. Januar 1994 wurden 242 (= 58,3 % der 415 Proben) und danach 173 Rohmilchproben (= 41,7 %) untersucht. Der Median fiel nach diesem Zeitpunkt von 77.000 auf 64.000 koloniebildende Einheiten pro Milliliter während der prozentuale Anteil der Proben, die einen Keimgehalt von unter 100.000 pro Milliliter besaßen, von 55,4 % auf 61,9 % stieg.

Bei 374 auf den Gehalt an coliformen Keimen überprüften Proben betrug der Median $9,3 \times 10^2$ Keime pro Milliliter bei einem mittleren 50 %-Bereich von $2,3 \times 10^2$ bis $7,5 \times 10^3$ koloniebildenden Einheiten.

Von den 415 auf Listerien untersuchten Proben waren in 44 Fällen Listerien nachweisbar (= 10,6 %). Bei 23 Isolaten handelte es sich um *Listeria monocytogenes* (= 5,5 %) und bei 21 um *Listeria innocua* (= 5,1 %). Die 44 positiven Proben verteilten sich auf 28 Bestände (= 34,1 %), wobei in 14 Betrieben (= 50,0 %) *Listeria monocytogenes* und in 13 (= 46,4 %) *Listeria innocua* nachgewiesen wurden. In einem Bestand traten sowohl *Listeria monocytogenes* als auch *Listeria innocua* auf. Der Listeriengehalt der 44 positiven Proben lag bei 40 unter 10^2 koloniebildenden Einheiten pro Milliliter Rohmilch. Bei den übrigen vier Proben betrug der Listeriengehalt 1×10^2 , 2×10^2 und zweimal $5,5 \times 10^2$ koloniebildende Einheiten pro Milliliter Rohmilch.

Salmonellen konnten bei 415 untersuchten Rohmilchproben in 1 ml nicht nachgewiesen werden. In 113 Rohmilchproben, die parallel untersucht wurden, ließen sich Salmonellen auch in 25 ml nicht ermitteln.

Campylobacter fand sich gleichfalls in keiner der untersuchten Rohmilchproben.

Aus 349 von 403 (= 86,6 %) untersuchten Proben wurden Koagulase-positive Staphylokokken angezüchtet, was bedeutet, daß dieser Mikroorganismus bei 78 von 82 untersuchten Beständen (= 95,1 %) mit einem Maximum von $1,5 \times 10^6$ Keimen pro Milliliter auftrat. Der mittlere Gehalt betrug $\bar{x} = 1,7 \times 10^3$ koloniebildende Einheiten pro Milliliter Rohmilch bei einem zentralen 50 %-Bereich von 630 - 4.400 koloniebildenden Einheiten.

Aufgrund der Resultate würde die Milch einiger der untersuchten Bestände eine Gefahr für die menschliche Gesundheit vor allem in Hinblick auf *Listeria monocytogenes* - sowie bedingt *Staphylococcus aureus* - darstellen, sofern es zu einem unkontrollierten Rohverzehr käme. Wird die Milch entsprechend der Milchverordnung (1995) wärmebehandelt, so läßt sich ein Infektionsrisiko bis auf das aufgrund technischen und menschlichen Versagens immer bestehende Restrisiko ausschließen.

6 Summary

Investigation on the presence of *Listeria*, *Salmonella*, *Campylobacter* and *Staphylococci* species in raw milk collected in Brandenburg

Due to related diseases the consumption of raw milk has recently been called into question. On the one hand there are many reports in the literature about milk-borne enteritis associated with raw milk and dairy-products manufactured from raw milk whereas heat-treated milk and dairy-products are seldom the cause for infection and intoxication. On the other hand there is a demand for natural, untreated foods on the the part of the consumer.

The intention of this investigation was to examine the occurrence of certain human pathogens in raw milk from Brandenburg (Germany). Beside the total bacterial count and the coliform count as parameters of hygiene the presence of *Listeria* species, especially *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* species, *Campylobacter* species and *Staphylococcus aureus* was tested.

The investigation was carried out according to the Official Methods-Collection of § 35 of the German Foods and Foodstuffs Article (LMBG) which have in part been slightly changed. The research on *Campylobacter* was done according to the methods suggested by the Nordic Comitee on Food Analysis to the European Committee for Standardization (CEN).

The research was done between June 1993 and July 1994 with 415 raw milk samples altogether taken by the dairy for their own tests from farm bulk-tanks of 82 dairy farms being investigated. The milk was then delivered to the dairy for heat-treatment and further processing and was not destined for raw consumption.

The medium bacterial count was $\bar{x} = 7,3 \times 10^4$ per milliliter with a central 50 %-range from $2,6 \times 10^4$ to $2,3 \times 10^5$ colony forming units per milliliter (cfu/ml). The colony count of 241 raw milk samples (= 58,1 %) was below 100.000 cfu/ml. Before the the EC-directive 92/46/EWG/EEC came into force on January 1st 1994, 242 samples (= 58,3 % out of the 415 samples) and after that date 173 raw milk samples (= 41,7 %) had been investigated. The medium bacterial count (\bar{x}) dropped from 77.000 to 64.000 cfu/ml after that date and the percentage of samples showing colony counts less than 100.000 cfu/ml had risen from 55,4 % to 61,9 %.

In the 374 samples tested for coliforms the medium bacterial count (\bar{x}) of these bacteria was $9,3 \times 10^2$ cfu/ml with a central 50 %-range from $2,3 \times 10^2$ to $7,5 \times 10^3$ cfu/ml.

Listeria was isolated from 44 out of 415 tested samples (= 10,6 %). 23 strains were confirmed as *Listeria monocytogenes* (= 5,5 %) and 21 as *Listeria innocua* (= 5,1 %). The 44 positive samples were isolated from milk samples of 28 dairy farms (= 34,1 %) with 14 farms (= 50,0 %) showing evidence of *Listeria monocytogenes* and 13 farms (= 46,4 %) *Listeria innocua*. In one farm both

strains were observed. The average count of *Listeria* in 40 samples out of the 44 positive samples was less than 10^2 per milliliter raw milk. *Listeria*-levels of 10^2 , 2×10^2 and twice $5,5 \times 10^2$ bacteria per milliliter raw milk were found in the remaining four samples.

Salmonella could not be detected in 1 ml of 415 raw milk samples nor in 25 ml of 113 parallel investigations of raw milk samples.

Nor could *Campylobacter* be found in any milk sample.

The growth of coagulase-positive *Staphylococci* was observed in 349 out of 403 (= 86,6 %) tested samples so that this microorganism occurred in 78 out of 82 farms (= 95,1 %) under investigation with a maximum of $1,5 \times 10^6$ cfu/ml. The average count was $\tilde{x} = 1,7 \times 10^3$ cfu/ml with a central 50 %-range from 630 - 4.400 cfu/ml.

Due to the findings the milk of some of the tested farms would cause a risk for human health if consumed uncontrolled especially when a possible infection with *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* is taken into consideration. If raw milk is heat-treated according to the Milchverordnung (Milk Article, 1995) there is no risk of infection with pathogens. Nevertheless, there will always remain a small risk due to technical faults which can never be excluded.

7 Schrifttum

Anonym (1987 a)

Voten des Bundesgesundheitsrates
Deutsches Tierärzteblatt 9, 625-626

Anonym (1987 b)

Empfehlungen zur Erkennung und Verhütung von Infektionen mit *Listeria monocytogenes*
Bundesgesundheitsblatt 30, 369-370

Anonym (1991)

Empfehlungen des Bundesgesundheitsamtes zum Nachweis und zur Bewertung von *Listeria monocytogenes* in Lebensmitteln
Bundesgesundheitsblatt 34, 227-229

Anonym (1993)

Die Familie der Enterobacteriaceae - Bedeutung und Nachweismöglichkeiten
Deutsche Milchwirtschaft 44, 283-284

Bartlett, P. C.; Miller, G. Y.; Lance, S. E.; Heider, L. E. (1991)

Use of bulk tank and milk filter cultures in screening for *Streptococcus agalactiae* and coagulase-positive staphylococci
Journal of Food Protection 54, 848-851

Bean, N. H.; Griffin, P. M.; Goulding, J. S.; Ivey, C. B. (1990)

Foodborne disease outbreaks, 5-year summary, 1983-1987
Morbidity and Mortality Weekly Report 39, 15-57

Beckers, H. J.; Soentoro, P. S. S.; Delfgou-van Asch, E. H. M. (1987)

The occurrence of *Listeria monocytogenes* in soft cheeses and raw milk and its resistance to heat
International Journal of Food Microbiology 4, 249-256

Beumer, R. R.; Cruysen, J. J. M.; Birtantie, I. R. K. (1988)

The occurrence of *Campylobacter jejuni* in cows' milk
Journal of Applied Bacteriology 65, 93-96

Bisping, W. (1993)

Salmonellen in Futtermitteln
Deutsche Tierärztliche Wochenschrift 100, 262-263

Blaser, M. J.; Cravens, J.; Powers, B. W.; Laforce, F. M.; Wang, W-L. L. (1979)

Campylobacter enteritis associated with unpasteurized milk
The American Journal of Medicine 67, 715-718

- Blessing, D. J.; Thompson, M.; Fisher, B.; Schooley, D.; Kramer, M. J.; DeMelfi, T. M.; McCarthy, M. A.; Witte, E. J.; Hays, C. W.; Smucker, J. (1983)
Campylobacteriosis associated with raw milk consumption - Pennsylvania
Morbidity and Mortality Weekly Report 32, 337-344
- Bramley, A. J.; McKinnon, C. H.; Staker, R. T.; Simpkin, D. L. (1984)
The effect of udder infection on the bacterial flora of the bulk milk of ten dairy herds
Journal of Applied Bacteriology 57, 317-323
- Brückler, J.; Klima, H.; Schaeg, W.; Manz, D.; Blobel, H. (1981)
Staphylococcus aureus von Kühen mit subklinischen Euterinfektionen
Zentralblatt für Veterinärmedizin B 28, 494-499
- Christopher, F. M.; Smith, G. C.; Vanderzant, C. (1982)
Examination of poultry giblets, raw milk and meat for Campylobacter fetus subsp. jejuni
Journal of Food Protection 45, 260-262
- D'Aoust, J.-Y. (1989)
Manufacture of dairy products from unpasteurized milk: a safety assessment
Journal of Food Protection 52, 906-914
- de Boer, E.; Hartog, B. J.; Borst, G. H. A. (1984)
Milk as a source of Campylobacter jejuni
Netherlands Milk and Dairy Journal 38, 183-194
- de Vries, J.; Strikwerda, R. (1956)
Ein Fall klinischer Euter-Listeriose beim Rind
Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten und Hygiene 167,
229-232 (zitiert nach GITTER et al. (1980))
- Dominguez Rodriguez, L.; Fernández Garayzabal, J. F.; Vazquez Boland, J. A.; Rodriguez Ferri;
Suarez Fernandez, G. (1985)
Isolation de micro-organismes du genre Listeria à partir de lait cru destiné à la consommation humaine
Canadian Journal of Microbiology 31, 938-941
- Donnelly, C. B.; Leslie, J. E.; Black, L. A. (1968)
Production of enterotoxin A in milk
Applied Microbiology 16, 917-924
- dos Santos, E. C.; Genigeorgis, C.; Farver, T. B. (1981)
Prevalence of Staphylococcus aureus in raw and pasteurized milk for commercial manufacturing of brazilian Mians cheese
Journal of Food Protection 44, 172-176

- Doyle, M. P. (1981)
Campylobacter fetus subsp. jejuni: an old pathogen of new concern
Journal of Food Protection 44, 480-488
- Doyle, M. P.; Glass, K. A.; Beery, J. T.; Garcia, G. A.; Pollard, D. J.; Schultz, R. D. (1987)
Survival of Listeria monocytogenes in milk during high-temperature, short-time pasteurization
Applied and Environmental Microbiology 53, 1433-1438
- Doyle, M. P.; Roman, D. J. (1982 a)
Prevalence and survival of Campylobacter jejuni in unpasteurized milk
Applied and Environmental Microbiology 44, 1154-1158
- Doyle, M. P.; Roman, D. J. (1982 b)
Recovery of Campylobacter jejuni and Campylobacter coli from inoculated foods by selective enrichment
Applied and Environmental Microbiology, 43, 1343-1353
- El Marrakchi, A.; Hamana, A.; El Othmani, F. (1993)
Occurrence of Listeria monocytogenes in milk and dairy products produced or imported into Morocco
Journal of Food Protection, 56, 256-259
- Erichsen, H.; Ullmann, U. (1994)
Zur Entwicklung der durch Salmonellen verursachten Enteritis infectiosa in Schleswig-Holstein in den Jahren 1989-1992
Bundesgesundheitsblatt 37, 69-73
- Errebo-Larsen, H.; Jensen, J. (1979)
Proceedings of the 7th international symposium on problems of listeriosis, Varna, Bulgaria, 1977, ed. I. Ivanov., S. 193
(zitiert nach GITTER et al. (1980))
- European Committee for Standardization (1990)
Proposal from NMKL (Nordisk Metodikkommitte för Livsmedel) - Campylobacter jejuni/coli detection in foods
CEN/TC 275/WG 6, 24
- Fahey, T.; Morgan, D.; Gunneburg, C.; Adak, G. K.; Majid, F.; Kaczmarek, E. (1995)
An outbreak of Campylobacter jejuni enteritis associated with failed milk pasteurisation
Journal of Infection 31, 137-143
- Farber, J. M.; Sanders, G. W., Malcolm, S. A. (1988)
The presence of Listeria spp. in raw milk in Ontario
Canadian Journal of Microbiology 34, 95-100

- Fedio, W. M.; Jackson, H. (1992)
On the origin of *Listeria monocytogenes* in raw bulk-tank milk
International Dairy Journal 2, 197-208
- Fenlon, D.R. (1986)
Rapid quantitative assessment of the distribution of listeria in silage implicated in a suspected outbreak of listeriosis in calves
The Veterinary Record 118, 240-242
- Fenlon, D. R.; Wilson, J. (1989)
The incidence of *Listeria monocytogenes* in raw milk from bulk tanks in North-East Scotland
Journal of Applied Bacteriology 66, 191-196
- Fenlon, D.R.; Stewart, T.; Donachie, W. (1995)
The incidence, numbers and types of *Listeria monocytogenes* isolated from farm bulk tank milks
Letters in Applied Microbiology 20, 57-60
- Fernandez Garayzabal, J. F.; Dominguez, L.; Vazquez, A.; Gomez-Lucia, E.; Rodriguez Ferri, E. R.; Suarez, G. (1987)
Occurrence of *Listeria monocytogenes* in raw milk
The Veterinary Record 120, 258-259
- Finch, M. J.; Blake, P. A. (1985)
Foodborne outbreaks of campylobacteriosis: The United States experience, 1980-1982
American Journal of Epidemiology 122, 262-268
- Fleming, D. W.; Cochi, S. L.; MacDonald, K. L.; Brondum, J.; Hayes, P. S.; Plikaytis, B. D.; Holmes, M. B.; Audurier, A.; Broome, C. V.; Reingold, A. L. (1985)
Pasteurized milk as a vehicle of infection in an outbreak of listeriosis
The New England Journal of Medicine 312, 404-407
- Friedrich, A. (1993)
Untersuchungen über die Qualität von Vorzugsmilch in Baden-Württemberg
Tierärztliche Umschau 48, 508-512
- Gitter, M.; Bradley R.; Blampied, P.H. (1980)
Listeria monocytogenes infection in bovine mastitis
The Veterinary Record 107, 390-393
- Greenwood, M. H.; Roberts, D.; Burden, P. (1991)
The occurrence of *Listeria* species in milk and dairy products: a national survey in England and Wales
International Journal of Food Microbiology 12, 197-206

- Halpin-Dohnalek, M. I.; Marth, E. H. (1989)
Staphylococcus aureus: production of extracellular compounds and behavior in foods - a review
Journal of Food Protection 52, 267-282
- Hartung, M. (1993)
Vorkommen von Enteritis-Salmonellen in Lebensmitteln und bei Nutztieren 1991
Deutsche Tierärztliche Wochenschrift 100, 259-261
- Hartung, M. (1994)
Ergebnisse der Jahresherhebung 1993 über Salmonellenbefunde
Ergebnisprotokoll der 47. Arbeitstagung des Arbeitskreises Lebensmittelhygienischer Tierärztlicher Sachverständiger (ALTS) vom 21.-23.6.1994 in Berlin, S. 39-47
- Hartung, M. (1995)
Ergebnisse der Jahresherhebung 1994 über Salmonellenbefunde
Ergebnisprotokoll der 48. Arbeitstagung des Arbeitskreises Lebensmittelhygienischer Tierärztlicher Sachverständiger (ALTS) vom 20.-22.6.1995 in Berlin, S. 47-52
- Harvey, J.; Gilmour, A. (1985)
Application of current methods for isolation and identification of staphylococci in raw bovine milk
Journal of Applied Bacteriology 59, 207-221
- Harvey, J.; Gilmour, A. (1992)
Occurrence of Listeria species in raw milk and dairy products produced in Northern Ireland
Journal of Applied Bacteriology 72, 119-125
- Hayes, P. S.; Feeley, J. C.; Graves, L. M.; Ajeloo, G. W.; Fleming, D. W. (1986)
Isolation of Listeria monocytogenes from raw milk
Applied and Environmental Microbiology 51, 438-440
- Heeschen, W.; Suhren, G.; Blüthgen, A.; Hamann, J.; Reichmuth, J. (1988)
Hygienische Qualität von Milch und Milchprodukten - Sicherheit statt Risiko
Deutsche Molkerei-Zeitung, 25, 766-771 und 26, 794-800
- Humphrey, T. J.; Beckett, P. (1987)
Campylobacter jejuni in dairy cows and raw milk
Epidemiology and Infection 98, 263-269
- Humphrey, T. J.; Hart, R. J. C. (1988)
Campylobacter and salmonella contamination of unpasteurized cows' milk on sale to the public
Journal of Applied Bacteriology 65, 463-467

- Hutchinson, D. N.; Bolton, F. J.; Hinchliffe, P. M.; Horsley, S. D.; Jessop, E. G.;
Robertshaw, P. A., Counter, D. E. (1985)
Evidence of udder excretion of *Campylobacter jejuni* as the cause of milk-borne campy-
lobacter outbreak
Journal of Hygiene, Cambridge 94, 205-215
- Hyslop, N. St. G.; Osborne, A. D. (1959)
Listeriosis: a potential danger to public health
The Veterinary Record 71, 1082-1091
- Jensen, J; Errebo-Larsen, H. (1973)
Nordisk Veterinaermedicin 25, 322
(zitiert nach GITTER et al. (1980))
- Jones, D. M.; Robinson, D. A.; Eldridge, J. (1981)
Serological studies in two outbreaks of *Campylobacter jejuni* infection
Journal of Hygiene, Cambridge 87, 163-170
- Jones, P. H.; Willis, A. T.; Robinson, D. A.; Skirrow, M. B.; Josephs, D. S. (1981)
Campylobacter enteritis associated with the consumption of free school milk
Journal of Hygiene, Cambridge 87, 155-162
- Joseph, C.; Noah, N.; White, J.; Hoskins, T. (1990)
A review of outbreaks of infectious disease in school in England and Wales 1979-1988
Epidemiology and Infection 105, 419-434
- Kerr, K. G.; Birkenhead, D.; Seale, K.; Major, J.; Hawkey, P. M. (1993)
Prevalence of *Listeria* spp. on the hands of food workers
Journal of Food Protection 56, 525-527
- Klein, B. S.; Vergeront, J. M.; Blaser, M. J.; Edmonds, P.; Brenne, D. J.; Janssen, D.;
Davis, J. P. (1986)
Campylobacter infection associated with raw milk
Journal of the American Medical Association 255, 361-364
- Kloos, W. E.; Schleifer, K. H. (1986)
Section 12: Gram-positive cocci - Family I: Micrococcaceae - Genus IV: *Staphylococcus*
in *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, S. 1013 ff.
Williams & Wilkins, Baltimore (USA), 1986
- Korlath, J. A.; Osterholm, M. T.; Judy, L. A.; Forfang, J. C.; Robinson, R. A. (1985)
A point-source outbreak of campylobacteriosis associated with consumption of raw milk
The Journal of Infectious Diseases 152, 592-596
- Kühn, H. (1993)
Vorkommen von Enteritis-Salmonellen beim Menschen
Deutsche Tierärztliche Wochenschrift 100, 255-258

- Larkin, L. L.; Vasavada, P. C.; Marth, E.H. (1991)
Incidence of *Campylobacter jejuni* in raw milk as related to its quality
Milchwissenschaft 46, 428-430
- Le Minor, L. (1984)
Section 5: Facultative anaerobic gram-negative rods - Family I: Enterobacteriaceae - Genus III: Salmonella
in *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, S. 427 ff.
Williams & Wilkins, Baltimore (USA), 1984
- Lecos, C. (1986)
Of microbes and milk: probing America's worst Salmonella outbreak
Dairy and Food Sanitation 6, 136-140
- Levy, A. J. (1946)
A gastroenteritis outbreak probably due to a bovine strain of *Vibrio*
Yale Journal of Biology and Medicine 18, 243
- Loewenherz, K. (1995)
Untersuchungen zum Vorkommen von *Campylobacter jejuni* in verschiedenen Lebensmitteln tierischen Ursprungs
Berlin: Freie Universität, Fachbereich Veterinärmedizin, Dissertation
- Logan, E. F.; Neill, S. D.; Mackie, D. P. (1982)
Mastitis in dairy cows associated with an aerotolerant campylobacter
The Veterinary Record 110, 229-230
- Lopes, H. R.; Noletto, A. L. S.; de Las Heras, M. D.; Bergdoll, M. S. (1993)
Selective enterotoxin production in foods by *Staphylococcus aureus* strains that produce more than one enterotoxin
Journal of Food Protection 56, 538-540
- Lovett, J.; Francis, D. W.; Hunt, J. M. (1983)
Isolation of *Campylobacter jejuni* from raw milk
Applied and Environmental Microbiology 46, 459-462
- Lovett, J.; Francis, D. W.; Hunt, J. M. (1987)
Listeria monocytogenes in raw milk: detection, incidence, and pathogenicity
Journal of Food Protection 50, 188-192
- Machado, A. (1993)
Prevalence of *Staphylococcus aureus* in raw milk and possibility of toxin production
FU Berlin; Institut für Tropenveterinärmedizin; Master of Science-Arbeit
- Magruder, G. L. (1910)
Further observations on the milk supply of Washington, DC
Journal of the American Medical Association 55, 581-589

- Massa, S.; Cesaroni, D.; Poda, G.; Trovatelli, L. D. (1990)
The incidence of *Listeria* spp. in soft cheeses, butter and raw milk in the province of Bologna
Journal of Applied Bacteriology 68, 153-156
- Mayr, Anton (Hrsg.) (1984)
Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre für Tierärzte, Biologen und Agrarwissenschaftler
Stuttgart: Enke, 1984
- McEwen, S. A.; Martin, S. W.; Clarke, R. C.; Tamblyn, S. E. (1988)
A prevalence survey of salmonella in raw milk in Ontario, 1986-87
Journal of Food Protection 51, 963-965
- McNaughton, R. D.; Leyland, R.; Mueller, L. (1982)
Outbreak of *Campylobacter* enteritis due to consumption of raw milk
Canadian Medical Association Journal 126, 657-658
- MERCK (1992)
Microbiology Manual
E. Merck, Darmstadt
- Moura, S. M.; Destro, M. T.; Franco, B. D. G. M. (1993)
Incidence of *Listeria* species in raw and pasteurized milk produced in Sao Paulo, Brazil
International Journal of Food Microbiology 19, 229-237
- Niskanen, A.; Koiranen, L. (1977)
Correlation of enterotoxin and thermonuclease production with some physiological and biochemical properties of staphylococcal strains isolated from different sources
Journal of Food Protection 40, 543-548
- Olsvik, O.; Berdal, B.; Fossum, K.; Omland, T. (1981)
Enterotoxin production by *Staphylococcus aureus* related to the origin of the strains
Acta Pathologica et Microbiologica Scandinavia Sect. B. 89, 423-426
- Ombui, J. N.; Arimi, S. M.; Kayihura, M. (1992)
Raw milk as a source of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* and enterotoxins in consumer milk
East African Medical Journal 69, 123-125
- Oosterom, J.; Engels, G. B.; Peters, R.; Pot, R. (1982)
Campylobacter jejuni in cattle and raw milk in the Netherlands
Journal of Food Protection 45, 1212-1213

- Orr, K. E.; Lightfoot, N. F.; Sisson, P. R.; Harkis, B. A.; Tweddle, J. L.; Boyd, P.; Carrol, A.; Jackson, C. J.; Wareing, D. R. A.; Freeman, R. (1995)
Direkt milk excretion of *Campylobacter jejuni* in a dairy cow causing cases of human enteritis
Epidemiology and Infection 114, 15-24
- Otsuka, G.; Umeki, F.; Seki, M.; Yoshida, M.; Yosai, A.; Takeishi, M. (1992)
Evaluation of biological character and pathogenicity of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine quarter milk
Milchwissenschaft 47, 423-426
- OXOID Handbuch (1993)
5. aktualisierte deutsche Auflage
Unipath GmbH, Wesel
- Pastoni, F.; Marengo, G.; Bignami, M. E.; Malaspina, C.; Marengo, C.; Cavedoni, L.; Viola, L. (1992)
The infection of food by *Campylobacter jejuni*: study on the paths of diffusion to man
Proceedings of the 3rd World Congress Foodborne Infections and Intoxications;
16 - 19 June 1992, Berlin; 1, 147-150
- Porter, I. A.; Reid, T. M. S. (1980)
A milk-borne outbreak of *Campylobacter* infection
Journal of Hygiene, Cambridge 84, 415-419
- Potel, J. (1953-1954)
Wissenschaftliche Zeitschrift der Martin-Luther-Universität, Halle-Wittenberg 3, 341
(zitiert nach GITTER et al. (1980))
- Potter, M. E.; Blaser, M. J.; Sikes, R. K.; Kaufmann, A. F.; Wells, J. G. (1983)
Human *Campylobacter* infection associated with certified raw milk
American Journal of Epidemiology 117, 475-483
- Potter, M. E.; Kaufmann, A. F.; Blake, P. A.; Feldman, R. A. (1984)
Unpasteurized milk - the hazards of a health fetish
Journal of the American Medical Association 252, 2050-2054
- Pschyrembel, W. (Hrsg.) (1985)
Klinisches Wörterbuch
Berlin: de Gruyter
- Rea, M. C.; Cogan, T. M.; Tobin, S. (1992)
Incidence of pathogenic bacteria in raw milk in Ireland
Journal of Applied Bacteriology 73, 331-336

- Reilly, W. J.; Sharp, J. C. M.; Forbes, G. I.; Paterson, G. M. (1983)
Milkborne salmonellosis in Scotland 1980 to 1982
The Veterinary Record 112, 578-580
- Robinson, D. A.; Edgar, W. J.; Gibson, G. L.; Matchett, A. A.; Robertson, L. (1979)
Campylobacter enteritis associated with consumption of unpasteurised milk
British Medical Journal 1, 1171-1173
- Robinson, D. A. (1981)
Infective dose of Campylobacter jejuni in milk
British Medical Journal 282, 1584
- Robinson, D. A.; Jones, D. M. (1981)
Milk-borne campylobacter infection
British Medical Journal 282, 1374-1376
- Rosef, O.; Gondrosen, B.; Kapperud, G.; Underdal, B. (1983)
Isolation and characterization of Campylobacter jejuni and Campylobacter coli from domestic and wild mammals in Norway
Applied and Environmental Microbiology 46, 855-859
- Sachs, L. (Hrsg.) (1992)
Angewandte Statistik
Springer-Verlag, Berlin - Heidelberg, 1992
- Sanaa, M.; Poutrel, B.; Menard, J. L.; Serieys, F. (1993)
Risk factors associated with contamination of raw milk by Listeria monocytogenes in dairy farms
Journal of Dairy Science 76, 2891-2898
- Sander, J. (1993)
Pathogenese der Salmonella-Infektion des Menschen
Deutsche Tierärztliche Wochenschrift 100, 283-285
- Schäfer, G. (1994)
Rückblick: Der deutsche Milchmarkt 1993
dmz Lebensmittelindustrie und Milchwirtschaft 115, 46-48
- Scheirle, U. (1988)
Zum Vorkommen von Campylobacter und Salmonellen in Rohmilch
Ludwig-Maximilian-Universität München, Dissertation
- Schulz, G. (1967)
Untersuchungen über das Vorkommen von Listerien in Rohmilch
Monatshefte für Veterinärmedizin 22, 766-768

- Seeliger, H. P. R.; Jones, D. (1984)
Section 14: Regular, nonsporing, gram-positive rods - Genus *Listeria*
in Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, S. 1235 ff.
Williams & Wilkins, Baltimore (USA), 1984
- Seeliger, H. P. R.; Donker-Voet, J. (1987)
Serovars of the genus *Listeria* - Paterson's scheme
in Seeliger, H. P. R.
Classification and pathogenicity of *Listeria*
Listeriosis - Joint WHO/ROI Consultation on Prevention and Control; Berlin (West),
10-12 December 1986
Vetmed-Hefte 5, 56-62
- Skirrow, M. B. (1982)
Campylobacter enteritis - the first five years
Journal of Hygiene, Cambridge 89, 175-184
- Slade, P. J.; Fistrovici, E. C.; Collins-Thompson, D. L. (1989)
Persistence at source of *Listeria* spp. in raw milk
International Journal of Food Microbiology 9, 197-203
- Stajner, B. A. (1971)
Excretion of *Listeria* in the milk of infected cows
Acta Veterinaria, Beograd 21, 217-224
- Suhren, G.; Heeschen, W. (1992)
Zur bakteriologischen und zytologischen Beschaffenheit roher (Erzeuger- und Vorstape-
lebene) und wärmebehandelter Milch in der Bundesrepublik Deutschland
Kieler Milchwirtschaftliche Forschungsberichte 44/2, 83-102
- Swibert, R. M. (1984)
Section 2: Aerobic / microaerophilic, motile, helical / vibroid gram-negative bacteria -
Genus *Campylobacter*
in Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, S. 111 ff.
Williams & Wilkins, Baltimore (USA), 1984
- Tacket, C. O.; Dominguez, L. B.; Fisher, H. J.; Cohen, M. L. (1985)
An outbreak of multiple-drug-resistant *Salmonella enteritis* from raw milk
Journal of the American Medical Association 253, 2058-2060
- Taylor, P. R.; Weinstein, W. M.; Bryner, J. H. (1979)
Campylobacter fetus infection in human subjects: association with raw milk
The American Journal of Medicine 66, 779-783
- Terplan, G.; Schoen, R.; Springmeyer, W.; Degle, I.; Becker, H. (1986)
Listeria monocytogenes in Milch und Milchprodukten
dmz Deutsche Molkerei-Zeitung 41, 1358-1368

- Teufel, P. (1994)
Änderungsvorschlag zur Untersuchung und Bewertung von *Listeria monocytogenes* in der amtlichen Lebensmittelüberwachung
Ergebnisprotokoll der 47. Arbeitstagung des Arbeitskreises Lebensmittelhygienischer Tierärztlicher Sachverständiger (ALTS) vom 21.-23.6.1994 in Berlin, S. 59-61
- Teufel, P.; Bendzulla, C. (1995)
Bundesweite Erhebung zum Vorkommen von *Listeria monocytogenes* in Lebensmitteln - Abschlußbericht
Fachgebiet Mikrobiologie und Hygiene - Fachbereich Hygiene der Lebensmittel und Bedarfsgegenstände des Bundesinstitutes für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin (BgVV); persönliche Mitteilung
- Tolle, A. (1981)
The bacteriological quality of raw milk. Public health aspects
Kieler Milchwirtschaftliche Forschungsberichte 33, 281-288
- Tolle, A. (1984)
Rohmilch - Gesundheitliche Risiken des Verzehrs
Die Molkerei-Zeitung Welt der Milch 38, 961-965
- Tosh, F. E.; Mullen, G. A.; Wilcox, D. E. (1981)
Outbreak of *Campylobacter enteritis* associated with raw milk - Kansas
Morbidity and Mortality Weekly Report 30, 218-220
- Tranter, H. S. (1990)
Foodborne illness - foodborne staphylococcal illness
The Lancet 336, 1044-1046
- Waterman, S. C.; Park, R. W. A.; Bramley, A. J. (1984)
A search for the source of *Campylobacter jejuni* in milk
Journal of Hygiene, Cambridge 92, 333-337
- Wegmüller, B.; Lüthy, J.; Candrian, U. (1993)
Direct polymerase chain reaction detection of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in raw milk and dairy products
Applied and Environmental Microbiology 59, 2161-2165
- Weik, D.; Kaufmann, U. (1991)
Campylobacter jejuni in Rohmilch
Schweizerische Milchwirtschaftliche Forschung 20, 30-32
- Wendt, K.; Mielke, H.; Fuchs, H.-W. (Hrsg.) (1986)
Euterkrankheiten
VEB Gustav Fischer Verlag, Jena, 1986

Wieneke, A. A. (1991)

Comparison of four kits for the detection of staphylococcal enterotoxin in foods from outbreaks of food poisoning

International Journal of Food Microbiology 14, 305-312

Wnorowski, T. (1990)

The prevalence of Listeria species in raw milk from the Transvaal region

Suid-Afrikaanse Tydskrif vir Suiwelkunde 22, 15-21

Wood, R. C.; MacDoanld, K. L.; Osterholm, M. T. (1992)

Campylobacter enteritis outbreaks associated with drinking raw milk during youth activities

Journal of the American Medical Association 268, 3228-3230

Wramby, G. O. (1944)

Skandinavisk Veterinärtidshrift 34, 277

(zitiert nach GITTER et al. (1980))

World Health Organization, WHO (1988)

Foodborne Listeriosis Report of the WHO

Informal Working Group on Foodborne Listeriosis, Geneva, 15-19 February 1988

World Health Organization, WHO (1994)

Foodborne disease outbreaks by food involved (Germany 1992 - 1994)

WHO-Surveillance Programme for Control of Foodborne Infections and Intoxications in Europe

Rechtsvorschriften

Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 35 des Lebensmittel- und Bedarfsgegenständegesetz (LMBG)

Untersuchung von Lebensmitteln

Loseblattsammlung, Hrsg: Beuth Verlag in der jeweils letzten gültigen Fassung

Amtsblatt der Europäischen Gemeinschaften (1985)

Richtlinie 85/397/EWG des Rates vom 24. August 1985

Amtsblatt der Europäischen Gemeinschaften, 28, Nr. L 226/13 - L 226/32

Amtsblatt der Europäischen Gemeinschaften (1992)

Richtlinie 92/46/EWG des Rates vom 16. Juni 1992

Amtsblatt der Europäischen Gemeinschaften, 35, Nr. L 268/1 - L 268/32

Gesetz über den Verkehr mit Lebensmitteln, Tabakerzeugnissen, kosmetischen Mitteln und sonstigen Bedarfsgegenständen (Lebensmittel- und Bedarfsgegenständegesetz) in der Fassung vom 8.7.1993

Loseblattsammlung

Milch-Güteverordnung (1980)

Verordnung über die Güteprüfung und Bezahlung der Anlieferungsmilch vom 9. Juli 1980

Fassung vom 27. 12. 1993 im Bundesgesetzblatt I, Nr. 74 vom 31. 12. 1993, S. 2481

Milchverordnung (1989)

Verordnung über Hygiene- und Qualitätsanforderungen an das Gewinnen, Behandeln und Inverkehrbringen von Milch vom 23. 6. 1989

Fassung vom 27. 4. 1993 im Bundesgesetzblatt I, Nr. 17 vom 30. 4. 1993, S. 512-555

Milchverordnung (1995)

Verordnung über Hygiene- und Qualitätsanforderungen an Milch und Erzeugnisse auf Milchbasis vom 24. 4. 1995

Bundesgesetzblatt I, Nr. 21 vom 3.5. 1995, S. 544-576

Verordnung zum Schutz gegen die Salmonellose der Rinder (Rinder-Salmonellose-Verordnung) vom 6. Januar 1972 in der Fassung vom 14. November 1991

Bundesgesetzblatt I (1991), S. 2118

8 Anhang

Statistischer Anhang:

Abbildung 4: Beziehung zwischen der Zahl coliformer Keime und der aeroben Gesamtkeimzahl (Seite 103)

Abbildung 5: Beziehung zwischen der Zahl Koagulase-positiver Staphylokokken und der aeroben Gesamtkeimzahl (Seite 103)

Abbildung 6: Beziehung zwischen der Zahl Koagulase-positiver Staphylokokken und der Zahl coliformer Keime (Seite 104)

Abbildung 7: Beziehung zwischen der aeroben Gesamtkeimzahl und der Anlieferungsmenge (Seite 104)

Abbildung 8: Beziehung zwischen der aeroben Gesamtkeimzahl und der Milchttemperatur bei der Probenahme (Seite 105)

Abbildung 9: Beziehung zwischen der Zahl coliformer Keime und der Anlieferungsmenge (Seite 105)

Abbildung 10: Beziehung zwischen der Zahl coliformer Keime und der Milchttemperatur (Seite 106)

Abbildung 11: Beziehung zwischen der Zahl Koagulase-positiver Staphylokokken und der Anlieferungsmenge (Seite 106)

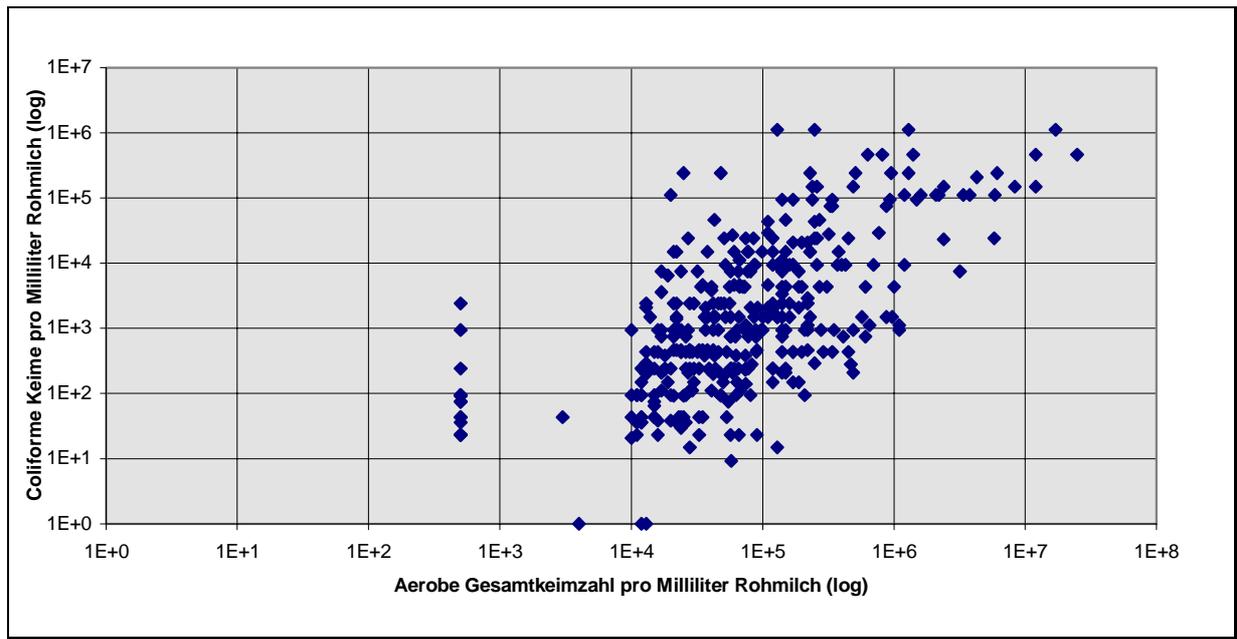
Abbildung 12: Beziehung zwischen der Zahl Koagulase-positiver Staphylokokken und der Milchttemperatur (Seite 107)

Tabellarischer Anhang:

Tabelle 17: Ergebnisse der Untersuchung von 415 Rohmilchproben (Seite 108 - 122)

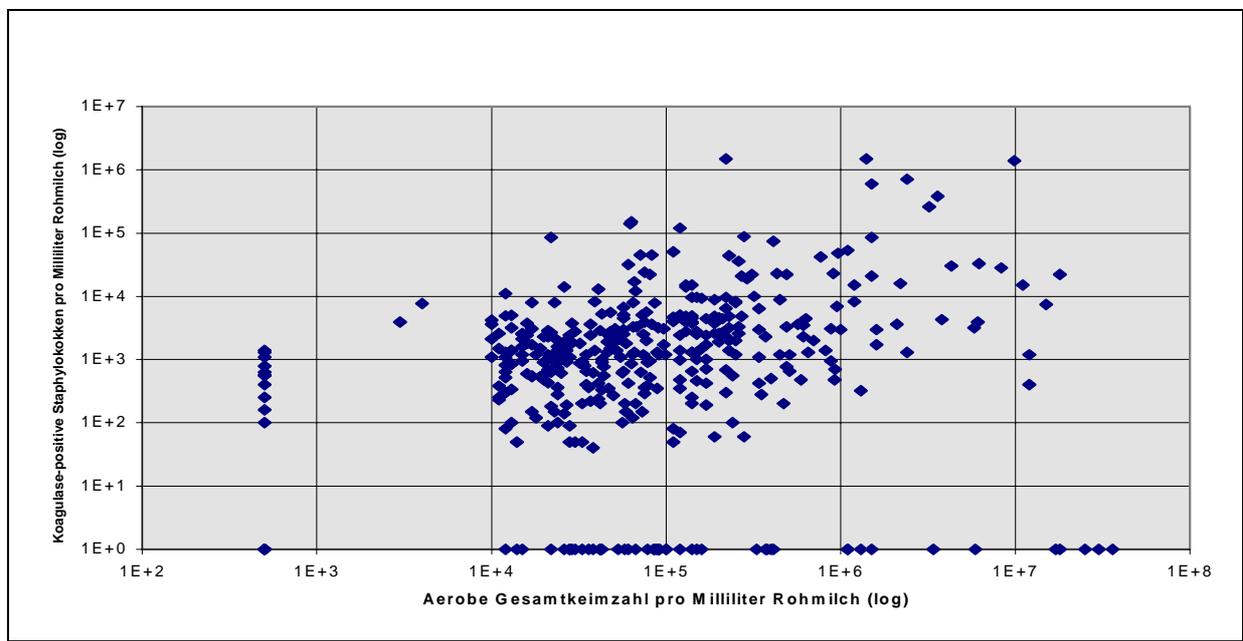
Tabelle 18: Differenzierung der isolierten Listerien-Stämme (Seite 123 - 124)

Abbildung 4: Beziehung zwischen der Zahl coliformer Keime und der aeroben Gesamtkeimzahl



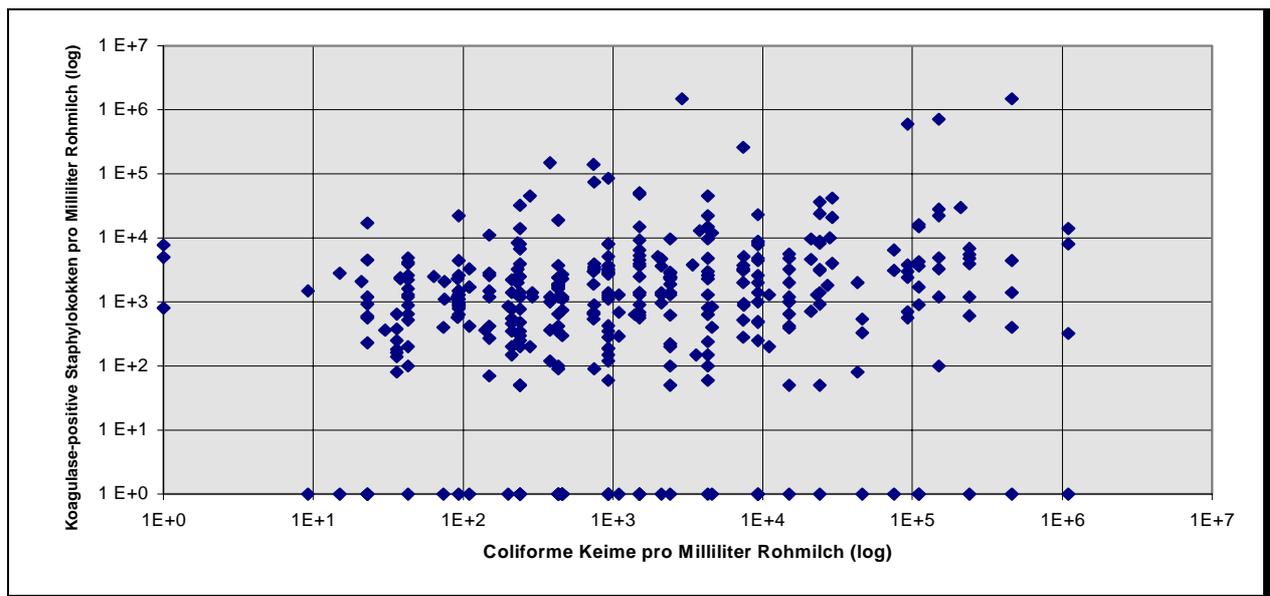
Aus der großen Streuung der Ergebnisse und dem Wert des Korrelationskoeffizienten $r = 0,44$ ist ersichtlich, daß eine statistische Korrelation zwischen der aeroben Gesamtkeimzahl und dem Gehalt an coliformen Keimen nicht besteht.

Abbildung 5: Beziehung zwischen der Zahl Koagulase-positiver Staphylokokken und der aeroben Gesamtkeimzahl



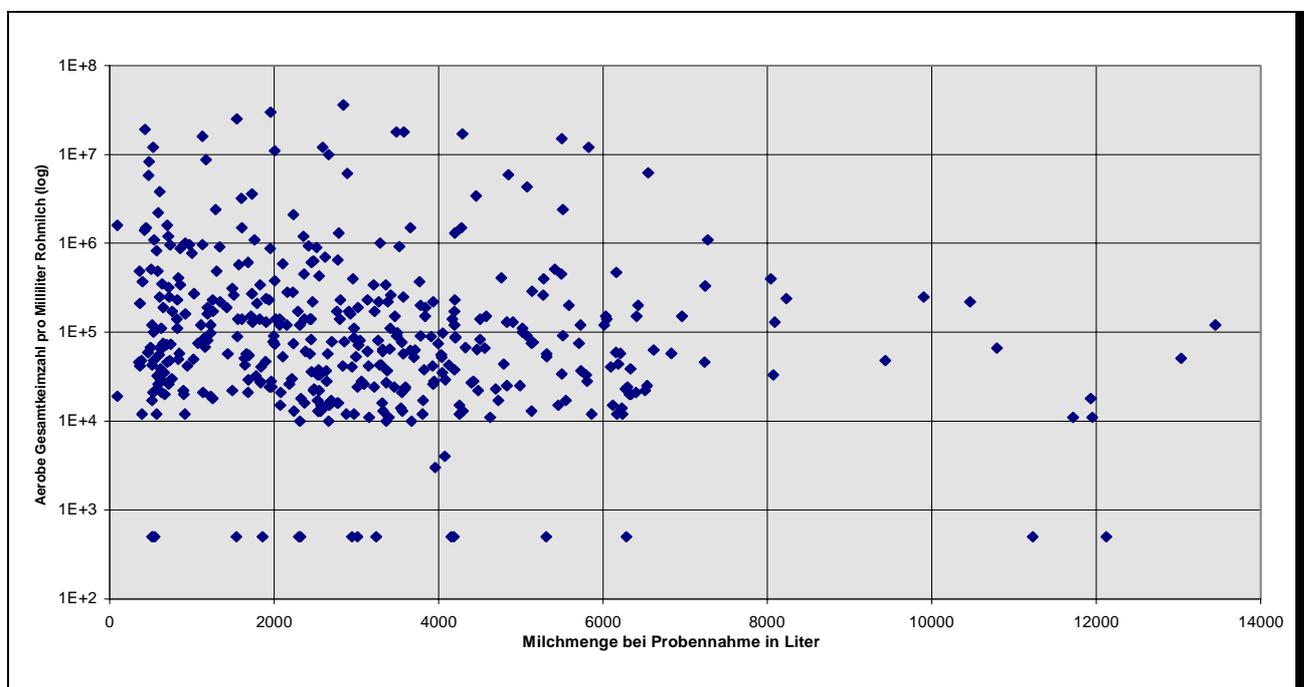
Aus der großen Streuung der Ergebnisse und dem Wert des Korrelationskoeffizienten $r = 0,19$ ist ersichtlich, daß eine statistische Korrelation zwischen der aeroben Gesamtkeimzahl und der Zahl Koagulase-positiver Staphylokokken nicht besteht.

Abbildung 6: Beziehung zwischen der Zahl Koagulase-positiver Staphylokokken und der Zahl coliformer Keime



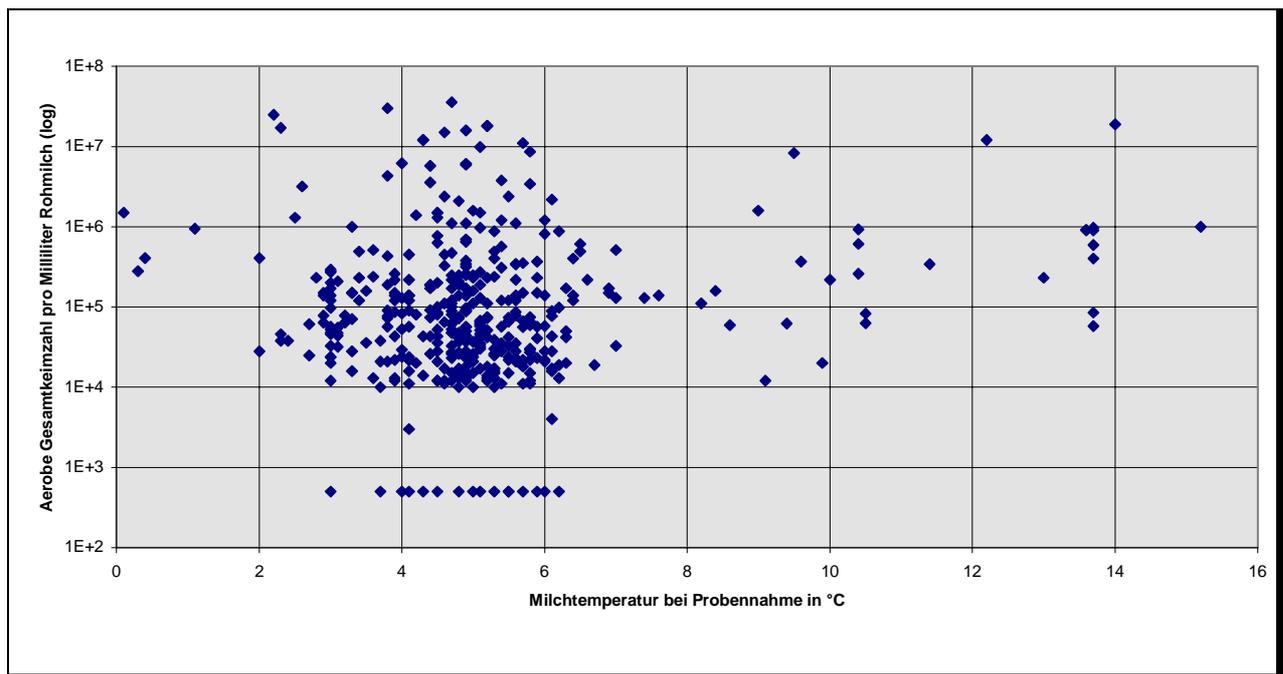
Aus der großen Streuung der Ergebnisse und dem Wert des Korrelationskoeffizienten $r = 0,12$ ist ersichtlich, daß eine statistische Korrelation zwischen der Zahl Koagulase-positiver Staphylokokken und der Zahl coliformer Keimen nicht besteht.

Abbildung 7: Beziehung zwischen der aeroben Gesamtkeimzahl und der Anlieferungsmenge



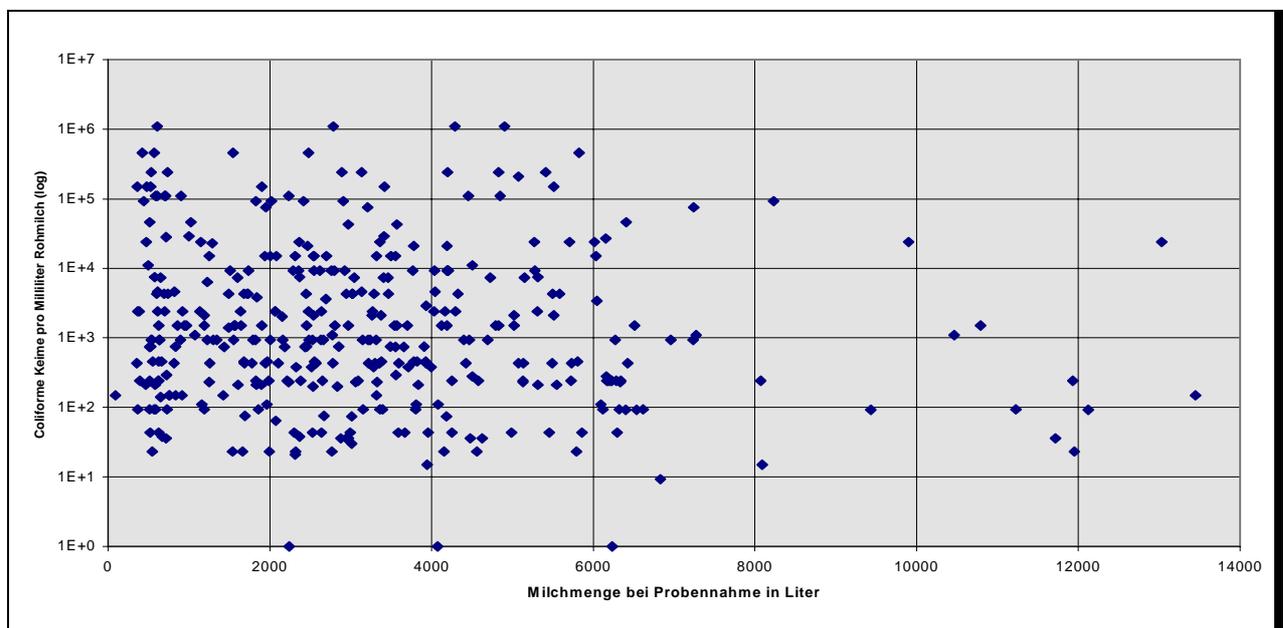
Aus der großen Streuung der Ergebnisse und dem Wert des Korrelationskoeffizienten $r = -0,58$ ist ersichtlich, daß eine statistische Korrelation zwischen der Anlieferungsmenge und der aeroben Gesamtkeimzahl nicht besteht.

Abbildung 8: Beziehung zwischen der aeroben Gesamtkeimzahl und der Milchtemperatur bei der Probenahme



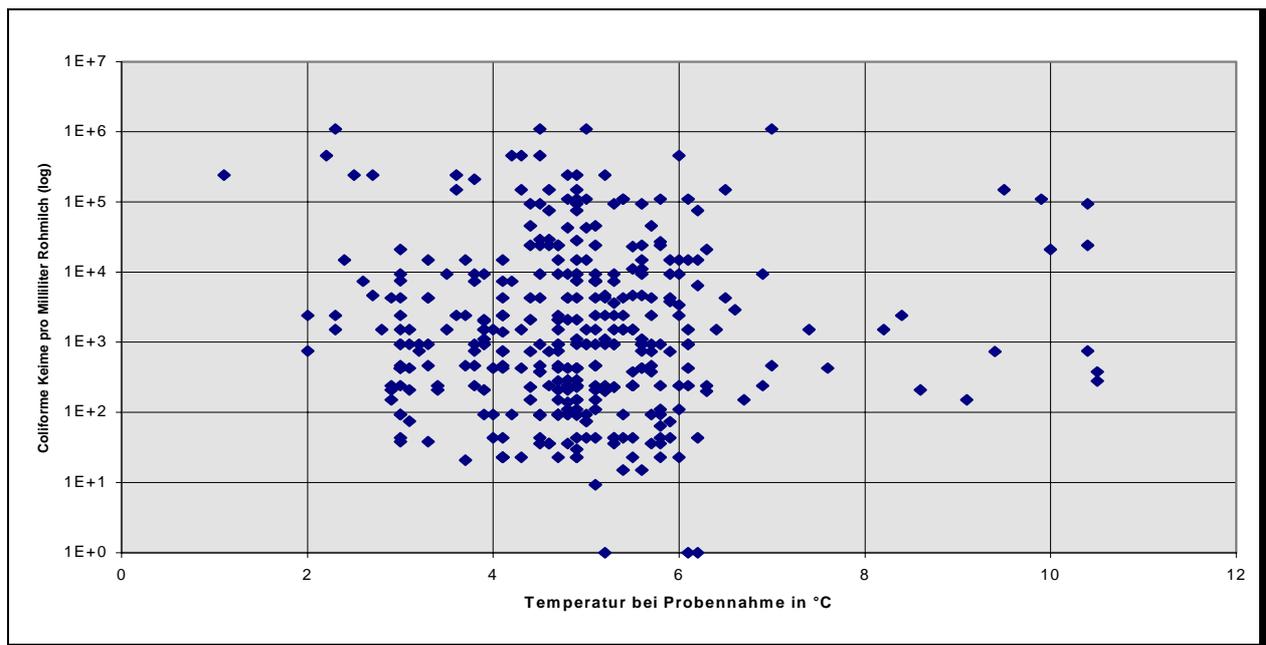
Aus der großen Streuung der Ergebnisse und dem Wert des Korrelationskoeffizienten $r = 0,03$ ist ersichtlich, daß eine statistische Korrelation zwischen der aeroben Gesamtkeimzahl und der Temperatur nicht besteht.

Abbildung 9: Beziehung zwischen der Zahl coliformer Keime und der Anlieferungsmenge



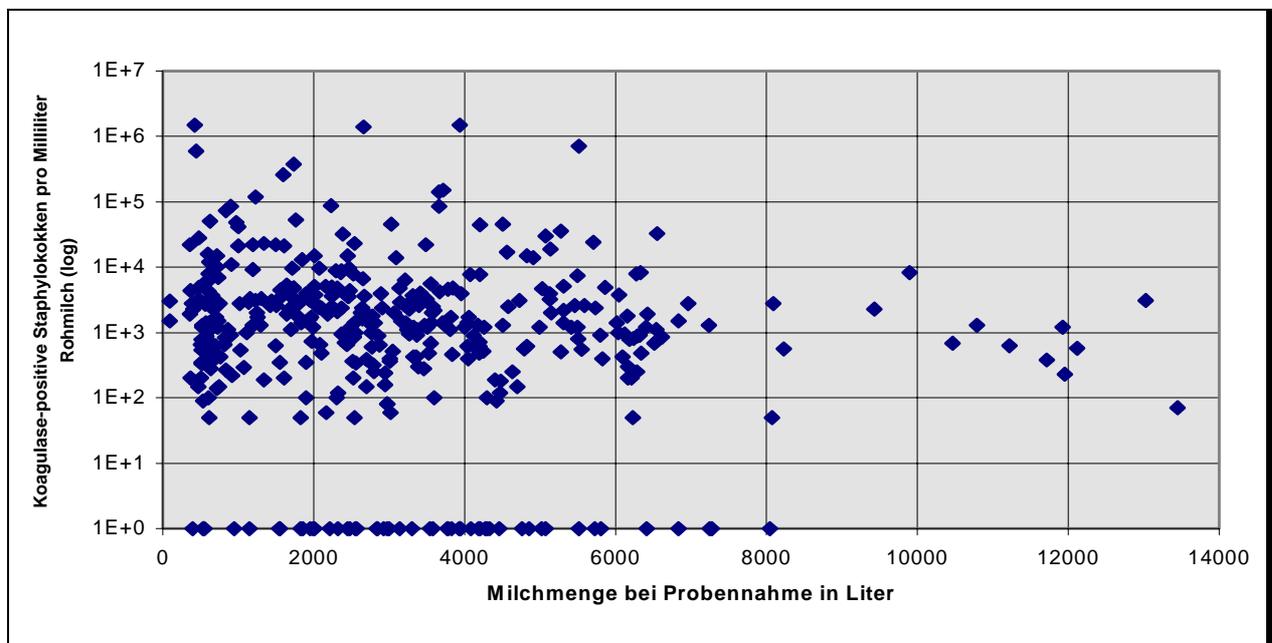
Aus der großen Streuung der Ergebnisse und dem Wert des Korrelationskoeffizienten $r = -0,04$ ist ersichtlich, daß eine statistische Korrelation zwischen der Zahl coliformer Keime und der Anlieferungsmenge nicht besteht.

Abbildung 10: Beziehung zwischen der Zahl coliformer Keime und der Milchttemperatur bei der Probenahme



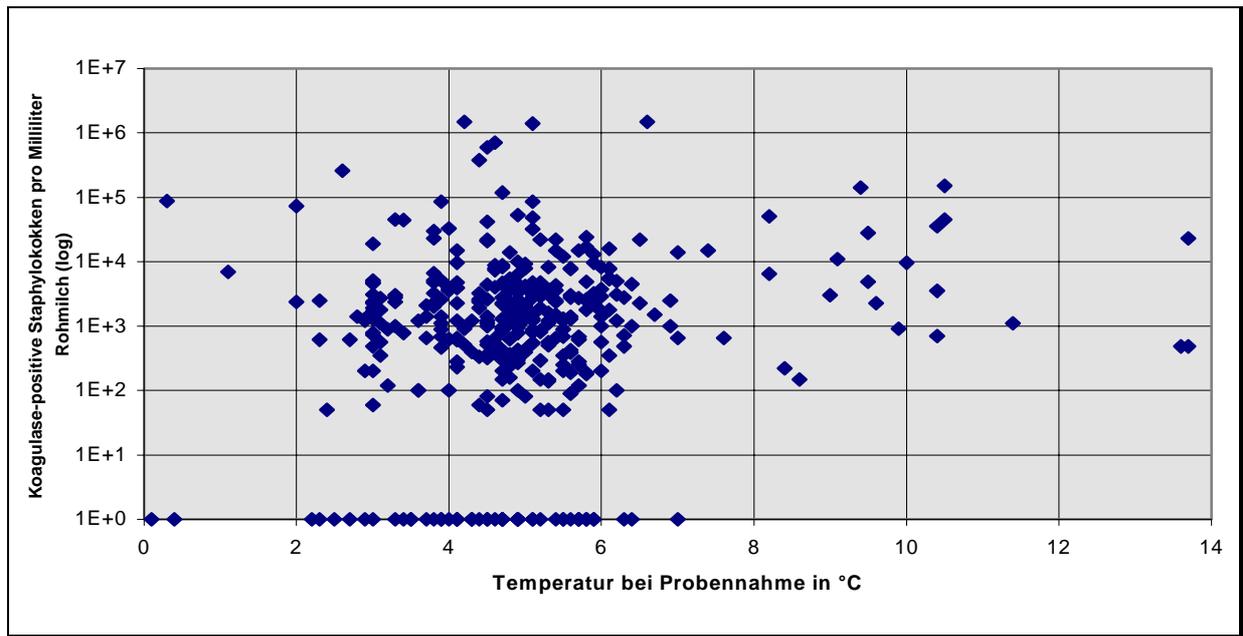
Aus der großen Streuung der Ergebnisse und dem Wert des Korrelationskoeffizienten $r = -0,04$ ist ersichtlich, daß eine statistische Korrelation zwischen der Zahl coliformer Keime und der Temperatur nicht besteht.

Abbildung 11: Beziehung zwischen der Zahl Koagulase-positiver Staphylokokken und der Anlieferungsmenge



Aus der großen Streuung der Ergebnisse und dem Wert des Korrelationskoeffizienten $r = -0,05$ ist ersichtlich, daß eine statistische Korrelation zwischen der Zahl Koagulase-positiver Staphylokokken und der Milchmenge nicht besteht.

Abbildung 12: Beziehung zwischen der Zahl Koagulase-positiver Staphylokokken und der Milchtemperatur bei der Probenahme



Aus der großen Streuung der Ergebnisse und dem Wert des Korrelationskoeffizienten $r = 0,02$ ist ersichtlich, daß eine statistische Korrelation zwischen der Zahl Koagulase-positiver Staphylokokken und der Temperatur nicht besteht.

Anmerkung: Die Berechnung der Korrelation erfolgt nach der Formel für den Produkt-Moment-Korrelationskoeffizienten (SACHS, 1992, S. 490 ff.)

Tabelle 17: Ergebnisse der Untersuchung von 415 Rohmilchproben

Untersuchungsnummer	Liefernummer des Betriebes	Abgabe Liter	Entnahmedatum	Lagerdauer in Tagen	Temperatur in °C	Gesamtkeimzahl /ml *	Coliforme /ml	Listeria-Spezies	Listeriengehalt /ml	Koagulase-positive Staph. /ml
8	33	92	11.06.1993	1	9	1,60E+6				3,00E+3
9	33	3523	11.06.1993	1	13,6	9,20E+5				4,80E+2
10	32	2105,1	11.06.1993	1	13,7	5,90E+5				4,80E+2
11	38	1335,9	11.06.1993	1	13,7	9,10E+5		innocua/murrayi	< 100	2,30E+4
12	43	429,6	11.06.1993	1	14	1,90E+7		monocytogenes	200	
13	29	1128,2	11.06.1993	1	4,9	1,60E+7				
14	25	2516,8	11.06.1993	1	13,6	9,00E+5				
15	27	1144,9	11.06.1993	1	13,7	8,50E+4				
16	26	920,3	11.06.1993	1	15,2	1,00E+6				
17	36	2959,6	11.06.1993	1	13,7	4,00E+5				
18	36	849,2	11.06.1993	1	13,7	5,80E+4				
19	34	822,4	11.06.1993	1	13	2,30E+5				
20	35	1130,8	11.06.1993	1	13,7	9,70E+5				
21	40	1175,1	11.06.1993	1	5,8	8,70E+6				
22	21	2590,6	11.06.1993	1	12,2	1,20E+7				
23	13	4198,7	20.06.1993	1	3,4	2,30E+5				4,40E+4
24	14	2229,3	20.06.1993	1	0,3	2,80E+5				8,80E+4
25	55	4279,2	20.06.1993	1	0,1	1,50E+6				negativ
26	56	4760,3	20.06.1993	1	0,4	4,10E+5				negativ
27	12	3841,9	20.06.1993	1	3,8	1,90E+5				4,80E+3
28	1	3486,9	19.06.1993	2	5,2	1,80E+7				2,20E+4
29	2	2008,1	19.06.1993	2	5,7	1,10E+7				1,50E+4
30	8	1733,3	19.06.1993	2	4,4	3,60E+6				3,80E+5
31	9	2661,4	19.06.1993	2	5,1	9,90E+6				1,40E+6
32	49	1761,1	19.06.1993	2	4,9	1,10E+6		monocytogenes	100	5,30E+4
33	46	8042,5	19.06.1993	2	6,4	4,00E+5				negativ

* die Angaben sind wie folgt zu lesen: 1,60E+6 = 1,6 x 10⁶ koloniebildende Einheiten pro Milliliter

Untersuchungsnummer	Liefernummer des Betriebes	Abgabe Liter	Entnahmedatum	Lagerdauer in Tagen	Temperatur in °C	Gesamtkeimzahl /ml *	Coliforme /ml	Listeria-Spezies	Listeriengehalt /ml	Koagulase-positive Staph. /ml
34	33	3812,8	27.06.1993	1	4,8	1,70E+4	110			1,70E+3
35	32	1962,1	27.06.1993	1	6	2,80E+4	110			1,70E+3
36	38	1230,2	27.06.1993	1	4,7	1,20E+5				1,20E+5
37	43	401,9	27.06.1993	1	9,6	3,70E+5		monocytogenes	< 100	2,30E+3
38	29	1071,8	27.06.1993	1	5,2	7,50E+4	1100	monocytogenes	< 100	2,90E+2
39	25	2449,7	27.06.1993	1	4	8,30E+4				3,60E+3
40	27	1160,5	27.06.1993	1	5,1	6,80E+4	110			3,30E+3
41	26	861,9	27.06.1993	1	11,4	3,40E+5				1,10E+3
42	36	4051,4	27.06.1993	1	4,9	9,70E+4				1,70E+3
43	34	1018,3	27.06.1993	1	6,3	5,00E+4				2,80E+3
44	40	501,6	27.06.1993	1	7	5,10E+5				6,50E+2
45	35	1108,8	27.06.1993	1	6,4	1,20E+5				9,90E+2
46	1	3577,9	03.07.1993	2	5,2	1,80E+7				negativ
47	2	1599,5	03.07.1993	2	2,6	3,20E+6	7400			2,60E+5
48	8	1957,7	03.07.1993	2	3,8	3,00E+7				negativ
49	9	2840,8	03.07.1993	2	4,7	3,60E+7				negativ
50	49	1609,2	03.07.1993	2	4,5	1,50E+6		monocytogenes	550	2,10E+4
51	46	7274,1	03.07.1993	1	5,6	1,10E+6	1100	monocytogenes	< 100	negativ
52	62	6546,3	03.07.1993	2	4	6,20E+6				3,30E+4
53	44	712,9	03.07.1993	2	5,4	1,20E+6	110000			1,50E+4
54	39	591,8	03.07.1993	2	6,1	2,20E+6	110000			1,60E+4
55	59	4457,8	03.07.1993	2	5,8	3,40E+6	110000			negativ
56	60	3660,6	03.07.1993	2	5,1	1,50E+6				8,50E+4
57	61	5498,2	03.07.1993	2	4,6	1,50E+7				7,40E+3
58	39	611,2	17.07.1993	1	5,3	3,00E+4	2400			< 1E+2
59	59	4630,5	17.07.1993	1	5,7	1,10E+4	36			2,50E+2
60	60	3010,9	17.07.1993	2	4,9	2,40E+4	30			3,60E+2
61	61	6619	17.07.1993	1	4,7	6,30E+4	93			8,60E+2

* die Angaben sind wie folgt zu lesen: 1,60E+6 = 1,6 x 10⁶ Keime pro Milliliter

Untersuchungsnummer	Liefernummer des Betriebes	Abgabe Liter	Entnahmedatum	Lagerdauer in Tagen	Temperatur in °C	Gesamtkeimzahl /ml *	Coliforme /ml	Listeria-Spezies	Listeriengehalt /ml	Koagulase-positive Staph. /ml
62	13	3933,2	17.07.1993	1	6,6	2,20E+5	2900			1,50E+6
63	55	4328,1	17.07.1993	1	5,7	6,70E+4	4300			negativ
64	56	5130,5	17.07.1993	1	5,3	1,30E+4	230			3,20E+3
65	12	4186,5	17.07.1993	2	5,9	5,00E+2	74			negativ
66	8	1507,1	17.07.1993	1	3,9	2,60E+5	9300			2,60E+3
67	9	2623,1	17.07.1993	1	4,9	7,00E+5	9300			2,00E+3
68	49	1573,5	17.07.1993	1	5,4	5,70E+5	1500	monocytogenes	< 100	3,60E+3
69	46	7235,4	17.07.1993	1	5,1	4,60E+4	930	monocytogenes	< 100	1,30E+3
70	62	6539,5	23.07.1993	3	4,9	2,50E+4	92			1,10E+3
71	44	740,4	23.07.1993	3	5,2	7,30E+4	4300			1,50E+2
72	39	604,2	23.07.1993	3	4,9	5,60E+4	4300			1,00E+2
73	59	4479,4	23.07.1993	3	5,8	2,20E+4	36			1,80E+2
74	60	2948,5	23.07.1993	3	4,8	5,00E+2	36			1,60E+2
75	61	2948,5	23.07.1993	3	4,8	4,10E+4	4300			2,40E+2
76	72	12120	24.07.1993	2	4,5	5,00E+2	92			5,70E+2
77	72	11720	24.07.1993	2	4,6	1,10E+4	36			3,80E+2
78	70	5584,5	24.07.1993	2	4,5	2,00E+5	4300			2,60E+3
79	69	9432	24.07.1993	2	4,7	4,80E+4	92			2,30E+3
80	73	1249,7	24.07.1993	2	5,2	1,80E+4	230			
81	72	2969,1	24.07.1993	2	4,5	1,20E+4	36			< 1E+2
82	81	2357,7	01.08.1993	1	6	1,20E+6	9300			8,30E+3
83	82	531,7	01.08.1993	1	4,5	1,00E+5	930			negativ
84	70	4850,2	01.08.1993	1	4,9	5,90E+6	110000			negativ
85	69	9902,2	01.08.1993	1	4,7	2,50E+5	24000			8,20E+3
86	73	1494,3	01.08.1993	1	5,4	3,10E+5	4300			2,20E+4
87	72	13447	01.08.1993	1	4,7	1,20E+5	150			< 1E+2
88	62	6425,3	31.07.1993	2	4,8	2,00E+5	430			1,90E+3
89	44	605,4	31.07.1993	2	5,4	3,80E+6	110000			4,30E+3

* die Angaben sind wie folgt zu lesen: 1,60E+6 = 1,6 x 10⁶ koloniebildende Einheiten pro Milliliter

Untersuchungsnummer	Liefernummer des Betriebes	Abgabe Liter	Entnahmedatum	Lagerdauer in Tagen	Temperatur in °C	Gesamtkeimzahl /ml *	Coliforme /ml	Listeria-Spezies	Listeriengehalt /ml	Koagulase-positive Staph. /ml
90	39	702,2	31.07.1993	2	5	1,60E+6	110000			1,70E+3
91	59	4505,8	31.07.1993	2	5,6	1,40E+5	11000			1,30E+3
92	60	3062,6	31.07.1993	2	4,9	2,80E+4	230			2,00E+3
93	61	6410,5	31.07.1993	2	5,7	1,50E+5	46000			negativ
94	62	6184,9	08.08.1993	1	4,9	4,40E+4	240			7,80E+2
95	39	694	08.08.1993	1	4,8	7,20E+4	4300			6,30E+2
96	59	4422,8	08.08.1993	1	5,6	2,80E+4	430			< 1E+2
97	60	2672	08.08.1993	1	5	1,50E+4	75			2,10E+3
98	61	6016,8	08.08.1993	1	5,6	1,20E+5	24000			1,40E+3
99	24	575,3	08.08.1993	1	5,1	3,20E+4	7500			8,80E+2
100	68	4191,7	08.08.1993	1	6,3	1,70E+5	21000			7,10E+2
101	63	3240	08.08.1993	1	5,3	5,00E+2	930			1,10E+3
102	64	3149,9	08.08.1993	1	5,2	4,20E+4	930			2,90E+3
103	66	2304,6	08.08.1993	1	6,2	5,00E+2	43			1,00E+2
104	65	1827,4	08.08.1993	1	6,1	2,80E+4	240	monocytogenes	< 100	< 1E+2
105	67	4083,9	08.08.1993	1	5,8	2,90E+4	110			negativ
106	1	3137,4	14.08.1993	2	5,2	2,30E+5	240000			4,80E+3
107	2	1641,8	14.08.1993	2	5,2	5,10E+4	2400	monocytogenes	< 100	1,90E+3
108	8	1424,2	14.08.1993	2	4,4	1,90E+5	150			2,60E+3
109	9	2773,5	14.08.1993	2	4,9	6,50E+5	1100			1,30E+3
110	48	1780,6	14.08.1993	2	3,1	3,20E+4	430			1,80E+3
111	49	1690,8	14.08.1993	2	4	2,90E+4	430			3,70E+3
112	46	6511,1	14.08.1993	2	5,5	2,20E+4	1500			6,90E+2
113	10	3555	15.08.1993	1	6,1	7,70E+4	15000	monocytogenes	< 100	5,60E+3
114	11	3026,3	15.08.1993	1	3,3	7,10E+4	4300			4,50E+4
115	47	3013,3	15.08.1993	1	5	5,00E+2	74			4,00E+2
116	20	361,6	15.08.1993	1	6,5	4,90E+5	150000			2,20E+4
117	15	5731,4	15.08.1993	1	4,8	3,70E+4	430	monocytogenes	< 100	2,40E+3

* die Angaben sind wie folgt zu lesen: 1,60E+6 = 1,6 x 10⁶ koloniebildende Einheiten pro Milliliter

Untersuchungsnummer	Liefernummer des Betriebes	Abgabe Liter	Entnahmedatum	Lagerdauer in Tagen	Temperatur in °C	Gesamtkeimzahl /ml *	Coliforme /ml	Listeria-Spezies	Listeriengehalt /ml	Koagulase-positive Staph. /ml
118	62	6403,2	22.08.1993	1	4,5	2,10E+4	92			1,20E+3
119	44	715,2	22.08.1993	1	5,3	2,60E+4	36			1,40E+2
120	39	652,1	22.08.1993	1	4,8	7,50E+4	140			3,60E+2
121	59	4399,6	22.08.1993	1	5,8	2,70E+4	930			1,90E+2
122	60	2562,5	22.08.1993	1	4,9	1,30E+4	430			3,40E+2
123	61	6236	22.08.1993	1	5,2	1,20E+4	0			8,10E+2
124	24	500	22.08.1993	1	5,5	6,70E+4	11000			2,00E+2
125	23	2487,1	22.08.1993	1	4,9	2,30E+4	930			1,20E+3
126	68	4074,2	22.08.1993	1	6,1	4,00E+3	0			7,70E+3
127	63	3300	22.08.1993	1	4,3	4,30E+4	430			negativ
128	64	2875,8	22.08.1993	1	4,6	1,20E+4	36			6,40E+2
129	66	2241,8	22.08.1993	1	6,2	1,30E+4	0			5,00E+3
130	24	616,2	29.08.1993	1	5,5	6,70E+4	4600			1,20E+4
131	23	2381,3	29.08.1993	1	5,1	6,10E+4	240			3,20E+4
132	68	4157,3	29.08.1993	1	6	5,00E+2	23			5,60E+2
133	63	3152,2	29.08.1993	1	5,4	1,10E+4	93			1,50E+3
134	64	3093,6	29.08.1993	1	4,8	2,60E+4	240			1,40E+4
135	66	2073,2	29.08.1993	1	5,8	1,50E+4	64			2,50E+3
136	65	1857,3	29.08.1993	1	5,7	5,00E+2	93			negativ
137	67	3928,1	29.08.1993	1	5,1	4,20E+4	460			negativ
138	62	6322,6	29.08.1993	1	4,2	2,00E+4	93			9,10E+2
139	44	753	29.08.1993	1	5,1	3,00E+4	150			2,80E+3
140	39	662,5	29.08.1993	1	5,1	3,50E+4	460			1,20E+3
141	59	4562,3	29.08.1993	1	5,8	6,60E+4	23			1,70E+4
142	62	6162,3	18.09.1993	2	4,7	4,70E+5	280			2,00E+2
143	44	722,8	18.09.1993	2	4,9	2,50E+5	290			1,20E+3
144	39	652,3	18.09.1993	2	5,1	1,90E+5	7400			3,70E+3
145	59	4206,1	18.09.1993	2	5,6	8,60E+4	9300			7,80E+3

* die Angaben sind wie folgt zu lesen: 1,60E+6 = 1,6 x 10⁶ koloniebildende Einheiten pro Milliliter

Untersuchungsnummer	Liefernummer des Betriebes	Abgabe Liter	Entnahmedatum	Lagerdauer in Tagen	Temperatur in °C	Gesamtkeimzahl /ml *	Coliforme /ml	Listeria-Spezies	Listeriengehalt /ml	Koagulase-positive Staph. /ml
146	60	2320,3	18.09.1993	2	4,1	5,00E+2	23			negativ
147	61	6282,5	18.09.1993	2	5,5	5,00E+2	240			2,50E+2
148	81	2066,2	19.09.1993	1	5,4	1,20E+5	2400			2,40E+3
149	82	443,6	19.09.1993	1	4,5	1,50E+6	93000			6,00E+5
150	70	5073	19.09.1993	1	3,8	4,30E+6	210000			3,00E+4
151	69	10466	19.09.1993	1	3,9	2,20E+5	1100			6,90E+2
152	73	1995	19.09.1993	1	4,9	9,10E+4	23			1,20E+3
153	72	1538,5	19.09.1993	1	4,3	5,00E+2	23			negativ
154	81	1954,5	25.09.1993	2	6,2	8,80E+5	75000			3,10E+3
155	82	423,8	25.09.1993	2	4,2	1,40E+6	460000			1,50E+6
156	70	5510,8	25.09.1993	2	4,6	2,40E+6	150000			7,10E+5
157	69	10789	25.09.1993	2	5,5	6,60E+4	1500			1,30E+3
158	73	1837	25.09.1993	2	4,8	2,70E+4	210			1,40E+3
159	72	2016,3	25.09.1993	2	4,9	1,40E+5	93000			3,80E+3
160	72	13032	26.09.1993	1	5,1	5,10E+4	24000			3,10E+3
161	72	11930	26.09.1993	1	4,9	1,80E+4	240			1,20E+3
162	24	573,4	26.09.1993	1	4,7	1,20E+4	93			1,30E+3
163	23	2700,1	26.09.1993	1	5,6	7,80E+4	15000			3,90E+2
164	68	3945,4	26.09.1993	1	5,4	2,80E+4	15			negativ
165	63	3573,4	26.09.1993	1	5,4	5,70E+4	1500			2,50E+3
166	63	2547,4	10.10.1993	1	6	2,20E+4	15000			1,00E+3
167	23	3285,3	10.10.1993	1	4,5	4,30E+4	380			1,00E+3
168	32	1133,3	10.10.1993	1	6	2,10E+4	2400			2,90E+3
169	33	3366,4	10.10.1993	1	4,8	1,00E+4	93			1,10E+3
170	38	720	10.10.1993	1	4,9	3,20E+5	28000			1,00E+4
171	42	464	10.10.1993	1	8,6	5,90E+4	210			1,50E+2
172	29	1189,1	10.10.1993	1	5	1,60E+5	1500			9,30E+3
173	26	899,9	10.10.1993	1	9,9	2,00E+4	110000			9,10E+2

* die Angaben sind wie folgt zu lesen: 1,60E+6 = 1,6 x 10⁶ koloniebildende Einheiten pro Milliliter

Untersuchungsnummer	Liefernummer des Betriebes	Abgabe Liter	Entnahmedatum	Lagerdauer in Tagen	Temperatur in °C	Gesamtkeimzahl /ml *	Coliforme /ml	Listeria-Spezies	Listeriengehalt /ml	Koagulase-positive Staph. /ml
174	36	4203,9	10.10.1993	1	4,9	8,80E+4	9300			negativ
175	27	1249,7	10.10.1993	1	5	2,30E+5	15000			2,00E+3
176	25	2365,4	10.10.1993	1	4,6	4,50E+5	24000			8,90E+3
177	28	970	10.10.1993	1	5,1	9,70E+5	1500			4,80E+4
178	63	2633,3	17.10.1993	1	5	3,70E+4	930			2,20E+2
179	23	3219,8	17.10.1993	1	4,9	1,70E+5	430			1,90E+2
180	38	861,2	17.10.1993	1	5,3	8,80E+5	1500			9,50E+2
181	32	1224,9	17.10.1993	1	6,2	1,90E+4	6400			5,40E+2
182	33	3325,4	17.10.1993	1	4,8	1,30E+4	230			8,40E+2
183	36	3907,5	17.10.1993	1	4,7	8,90E+4	750			1,30E+3
184	26	922	17.10.1993	1	8,4	1,60E+5	2400			1,50E+3
185	27	1342,9	17.10.1993	1	5,6	2,20E+5	930			6,50E+3
186	25	2370,3	17.10.1993	1	4,9	1,40E+5	7500			4,90E+3
187	28	1026,8	17.10.1993	1	5,1	2,70E+5	46000			2,10E+4
188	41	821,5	17.10.1993	1	5,2	1,10E+5	4600			< 1E+2
189	29	1188,3	17.10.1993	1	4,8	1,90E+5	2100			8,90E+3
190	23	6833,1	24.10.1993	1	5,1	5,80E+4	9			negativ
191	42	623,4	24.10.1993	1	8,2	1,10E+5	1500			5,10E+4
192	43	481,4	24.10.1993	1	9,5	8,30E+6	150000			2,80E+4
193	28	997,5	24.10.1993	1	4,5	7,70E+5	29000			4,20E+4
194	29	1146,7	24.10.1993	1	4,5	8,50E+4	24000			negativ
195	25	2290,3	24.10.1993	1	4,7	1,70E+5	9300			4,40E+3
196	27	1290,7	24.10.1993	1	5,5	2,40E+6	23000			1,30E+3
197	26	814,2	24.10.1993	1	7,6	1,40E+5	430			6,50E+2
198	36	4038,7	24.10.1993	1	4,5	5,20E+4	9300			1,40E+3
199	32	2778,4	24.10.1993	1	6,1	1,60E+4	430			1,80E+3
200	72	11953	24.10.1993	1	4,1	1,10E+4	23			2,30E+2
201	72	11224	24.10.1993	1	4	5,00E+2	93			6,30E+2

* die Angaben sind wie folgt zu lesen: 1,60E+6 = 1,6 x 10⁶ koloniebildende Einheiten pro Milliliter

Untersuchungsnummer	Liefernummer des Betriebes	Abgabe Liter	Entnahmedatum	Lagerdauer in Tagen	Temperatur in °C	Gesamtkeimzahl /ml *	Coliforme /ml	Listeria-Spezies	Listeriengehalt /ml	Koagulase-positive Staph. /ml
202	8	1258,1	14.11.1993	1	3	1,70E+5	430			1,70E+3
203	9	2105,3	14.11.1993	1	3	5,30E+4	430			2,40E+3
204	56	3702	14.11.1993	1	3	5,20E+4	1500			1,40E+3
205	55	4193,3	14.11.1993	1	3	1,20E+5	9300	innocua/murrayi	< 100	4,80E+2
206	57	395,4	14.11.1993	1	3	1,20E+4	240			negativ
207	18	5140,1	14.11.1993	1	3	2,90E+5	430			1,90E+4
208	17	2527,2	14.11.1993	1	3	3,30E+4	43			2,00E+2
209	19	2163,3	14.11.1993	1	3	2,80E+5	930			< 1E+2
210	21	2314,6	14.11.1993	1	4,1	1,20E+5	15000			4,80E+3
211	76	5308,7	14.11.1993	1	3,7	5,00E+2	2400			1,40E+3
212	75	3540,4	14.11.1993	1	4,3	1,40E+4	1500			negativ
213	77	4580,7	14.11.1993	1	6,9	1,50E+5	240			2,50E+3
214	63	2760,1	21.11.1993	1	6,9	1,70E+5	9300			1,00E+3
215	23	3212,9	21.11.1993	1	4,9	3,40E+5	75000			6,40E+3
216	32	1491,4	21.11.1993	1	4,1	2,20E+4	1400			6,30E+2
217	33	2526,9	21.11.1993	1	6,1	1,70E+4	930			8,00E+3
218	50	3958,7	21.11.1993	1	4,1	3,00E+3	43			3,90E+3
219	53	4727,4	21.11.1993	1	5,3	1,70E+4	7400			3,10E+3
220	21	3657,3	21.11.1993	1	9,4	6,20E+4	740			1,40E+5
221	76	5273,3	21.11.1993	1	10,4	2,60E+5	24000			3,60E+4
222	75	3712,4	21.11.1993	1	10,5	6,30E+4	380			1,50E+5
223	77	4505,8	21.11.1993	1	10,5	8,30E+4	280			4,50E+4
224	80	2455,7	21.11.1993	1	10,4	6,10E+5	750			3,50E+3
225	78	912,2	21.11.1993	1	9,1	1,20E+4	150			1,10E+4
226	21	2156,8	28.11.1993	1	3,9	1,20E+5	2000			5,10E+3
227	76	5151,1	28.11.1993	1	3,8	7,70E+4	7400			2,00E+3
228	75	3803,8	28.11.1993	1	3,9	1,20E+4	93			1,10E+3
229	77	4251,7	28.11.1993	1	4,5	1,20E+4	43			5,20E+2

* die Angaben sind wie folgt zu lesen: 1,60E+6 = 1,6 x 10⁶ koloniebildende Einheiten pro Milliliter

Untersuchungsnummer	Liefernummer des Betriebes	Abgabe Liter	Entnahmedatum	Lagerdauer in Tagen	Temperatur in °C	Gesamtkeimzahl /ml *	Coliforme /ml	Listeria-Spezies	Listeriengehalt /ml	Koagulase-positive Staph. /ml
230	80	2324,4	28.11.1993	1	5,7	1,80E+4	380			1,20E+2
231	78	899	28.11.1993	1	3,9	2,20E+4	930			8,50E+4
232	8	1226,3	28.11.1993	1	3	9,70E+4	930			3,10E+3
233	9	1943,6	28.11.1993	1	3	2,40E+4	430			1,60E+3
234	56	3781,7	28.11.1993	1	3	2,00E+5	21000			4,60E+3
235	55	4170,5	28.11.1993	1	3	1,40E+5	2400	innocua/murrayi	< 100	1,30E+3
236	57	355,2	28.11.1993	1	3	4,60E+4	430			1,90E+3
237	18	5312,9	28.11.1993	1	3	5,70E+4	7500			5,10E+3
238	63	2692,8	05.12.1993	1	5,3	1,70E+4	3600			1,50E+2
239	23	3313,8	05.12.1993	1	5,3	1,60E+4	930			3,70E+3
240	32	1665,6	05.12.1993	1	4,9	5,70E+4	23			4,50E+3
241	33	2313,9	05.12.1993	1	3,7	1,00E+4	21			2,10E+3
242	50	3592,5	05.12.1993	1	5,9	2,30E+4	43			2,20E+3
243	53	5458,7	05.12.1993	1	4,9	1,50E+4	43			2,60E+3
244	1	1826,2	04.12.1993	2	5,6	3,40E+5	93000			3,00E+3
245	2	1735,2	04.12.1993	2	5,1	1,30E+5	9300			4,80E+3
246	6	518	04.12.1993	2	3	5,00E+2	93			7,90E+2
247	3	3391,2	04.12.1993	2	5,8	1,10E+4	93			2,60E+3
248	7	2215,3	04.12.1993	2	5,8	3,00E+4	240			negativ
249	13	2545,4	05.12.1993	1	3,8	4,30E+5	9300			2,30E+4
250	63	2652,6	09.01.1994	1	3,8	5,70E+4	240			6,70E+3
251	23	3411,5	09.01.1994	1	4,6	1,10E+5	29000			4,00E+3
252	32	1902,8	09.01.1994	1	4	1,30E+5	1500			3,90E+3
253	33	1842,4	09.01.1994	1	5,9	4,10E+4	3800			1,30E+4
254	51	2968,1	09.01.1994	1	3,9	8,60E+4	1500			negativ
255	52	517,1	09.01.1994	1	4,4	4,30E+4	46000			3,30E+2
256	53	6154,2	09.01.1994	1	5,8	5,90E+4	27000			1,80E+3
257	48	1608,7	09.01.1994	1	2,9	1,40E+5	210			2,00E+2

* die Angaben sind wie folgt zu lesen: 1,60E+6 = 1,6 x 10⁶ koloniebildende Einheiten pro Milliliter

Untersuchungsnummer	Liefernummer des Betriebes	Abgabe Liter	Entnahmedatum	Lagerdauer in Tagen	Temperatur in °C	Gesamtkeimzahl /ml *	Coliforme /ml	Listeria-Spezies	Listeriengehalt /ml	Koagulase-positive Staph. /ml
258	62	5827,1	08.01.1994	2	4,3	1,20E+7	460000			4,00E+2
259	64	2234,3	08.01.1994	2	4,8	2,10E+6	110000			3,60E+3
260	44	473,6	08.01.1994	2	4,4	5,80E+6	24000	innocua/murrayi	< 100	3,20E+3
261	39	525,3	08.01.1994	2	4,3	1,20E+7	150000	innocua/murrayi	< 100	1,20E+3
262	63	2439,4	16.01.1994	1	4,1	1,40E+5	750	innocua/murrayi	< 100	3,90E+3
263	23	3264,4	16.01.1994	1	4,7	8,10E+4	2100			9,60E+2
264	32	2069,2	16.01.1994	1	4,1	1,40E+5	2400			9,70E+3
265	33	1719,2	16.01.1994	1	5,9	1,50E+5	4300			9,60E+3
266	51	3491	16.01.1994	1	3,8	9,00E+4	750			3,20E+3
267	52	368	16.01.1994	1	4,8	2,10E+5	93			4,40E+3
268	53	6212,3	16.01.1994	1	6	5,80E+4	240			2,00E+2
269	48	1732,1	16.01.1994	1	3	2,70E+5	4300			4,80E+3
270	8	1560,6	16.01.1994	1	6,4	1,40E+5	1500			4,50E+3
271	56	4791,4	16.01.1994	1	3,1	4,40E+4	1500	monocytogenes	< 100	5,60E+2
272	55	4470,3	16.01.1994	1	3,2	6,40E+4	930			1,20E+2
273	57	547,7	16.01.1994	1	5,5	5,00E+2	23			negativ
274	63	2538,8	23.01.1994	1	3,9	1,30E+4	2100			1,40E+3
275	23	3373,1	23.01.1994	1	4,9	3,70E+4	2100			3,60E+3
276	32	2009,8	23.01.1994	1	3,8	7,30E+4	930			5,10E+3
277	33	1645,6	23.01.1994	1	6,1	4,30E+4	1500			5,30E+3
278	51	1679,9	23.01.1994	1	3,8	2,10E+4	460			2,30E+3
279	52	555,2	23.01.1994	1	5,7	2,20E+4	460			2,70E+3
280	53	5706	23.01.1994	1	5,8	7,50E+4	24000			2,40E+4
281	48	1792,1	23.01.1994	1	3,1	2,10E+5	930	innocua/murrayi	< 100	2,70E+3
282	77	4906,8	23.01.1994	1	7	1,30E+5	1100000			1,40E+4
283	80	2416,3	23.01.1994	1	10,4	9,30E+5	93000			7,00E+2
284	78	834,3	23.01.1994	1	2	4,10E+5	750			7,40E+4
285	75	3935,3	23.01.1994	1	4,7	2,60E+4	430			negativ

* die Angaben sind wie folgt zu lesen: 1,60E+6 = 1,6 x 10⁶ koloniebildende Einheiten pro Milliliter

Untersuchungsnummer	Liefernummer des Betriebes	Abgabe Liter	Entnahmedatum	Lagerdauer in Tagen	Temperatur in °C	Gesamtkeimzahl /ml *	Coliforme /ml	Listeria-Spezies	Listeriengehalt /ml	Koagulase-positive Staph. /ml
286	63	2436,9	05.02.1994	2	4,1	5,70E+4	740			6,50E+2
287	23	3321,4	05.02.1994	2	4,7	6,10E+4	15000			4,20E+2
288	32	2236,1	05.02.1994	2	4,4	7,40E+4	230			2,50E+3
289	33	1554,5	05.02.1994	2	6,1	8,90E+4	930			3,50E+2
290	51	3458,7	05.02.1994	2	4,1	2,40E+4	7400			2,80E+2
291	52	623,6	05.02.1994	2	5,4	3,50E+4	43			6,50E+2
292	53	6331,5	05.02.1994	2	5,3	3,90E+4	230			8,30E+3
293	48	1822	05.02.1994	2	3,9	1,40E+5	930			negativ
294	71	5495,7	13.02.1994	1	4,1	4,50E+5	430			1,20E+3
295	8	1681,9	13.02.1994	1	6,5	6,10E+5	4300			2,30E+3
296	49	1302,5	13.02.1994	1	5,3	4,90E+5	930			3,30E+3
297	46	7244,9	13.02.1994	1	4,6	3,30E+5	75000			negativ
298	63	92,3	13.02.1994	1	6,7	1,90E+4	150			1,50E+3
299	63	2370,7	13.02.1994	1	3,3	1,60E+4	38			2,40E+3
300	23	3365,1	13.02.1994	1	4,7	2,70E+4	24000			9,20E+2
301	32	2185	13.02.1994	1	4,4	2,60E+4	740			1,90E+3
302	33	1437,8	13.02.1994	1	5,9	5,70E+4	740			3,00E+3
303	51	3599,1	13.02.1994	1	4	2,40E+4	430			1,00E+2
304	52	591	13.02.1994	1	5	2,60E+4	93	monocytogenes	< 100	1,30E+3
305	53	6274,2	13.02.1994	1	5,6	2,30E+4	930			8,00E+3
306	48	1900	13.02.1994	1	3,6	2,40E+5	150000			1,00E+2
307	62	5312,8	13.02.1994	1	4,7	5,30E+4	210			2,20E+3
308	44	366	13.02.1994	1	5,1	4,20E+4	2400	innocua/murrayi	< 100	2,00E+2
309	39	388,9	13.02.1994	1	4,7	4,80E+4	2400			2,80E+3
310	1	2513,7	21.02.1994	0	4,5	3,60E+4	380			3,60E+2
311	2	1694,7	21.02.1994	0	3,1	5,50E+4	75			1,10E+3
312	13	1189,2	21.02.1994	0	4,5	8,10E+4	93			2,20E+4
313	14	4988,4	21.02.1994	0	5,3	2,50E+4	43			1,20E+3

* die Angaben sind wie folgt zu lesen: 1,60E+6 = 1,6 x 10⁶ koloniebildende Einheiten pro Milliliter

Untersuchungsnummer	Liefernummer des Betriebes	Abgabe Liter	Entnahmedatum	Lagerdauer in Tagen	Temperatur in °C	Gesamtkeimzahl /ml *	Coliforme /ml	Listeria-Spezies	Listeriengehalt /ml	Koagulase-positive Staph. /ml
314	12	5547,7	21.02.1994	0	5,1	1,70E+4	210			5,50E+2
315	9	1894,5	21.02.1994	0	3,1	4,70E+4	210			3,50E+2
316	10	3835,2	21.02.1994	0	3,9	1,50E+5	210			4,60E+2
317	4	2572,1	21.02.1994	0	4,9	1,50E+4	430	monocytogenes	< 100	negativ
318	5	3321,1	21.02.1994	0	2,9	6,40E+4	150			1,20E+3
319	6	523,6	21.02.1994	0	5,1	5,00E+2	43			1,30E+3
320	3	3668,6	21.02.1994	0	5	1,00E+4	43			4,20E+3
321	7	2996,9	21.02.1994	0	4	5,30E+4	43	monocytogenes	550	negativ
322	5	3465,2	28.02.1994	0	2,9	1,50E+5	4300			1,30E+3
323	4	2800	28.02.1994	0	4,8	1,40E+5	9300	monocytogenes	< 100	2,50E+2
324	6	528	28.02.1994	0	5,6	2,10E+4	750			< 1E+2
325	3	3550,7	28.02.1994	0	5,7	2,10E+4	740			6,80E+2
326	7	2854	28.02.1994	0	3,2	7,80E+4	750	innocua/murrayi	< 100	9,00E+2
327	45	609,1	27.02.1994	1	5	2,50E+5	1100000			8,00E+3
328	79	2554	27.02.1994	1	7	3,30E+4	460			negativ
329	77	4829,9	27.02.1994	1	7,4	1,30E+5	1500			1,50E+4
330	80	2468,2	27.02.1994	1	10	2,20E+5	21000			9,70E+3
331	78	736,6	27.02.1994	1	1,1	9,50E+5	240000			6,90E+3
332	75	3997,1	27.02.1994	1	5,5	7,40E+4	380			1,20E+3
333	76	5510	27.02.1994	1	4,4	9,20E+4	2100			negativ
334	1	2477,5	27.03.1994	1	4,5	6,30E+5	460000			4,40E+3
335	4	2911,6	27.03.1994	1	4,4	1,70E+5	93000			2,40E+3
336	5	4201,2	27.03.1994	1	2,5	1,30E+6	240000			negativ
337	74	6033,7	27.03.1994	1	3,3	1,50E+5	15000	innocua/murrayi	< 100	1,00E+3
338	6	531,3	27.03.1994	1	4,8	4,80E+4	240000			5,50E+3
339	3	3404,6	27.03.1994	1	5,1	6,50E+4	7400			3,30E+3
340	7	2804	27.03.1994	1	2,8	2,30E+5	1500	monocytogenes	< 100	1,40E+3
341	33	1936,8	27.03.1994	1	5,9	2,30E+5	15000			3,20E+3

* die Angaben sind wie folgt zu lesen: 1,60E+6 = 1,6 x 10⁶ koloniebildende Einheiten pro Milliliter

Untersuchungsnummer	Liefernummer des Betriebes	Abgabe Liter	Entnahmedatum	Lagerdauer in Tagen	Temperatur in °C	Gesamtkeimzahl /ml *	Coliforme /ml	Listeria-Spezies	Listeriengehalt /ml	Koagulase-positive Staph. /ml
342	51	3270,4	27.03.1994	1	4,1	2,20E+5	2400	innocua/murrayi	< 100	2,30E+3
343	52	625,7	27.03.1994	1	4,6	6,50E+4	240			8,00E+3
344	53	6044,8	27.03.1994	1	6	1,40E+5	3400			3,80E+3
345	48	2009,7	27.03.1994	1	4,9	3,80E+5	15000			negativ
346	5	4189,8	06.04.1994	0	2,3	3,80E+4	1500			6,20E+2
347	4	3043,1	06.04.1994	0	4,2	8,10E+4	7400			5,20E+2
348	74	5807,9	06.04.1994	0	3,3	2,80E+4	460			negativ
349	6	515,8	06.04.1994	0	4,6	1,70E+4	740			5,40E+2
350	3	3562,4	06.04.1994	0	4,8	1,30E+4	290			1,40E+3
351	7	3138	06.04.1994	0	2,7	6,10E+4	4600			negativ
352	22	2639	06.04.1994	0	2	2,80E+4	2400			2,40E+3
353	37	2080,5	06.04.1994	0	3,7	2,10E+4	15000			6,50E+2
354	30	2541,2	06.04.1994	0	2,4	3,80E+4	15000			< 1E+2
355	31	2453,2	06.04.1994	0	3,5	3,60E+4	1500			negativ
356	63	2476,6	10.04.1994	1	4,1	2,20E+4	2400			negativ
357	64	2533,7	10.04.1994	1	5,2	1,30E+4	200			8,50E+2
358	23	3383,8	10.04.1994	1	4,7	2,20E+5	460			3,00E+2
359	51	3777,8	10.04.1994	1	4,1	9,10E+4	460			negativ
360	52	731,6	10.04.1994	1	3	4,80E+4	93			1,50E+3
361	53	6295	10.04.1994	1	5,5	2,40E+4	43			8,90E+2
362	48	1988,2	10.04.1994	1	2,9	7,80E+4	240	innocua/murrayi	< 100	negativ
363	45	585	10.04.1994	1	3,4	4,90E+5	210			7,80E+2
364	79	2836,6	10.04.1994	1	6,3	4,20E+4	200			negativ
365	77	5131,2	10.04.1994	1	4,8	7,50E+4	240	monocytogenes	< 100	3,90E+3
366	80	2972	10.04.1994	1	5	1,10E+5	43000			< 1E+2
367	76	5501,7	10.04.1994	1	5,1	3,40E+4	4300	monocytogenes	< 100	8,00E+2
368	63	2768	18.04.1994	1	4,1	1,60E+4	23			6,00E+2
369	64	2638,9	18.04.1994	1	5,3	1,50E+4	43			1,60E+3

* die Angaben sind wie folgt zu lesen: 1,60E+6 = 1,6 x 10⁶ koloniebildende Einheiten pro Milliliter

Untersuchungsnummer	Liefernummer des Betriebes	Abgabe Liter	Entnahmedatum	Lagerdauer in Tagen	Temperatur in °C	Gesamtkeimzahl /ml *	Coliforme /ml	Listeria-Spezies	Listeriengehalt /ml	Koagulase-positive Staph. /ml
370	23	3415,8	18.04.1994	1	4,9	2,60E+5	150000			3,30E+3
371	51	3825	18.04.1994	1	3,7	3,80E+4	460	innocua/murrayi	< 100	negativ
372	52	666,1	18.04.1994	1	3	2,00E+4	38			2,30E+3
373	53	5863,1	18.04.1994	1	5,8	1,20E+4	43			4,90E+3
374	48	1970,4	18.04.1994	1	3	2,40E+4	460	innocua/murrayi	< 100	7,40E+2
375	62	5796,5	18.04.1994	1	4,7	3,30E+4	23			9,20E+2
376	44	759,4	18.04.1994	1	4,9	1,70E+5	150			4,20E+2
377	39	637,5	18.04.1994	1	5,7	3,50E+5	930			2,80E+2
378	58	3766,2	18.04.1994	1	5,9	3,70E+5	9300	monocytogenes	< 100	negativ
379	60	5023,2	18.04.1994	1	4,7	1,10E+5	2100	innocua/murrayi	< 100	4,70E+3
380	74	5414,7	24.04.1994	1	3,6	5,10E+5	240000	innocua/murrayi	< 100	1,20E+3
381	5	4292,9	24.04.1994	1	2,3	1,70E+7	1100000			negativ
382	4	2788,8	24.04.1994	1	4,5	1,30E+6	1100000	monocytogenes	< 100	3,20E+2
383	6	571,9	24.04.1994	1	6	8,20E+5	460000			1,40E+3
384	3	3500,4	24.04.1994	1	6,2	9,90E+4	15000			1,20E+3
385	7	2930,7	24.04.1994	1	3,5	1,60E+5	9300	monocytogenes	< 100	negativ
386	1	2890,9	24.04.1994	1	4,9	6,10E+6	240000	innocua/murrayi	< 100	3,90E+3
387	2	1546,9	24.04.1994	1	2,2	2,50E+7	460000			negativ
388	12	5278,6	24.04.1994	1	5,3	4,00E+5	9300			5,00E+2
389	62	6121	01.05.1994	1	4,7	1,50E+4	93			9,60E+2
390	44	835,2	01.05.1994	1	4,9	5,00E+4	150			2,70E+2
391	39	627,7	01.05.1994	1	4,5	2,80E+4	460			1,10E+3
392	58	4044,3	01.05.1994	1	5,6	3,50E+4	4600			4,00E+2
393	60	5017,8	01.05.1994	1	4,7	1,00E+5	1500			negativ
394	61	8229,1	01.05.1994	1	5,3	2,40E+5	93000			5,60E+2
395	63	3217	01.05.1994	1	5	2,40E+4	930			1,40E+3
396	64	2665,3	01.05.1994	1	5,3	1,00E+4	930			3,60E+3
397	23	3571,6	01.05.1994	1	4,8	2,50E+5	43000			2,00E+3
398	51	4122,6	01.05.1994	1	3,9	4,30E+4	1500			9,00E+2

* die Angaben sind wie folgt zu lesen: 1,60E+6 = 1,6 x 10⁶ koloniebildende Einheiten pro Milliliter

Untersuchungsnummer	Liefernummer des Betriebes	Abgabe Liter	Entnahmedatum	Lagerdauer in Tagen	Temperatur in °C	Gesamtkeimzahl /ml *	Coliforme /ml	Listeria-Spezies	Listeriengehalt /ml	Koagulase-positive Staph. /ml
399	52	697,7	01.05.1994	1	2,3	4,60E+4	2400			2,50E+3
400	53	6338,6	01.05.1994	1	6,3	2,00E+4	240			4,80E+2
401	62	6096,3	09.05.1994	1	4,9	4,10E+4	110	innocua/murrayi	< 100	4,20E+2
402	39	633,6	09.05.1994	1	5	2,10E+4	930			4,30E+2
403	58	4034	09.05.1994	1	5,7	5,60E+4	2400			6,20E+2
404	60	5075,4	09.05.1994	1	4,9	9,00E+4	430			negativ
405	61	8089,9	09.05.1994	1	5,6	1,30E+5	15			2,80E+3
406	19	2451,3	09.05.1994	1	4,1	1,40E+5	4300			1,50E+4
407	16	942,7	09.05.1994	1	5,5	4,20E+4	1500			negativ
408	18	6962,9	09.05.1994	1	3,3	1,50E+5	930	innocua/murrayi	< 100	2,80E+3
409	54	4293,9	09.05.1994	1	3,6	1,30E+4	2400	innocua/murrayi	< 100	1,00E+2
410	56	6230,8	09.05.1994	1	5,2	1,40E+4	240			< 1E+2
411	62	6168,9	28.05.1994	2	4,9	1,20E+4	240			3,00E+2
412	44	538,5	28.05.1994	2	4,7	1,10E+6	930			negativ
413	39	618,9	28.05.1994	2	4,9	3,90E+4	240			1,40E+3
414	58	4254,1	28.05.1994	2	5,5	1,50E+4	240			1,20E+3
415	60	4697,7	28.05.1994	2	4,7	2,30E+4	930			1,50E+2
416	61	8072	28.05.1994	2	5,5	3,30E+4	240			< 1E+2
417	74	5724,1	29.05.1994	1	3,4	1,20E+5	240			negativ
418	5	4827,5	29.05.1994	1	2,7	2,50E+4	240000			6,10E+2
419	4	3018	29.05.1994	1	4,4	1,90E+5	4300			< 1E+2
420	6	516,9	29.05.1994	1	5,5	1,20E+5	240			3,50E+2
421	3	3355,6	29.05.1994	1	5,6	3,40E+5	430			4,20E+2
422	7	3290,1	29.05.1994	1	3,3	1,00E+6	4300	innocua/murrayi	< 100	3,00E+3

* die Angaben sind wie folgt zu lesen: 1,60E+6 = 1,6 x 10⁶ koloniebildende Einheiten pro Milliliter

Tabelle 18: Differenzierung der isolierten Listerien-Stämme

Untersuchungsnummer	Ergebnis der kulturellen und biochemischen Differenzierung	Ergebnis der serologischen Differenzierung
11	Listeria innocua	6a
12	Listeria monocytogenes	1/2a ?
32	Listeria monocytogenes	1/2a ?
37	Listeria monocytogenes	1/2a
38	Listeria monocytogenes	1/2a ?
50	Listeria monocytogenes	1/2a ?
51	Listeria monocytogenes	1/2a
68	Listeria monocytogenes	1/2a
69	Listeria monocytogenes	1/2a
104	Listeria monocytogenes	1/2b
107	Listeria monocytogenes	1/2a
113	Listeria monocytogenes	1/2a ?
117	Listeria monocytogenes	1/2a ?
205	Listeria innocua	6b
235	Listeria innocua	6b
260	Listeria innocua	6b
261	Listeria innocua	nicht untersucht
262	Listeria innocua	6b
271	Listeria monocytogenes	1/2a ?
281	Listeria innocua	nicht bestätigt
304	Listeria monocytogenes	1/2a ?
308	Listeria innocua	nicht untersucht
317	Listeria monocytogenes	1/2
321	Listeria monocytogenes	1/2a ?
323	Listeria monocytogenes	1/2a ?
326	Listeria innocua	6a
337	Listeria innocua	6b
340	Listeria monocytogenes	1/2
342	Listeria innocua	6a
362	Listeria innocua	6a
365	Listeria monocytogenes	1/2a ?

Untersuchungsnummer	Ergebnis der kulturellen und biochemischen Differenzierung	Ergebnis der serologischen Differenzierung
367	Listeria monocytogenes	1/2a
371	Listeria innocua	6a
374	Listeria innocua	6b
378	Listeria monocytogenes	1/2
379	Listeria innocua	6b
380	Listeria innocua	6b
382	Listeria monocytogenes	1/2a
385	Listeria monocytogenes	1/2a ?
386	Listeria innocua	6b
401	Listeria innocua	Listeria monocytogenes serovar 1/2a ?
408	Listeria innocua	6a
409	Listeria innocua	Listeria monocytogenes serovar 1/2a ?
422	Listeria innocua	Listeria monocytogenes serovar 1/2a ?

? : Serovar-Bestimmung mit Einschränkung

Die H-Faktoren-Überprüfung verläuft bei „AB“ positiv und bei „A“ alleine negativ. Die Ursache hierfür kann im Alter der Stämme liegen, wobei zum Beispiel die Stämme 401, 409 und 422 innerhalb von zwei Wochen untersucht werden, oder auch in der Qualität des Antiserums.

Danksagung

Herrn Prof. Dr. G. Hildebrandt danke ich für die Überlassung des Themas und seine konstruktive Kritik, Unterstützung und Geduld bei der Verwirklichung der vorliegenden Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. J. Bräunig vom Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin (BgVV). Im Labor des von ihr geleiteten Fachgebietes Milchhygiene des Fachbereiches Hygiene der Lebensmittel und Bedarfsgegenstände wurden die Untersuchungen durchgeführt. Sie hat mich in die Thematik der Milchuntersuchung eingeführt und mir bei Fragen jederzeit mit Rat und Tat zur Seite gestanden.

Ebenso möchte ich Frau Dr. S. Dahms vom Institut für Biometrie und Informationsverarbeitung des Fachbereichs Veterinärmedizin der Freien Universität Berlin danken, die mir bei der Lösung der statistischen Fragen hilfreich zur Seite stand.

Ein großer Dank gilt allen Mitarbeitern im BgVV, die mir mit fachlichen und persönlichen Ratschlägen sehr geholfen haben. Insbesondere möchte ich Frau U. Maslanka, Frau M. Böhm, Frau B. Kliesch und Frau M. Wallin erwähnen, die mir halfen und im Labor eine familiäre Atmosphäre schufen, welche mir das Arbeiten sehr erleichterte.

Die Meierei-Zentrale emzett GmbH Berlin-Brandenburg hat mir freundlicherweise die Milchproben für die Untersuchungen zur Verfügung gestellt.

Ganz besonders danke ich meinen Eltern, Hildegard und Dr. med Peter Specker, die mir mein Studium und meine Doktorarbeit ermöglichten und die, wie meine ganze Familie, immer für mich da waren.

Meinem Bruder Dr. med. vet. Georg Specker danke ich für die Inspiration meines Berufswunsches. Er hat durch seine Liebe zum Beruf meinen Werdegang zum Tierarzt sehr beeinflusst.

Meinem Bruder Dr. med. Christof Specker danke ich für die Führung meiner Persönlichkeit, die er mir hat zukommen lassen.

Ein weiterer Dank gilt meinen Freunden, die mir in den Zeiten neben der Doktorarbeit eine Hilfe waren.

Lebenslauf

Marcus Specker

Geburtsdatum: 29. April 1968
Geburtsort: Düsseldorf
Eltern: Hildegard Specker, geb. Schön
Dr. med. Peter Specker

Schulbildung

1974 - 1978 Katholische Grundschule an der Itterstraße in Düsseldorf-Himmelgeist
1978 - 1987 Städtisches Lessing-Gymnasium in Düsseldorf-Oberbilk
2. Juni 1987 Abitur

Beruflicher Werdegang

1987 - 1993 Studium der Veterinärmedizin an der Freien Universität Berlin
18. Februar 1993 Approbation als Tierarzt
April 1993 - Dezember 1995 Doktorand am Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin (BgVV) in Berlin
Januar - August 1996 Assistenzarzt in der Tierarztpraxis Dr. Georg Specker in Heiligenhaus