Aus dem
Institut für Lebensmittelhygiene
der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig

angefertigt im
Institut für Mikrobiologie und Biotechnologie des
Max Rubner-Instituts
Bundesforschungsinstitut für Ernährung und Lebensmittel, Standort Kulmbach

Untersuchungen zur mikrobiologischen Sicherheit von marinierten, vorverpackten Schweinefleischzubereitungen

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

eingereicht von
Clien Schönheit
aus Saalfeld

Leipzig, 2011

Mit Genehmigung der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig

Dekan: Prof. Dr. Uwe Truyen

Betreuer: Prof. Dr. Dr. h. c. Karsten Fehlhaber
Dir. u. Prof. Dr. Dr. Manfred Gareis

Gutachter: Prof. Dr. Dr. h. c. Karsten Fehlhaber, Institut für Lebensmittelhygiene, Veterinärmedizinische Fakultät der Universität Leipzig

Dir. u. Prof. Dr. Dr. Manfred Gareis, Institut für Mikrobiologie und Biotechnologie, Max Rubner-Institut Kulmbach

Univ.-Prof. Dr. Thomas Alter, Institut für Lebensmittelhygiene, Fachbereich Veterinärmedizin der Freien Universität Berlin

Tag der Verteidigung: 25.10.2011

Meiner Familie

INHALTSVERZEICHNIS

1 EINLEITUNG 1

2 LITERATURÜBERSICHT 2

2.1 Begriffsbestimmung und Bedeutung von marinierten Fleischzubereitungen 2

2.2 Einteilung und Zusammensetzung von Marinaden 4

2.3 Eigenschaften von marinierten, vorverpackten Schweinefleischzubereitungen 6

2.4 Mikrobiologie marinierter Schweinefleischzubereitungen 6

2.5 Vorkommen und Bedeutung von bakteriellen Zoonoseerregern in Schweinefleischprodukten 9

2.5.1 *Salmonella* spp. 9
2.5.1.1 Eigenschaften und lebensmittel-assoziierte Erkrankungen 9
2.5.1.2 Epidemiologie und Vorkommen in Schweinefleisch 10
2.5.1.3 Tenazität in Lebensmitteln 11

2.5.2 Shigatoxinbildende *E. coli* (STEC) 14
2.5.2.1 Eigenschaften und lebensmittel-assoziierte Erkrankungen 14
2.5.2.2 Epidemiologie und Vorkommen in Schweinefleisch 16
2.5.2.3 Tenazität in Lebensmitteln 17

2.5.3 *Listeria monocytogenes* 17
2.5.3.1 Eigenschaften und lebensmittel-assoziierte Erkrankungen 17
2.5.3.2 Epidemiologie und Vorkommen in Schweinefleisch 19
2.5.3.3 Tenazität in Lebensmitteln 20

2.5.4 *Staphylococcus aureus* 22
2.5.4.1 Eigenschaften und lebensmittel-assoziierte Erkrankungen 22
2.5.4.2 Epidemiologie und Vorkommen in Schweinefleisch 23
2.5.4.3 Tenazität in Lebensmitteln 25

2.5.5 *Bacillus cereus* 25
2.5.5.1 Eigenschaften und lebensmittel-assoziierte Erkrankungen 25
2.5.5.2 Epidemiologie und Vorkommen in Schweinefleisch 27
2.5.5.3 Tenazität in Lebensmitteln 28

2.5.6 *Clostridium perfringens* 29
2.5.6.1 Eigenschaften und lebensmittel-assoziierte Erkrankungen 29
2.5.6.2 Epidemiologie und Vorkommen in Schweinefleisch 31
2.5.6.3 Tenazität in Lebensmitteln 32

3 MATERIAL UND METHODEN 33

3.1 Material 33

3.1.1 Referenzstämme 33

3.1.2 Materialien und Geräte für kulturelle Verfahren 34
3.1.2.1 Nährmedien 34

3.1.2.2 Chemikalien und Geräte ... 35
3.1.3 Materialien und Geräte für PCR ... 35
3.1.4 Materialien und Geräte für ELISA ... 37
3.1.5 Sonstige Materialien und Geräte ... 37
3.1.6 Probenmaterial ... 38
3.2 Methodik ... 40
3.2.1 Untersuchung von marinierten Schweinenackensteaks und Marinaden ... 40
3.2.1.1 Logistik ... 40
3.2.1.2 Messung von pH- und a_W-Wert ... 41
3.2.1.3 Untersuchungsspektrum ... 41
3.2.1.4 Allgemeine mikrobiologische Untersuchungen ... 42
3.2.1.4.1 Bestimmung der aeroben, mesophilen Gesamtkeimzahl ... 43
3.2.1.4.2 Bestimmung der Anzahl der *Enterobacteriaceae* ... 43
3.2.1.4.3 Bestimmung der Anzahl der Milchsäurebakterien ... 43
3.2.1.5 Spezielle mikrobiologische Untersuchungen ... 44
3.2.1.5.1 *Salmonella* spp. ... 44
3.2.1.5.2 Shigatoxin bildende *E. coli* (STEC) ... 44
3.2.1.5.3 *Listeria* spp. und *Listeria monocytogenes* ... 47
3.2.1.5.4 *Staphylococcus aureus* ... 49
3.2.1.5.5 *Bacillus cereus* ... 50
3.2.1.5.6 Sulfitreduzierende Clostridien ... 55
3.2.2 Tenazität von *Salmonella* spp. und *L. monocytogenes* in Marinaden ... 56
3.2.2.1 Probenmaterial ... 56
3.2.2.2 Herstellung des Inokulats ... 57
3.2.2.3 Inokulation der Marinaden ... 58
3.2.2.4 Stammdifferenzierung der überlebenden Isolate ... 58
3.2.2.5 Probennahmeschema und durchgeführte Untersuchungen ... 58

4 ERGEBNISSE ... 61

4.1 Marktstudie ... 61
4.1.1 Marinierte Schweinenackensteaks ... 61
4.1.1.1 pH-Wert ... 61
4.1.1.2 Allgemeine mikrobiologische Untersuchungen ... 62
4.1.1.2.1 Aerobe, mesophile Gesamtkeimzahl ... 62
4.1.1.2.2 *Enterobacteriaceae* ... 63
4.1.1.2.3 Milchsäurebakterien ... 64
4.1.1.3 Spezielle mikrobiologische Untersuchungen ... 65
4.1.1.3.1 *Salmonella* spp. ... 66
4.1.1.3.2 Shigatoxinbildende *E. coli* (STEC) ... 66
4.1.1.3.3 *Listeria* spp. und *Listeria monocytogenes* ... 68
4.1.1.3.4 *Staphylococcus aureus* ... 70
4.1.1.3.5 *Bacillus cereus* ... 72
4.1.1.3.6 Sulfitreduzierende Clostridien ... 75
4.1.2 Marinaden ... 76
4.1.2.1 pH-Wert und a_W-Wert ... 76
4.1.2.2 Allgemeine mikrobiologische Untersuchungen ... 77
4.1.2.2.1 Aerobe, mesophile Gesamtkeimzahl ... 77
4.1.2.2.2 *Enterobacteriaceae* und Milchsäurebakterien ... 78

4.1.2.3 Spezielle mikrobiologische Untersuchungen 78
4.1.2.3.1 *Salmonella* spp., STEC und *St. aureus* 78
4.1.2.3.2 *Listeria* spp. und *L. monocytogenes* 79
4.1.2.3.3 *Bacillus cereus* 79
4.1.2.3.4 Sulfitreduzierende Clostridien 80

4.2 Tenazität von *Salmonella* spp und *L. monocytogenes* in Marinaden 81
4.2.1 Überlebensfähigkeit von *Salmonella* spp. 81
4.2.2 Überlebensfähigkeit von *L. monocytogenes* 83

4.3 Übersicht der Ergebnisse 86

4.4 Ableitung von Empfehlungen für mikrobiologische Richtwerte 88

5 DISKUSSION 89

6 ZUSAMMENFASSUNG 98

7 SUMMARY 100

8 LITERATURVERZEICHNIS 102

9 ANHANG 131

Abkürzungsverzeichnis

A. bidest.	Aqua bidestillata
A. dest.	Aqua destillata
Abb.	Abbildung
ATCC	American Type Culture Collection
B.	*Bacillus*
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
C.	*Clostridium*
ca.	circa
CPE	*C. perfringens*-Enterotoxin
DGHM	Deutsche Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie
d. h.	das heißt
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
E.	*Escherichia*
EhlyA	Enterohämolysin A
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
et al.	et alii/ et aliae
etc.	et cetera
EU	Europäische Union
g	Gramm
h	Stunde
HBL	Hämolysin B
k. A.	keine Angabe
KbE	Kolonie bildende Einheiten
LEE	locus of enterocyte effacement
L. monocytogenes	*Listeria monocytogenes*
MHD	Mindesthaltbarkeitsdatum
mM	Millimolar
MPN	most probable number
MRSA	Methicillin-resistenter *St. aureus*
NCTC	National Collection of Type Cultures
Nhe	non-hemolytic enterotoxin
PBP2a	Penicillin-Bindungsprotein 2a
PCR	polymerase chain reaction (Polymerase-Kettenreaktion)
rpm	rounds per minute
S.	*Salmonella*
SE	Staphylokken- Enterotoxin
SB	Selbstbedienung

spp.	species (Plural)
STEC	Shigatoxin-bildende *E. coli*
St.	*Staphylococcus*
Stx	Shigatoxin
Tab.	Tabelle
U	Units (Einheiten)
u. U.	unter Umständen
vgl.	vergleiche
z. B.	zum Beispiel
ZMP	Zentrale Markt- und Preisberichtsstelle
°C	Grad Celsius
µl/ l	mikro-/ Liter

1 Einleitung

Vorverpackte, marinierte Schweinefleischzubereitungen, wie Steaks, Spare Ribs und Filets werden unter den Convenience-Produkten bei Verbrauchern immer beliebter (O´DONNELL, 2004; ANON., 2007; ANON., 2009b). In der Grillsaison im Jahr 2007 wurden etwa 400 000 Tonnen Grillfleischprodukte vom Schwein, Rind und Geflügel abgesetzt. Von diesen Artikeln haben in Deutschland marinierte Schweinenackensteaks die größte Bedeutung. Derartige Produkte aus dem SB-Bereich werden üblicherweise aus tiefgefrorenen Schweinekämmen und industriell gefertigter Marinade hergestellt und besitzen im Handel zum Teil MHD-Fristen von 13-18 Tagen.

Mikrobiologische und sensorische Untersuchungen marinierter, vorverpackter Fleischprodukte durch die Stiftung Warentest aus dem Jahr 2008 dokumentierten eine teils sehr schlechte lebensmittelhygienische Qualität (ANON., 2008c). Die Problematik einer Maskierung von mikrobiologisch minderwertigem Schweinefleisch rückte damit in den Mittelpunkt des Interesses. In Anbetracht der teils sehr langen Restlaufzeiten dieser Produkte im SB-Bereich ergab sich die Frage nach deren Lebensmittelsicherheit. Studien belegen, dass die Marinierung nicht zwangsläufig zu einer Haltbarkeitsverlängerung beitrug. Die Pufferkapazität des Fleisches und Neutralisationsreaktionen von Fetten und Säuren könnten mögliche antimikrobielle Effekte aufheben (BJÖRKROTH, 2005). Eine Verbrauchergefährdung durch pathogene und toxinogene Mikroorganismen kann daher nicht ausgeschlossen werden.

Bislang liegt jedoch nur wenig Datenmaterial über die mikrobiologische Beschaffenheit dieser Produkte vor. Ebenso sind keine Richtwerte für Mindesthaltbarkeitsfristen verfügbar. Die lebensmittelrechtliche Einordnung marinierter Fleischprodukte ist mangels detaillierter Definitionen und Vorgaben erschwert.

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Erhebung wissenschaftlich abgesicherter Daten zur Prävalenz und Toxinogenität von Lebensmittelinfektionserregern in mariniertem Schweinefleisch. Zusätzlich sollten durch Tenazitätsstudien mit *Salmonella* spp. und *L. monocytogenes* in industriell hergestellten Flüssigmarinaden Auswirkungen von „worst-case“ – Bedingungen im Sinne von Temperaturabusus auf die mikrobiologische Stabilität der Marinaden untersucht werden.

Basierend auf diesen Daten sollten produktspezifische mikrobiologische Kriterien und Empfehlungen für angemessene Mindesthaltbarkeitsfristen abgeleitet werden, die als zuverlässige Anhaltspunkte zur Orientierung für Hersteller, Handel und Lebensmittelüberwachung dienen.

2 Literaturübersicht

2.1 Begriffsbestimmung und Bedeutung von marinierten Fleischzubereitungen

Marinierte Schweinesteaks gehören zu der Gruppe von Convenience-Erzeugnissen. Diese sind als industriell hergestellte, vorgefertigte Lebensmittel definiert, bei denen die küchenmäßige Zubereitung für den Verbraucher erleichtert bzw. verkürzt wurde (GURSKY, 1997). Die Nachfrage nach solchen Erzeugnissen hat in Deutschland sowie in den anderen westlichen Ländern in den letzten Jahren stetig zugenommen. Als Gründe wurden grundlegende Veränderungen im Ernährungsverhalten, dem Gesundheitsbewusstsein, der Genussorientierung und Bequemlichkeit der Endverbraucher sowie der Wandel der Gesellschaftsformen von Mehr-Personen- zu Single- und Zwei-Personen-Haushalten genannt (GURSKY, 1997; KERN, 1997; ANON., 2002; FROHN, 2002).

Der Begriff Marinade als Mittel zur Fleischveredelung wurde bisher in Deutschland und EU weder rechtlich noch in fachbezogenen Nachschlagewerken eindeutig definiert (FREY, 1999). Unter Punkt II. H. 1 des Kapitels „Fisch, Krebse, Weichtiere und Erzeugnisse daraus“ der Leitsätze des Deutschen Lebensmittelbuches (2009) werden Marinaden als Fischerzeugnisse definiert, die ohne Wärmeeinwirkung durch Behandlung mit Essig, Säuerungsmitteln und Salz auch unter Zufügung sonstiger Zutaten zum Würzen gar gemacht wurden. Ähnlichkeit mit der Beschaffenheit der bei Fleischzubereitungen verwendeten Marinaden haben nur die in den Leitsätzen unter Punkt I. A. 10 des Kapitels „Gewürze und andere würzende Zutaten“ genannten Würzsoßen, die nur zum Würzen vor dem Verzehr geeignet sind (FREY, 1999).

Etymologisch entwickelte sich der Begriff „Marinieren“ aus dem lateinischen Wort „marinare“ (frz. „mariner“ bzw. ital. „marinare“), was in „Salzwasser einlegen“ bedeutet (MCEVOY, 2003; BJÖRKROTH, 2005). Er bezeichnet also eine einfache Kurzkonservierungsform, die wahrscheinlich traditionell v. a. von Bewohnern von Meeresanrainerstaaten schon seit vielen Jahrhunderten praktiziert wurde. Die genaue Herkunft ist nicht bekannt. Umgangssprachlich versteht man heutzutage darunter ganz allgemein das Einlegen von Lebensmitteln in Gewürzsud, insbesondere von mageren, trockenen Fleischteilen. Funktionell enthalten Marinaden drei wesentliche Komponenten: Organische Säuren, Öl und aromatisierende Inhaltsstoffe, wie z. B. eine bestimmte Gewürzkomposition (FREY, 1999; MCEVOY, 2003). Mit Hilfe von Säuren kann durch Verbesserung des Wasserbindungsvermögens und Denaturierung des intramuskulären kollagenen Bindegewebes sowie der Myofibrillen eine vermehrte Zartheit des Fleisches erreicht werden (AKTAS et al., 2001; MOELLER et al., 2003; SMITH, 2007). Öle bzw. Fette in Marinaden verringern durch die Bildung einer Schutzschicht um das Fleisch den Bratverlust während und nach der Zubereitung. Mit aromatisierenden Inhaltsstoffen soll über eine Modifikation des Eigengeschmacks des Fleisches ein verbessertes Geschmackserlebnis beim Verbraucher bewirkt werden (MCEVOY, 2003; LYNCH, 2010). Zugesetzte Phosphate können über Änderungen des pH-Wertes neben positiven Einflüssen auf Wasserbindungskapazität und Sensorik

auch wachstumshemmende Effekte auf Verderbniskeime aufweisen (CANNON et al., 1993; BUSES et al., 2003; MOELLER et al., 2003).

Neben der Herstellung von mariniertem Grillfleisch werden Marinaden auch als Zartmacher für festes, zähes Fleisch („Beize“) wie z.B. für Wildgerichte und Sauerbraten verwendet. Als Weiterentwicklung gelten Marinaden mit Gemüse, Pilzen oder Früchten für die Herstellung von Halbfertiggerichten wie Geschnetzeltem oder gulaschähnlichen Zubereitungen (FREY, 1999). Diesen unterschiedlichen Einsatzmöglichkeiten und Eigenschaften von Marinaden werden in der englischsprachigen Literatur zur genaueren Unterscheidung Begriffe wie Rub (Trockenmarinade, Würzöl), Glaze (karamellisierende, zuckerhaltige Marinaden), Brine (Salzlake), Raw Marinade (Marinade ohne Erhitzung) und Cooked Marinade (hitzebehandelte, „eingekochte“ Marinade, häufig mit Gemüseanteil) zugeordnet (MCEVOY, 2003).

Seit der Markteinführung von marinierten Fleischzubereitungen vor etwa 20 Jahren ist die Produktpalette stark angewachsen. Neben saisonalen Würzrichtungen, wie z. B. Produkten mit Bärlauchmarinade, sind geografisch geprägte Würzkompositionen, wie Thüringer Rostbrätl oder auch Produkte mit z.B. asiatischer, mexikanischer oder US-amerikanischer BBQ-Würzung, im Handel erhältlich (FISCHER, 1997; LYNCH, 2010).

Nach KUCHENBECKER et al. (2001) werden marinierte Fleischzubereitungen in den Niederlanden und Dänemark ausschließlich als SB-Ware sowie in einer größeren Produktpalette als in Deutschland angeboten. In diesen Ländern werden vermehrt Zusatzstoffe, wie Verdickungsmittel und Stabilisatoren, bei der Herstellung dieser Erzeugnisse eingesetzt (KUCHENBECKER et al., 2001). In Deutschland werden marinierte Fleischerzeugnisse sowohl im SB-Bereich von Discountern als auch an Bedienungstheken des Fachhandels angeboten, wobei der Anteil an SB-Ware stetig zunimmt (FROHN, 2000; MICHELS, 2007). Küchenfertig marinierte Grillfleischprodukte haben dabei zur Grillsaison (Mai bis Oktober) eine stetig zunehmende Marktbedeutung (O´DONNELL, 2004). In der Grillsaison 2007 wurden etwa 400 000 Tonnen Grillartikel vom Schwein, Rind und Geflügel abgesetzt. In Deutschland dominierten dabei während der Grillsaison Mai bis Oktober 2007 wie in den Vorjahren marinierte Schweinenackensteaks/ Schweinekoteletts mit 34 % den Grillfleischmarkt, gefolgt von mariniertem Puten- und Hähnchenfleisch und Rindersteaks (ANON., 2007; MICHELS, 2007; ANON., 2009b) (vgl. Abbildung 1).

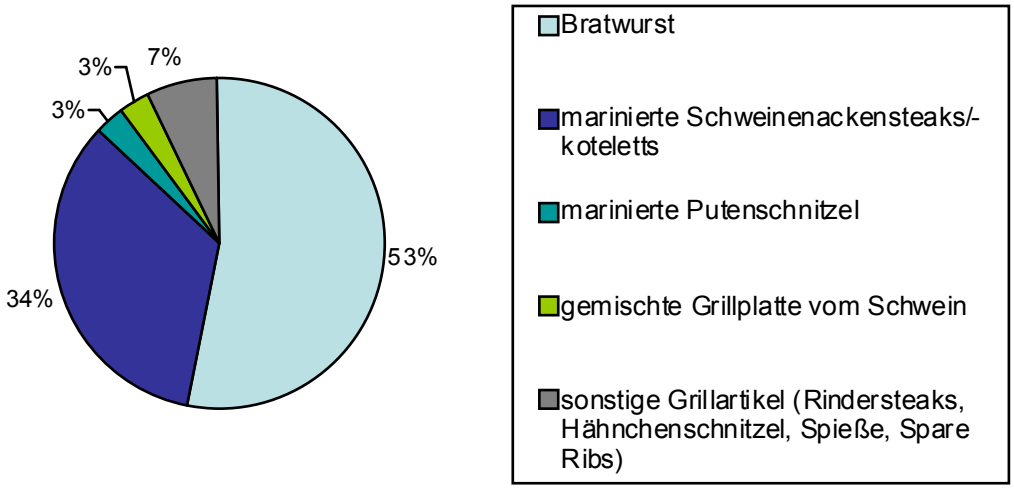

Abbildung 1: Mengenrelation der abgesetzten Grillfleischprodukte während der Grillsaison 2007 in Deutschland nach Daten der ZMP GmbH (ANON., 2007)

Daten zur Produktion und Absatz von Grillfleisch für die Jahre 2008 bis 2011 sind derzeit aufgrund der Einstellung des Geschäftsbetriebs der ZMP GmbH im Jahre 2009 nicht verfügbar.

2.2 Einteilung und Zusammensetzung von Marinaden

Marinaden stellen eine sehr heterogene Produktgruppe dar, für die es keine allgemeingültigen Definitionen und Vorgaben gibt. Marinaden für Fleischwaren können aufgrund ihrer Herstellung und Zusammensetzung in unterschiedliche Gruppen eingeteilt werden (vgl. Tabelle 1).

Echte Würzöle enthalten keinen Wasserzusatz und bestehen nur aus Sonnenblumen- oder Sojaöl und öllöslichen Aromaextrakten mit oder ohne Gewürzpartikeln. Diese sind von Marinaden auf Wasser-Öl-Basis zu unterscheiden. Hierbei handelt es sich um echte Emulsionen aus Wasser, Öl, Emulgator und Stabilisator oder Dispersionen aus Wasser, Öl und Verdickungsmittel. Emulsionsmarinaden weisen eine visköse, eher mayonnaiseähnliche Struktur auf, decken das Fleischerzeugnis optisch ab und bilden beim Anbraten eine abbindende Sauce. Hingegen sind Dispersionsmarinaden oft deutlich weniger viskös und lassen die Fleischstruktur besser erkennen. Bei beiden Gruppen ist eine zusätzliche Öl-/Fettzugabe beim Braten nicht nötig. Im Gegensatz dazu ist in der Gruppe der reinen Wasser-Quellstoff-Marinaden kein Öl enthalten, was derartige Produkte anfällig für Anbrennen macht (JÖCKEL et al., 2003a).

Tabelle 1: Übersicht über Marinadentypen (modifiziert nach FREY, 1999)

Marinadentyp	**Zusammensetzung**	**Kennzeichen/Vorteile**
1. Marinaden auf Ölbasis (Würzöle)	Suspensionen aus Gewürzen, Zucker, Salz in Speiseöl (i. d. R. Sonnenblumen- oder Sojaöl)	• Ansprechender Glanz mit durchscheinender Fleischstruktur • Guter Zartmachereffekt • Längere Grilldauer möglich (kein so schnelles Verbrennen)
2. Marinaden auf Wasser-Öl-Basis:		• Ansprechende Optik • Abdeckung der Fleischstruktur • Abbindende Sauce • Kein Verbrennen in der Pfanne durch Ölanteil
a) Emulsionsmarinaden	Wasser, Öl, Gewürze, Emulgator, evtl. Stabilisator	• Sehr viskös, mayonnaiseähnlich
b) Dispersionsmarinaden	Wasser, Öl, Gewürze, Verdickungsmittel (z. B. Guarkernmehl, Xanthan)	• Weniger viskös • Fleischstruktur besser erkennbar
3. Marinaden auf Wasserbasis	Suspensionen aus Gewürzen, Zucker, Salz, Säure etc. in Wasser mit Quellstoffen bzw. Verdickungsmitteln	• Vermeidung von zusätzlichem Fetteintrag • Beim Braten in der Pfanne Öl-/Fettzugabe nötig

Sonderformen wie Würzsaucen auf Zuckersirup-Honig-Basis finden eher Verwendung bei der Herstellung von Spare-Ribs und können auch als Grillsauce direkt verzehrt werden. Weiterentwicklungen der klassischen Marinaden sind Produkte mit Gemüseeinlagen, die aber eher in der Herstellung von Pfannen-/ Teilfertiggerichten Bedeutung besitzen (FREY, 1999).

Marinaden werden, mit Ausnahme eines Großteils der Würzöle, Säuren, wie hauptsächlich Zitronen- oder Essigsäure zugesetzt (LYNCH, 2010). Daraus resultiert häufig ein pH-Wert unterhalb von 4,5. Daher sind diese Marinaden mikrobiologisch relativ stabil. Ein Verderb ist dennoch durch Schimmelbefall möglich, was durch Sorbinsäurezusatz jedoch vermieden werden kann. Marinaden mit pH-Werten über 4,5 müssen für eine längere Aufbewahrung durch Hitzbehandlung haltbar gemacht werden. Dies kann durch Sterilisation (ca. 120 °C) oder Pasteurisierung bei etwa 85 °C mit anschließend erforderlicher Kühlung erfolgen (FREY, 1999).

2.3 Eigenschaften von marinierten, vorverpackten Schweinefleischzubereitungen

Mariniertes Grillfleisch wird an der Selbstbedienungstheke als Fertigpackung vertrieben. Die Herstellung marinierter Schweinesteaks erfolgt dabei meist direkt im fleischverarbeitenden Betrieb aus tiefgefrorenen Schweinekämmen und industriell hergestellter Marinade. Die Zuschnitte der auf etwa -3 °C aufgetauten Schweinenacken erfolgen per Hand oder maschinell (JÖCKEL et al., 2003b). Anschließend wird die Ware überwiegend in Vakuumverpackungen, zu einem geringeren Anteil auch in Tiefziehpackungen mit modifizierter Atmosphäre angeboten. Die für die Verpackungen verwendeten thermoplastischen Kunststofffolien aus zwei oder mehr Schichten schützen das Produkt mechanisch und konservieren Aroma und Flüssigkeitsgehalt (WEINBERG, 1999). Zudem werden mikrobielle Kontamination und Sauerstoffzutritt verhindert und dadurch Verderbsprozesse verzögert.

2.4 Mikrobiologie marinierter Schweinefleischzubereitungen

Mikrobiologie und Haltbarkeit von vakuumverpacktem Schweinefleisch:

Muskelfleisch als keimfreies Gewebe bei einem gesunden, ausgeruhten Tier kann während des Schlachtvorganges oder bei der Zerlegung sekundär mit Mikroorganismen kontaminiert werden. Der Anfangskeimgehalt, die Keimflorazusammensetzung und intrinsischen Parameter des Fleischprodukts limitieren dabei die hygienische Qualität und Haltbarkeit (BORCH et al., 1996). Verderbnisprozesse und bakterielles Wachstum hängen insbesondere von pH-Wert, Fettgehalt und L-Laktat ab (BOERS et al., 1994; BLIXT et al., 2002).

Für eviszerierte, gekühlte Schweineschlachtkörper liegt 24 Stunden nach der Schlachtung die aerobe Gesamtkeimzahl im Durchschnitt bei 10^3 KbE/cm^2 (JOHANSON et al., 1983; GILL et al., 2000; ZWEIFEL et al., 2005). Auf frischem Schweinfleisch werden häufig Vertreter der Familien *Enterobacteriaceae, Pseudomonaceae, Micrococcaceae, Streptococcaceae* und *Bacillaceae* nachgewiesen. In vakuumverpacktem Schweinefleisch besteht die typische Mikrobiota gemäß der Häufigkeit ihres Vorkommens aus Milchsäurebakterien, *Enterobacteriaceae*, *Brochothrix thermosphacta* und *Pseudomonaceae* (HOLLEY et al., 2004; RUSSO et al., 2006). Vakuumverpackte Schweinenacken weisen einen pH-Wert von durchschnittlich 5,7 auf, der nach 4 Wochen durch Laktatproduktion der Milchsäurebakterien auf etwa 5,3 absinkt. Die Fettgehalte in Schweinenacken liegen bei 15-17 %, was aufgrund des höheren pH-Werts von Fett wiederum das intrinsische Milieu beeinflusst und damit das mikrobielle Wachstum beschleunigt (BLIXT et al., 2002). Milchsäurebakterien (v.a. *Carnobacterium* spp., *Lactobacillus* spp.) konnten als zahlenmäßig vorherrschende Mikroorganismen maximale Keimkonzentrationen von 10^7 bis 10^8 KbE/g in vakuumverpacktem Schweinenacken nach 3 bis 4 Wochen Kühllagerung erreichen. *Enterobacteriaceae* und Pseudomonaden waren nach 2 Wochen Lagerung mit Keimzahlen von 10^6 KbE/g bzw. 10^5 KbE/g präsent (BLIXT et al., 2002). *Brochothrix thermosphacta* als typischer lipolytischer Fleischverderbniskeim war insbesondere in fettreichem Schweinenacken bis 5 x 10^4 KbE/g nachweisbar, was schon in früheren Arbeiten auf die Wachstumspräferenz dieses

Keims für Fettgewebe zurückgeführt wurde (GRAU, 1983). Die Haltbarkeit von vakuumverpacktem Schweinefleisch wurde bisher bei Kühltemperaturen zwischen 8 und 9 Wochen angenommen (BOERS et al., 1994; JEREMIAH et al., 1995). Dennoch war bei Schweinenacken bereits nach einer Woche Kühllagerung ein steiler Anstieg des mikrobiellen Wachstums zu verzeichnen, teils traten erste verderbsbedingte Geruchsabweichungen bereits nach 1-2 Wochen ein (BLIXT et al., 2002). Der Anteil der *Enterobacteriaceae*, die als Indikatorkeime für Hygiene- und Qualitätsmängel gelten, sollte an der aeroben Gesamtkeimzahl dabei nicht über 5 % liegen (HOLLEY et al., 2004). Auch *Listeria* spp. werden aufgrund des ubiquitären Vorkommens als Hygieneindikatoren auf allen Stufen der Fleischverarbeitung angesehen (JEMMI et al., 2006). Als nicht rechtsverbindliche Orientierungshilfe für die objektive Beurteilung der mikrobiologischen Qualität von rohem, ungewürztem Schweinefleisch hat die Deutsche Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie (DGHM) Warn- und Richtwerte erarbeitet (vgl. Tabelle 2).

Tabelle 2: Richt- und Warnwerte für rohes Schweinefleisch [a)] (DGHM, 2010)

Keimart	Richtwert[*)]	Warnwert[**) b)]
Aerobe mesophile Koloniezahl	5,0 x 10^6 KbE/g	---
Enterobacteriaceae	1,0 x 10^4 KbE/g	1,0 x 10^5 KbE/g
Escherichia coli	1,0 x 10^2 KbE/g	1,0 x 10^3 KbE/g
Pseudomonaden	1,0 x 10^6 KbE/g	---
Koagulase-positive Staphylokokken	5,0 x 10^2 KbE/g	5,0 x 10^3 KbE/g
Salmonella spp.	---	Nicht nachweisbar in 25 g
Listeria monocytogenes [b)]	---	1,0 x 10^2 KbE/g

*) Richtwerte geben eine Orientierung, welches produktspezifische Mikroorganismenspektrum zu erwarten und welche Mikroorganismengehalte in den jeweiligen Lebensmitteln bei Einhaltung einer guten Hygienepraxis akzeptabel sind.

**) Warnwerte geben Mikroorganismengehalte an, deren Überschreitung einen Hinweis darauf gibt, dass die Prinzipien der guten Hygienepraxis verletzt wurden und zudem eine Gesundheitsgefährdung des Verbrauchers nicht auszuschließen ist.

a) nicht gewürzt, lose oder in Fertigpackung

b) Für den Nachweis und die Bewertung von *L. monocytogenes* sind die Vorgaben der Verordnung (EG) Nr. 2073/2005 über mikrobiologische Kriterien für Lebensmittel zu beachten.

Mikrobiologie der Marinaden:

Zum mikrobiologischen Status von Marinaden sind sehr wenige Daten verfügbar. MAHLER (2004) untersuchte in einer Studie 53 Marinaden und Würzmischungen auf deren mikrobiologische Eigenschaften. Die Gesamtkeimzahlen in den analysierten Proben lagen dabei in einer Größenordnung von 10^3 bis 10^5 KbE/g. In jeweils 29 % der Proben wurden präsumtive *B. cereus* und *C. perfringens* nachgewiesen, wobei jedoch keine Quantifizierung erfolgte. 4 % der Proben wiesen Enterobakteriazeen bis zu 80 KbE/g und 24 % der Proben wiesen Milchsäurebakterien bis 400 KbE/g auf. Salmonellen und *E. coli* wurden nicht detektiert.

Der Eintrag von Mikroorganismen in Marinaden ist dabei über Gewürze möglich. Diese können mit einer Vielzahl von Keimen, einschließlich pathogener Bakterien, Schimmel- und Hefepilzen belastet sein (SCHWEIGGERT et al., 2007). Als vorrangige Kontaminanten von Gewürzen sind dabei aerobe Sporenbildner anzusehen (KNEIFEL et al., 1994; LITTLE et al., 2003; HAMMON, 2008). Das Ausmaß der mikrobiellen Kontamination von Gewürzen und damit auch der Marinaden ist abhängig von Art und Herkunft der Gewürzsorte, ihren antimikrobiellen Eigenschaften und der Hygiene bei Trocknung, Verarbeitung und Transport (BECKMANN et al., 1996).
Aufgrund des von Gewürzen ausgehenden hohen Kontaminationsrisikos für Lebensmittel hat die Deutsche Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie (DGHM) Warn- und Richtwerte erarbeitet, die Lebensmittelherstellern und –inverkehrbringern sowie der Überwachung als Orientierungshilfe ohne gesetzlich-regulatorischen Charakter dienen sollen (vgl. Tabelle 3).

Tabelle 3: Richt- und Warnwerte für getrocknete Kräuter[a)] und Gewürze[a)] (DGHM, 2010)

Keimart	Richtwert[*) b)]	Warnwert[**) b)]
Escherichia coli	1,0 x 10^3 KbE/g	1,0 x 10^4 KbE/g
Schimmelpilze	1,0 x 10^5 KbE/g	---
Bacillus cereus	1,0 x 10^3 KbE/g	1,0 x 10^4 KbE/g
Sporen sulfitreduzierender Clostridien	1,0 x 10^3 KbE/g	1,0 x 10^4 KbE/g
Salmonella spp.	-	Nicht nachweisbar in 25 g

*) Richtwerte geben eine Orientierung, welches produktspezifische Mikroorganismenspektrum zu erwarten und welche Mikroorganismengehalte in den jeweiligen Lebensmitteln bei Einhaltung einer guten Hygienepraxis akzeptabel sind.

**) Warnwerte geben Mikroorganismengehalte an, deren Überschreitung einen Hinweis darauf gibt, dass die Prinzipien der guten Hygienepraxis verletzt wurden und zudem eine Gesundheitsgefährdung des Verbrauchers nicht auszuschließen ist.

a) die zur Abgabe an den Endverbraucher bestimmt und zum Verzehr ohne weitere Erhitzung geeignet sind

b) Werte gelten für Endverbraucher

Mikrobiologie von marinierten Schweinefleischprodukten:

Zu mikrobiologischen Parametern von mariniertem Schweinefleisch liegt wenig Datenmaterial vor. Bei der Untersuchung von mariniertem Schweinefleisch (n=20) wurden in einer Studie in 9 Proben (45 %) Keimdichten an *B. cereus* von bis zu 10^2 KbE/g ermittelt (HAMMON, 2008) (vgl. Tabelle 12 in Abschnitt 2.5.5.2). Die aeroben Gesamtkeimzahlen lagen hier bei 10^3 bis 10^6 KbE/g und stiegen nach 7-tägiger Lagerung bei 4 °C auf Werte bis zu 10^7 KbE/g an.

Andere Studien in mariniertem Fleisch hatten vorrangig Untersuchungen der Verderbnisflora, insbesondere der Milchsäurebakterien, zum Inhalt. Nach BJÖRKROTH (2005) und SCHIRMER et al. (2009) konnten sich Milchsäurebakterien auf mariniertem Fleisch bis zum Ende des MHD

stark vermehren und sich zu der zahlenmäßig dominierenden Mikrobiota entwickeln. An derartigen Verderbnisprozessen waren vor allem *Lactobacillus* spp., *Leuconostoc* spp. und *Carnobacterium* spp. beteiligt. Dabei führte eine Marinierung nicht zu einer Verlängerung der Haltbarkeit, weil die Pufferkapazität des Fleisches und die Reaktionen der lipophilen Säuren mit Fetten und Ölen die mögliche antimikrobielle Wirkung der Säuren in den Marinaden neutralisieren könnten (BJÖRKROTH, 2005).
Für die Ableitung mikrobiologischer Richtwerte sind bisher keine Daten zur Charakterisierung und Prävalenz von pathogenen, toxinogenen Mikroorganismen in mariniertem Grillfleisch publiziert.

2.5 Vorkommen und Bedeutung von bakteriellen Zoonoseerregern in Schweinefleischprodukten

2.5.1 *Salmonella* spp.

2.5.1.1 Eigenschaften und lebensmittel-assoziierte Erkrankungen

Salmonellen sind gramnegative, sporenlose, fakultativ anaerobe Stäbchen, die sich morphologisch nicht von den anderen *Enterobacteriaceae* unterscheiden lassen. Die serologischen Eigenschaften von Salmonellen ergeben sich aus den O-Antigenen (somatische Antigene) und den H-Antigenen (Geißelantigene), die als Gesamtantigenformel der einzelnen, inzwischen etwa 2500 bekannten Serovare zusammen mit dem lateinischen Namen im Kauffmann-White-Schema niedergelegt sind. Dieses wird als international verbindliche Differenzierungsgrundlage verwendet und regelmäßig aktualisiert (GUIBOURDENCHE et al., 2010). Daneben ist die Weiterdifferenzierung anhand der Empfindlichkeit gegenüber Bakteriophagen (Lysotypisierung) üblich (WARD et al., 1987).

Im Jahr 2009 wurden 31 397 Salmonellose-Fälle in Deutschland gemeldet, 27 % weniger als im Jahr 2008 (ANON., 2010c). Damit ist die Salmonellose die zweithäufigste meldepflichtige bakterielle Infektionskrankheit. Im Zusammenhang mit Lebensmittelinfektionen wurden 2009 in Deutschland die Serovarietät *S.* Enteritidis für 69 % und *S.* Typhimurium für 12 % der Salmonellose-Ausbrüche verantwortlich gemacht (ANON., 2010a).

Die minimale infektiöse Dosis für die Auslösung einer Salmonellose liegt im Regelfall bei 10^5 Keimen, kann jedoch in Abhängigkeit von Immunstatus und Alter der betroffenen Personen mit ein bis zehn Keimen auch deutlich darunter liegen (D´AOUST, 2001). Eine klinische Manifestation der gastroenteritischen Salmonellose zeigt sich nach einer Inkubationszeit von etwa 12 bis 36 Stunden meist als nicht-septikämische, lokal begrenzte Enterocolitis mit Kopf- und Leibesschmerzen, mildem Fieber und Durchfall mit Exsikkose. In der Regel tritt eine Rekonvaleszenz nach fünf Tagen ein (MEYER, 1999). Schwere bakteriämische Zustände sowie Komplikationen wie das Reiter-Syndrom (Urethritis, Konjunktivitis, Polyarthritis) treten selten auf. Risikogruppen wie Kleinkinder, Ältere und Immunkomprimittierte sind meist empfänglicher, erkranken schwerer

und weisen eine höhere Letalität auf (SCALLAN et al., 2011). Gastroenteritische Salmonellen werden nach überstandener Infektion durchschnittlich vier bis fünf Wochen, vor allem bei Kleinkindern jedoch auch deutlich verlängert bis zu einem Jahr ausgeschieden (BUCHWALD et al., 1984; ANON., 2009a). Da Salmonellosen jedoch auch klinisch inapparent verlaufen können, kann von einer unbemerkten Salmonellenausscheidung des Personals von lebensmittelverarbeitenden Betrieben eine zusätzliche Kontaminationsgefahr ausgehen.

Die Hauptinfektionsquellen stellen Eier und Fleisch von Geflügel und Schweinen dar (EFSA, 2009b). Etwa 20 bis 30 % der lebensmittelbedingten Salmonellosen wurden mit dem Verzehr von Schweinefleisch und Schweinefleischprodukten assoziiert (STEINBACH et al., 1999; CONRATHS, 2004). In den Jahren 2001 bis 2004 wurden in Deutschland fünf größere Salmonellose-Ausbrüche auf kontaminiertes Schweinefleisch zurückgeführt (JANSEN et al., 2007).

2.5.1.2 Epidemiologie und Vorkommen in Schweinefleisch

Salmonellen kommen im Darmtrakt zahlreicher warm- und kaltblütiger Tiere vor. Dabei stellt insbesondere das symptomlose Trägertum von nicht-speziesadaptierten Serovaren in Schweinebeständen ein Problem dar (TSCHÄPE et al., 2002). In einer Grundlagenstudie des Bundesinstituts für Risikobewertung wurden im Zeitraum 2006 bis 2007 12,7 % der Schlachtschweine in Deutschland im kulturellen Nachweis positiv auf Salmonellen getestet (ANON., 2008a).

Stressbedingungen während des Transports und im Schlachthof erhöhen durch Translokation und Reaktivierung der Salmonellenausscheidung die Belastung des Schlachttierbestands weiter (FEHLHABER et al., 1999a; MARG et al., 2001; SEIDLER et al., 2001). Zusätzlich stellen direkte und indirekte Kreuzkontaminationen der Schlachtkörper im Verlauf des Schlachtprozesses ein weiteres Kontaminationsrisiko für Schweinefleisch und daraus hergestellte Produkte dar (BOTTELDOORN et al., 2003). Nationale und internationale Studien bezifferten das Vorkommen von Salmonellen in Schweinefleisch mit etwa 2 – 10 % (vgl. Tabelle 4). Bei der Serotypisierung *Salmonella*-positiver Proben aus Schlachtschweinen in Deutschland dominierte *S.* Typhimurium mit 55,7-61,1 % (ANON., 2008a; FRIEDRICH et al., 2010). Auch innerhalb der *Salmonella*-Isolate aus Lebensmitteln vom Schwein (n=1174) machte diese Serovar mit 50,3 % den Hauptanteil aus (FRIEDRICH et al., 2010). Studien über positive Salmonellenbefunde in Gewürzen mit bis zu 5,6 % implizieren, dass ein Eintrag dieser Keime in marinierte Schweinefleischprodukte auch über Gewürze möglich ist (vgl. Tabelle 4).

Tabelle 4: Vorkommen von Salmonellen in rohem Schweinefleisch und Gewürzen

Produkt	Anzahl untersucht n	Positive Proben n	(%)	Keim-zahl (KbE/g)	Referenz
Schweinefleisch	4170	75	(1,8)	k. A.	(MEYER et al., 2010)
Schweinefleisch	1038	18	(2,0)	<10	(YEH et al., 2005)
Schweinefleisch	3891	101	(2,6)	k. A.	(ANON., 2010b)
Schweinefleisch	720	22	(3,0)	k. A.	(PRENDERGAST et al., 2008)
Schweinefleisch	3821	187	(5,0)	k. A.	(BUSANI et al., 2005)
Schweinefleisch	1485	94	(6,0)	k. A.	(STOCK et al., 2001)
Schweinefleisch	384	37	(10,0)	k. A.	(DUFFY et al., 2001)
Gewürze	484	5	(1,0)	k. A.	(BECKMANN et al., 1996)
Gewürze	2965	44	(1,5)	k. A.	(SAGOO et al., 2009)
Gewürze	5754	230	(4,0)	k. A.	(HARTWIG et al., 2006)
Gewürze	233	13	(5,6)	k. A.	(MOREIRA et al., 2009)

k. A.: keine Angabe

2.5.1.3 Tenazität in Lebensmitteln

Salmonella (S.) spp. können als sehr widerstandsfähige Bakterien mit geringen Milieuansprüchen Temperaturschwankungen, niedrige pH-Werte, geringe Sauerstoffgehalte und osmotischen sowie oxidativen Stress überleben (FOSTER et al., 1995). Eine Vermehrung ist im Temperaturbereich von 5 bis 46 °C möglich, wobei das Optimum sich zwischen 35 und 45 °C befindet (D´AOUST, 2001). Bei längerer Lagerung von Lebensmitteln bei über 6 °C kann somit eine Anreicherung stattfinden. Zwar gelten Salmonellen aufgrund ihrer fehlenden Sporenbildung als hitzeempfindlich, dennoch sind milieuseitige Einflussfaktoren auf die Hitzeresistenz beschrieben. So ist bei Fleisch mit höheren Fettgehalten von einer niedrigeren Empfindlichkeit gegenüber letalen Effekten durch Hitze auszugehen (JUNEJA et al., 2000; SMITH et al., 2001). D´AOUST (1994) führte den protektiven Effekt von fetthaltigen Lebensmitteln auf die Einkapselung der Salmonellen in Lipidmicellen und die Reduktion der Wasseraktivität zurück. Auch niedrige Wasseraktivitäten in Lebensmitteln infolge von Abtrocknung und Hyperosmose resultierten in einer höheren Tenazität der Salmonellen gegenüber Hitze und anderen Umweltstressoren (MATTICK et al., 2000; KINSELLA et al., 2007; PODOLAK et al., 2010). Aus diesem Grund sind Salmonellen auch in teils bereits hitzebehandelten, trockenen Lebensmitteln mit niedrigem a_W-Wert, wie z. B. in Gewürzen nachweisbar (vgl. Tabelle 4). Mit einer Vermehrung von Salmonellen in Lebensmitteln mit a_W-Werten < 0,94 ist jedoch nicht zu rechnen (SINELL et al., 2005; BAUMGART et al., 2009).

Weitere protektive Effekte gehen in Fleisch und Fleischerzeugnissen von dem Anheftungsvermögen der Salmonellen an Membranen, insbesondere Fleischoberflächen, aus. Strukturell als Ganzes belassenes Muskelfleisch scheint dabei eine effektivere Schutzwirkung zu haben als Hackfleisch (ORTA-RAMIREZ et al., 2005). Verstärkt wurde das auch bei mariniertem Fleisch

festgestellt, bei dem eine ölbasierte Translokation der Keime ins Fleischinnere vermutet wird (WARSOW et al., 2008; VELASQUEZ et al., 2010). Adhärierte Bakterien sind resistenter gegenüber Hitze, Kälte und Säure als freie Zellen (HUMPHREY et al., 1997; GAWANDE et al., 2002; KINSELLA et al., 2007). Daher sind *Salmonella* spp. in Frischfleisch bei Temperaturen um -1 bis 3 °C etwa zwei Wochen nachweisbar und können sogar in gefrorenem Fleisch längere Zeit überleben (SCHMIDT, 1985; ESCARTIN et al., 2000; MELDRUM et al., 2005; DOMINGUEZ et al., 2009). Des Weiteren haben diese Keime bei Kühltemperaturen von etwa 4 °C infolge von Änderungen der Membranfluidität und des Proteinstoffwechsels erhöhte Überlebensraten gegenüber der Einwirkung von niedrigen Wasseraktivitäten und osmotischem Stress (KOELENSMID et al., 1964; BENEY et al., 2001; KINSELLA et al., 2007). Daher konnte auch in verschiedenen Inokulationsversuchen mit Lebensmitteln eine verlängerte Überlebenszeit von Salmonellen bei Kühllagerung gegenüber einer Lagerung bei Raumtemperatur nachgewiesen werden (HOLLIDAY et al., 2003; FRIEDMAN et al., 2007; FRANCO et al., 2010; PATHANIA et al., 2010). Im sauren Milieu sterben Salmonellen schnell ab, wobei jedoch die Art der Säure ein bestimmender Faktor ist. So liegt der minimale pH-Wert für eine Vermehrung für Zitronensäure mit 4,1 deutlich niedriger als für Essigsäure mit 5,4 (JAY, 1996). Bei pH-Werten über 9,5 sistiert die Vermehrung.

Daten zur Überlebensfähigkeit von Salmonellen in mariniertem Schweinefleisch sind nicht verfügbar. Aktuelle Studien zur Tenazität von Salmonellen untersuchten die Auswirkungen von Stressoren wie Säurezusatz, hohen Salzgehalt, Trocknung und antimikrobiellen Substanzen in Marinaden und marinierten Trockenfleischprodukten, wie Beef Jerky (vgl. Tabelle 5). Aufgrund unterschiedlicher methodischer Ansätze ist ein direkter Vergleich der Ergebnisse nicht möglich. Dennoch lässt sich durch den Einsatz von Marinaden eine sehr effektive Reduktion der Ausgangskeimbelastung ableiten. So wurden im Falle von Teriyaki-Marinade innerhalb 32 Stunden fast alle inokulierten Salmonellenstämme abgetötet. In Beef Jerky kann durch Dippen mit Essigsäure vor der Marinierung eine Reduktion von über 10^6 KbE/g der 10^7 KbE/g inokulierten Salmonellen nach 10 Stunden erzielt werden (vgl. Tabelle 5).

Tabelle 5: Übersicht zur Überlebensfähigkeit von *Salmonella* spp. in Marinaden und marinierten Trockenfleischprodukten unter Einsatz von verschiedenen Stressoren

Inokulat (KbE/g)	Produkt	Stressor	Stärkster Effekt auf bakterielles Wachstum	Referenz
10^4	Selbst hergestellte Marinaden	Alkohol und Polyphenole (Rotwein, Weißwein), Knoblauch, Oregano	Knoblauchmarinade bzw. Rotwein-Oregano-Knoblauch-Marinade: Reduktion um 10^2 KbE/g nach 60 min bei 4°C	(FRIEDMAN et al., 2007)
10^{8-9}	Kommerzielle Marinaden (Teriyaki*) und Lemon-Pepper)	Säure, Salzgehalt, Gewürzextrakte	Teriyaki-Marinade: Reduktion um 10^{8-9} KbE/g nach 32 Stunden	(PATHANIA et al., 2010)
10^6	Beef Jerky	Säure, osmotischer Stress (Salzgehalt, Dehydratation), Hitze	Nicht-säureadaptierte Stämme, Marinierung nach Tween 20- und Essigsäure-Dip: Reduktion um 10^{5-6} KbE/g nach 60 Tagen	(CALICIOGLU et al., 2003b)
10^6	Basturma	Gewürze, osmotischer Stress (Pökelsalz, Dehydratation)	Reduktion um 10^5 KbE/g nach 35 Tagen	(INGHAM et al., 2006a)
10^9	Beef Jerky	Säure, osmotischer Stress (Salzgehalt, Dehydratation), Hitze	Reduktion um $>10^7$ KbE/g nach 1,5 Stunden	(PORTO-FETT et al., 2008)
10^7	Beef Jerky	Säure, osmotischer Stress (Salzgehalt, Dehydratation), Hitze	Marinierung nach Essigsäure-Dip: Reduktion um $>10^6$ KbE/g nach 10 Stunden	(YOON et al., 2009)

*) Teriyaki: Marinade aus Sojasauce, Ingwer, Sake, Mirin, Zucker und Honig

2.5.2 Shigatoxinbildende *E. coli* (STEC)

2.5.2.1 Eigenschaften und lebensmittel-assoziierte Erkrankungen

Die Spezies *Escherichia (E.) coli* gehört als gramnegatives, Oxidase-negatives, fakultativ anaerob wachsendes, bewegliches Stäbchen der Familie der *Enterobacteriaceae* an. Die Vielfalt dieser Art ist durch das Vorkommen unterschiedlicher Zellwand-, Geißel- sowie Kapselantigene bedingt. Die darauf basierende serologische Einteilung ist für die Zuordnung einzelner Stämme zu bestimmten Pathogruppen von Bedeutung. In der Reihenfolge ihrer Bedeutung als Lebensmittelinfektionserreger sind neben enterohämorrhagischen *E. coli* (EHEC), die enterotoxinogenen *E. coli* (ETEC), die enteropathogenen *E. coli* (EPEC) und die enteroinvasiven *E. coli* (EIEC) zu nennen (NATARO et al., 1998; BÜLTE, 2005). Ein zur Shigatoxinbildung befähigter *E. coli* wird als shigatoxinogener *E. coli* (STEC) bezeichnet. Diese Shigatoxine sind die wichtigsten Virulenzfaktoren der EHEC (GYLES, 2007). Welche zusätzlichen Virulenzfaktoren (z.B. Intimin, EHEC-Hämolysin) für die Entstehung von EHEC-Erkrankungen des Menschen erforderlich sind, ist bisher nicht restlos geklärt. Für den Bereich der Lebensmittelhygiene ist es schwierig, positive STEC-Befunde in Lebensmitteln zu beurteilen, vor allem wenn sie nicht in Zusammenhang mit einem Ausbruchsgeschehen stehen. Daher werden STEC aus Lebensmitteln als potentielle EHEC-Erreger eingestuft (BOCKEMÜHL et al., 1996; ANON., 2008b). Ein Großteil der inzwischen über 200 bekannten STEC-Serovarietäten entspricht phänotypisch der normalen Darmflora, was zusätzlich Schwierigkeiten in der Diagnostik bereitet (BETTELHEIM, 2001).

EHEC-Stämme gehören einer Vielzahl von Serotypen an. In der Vergangenheit konzentrierte sich der Nachweis auf O157:H7-Stämme, die für eine Vielzahl von schwerwiegenden Ausbrüchen verantwortlich gemacht wurden. In Deutschland und in den meisten anderen europäischen Ländern gewinnen zunehmend andere Serotypen als die klassische EHEC-Serovar O157:H7 an Bedeutung (FAIRBROTHER et al., 2006; JOHNSON et al., 2006). Als potentiell pathogene nicht-O157-Serogruppen sind hierbei insbesondere die O-Gruppen O26, O91, O103, O111, O113, O118 und O145-Stämme beschrieben (ACHESON, 2000; BEUTIN et al., 2007; BETTELHEIM, 2007; ANON., 2010c).

Als gemeinsame Virulenzfaktoren sind die Haupttypen des Shigatoxins Stx1 und Stx2 von Bedeutung. Das Shigatoxin kann zytotoxisch, enterotoxisch oder neurotoxisch wirken und zählt neben dem Botulinumtoxin zu den potentesten bakteriellen Giften (MAINIL, 1999). Die Toxintypen 1 und 2 sind in Form von zwei Untereinheiten teils auf zwei lambdoiden Phagen, teils phagenunabhängig chromosomal codiert, was die hochgradige Variabilität dieser Toxine begründet (MAINIL et al., 2005). Mit dem Entstehen von HC und HUS sind hochvirulente STEC-Stämme mit den Stx-Typen Stx2 und Stx2d korreliert (FRIEDRICH et al., 2002; BIDET et al., 2005). Andere Typen, wie das an Schweine assoziierte Stx2e, treten beim Menschen meist im Zusammenhang mit unkomplizierten Diarrhoeformen und asymptomatischen Ausscheidern auf (OSEK, 1999; FRATAMICO et al., 2004; BEUTIN et al., 2007). Weitere wichtige Virulenzfaktoren sind in Tabelle 6 dargestellt.

Tabelle 6: Wichtige Virulenzfaktoren von STEC/EHEC

Virulenzfaktor	Gen	Codierung	Wirkung	Referenz
Stx1-Gruppe	*stx1*	Lambdoider Phage	Über Gb3-Rezeptor: Zytotoxisch an Endothelien, ZNS, Niere	(WEINSTEIN et al. 1988; MAINIL, 1999; OSEK, 1999; FRIEDRICH et al., 2002; FRATAMICO et al., 2004; BIDET et al. 2005; BEUTIN et al., 2007)
	stx1c	Lambdoider Phage		
	stx1d	Lambdoider Phage		
Stx2-Gruppe	*stx2*	Lambdoider Phage	Über Gb3-Rezeptor: neurotoxisch, nephrotoxisch (meist mit HUS/HC korreliert)	
	stx2c	Lambdoider Phage		
	stx2e	Lambdoider Phage	Über Gb4-Rezeptor: Endothelschäden	
	stx2d	Lambdoider Phage	Über Gb3-Rezeptor: neurotoxisch, nephrotoxisch	
	stx2f	Lambdoider Phage		
	stx2g	Lambdoider Phage		
Intimin	*eae*	Chromosom im LEE (locus of enterocyte effacement)	Adhärenz an Enterozyten und Degeneration der Mikrovilli	(SCHMIDT et al., 1994a; MCDANIEL et al., 1995; YUSTE et al., 2008)
Enterohämolysin (EhlyA)	*hlyA*	Plasmid	Zytolyse durch Porenbildung	(SCHMIDT et al., 1995)

Die Diagnostik von STEC/EHEC sollte die genannten Virulenzfaktoren und Serotypenbestimmung mit einbeziehen, um epidemiologische Rückschlüsse ziehen zu können. Aufgrund der phagen- und plasmidbedingten genetischen Variabilität in der Ausbildung von Virulenzfaktoren können bei Erkrankungen auch atypische Stämme auftreten, z. B. EHEC-Stämme ohne Shigatoxinproduktion (SCHMIDT et al., 1999).

EHEC können beim Menschen schwere, teils lebensbedrohliche Krankheitsbilder auslösen, für die keine kausale Therapie zur Verfügung steht (EFSA, 2009b). Daher besteht nach § 7 Infektionsschutzgesetz (IfSG) eine Meldepflicht für EHEC-Ausscheider und -Erkrankte. Im Jahr 2009 wurden in Deutschland 835 Erkrankungen durch EHEC gemeldet. Zu den bei Erkrankungen in Deutschland am häufigsten beteiligten EHEC-Serovarietäten zählten die O-Gruppen O26 (20 %), O157 (17 %) und O103 (11 %) (ANON., 2010c). Bakterienmengen von 10-100 KbE/g können für eine Infektion ausreichend sein (KARCH et al., 1999; BÜLTE, 2002; ANON., 2008b). EHEC-Infektionen des Menschen können zu einer akuten Gastroenteritis, hämorrhagischen Colitis (HC) bis hin zu lebensbedrohlichen postinfektiösen Syndromen wie dem hämolytisch-urämischen Syndrom (HUS) und der thrombotisch-thrombozytopenischen Purpura (TTP) führen (GRIFFIN et al., 1991; PEACOCK et al., 2001; TARR et al., 2005; ZIMMERHACKL et al., 2010). Im Jahr 2009 wurden in Deutschland 66 HUS-Fälle gemeldet (ANON., 2010c). Die Übertragung von EHEC auf den Menschen erfolgt in erster Linie durch die Aufnahme von rohen bzw. halbgaren tierischen Lebensmitteln, v. a. Fleisch- und Rohmilchprodukten (GRIFFIN et al., 1991; ANON., 2008b).

2.5.2.2 Epidemiologie und Vorkommen in Schweinefleisch

Das Hauptreservoir von STEC/EHEC stellen kleine und große Wiederkäuer inklusive Wildwiederkäuer dar (CAPRIOLI et al., 2005; GYLES, 2007; HUSSEIN, 2007). In Schweinebeständen variierten die Nachweisraten von STEC in Faecesproben von 0,08 – 11,9 % und umfassten überwiegend neben O157-Stämmen auch O26-, O111-, und O141-Stämme (STÖCKER, 2002; FEDER et al., 2003; ERIKSSON et al., 2003; KEEN et al., 2006; OJO et al., 2010). In einer Studie von BAUERFEIND et al. (2004) codierten alle STEC-Isolate aus 215 (11,9 %) positiven Kotproben von Schweinen (n=1810) ausschließlich für Stx2e und waren negativ für weitere Toxintypen und Intimin. Diese Stämme zeigten alle Charakteristika des *E. coli*- Stammes, welcher die Ödemkrankheit beim Schwein auslöst (WEINSTEIN et al., 1988). Da solche STEC- Stämme lediglich mit unkomplizierten Diarrhoeformen beim Menschen korreliert sind, wird die Spezies Schwein im Allgemeinen nicht als relevantes Reservoir für hochvirulente EHEC- Stämme angesehen (BAUERFEIND et al., 2004; ANON., 2008b).
Wegen der ausgeprägten Überlebensfähigkeit insbesondere der EHEC-Stämme in der unbelebten Umwelt ist eine sekundäre Kontamination von Produkten aus Schweinefleisch auf allen Prozessstufen der Lebensmittelherstellung möglich (MAULE, 2000; BROWN et al., 2002). Ein mehrmonatiges symptomloses Ausscheidertum wurde auch bei Menschen, die in der Fleisch verarbeitenden Industrie beschäftigt waren, beobachtet (GAREIS et al., 2000). Vor diesem Hintergrund ist die Kontrolle der Betriebshygiene einschließlich der Personalhygiene von entscheidender Bedeutung (BALJER et al., 1999; MAINIL et al., 2005). Im Schweinefleisch wurden in aktueller Literatur STEC-Kontaminationsraten von 0,1-12 % beschrieben (vgl. Tabelle 7), wobei hauptsächlich Stx2e-Produzenten detektiert wurden (BOUVET et al., 2002; BEUTIN et al., 2007).

Tabelle 7: Vorkommen von STEC und Toxinsubtypen in rohem Schweinefleisch

Produkt	Anzahl untersucht n	Positive Proben		Toxin-subtyp	Referenz
		n	(%)		
Schweinefleisch	4751	k.A.	(0,1)	k. A.	(EFSA, 2009b)
Schweinefleisch	1350	18	(1,3)	22 % stx2	(LEE et al., 2009)
Schweinefleisch	80	2	(2,5)	50 % stx1 50 % stx1+2	(JO et al., 2004)
Schweinefleisch	35	1	(2,9)	100 % stx2	(BROOKS et al., 2001)
Schweinefleisch	30	1	(3,3)	100 % stx2	(ZHOU et al., 2002)
Schweinefleisch	200	8	(4,0)	k. A.	(OJO et al., 2010)
Schweinefleisch	1600	188	(12,0)	89 % stx2e	(BOUVET et al., 2002)

k. A.: keine Angabe

2.5.2.3 Tenazität in Lebensmitteln

STEC-Stämme können hochresistent gegenüber physikochemischem Stress, wie niedrige pH-Werte und Trockenheit sein und so über längere Zeit in der unbelebten Umwelt überleben (MAULE, 2000; BROWN et al., 2002). Vor allem enterohämorrhagische *E. coli* zeichnen sich durch eine ausgeprägte Resistenz gegenüber niedrigen pH-Werten aus, was ihnen eine Passage des sauren Milieu des Magens ermöglicht (BEUTIN et al., 1995; LIN et al., 1996; BHAGWAT et al., 2005). Der minimale pH-Wert für eine Vermehrung beträgt 5,0. Wichtig sind dabei die Art der Säure, die stammspezifischen Fähigkeiten zur Säureadaptation und die Wachstumsphase zum Zeitpunkt der Säureeinwirkung (ZWEIFEL et al., 2009). Eine induzierte Säureresistenz führt möglicherweise auch zu einer allgemeinen Stressantwort und somit zu einer höheren Tenazität gegenüber Hitze, Salz und Bestrahlung (CHUNG et al., 2006). Die Vermehrung von STEC sistiert bei Temperaturen < 8 °C bzw. > 45 °C (RAGHUBEER et al., 1990; KAPER et al., 1998). Gegenüber Tiefgefrieren zeigen diese Keime eine hohe Widerstandsfähigkeit. Auch nach mehrwöchiger Tiefkühllagerung von EHEC O157-kontaminiertem Fleisch wurden noch lebende, infektionsfähige Keime nachgewiesen. Möglicherweise beruht diese Überlebensfähigkeit auf einem kryoprotektiven Effekt der Matrix Fleisch (CHAPMAN, 1995; CASARIN et al., 2009; KING et al., 2009). Die Resistenz gegen Umweltfaktoren zeigt sich vor allem bei O157-Stämmen: So kann diese Serovar pH-Werte bis 2, NaCl-Konzentrationen bis 8,5 % und a_W-Werte bis 0,95 überdauern (KAPER et al., 1998; BAUMGART et al., 2009).

Bei einer küchenüblichen Erhitzung mit einer Kerntemperatur von 70 °C für eine Minute werden EHEC im Regelfall zuverlässig abgetötet. Jedoch kann die Hitzeresistenz in Abhängigkeit von Wachstumsphase und Stress durch niedrige Wasseraktivitäten erheblich ansteigen (KAUR et al., 1998). Durch das Marinieren von Fleisch kann zwar eine Reduktion von EHEC erreicht werden, allerdings können einige Stämme die zum Teil sehr niedrigen pH- und a_W-Werte der Marinaden überleben (WILLIAMS-CAMPBELL et al., 2001; CALICIOGLU et al., 2002; YOON et al., 2005).

2.5.3 *Listeria monocytogenes*

2.5.3.1 Eigenschaften und lebensmittel-assoziierte Erkrankungen

Listerien sind kleine, sporenlose, grampositive, fakultativ anaerobe Stäbchenbakterien (SNEATH et al., 1996). Innerhalb der sieben *Listeria*-Spezies besitzt *Listeria (L.) monocytogenes* die größte lebensmittelhygienische Relevanz. Mit Erkrankungen des Menschen wurden dabei vor allem Serotyp 1/2a, 1/2b und 4b assoziiert (FARBER et al., 1991; KISS et al., 2006; ANON., 2010c). Während in der EU überwiegend der Serotyp 4b für Krankheitsausbrüche verantwortlich gemacht wird, zeichnet sich in den USA, Australien und Kanada eine zunehmende Bedeutung von Serotyp 1/2a und 1/2b ab (KISS et al., 2006; YIFAN et al., 2007; ANON., 2010d).

Die humane Listeriose kann sporadisch oder lebensmittel-assoziiert auftreten (SCHUCHAT et al., 1992; MEAD et al., 2006). Mit 394 gemeldeten Fällen in Deutschland im Jahr 2009 stellte sie eine verhältnismäßig seltene Erkrankung dar (ANON., 2010c). Ungeachtet dessen sind schwere Krankheitsverläufe mit einer hohen Mortalität von 20-30 %, bei Risikogruppen (alte Menschen, Neugeborene, Schwangere, immunsupprimierte Menschen) bis 45 %, möglich (VAZQUEZ-BOLAND et al., 2001; DENNY et al., 2008; ANON., 2010d; SCALLAN et al., 2011). Trotz seit 2001 bestehender genereller Meldepflicht nach Infektionsschutzgesetz (§7 (1) IfSG) aller *L. monocytogenes*-bedingten Erkrankungen, die mit positiven direktem Erregernachweis in Blut, Liquor und fetalen Abstrichen einhergehen, wird die Erkrankungsrate wegen der schwierigen Diagnosestellung oft unterschätzt (FARBER et al., 1991; MCLAUCHLIN et al., 2004). Nach der oralen Aufnahme von *L. monocytogenes* können die Betroffenen je nach Immunitätslage zu symptomlosen Ausscheidern werden oder nach einer variablen Inkubationszeit von bis zu 70 Tagen eine klinisch manifeste Listeriose entwickeln (HOF, 2001; SWAMINATHAN et al., 2007; ANON., 2010d). Bei guter Abwehrlage bildet der Erkrankte unter Umständen leichtes Fieber, Gastroenteritis oder grippeähnliche Symptome aus (AURELI et al., 2000), bei hoher Invasivität kann sich jedoch eine schwere Erkrankung mit Sepsis, Meningoencephalitis und bei Schwangeren Fehl- und Frühgeburten entwickeln, die vor allem für Risikogruppen lebensbedrohliche Folgen haben kann (SCHLECH, 2000; HOF, 2001; SIEGMAN-IGRA et al., 2002; DOGANAY, 2003). Auch eine Manifestation als Lokalinfektion von Augen und Haut mit anschließender Generalisierung wurde dokumentiert (MCLAUCHLIN, 1996; BETRIU et al., 2001; DOGANAY, 2003).
Genaue Daten zur minimalen infektiösen Dosis sind aufgrund der langen Inkubationszeit schwer zu erheben. Wegen des häufigen Nachweises von weniger als 10 KbE/g in vielen Lebensmitteln wird eine solch geringe Infektionsdosis für Erkrankungsfälle kontrovers diskutiert (MCLAUCHLIN et al., 2004; THEVENOT et al., 2006). Ein realistisches Infektionsrisiko scheint für den Verbraucher erst ab Kontaminationen über 100 KbE/ g Lebensmittel zum Zeitpunkt des Verzehrs zu bestehen (NORRUNG, 2000). Seit 2006 wird in für Risikogruppen produzierten Lebensmitteln nach Anhang 1 Kapitel 1 der Verordnung (EG) 2073/2005 der Kommission über mikrobiologische Kriterien für Lebensmittel die Nulltoleranz von *L. monocytogenes* in 25 g Lebensmittel gefordert.

Am häufigsten erfolgte die Erregeraufnahme über den Verzehr von kontaminierten Lebensmitteln, v. a. von verzehrsfertigen Fleisch- und Fischprodukten (SCHLECH, 2000; SWAMINATHAN et al., 2007; ANON., 2010a). Auch Schweinefleischprodukte waren bisher in einigen großen Lebensmittelinfektionsausbrüchen beteiligt (LONCAREVIC et al., 1997; GOULET et al., 1998; DE VALK et al., 2001; MEAD et al., 2006; PICHLER et al., 2009).

2.5.3.2 Epidemiologie und Vorkommen in Schweinefleisch

Die Anspruchslosigkeit von *L. monocytogenes* an das Substrat erklärt das ubiquitäre Vorkommen dieser Bakterien, die z. B. im Wasser, Erdboden, Silage, Schlachthofabfällen oder Abflüssen von Lebensmittel verarbeitenden Betrieben zu finden sind (HOF, 2003; THEVENOT et al., 2006). Aufgrund der weiten Verbreitung im landwirtschaftlichen Bereich, insbesondere in verdorbener Silage, ist nach oraler Aufnahme mit lokaler Besiedelung des Darms und symptomloser Ausscheidung bei landwirtschaftlichen Nutztieren zu rechnen (FARBER et al., 1991; NIGHTINGALE et al., 2004). Kotuntersuchungen in Schweinebeständen ergaben eine geringe Prävalenz von *L. monocytogenes* von etwa 6 % (BUROW et al., 1996; WESLEY et al., 2008; HELLSTROM et al., 2010). Höhere Nachweisraten dieses Keims (bis zu 61 %) wurden in Tonsillen der Schlachtschweine beschrieben, wodurch es während des Schlachtprozesses zu einer Keimverbreitung kommen kann (FENLON et al., 1996; KANUGANTI et al., 2002; AUTIO et al., 2004).
Weiterhin sind Kreuzkontaminationen des Fleisches über belebte und unbelebte Vektoren an Schlachthöfen und lebensmittelverarbeitenden Betrieben durch die Fähigkeit von Listerien zur Adhäsion und Biofilmbildung möglich (HOF, 2003; BORUCKI et al., 2003; LIN et al., 2006; KORNACKI et al., 2007). Da sich *L. monocytogenes* auch bei Kühltemperaturen vermehren kann, sind bei der Lebensmittelproduktion insbesondere bereits hitzebehandelte, gekühlt gelagerte, vakuumverpackte, verzehrsfertige tierische Lebensmittel als problematisch einzustufen (BOERLIN et al., 1991; BUROW et al., 1996; TSIGARIDA et al., 2000; SWAMINATHAN et al., 2007; NETSCHAJEW et al., 2009; ANON., 2010d). Rohfleischprodukte stellen nur bei Rohverzehr bzw. bei inadäquater hygienischer Handhabung im Haushalt des Verbrauchers ein Infektionsrisiko dar (VAN COILLIE et al., 2004; MATARAGAS et al., 2008). In Schweinefleisch wurde dieser Keim in etwa 8-20 % der Proben, in Einzelfällen in sogar bis zu 45 % nachgewiesen (vgl. Tabelle 8). Isolate aus Schweinefleischprodukten wurden überwiegend als Serotyp 1/2a charakterisiert (HELLSTROM et al., 2007; HONG et al., 2007; HELLSTROM et al., 2010).

Tabelle 8: Vorkommen von *L. monocytogenes* in rohem Schweinefleisch

Produkt	Anzahl untersucht n	Positive Proben		Keimzahl (KbE/g)	Referenz
		n	(%)		
Schweinefleisch	1038	8	(1,0)	k. A.	(YEH et al., 2005)
Schweinefleisch	80	4	(5,1)	k. A.	(MENGESHA et al., 2009)
Schweinefleisch	1024	105	(10,3)	k. A.	(BUSANI et al., 2005)
Schweinefleisch	152	19	(12,5)	k. A.	(KARAKOLEV, 2009)
Schweinefleisch	384	76	(20,0)	k. A.	(DUFFY et al., 2001)
Schweinefleisch	800	192	(24,0)	k. A.	(BOHAYCHUK et al., 2006)
Schweinefleisch	8	3	(36,0)	k. A.	(NETSCHAJEW et al., 2009)
Schweinehackfleisch	19	8	(42,1)	$< 10^2$	(VAN COILLIE et al., 2004)
Schweinehackfleisch	340	153	(45,0)	k. A.	(KANUGANTI et al., 2002)

k. A.: keine Angabe

2.5.3.3 Tenazität in Lebensmitteln

L. monocytogenes ist ein im Wachstum anspruchsloser, sehr anpassungsfähiger und widerstandsfähiger Lebensmittelinfektionserreger, der trotz einer Vielzahl von technologischen Hürden in Lebensmitteln überleben kann (FARBER et al., 1991; KORNACKI et al., 2007). Aufgrund psychrotropher Eigenschaften kann dieser Keim in gekühlten und gefrorenen Lebensmitteln mehrere Monate überdauern (GIANFRANCESCHI et al., 1996; BEAUCHAMP et al., 2010). Eine Vermehrung ist in Lebensmitteln bei sonst optimalen Bedingungen in einem Temperaturbereich von -0,4 °C bis 45 °C möglich, wobei Temperaturen kleiner als 10 °C zu signifikanten Verzögerungen in lag-Phase und Generationszeit führen (JUNTTILA et al., 1988; CHAN et al., 2009). Über Änderungen in ihrem Stoffwechsel können *L. monocytogenes* bei niedrigen Temperaturen um 10 °C in Medien mit hohen Salzgehalten von mehr als 10 % und saurem pH-Wert besser überleben als bei höheren Temperaturen von etwa 37 °C (SORRELLS et al., 1989; FRIEDMAN et al., 2007). Auch in Vakuumverpackungen weist dieser fakultativ anaerobe Keim bei Kühltemperaturen höhere Überlebensraten auf als bei Raumtemperatur (BYELASHOV et al., 2009).

Da eine ausschließliche Kühlung keine Sicherheit garantiert, hängt die Kontrolle der Vermehrung von *L. monocytogenes* maßgeblich von anderen Faktoren ab, wie dem Vorhandensein einer kompetitiven Flora (z.B. Bacteriocin-produzierenden Milchsäurebakterien) (DE MARTINIS et al., 1998; KOUAKOU et al., 2010), dem pH-Wert und der Salzkonzentration des Lebensmittels (KATHARIOU, 2002; ANON., 2010d). Listerien können sich innerhalb von pH-Werten zwischen 4,4 und 9,4 vermehren, wobei niedrige pH-Werte bei einigen Stämmen zu einer noch höheren Säuretoleranz führen können (FALEIRO et al., 2003). Hinsichtlich der Wasseraktivität ist ein Wachstum von *L. monocytogenes* von Werten bis zu 0,93, teilweise bis zu 0,89 möglich (KOUTSOUMANIS et al., 2004). NaCl-Konzentrationen von bis zu 10 % werden durch *L. monocytogenes* toleriert. Ein Überleben ist in Abhängigkeit von pH-Wert und Temperatur bis zu einem NaCl-Gehalt von 20-30 % möglich. Zahlreiche Studien belegen eine ausgeprägte Kreuzprotektion gegen Umweltstress (saurer pH, niedriger a_W-Wert, hohe Salzgehalte, hohe Temperaturen) nach initialer Einwirkung von subletalen Stressoren wie Säure- oder Hitzeschock (LOU et al., 1997; FALEIRO et al., 2003; KOUTSOUMANIS et al., 2003; SKANDAMIS et al., 2008). Bei Salzgehalten von 10 % und a_W-Werten kleiner als 0,92 wird damit *L. monocytogenes* zum hitzeresistentesten vegetativen Pathogen (VAN ASSELT et al., 2006). Hohe Fettgehalte in Lebensmitteln, v. a. in Fleisch, scheinen protektiv zu wirken und ebenfalls die Hitzetoleranz zu verstärken (FAIN et al., 1991; MURPHY et al., 2004). Daneben können Listerien in optimalen Milieubedingungen subletale Zellschädigungen, wie z. B. durch Nitritzusatz, regulieren (NGUTTER et al., 2003). Temperaturen über 70 °C töten *L. monocytogenes* ab (MACKEY et al., 1990).

Aufgrund der ausgeprägten Tenazität gegen Stressoren wie Säurezusatz, hohen Salzgehalt, Trocknung und antimikrobielle Substanzen wird die Überlebensfähigkeit von *L. monocytogenes* derzeit im Rahmen von Challengestudien insbesondere in Marinaden und mariniertem Fleisch (v.a. Beef Jerky) überprüft (vgl. Tabelle 9). Aufgrund unterschiedlicher methodischer Ansätze ist ein direkter Vergleich der dargestellten Ergebnisse nicht möglich. Dennoch lässt sich durch den

Einsatz von Marinaden eine sehr effektive Reduktion der Ausgangskeimbelastung ableiten. Bei Beef Jerky führte das Dippen in Essigsäure vor der Marinierung und Abtrocknung zum Absterben aller inokulierten Listerienstämme innerhalb von 28 Tagen (vgl. Tabelle 9).

Tabelle 9: Übersicht zur Überlebensfähigkeit von *L. monocytogenes* in Marinaden und marinierten Fleischprodukten unter Einsatz von verschiedenen Stressoren

Inokulat (KbE/g)	**Produkt**	**Stressor**	**Stärkster Effekt auf bakterielles Wachstum**	**Referenz**
10^4	Selbst hergestellte Marinaden	Alkohol und Polyphenole (Rotwein, Weißwein), Knoblauch, Oregano	Rotwein-Oregano-Marinade: Reduktion um 10^2 KbE/g nach 60 min bei 37°C	(FRIEDMAN et al., 2007)
10^4	Schweinefleisch	Rotweinmarinade, Ultraschall	Rotweinmarinade: Reduktion um 10^2 KbE/g nach 3 Tagen Ultraschallbehandlung: Zusätzliche Reduktion um 10 KbE/g	(BIRK et al., 2009)
10^6	Basturma*)	Gewürze, osmotischer Stress (Pökelsalz, Dehydratation)	Reduktion um 10^5 KbE/g nach 35 Tagen	(INGHAM et al., 2006a)
10^6	Beef Jerky	Säure, osmotischer Stress (Salzgehalt, Dehydratation), Hitze, Anaerobiose	Reduktion auf 10^4-10^5 KbE/g nach 4 Wochen	(INGHAM et al., 2006b)
10^6	Beef Jerky	Säure, osmotischer Stress (Salzgehalt, Dehydratation), Hitze	Marinierung nach Essigsäure-Dip: Reduktion um 10^6 KbE/g nach 28 Tagen	(CALICIOGLU et al., 2003a)
10^9	Beef Jerky	Säure, osmotischer Stress (Salzgehalt, Dehydratation), Hitze	Reduktion um >10^7 KbE/g nach 1,5 Stunden	(PORTO-FETT et al., 2008)

*) Basturma: gewürztes, gepresstes Rinderdörrfleisch

2.5.4 *Staphylococcus aureus*

2.5.4.1 Eigenschaften und lebensmittel-assoziierte Erkrankungen

Staphylococcus (St.) aureus sind grampositive, Katalase-positive, fakultativ anaerobe Kokken der Familie *Micrococcaceae* (SNEATH et al., 1996). Er gilt weltweit als einer der wichtigsten und häufigsten Lebensmittelintoxikationserreger (KANEKO et al., 2000; SHIMIZU et al., 2000; OLSEN et al., 2000; DO CARMO et al., 2004; EFSA, 2009b). Durch die Bildung hitzestabiler, superantigenetisch wirkender Enterotoxine und Enzyme besitzt dieser Keim eine große klinische Bedeutung (LELOIR et al., 2003; ARGUDIN et al., 2010). Die bisher 22 identifizierten Exotoxine umfassen neben dem toxic shock syndrome toxin 1 (TSST-1), Staphylokokken-Enterotoxine (SE) und Enterotoxin-ähnliche Proteine. Neben den bekannten, epidemiologisch bedeutenden SE-Hauptgruppen A bis E wurden in neuerer Literatur noch weitere Varianten (SEG bis SEV) beschrieben (THOMAS et al., 2006; SCHLIEVERT et al., 2007).

Für die Bildung von Enterotoxinen in kontaminierten Lebensmitteln sind intrinsische Faktoren (a_W-Wert, pH-Wert, Temperatur, Salzgehalt) und ein massives Wachstum des Keims entscheidend (WALLIN-CARLQUIST et al., 2010). Es wird davon ausgegangen, dass *S. aureus*-Populationen erst ab 10^5-10^6 KbE/g eine gesundheitsbedenkliche Toxinkonzentration produzieren können (BENNETT, 2005; HENNEKINNE et al., 2010). Die minimale toxische Dosis beträgt für SEA 0,1 µg/Person (EVENSON et al., 1988).

Am häufigsten mit Erkrankungsfällen waren bisher SEA, gefolgt von SED und SEB korreliert (CHA et al., 2006; BECKER et al., 2007; KEROUANTON et al., 2007; CHIANG et al., 2008; SCHMID et al., 2009). Einmal gebildete Toxine können weder durch übliche Koch- und Erhitzungsprozesse noch durch Verdauungsenzyme inaktiviert werden (GENIGEORGIS, 1989; BETLEY et al., 1992; BALABAN et al., 2000; MARTIN et al., 2004; BENNETT, 2005). Nach der Aufnahme des während der späten Wachstumsphase präformierten Enterotoxins kann es innerhalb von 1-6 Stunden zu Bauchkrämpfen, Vomitus und Nausea mit oder ohne Diarrhoe kommen. Die Erkrankung ist meist selbstlimitierend und klingt nach 1-2 Tagen ab (GENIGEORGIS, 1989; TRANTER, 1990; MURRAY, 2005). Komplikationen bei Säuglingen und älteren Patienten, wie Krämpfe und Kreislaufkollaps durch Elektrolytentgleisungen oder Exsikkose sind möglich. Todesfälle treten jedoch selten auf (DO CARMO et al., 2004; EFSA, 2009b; SCALLAN et al., 2011).

Innerhalb der Spezies *S. aureus* haben in den letzten Jahren Methicillin-resistente *S. aureus* (MRSA) weltweit gesundheitspolitische Bedeutung erlangt (WITTE et al., 2004; KOCK et al., 2010). Seine Resistenz gegen Methicillin und andere β-Lactam-Antibiotika wird durch das *mecA*-Gen vermittelt, welches das Penicillin-Bindungsproteins 2a (PBP2a) codiert (CHAMBERS, 1997; BADDOUR et al., 2007). MRSA gelten als Verursacher von Krankenhaus-assoziierten Erkrankungen wie Lungenentzündungen, nosokomialen Bakteriämien und Wundinfektionen, die aufgrund der ausgeprägten Multiresistenz dieses Keims gegenüber Antibiotika schwierig zu therapieren sind (MARTINS et al., 2007). Das Vorkommen und der Übertragungsweg dieses Keims beschränken sich jedoch nicht nur auf Krankenhäuser. Vielmehr ist auch bei Mensch und

Tier von einer symptomlosen Kolonisation von Nasenschleimhaut und Haut auszugehen (TENHAGEN et al., 2009). Bislang sind zwei große Ausbrüche von Lebensmittelvergiftungen durch sekundär mit MRSA kontaminierte Speisen bekannt geworden (KLUYTMANS et al., 1995; JONES et al., 2002). Inwiefern eine Übertragung von MRSA via Lebensmittel ausgehend von einer Primärkontamination des lebensmittelliefernden Tieres eine Rolle spielt, wird derzeit noch diskutiert (BLAHA, 2008; TENHAGEN et al., 2009; DE BOER et al., 2009; EFSA, 2009a).

2.5.4.2 Epidemiologie und Vorkommen in Schweinefleisch

Als Reservoir für dieses ubiquitäre Bakterium gelten sowohl intakte Haut und Schleimhäute als auch eiternde Wunden und Abszesse. 30 bis 80 % der Bevölkerung fungieren dabei als klinisch inapparente Träger. BANIA et al. (2006) dokumentierte bei 20 % der Menschen eine asymptomatische persistente, bei 60 % eine transiente, nasale Kolonisation mit *S. aureus*. Vor allem innerhalb dieser Stämme der Nasenschleimhaut wurde ein hoher Anteil an enterotoxinogenen Spezies ausgemacht, teils zu höheren Anteilen als bei Lebensmittelisolaten (ISIGIDI et al., 1992; BANIA et al., 2006; LAWRYNOWICZ-PACIOREK et al., 2007). Ausgangspunkt der Infektkette ist meist der Mensch, der das Lebensmittel direkt durch Körperkontakt oder indirekt durch Husten oder Niesen kontaminiert. Die Kontamination bzw. Rekontamination erfolgt daher in erster Linie sekundär während der Verarbeitung von sämtlichen tierischen und nichttierischen Lebensmitteln und ist zu allen Phasen des Herstellungsprozess möglich (ATANASSOVA et al., 2001; LELOIR et al., 2003). Aber auch eine mangelnde Schlachthygiene bei infizierten Nutztieren (z.B. Verarbeitung von Tieren mit sichtbaren Eiterherden) oder unauffälligen Keimträgern können das Rohmaterial und damit Produkte aus Fleisch verunreinigen. Häufig finden sich Kontaminationen in eiweiß- und kohlenhydrathaltigen Lebensmitteln, wie Fleisch- und Wurstwaren, Eier- oder Milchprodukten mit hohem Verarbeitungsgrad, v. a. in Kombination mit unsachgemäßer Erhitzung bzw. inadäquater Kühlung (BENNETT, 2005; NORMANNO et al., 2007; ZOUHAROVA et al., 2008). Das Vorkommen dieses Keims in bereits hitzebehandelten Lebensmitteln gilt als Indikator für mangelnde Personal- und Verarbeitungshygiene (LELOIR et al., 2003).

Bisher war *S. aureus* in rohem Schweinefleisch bis zu 58 % nachweisbar (vgl. Tabelle 10). Der Anteil von Enterotoxin-bildenden *S. aureus* in Lebensmitteln wurde dabei mit 40 bis 51 % und in rohem Fleisch mit etwa 60 % angegeben (ATANASSOVA et al., 2001; NORMANNO et al., 2005; NITZSCHE et al., 2007; PEREIRA et al., 2009). Der PCR-Nachweis von SE-Genabschnitten erbrachte in einer Studie für 98 % der Lebensmittel-Isolate positive Befunde (NAJERA-SANCHEZ et al., 2003). Bei Isolaten aus rohem Fleisch wurden vor allem die codierenden Gene für SEA (38,5 %), SEG (23 %) und SEG und SEI (30,8 %) detektiert (PEREIRA et al., 2009). In Milch- und Fleischprodukten wurde zu 33,6 % SED-, 18,4 % SEA- und 15,2 % SEC-Bildung beobachtet (NORMANNO et al., 2005).

Einzelne Arbeiten beziffern das Vorkommen von *S. aureus* in Gewürzen und Kräutern mit bis zu 11 % (vgl. Tabelle 10). Somit wäre auch ein Eintrag dieser Keime über Gewürze in das marinierte Endprodukt denkbar.

Tabelle 10: Vorkommen von *S. aureus* in Fleisch/-produkten und Gewürzen

Produkt	Anzahl untersucht n	Positive Proben		Keim-zahl (KbE/g)	Referenz
		n	(%)		
Schweinefleisch	1650	80	(5,0)	> 10	(YEH et al., 2005)
Schweinefleisch	680	77	(11,3)	k. A.	(LIN et al., 2009)
Schweinefleisch	1055	200	(19,0)	k. A.	(LIM et al., 2010)
Schweinefleisch	90	41	(45,6)	k. A.	(PU et al., 2009)
Schweinefleisch	135	78	(57,7)	k. A.	(ATANASSOVA et al., 2001)
Nham*)	155	61	(39,4)	2-3500 MPN/g	(CHOKESAJJAWATEE et al., 2009)
Wursterzeugnisse	126	13	(10,0)	k. A.	(WEI et al., 2006)
Fleischprodukte	1634	209	(13,0)	k. A.	(NORMANNO et al., 2007)
Gewürze	240	1	(0,5)	$< 10^2$	(BECKMANN et al., 1996)
Gewürze	35	3	(8,6)	$> 10^2$	(PSOMAS et al., 2009)
Gewürze	154	17	(11,0)	k. A.	(BANERJEE et al., 2003)

*) fermentiertes Schweinefleisch (Thai-Produkt)
k. A.: keine Angabe

Zahlreiche Studien belegen eine weite Verbreitung von Methicillin-resistenten *S. aureus* (MRSA) innerhalb der Schweinebestände, insbesondere des MRSA-Klons ST398 (NEELING et al., 2007; VAN BELKUM et al., 2008; KHANNA et al., 2008; SCHILLING et al., 2010; HUBER et al., 2010). Es wurde über ein Vorkommen von MRSA sowohl in Tieren mit infektiösen Erkrankungen des Respirations-, Urogenitaltrakts und der Haut als auch in klinisch gesunden Tieren berichtet (O´MAHONY et al., 2005; LEONARD et al., 2008). Die Untersuchung von Schweinefleisch erbrachte positive MRSA-Nachweise zwischen 0,3-10,7 % (vgl. Tabelle 11).

Tabelle 11: Nachweis von MRSA in Schweinefleisch

Anzahl untersucht n	Positive Proben		Häufigster MRSA-Typ	Referenz
	n	(%)		
1055	4	(0,3)	ST72	(LIM et al., 2010)
844	17	(2,0)	88 % ST398	(SCHILLING et al., 2010)
90	5	(5,6)	ST5, ST8	(PU et al., 2009)
402	31	(7,7)	39 % CMRSA-5	(WEESE et al., 2010)
309	33	(10,7)	97 % ST398	(DE BOER et al., 2009)

2.5.4.3 Tenazität in Lebensmitteln

S. aureus kann sich in einem weiten Temperaturbereich von 7 °C bis 48 °C, mit einem Optimum von 30-37 °C, aerob vermehren (SCHMITT et al., 1990). Die Kühlung unter 7 °C verhindert eine Vermehrung und Toxinbildung. Gegenüber großen pH-Wert-Schwankungen (4,0-10,0) verfügt der Keim über eine hohe Widerstandsfähigkeit. Der minimale pH-Wert für das Wachstum erhöht sich bei a_W-Werten kleiner als 0,96 und niedrigen Temperaturen (NOTERMANS et al., 1983).

Die SE-Bildung findet in einem ähnlich weiten pH-Wert-Bereich (4,9 bis 9,6) statt, wobei im sauren Milieu die Art der Säure von Bedeutung ist (TATINI, 1973). Stress durch organische Säuren (v.a. Essigsäure) wirkt dabei stärker inhibitorisch als starke anorganische Säuren (RODE et al., 2010). Gegenüber niedrigen a_W-Werten bis 0,83 und Salzkonzentrationen bis 20 % erweist sich dieser Keim als resistent (TATINI, 1973; VALERO et al., 2009). Unter anaeroben Bedingungen erhöht sich der minimale a_W-Wert für eine Vermehrung auf über 0,90 (BECKER et al., 2007).

Des Weiteren ist *S. aureus* gegenüber Trocknen, Kühlen und Einfrieren sehr widerstandsfähig (CASARIN et al., 2009). Die Tenazität dieser Keime wird durch ihr ausgeprägtes Vermögen zur Biofilmbildung weiter erhöht (CARPENTIER et al., 1993; GOETZ, 2002). So können suboptimale Temperaturen und andere Umweltfaktoren während der Lebensmittelverarbeitung insbesondere bei *S. aureus*-Isolaten aus Lebensmitteln die protektive Biofilmbildung steigern (RODE et al., 2007). Dadurch ist *S. aureus* ein Überleben in einer Vielzahl von Umweltstressoren, wie z. B. auch auf trockenen Oberflächen, über einen längeren Zeitraum möglich. Gegenüber anderen Mikroorganismen ist *S. aureus* jedoch wenig kompetetiv und erhält erst nach der Inhibition der Begleitflora (z. B. in erhitzten oder gesalzenen Lebensmitteln) einen selektiven Wachstumsvorteil (LELOIR et al., 2003; RODE et al., 2007). Das Verhalten von *S. aureus* gegenüber Umweltstressoren wie Säure, Salz und niedrige Wasseraktivitäten wurde bisher in Tenazitätsstudien mit Produkten wie mariniertem Trockenfleisch (Beef Jerky) überprüft (INGHAM et al., 2006b). Auch nach 28 Tagen wurden dabei noch Keimdichten von bis zu 10^2 KbE *S. aureus*/g festgestellt.

2.5.5 *Bacillus cereus*

2.5.5.1 Eigenschaften und lebensmittel-assoziierte Erkrankungen

Bacillus (B.) cereus ist ein ubiquitär vorkommendes, grampositives Stäbchen, das sich (fakultativ) aerob vermehrt und die Fähigkeit zur Sporenbildung besitzt (SNEATH et al., 1996). Aufgrund ausgeprägter proteolytischer Eigenschaften zählt er zu den wichtigsten Verursachern von Qualitätsminderung und Verderb bei Lebensmitteln (HEYNDRICKX et al., 2002). Zusätzlich ist *B. cereus* aufgrund seines Toxinbildungsvermögens, von dem eine Gefährdung des Verbrauchers ausgehen kann, seiner Hitzeresistenz und Kältetoleranz von lebensmittelhygienischer Relevanz (KOTIRANTA et al., 2000; GHELARDI et al., 2002). Durch *B. cereus*-Toxine hervorgerufene gastrointestinale Erkrankungen werden in das emetische und in das diarrhöische

Syndrom unterschieden (GRANUM et al., 1997). Beide Formen unterliegen laut Infektionsschutzgesetz (IfSG) nicht der Meldepflicht, was zusammen mit dem in der Regel milden Krankheitsverlauf eine hohe Dunkelziffer der Erkrankungsfälle bedingt.

Die emetische Form wird dabei auf das hitzestabile, trypsin-unempfindliche Cereulid zurückgeführt (SHINAGAWA et al., 1995; AGATA et al., 1995b; MIKKOLA et al., 1999). Ein Aktivitätsverlust dieses Toxins durch große Hitze bzw. starke pH-Wert-Schwankungen scheint dabei reversibel zu sein (RAJKOVIC et al., 2008). Das Cereulid wird während der Vermehrung vegetativer Zellen im Lebensmittel präformiert und kann nach Aufnahme in bereits geringen Dosen eine klassische Lebensmittelintoxikation hervorrufen (AGATA et al., 1995b). Nach einer Inkubationszeit von 0,5 bis 6 Stunden treten als Leitsymptome Nausea und Vomitus auf, wobei das Krankheitsgeschehen nicht länger als 24 Stunden andauert (EHLING-SCHULZ et al., 2004a). Trotz allgemein mildem und selbstlimitiertem Verlauf sind auch dramatische Fälle mit letalem Ausgang publiziert (MAHLER et al., 1997; DIERICK et al., 2005; FRICKER et al., 2007). Ab einer Kontamination von über 10^5 KbE/g muss mit Intoxikationen gerechnet werden (GRANUM et al., 1997). Jedoch sind auch Fälle des emetischen Syndroms in Verbindung mit Lebensmitteln, die 10^3 KbE *B. cereus* /g enthielten, beschrieben.

Derartige Intoxikationen treten fast ausschließlich in Verbindung mit dem Verzehr stärkehaltiger Lebensmittel wie Reis oder Nudeln auf (EHLING-SCHULZ et al., 2004b). Die Bedeutung emetischer *B. cereus* in gekühlten Lebensmitteln wird aufgrund des höheren Temperaturoptimums im Vergleich zu nicht-emetischen Stämmen als gering eingeschätzt (CARLIN et al., 2006). Cereulidbildenden *B. cereus*-Stämmen fehlt das Vermögen zur Stärkehydrolyse, was diagnostisch im Sinne einer ersten Charakterisierung genutzt werden kann (EHLING-SCHULZ et al., 2005; RAU et al., 2009).

Als Pathogenitätsfaktoren der diarrhöischen Form werden fünf verschiedene hitzelabile, trypsinempfindliche Enterotoxine bzw. -komplexe diskutiert. Als gesichert gilt das enterotoxische Potential für Hämolysin B (HBL) (BEECHER et al., 1990), Non-Hemolytic Enterotoxin (Nhe) (GRANUM et al., 1996) und Cytokin K (LUND et al., 2000). Die pathogenetische Relevanz des *B. cereus* Enterotoxin T (AGATA et al., 1995a) und des Enterotoxins FM (ASANO et al., 1997) wird von CHOMA und GRANUM (2002) angezweifelt. Die meisten Studien zur Pathogenität und zum Vorkommen der Enterotoxine der diarrhöischen Form liegen zu den Komplexen HBL und Nhe vor: das hämolytisch wirkende Enterotoxin HBL besteht aus B-, L_1 und L_2-Komponente, deren codierende Gene (*hblA*: B-Komponente, *hblC*: L1-Komponente, *hblD*: L2-Komponente) auf dem gleichen Operon lokalisiert sind (RYAN et al., 1997; LINDBÄCK et al., 1999). Für die Entfaltung der maximalen biologischen Aktivität ist die Kombination aller drei Komponenten nötig.
Auch der Nhe-Komplex besteht aus drei Proteinkomponenten (NheA, NheB und NheC), die durch drei ebenso benannte Genloci auf einem einzigen Operon codiert werden (GRANUM et al., 1999). Im Zellkulturtest wird die maximale biologische Aktivität auch hier nur bei Vorhandensein aller drei Komponenten erreicht (LUND et al., 1997). Nach derzeitigem Kenntnisstand werden die am Krankheitsgeschehen beteiligten Toxine erst im Darm nach der Aufnahme von kontaminierten Lebensmitteln gebildet (SCHOENI et al., 2005). Wird die minimale infektiöse

Dosis von 10^5 bis 10^7 KbE/g überschritten (GRANUM et al., 1997), kann es nach relativ kurzer Zeit von 8-16 Stunden zu profusen Durchfällen mit Abdominalkrämpfen und gelegentlicher Übelkeit kommen. Nach einer Dauer von 12-24 Stunden ist die Erkrankung in der Regel ebenso selbstlimitierend. Dennoch wurden in Einzelfällen auch über Todesfolge berichtet (LUND et al., 2000). Das Auftreten der diarrhöischen Form steht in engem Zusammenhang mit dem Verzehr von Fleisch/Fleischprodukten, Gemüse, Saucen, Milch/Milchprodukten und anderen proteinhaltigen Lebensmitteln (GRANUM et al., 1997).

Beide gastrointestinalen Erkrankungsformen werden in erster Linie ausgelöst, wenn auf eine Hitzebehandlung, wie Kochen oder Pasteurisierung, eine ungenügende Kühlung folgt, die das Auskeimen der Sporen und die Vermehrung vegetativer Zellen ermöglicht (EHLING-SCHULZ et al., 2004b).

2.5.5.2 Epidemiologie und Vorkommen in Schweinefleisch

Die ubiquitäre Verbreitung von *B. cereus* in Boden, Wasser und Pflanzen bedingt das Vorkommen in einer Vielzahl von pflanzlichen und tierischen Lebensmitteln. Primäre Reservoirs sind Erdboden und Staub (GUINEBRETIERE et al., 2003; SCHOENI et al., 2005). Somit können Fleischprodukte auf vielfältigem Wege auf allen Stufen des Herstellungsprozesses kontaminiert werden. Aufgrund der aerogenen Verbreitung von Sporen über Staub können auch Verpackungsmaterialien für Lebensmittel problematisch sein (PIRTTIJARVI et al., 2000). In komplexen Lebensmitteln werden vielfach Gewürze als Vektoren für Kontaminationen mit diesem Erreger angesehen (EFSA, 2004; ICMSF, 2005). Wie aus Tabelle 12 ersichtlich, können Gewürze und Produkte daraus, wie z. B. Marinaden, mit Anteilen bis 100 % und Keimzahlen von bis zu 10^6 KbE *B. cereus*/g belastet sein.

Ein besonderes Problem stellt *B. cereus* in Gemeinschaftsverpflegungseinrichtungen und Großküchen dar, wo er nach Lebensmittelinfektionsausbrüchen den am häufigsten isolierten Keim aus Rückstellproben darstellt (KLEER et al., 2001). Hauptfaktoren hierbei sind unzureichendes Erhitzen und Heißhalten, lange Zeitspannen zwischen Zubereitung und Verzehr mit langem Warmhalten und verzögertem Auskühlen und ungeeignete Lagerungstemperaturen (EHLING-SCHULZ et al., 2004a). Durch Hitzeaktivierung erfolgt das Auskeimen der *B. cereus*-Sporen, während die kompetitive Flora abgetötet wird und somit begünstigende Milieubedingungen für *B. cereus* geschaffen werden (BEUTLING et al., 1998).

Auch wenn *B. cereus* am häufigsten aus Milch und -produkten und Backwaren isoliert wird, sind Kontaminationen in Fleisch und Fleischprodukten von 2-99 % möglich (vgl. Tabelle 12). Dabei war mariniertes Fleisch zu 45 % mit bis zu 10^2 KbE *B. cereus*/g kontaminiert (HAMMON, 2008).

Tabelle 12:Vorkommen von *B. cereus* in Fleisch/–produkten, Marinaden und Gewürzen

Produkt	Anzahl untersucht	Positive Proben		Keimzahl	Referenz
	n	n	(%)	(KbE/g)	
Fleischprodukte	100	22	(22)	$\leq 10^5$	(GÜVEN et al., 2006)
Fleischprodukte	110	31	(28)	k. A.	(SCHLEGELOVA et al., 2003)
Hammelfleisch	20	11	(55)	10^2	(BEDI et al., 2004)
Hühnerfleisch	90	57	(63)	10^2	(BEDI et al., 2004)
Wursterzeugnisse	1666	1649	(99)	$\leq 10^3$	(ROSENQUIST et al., 2005)
Pâté	60	12	(2)	10^3	(WONG et al., 2005)
Mariniertes Schweinefleisch	20	9	(45)	$\leq 10^2$	(HAMMON, 2008)
Marinaden	48	8	(17)	k. A.	(MAHLER, 2004)
Gewürze	2090	178	(9)	$\geq 10^3$	(SAGOO et al., 2009)
Gewürze	304	32	(11)	$< 10^3$	(GARCIA et al., 2001)
Gewürze	160	63	(39)	$\leq 10^5$	(KNEIFEL et al., 1994)
Gewürze	35	15	(43)	$> 10^2$	(PSOMAS et al., 2009)
Gewürze	60	38	(63)	$\leq 10^3$	(HAMMON, 2008)
Gewürze	154	131	(85)	$\leq 10^6$	(BANERJEE et al., 2003)
Gewürze	170	170	(100)	$< 10^5$	(KAHRAMAN et al., 2009)

k. A.: keine Angabe

Das Vorkommen von Cereulidbildnern in Lebensmitteln wurde bisher mit 0,6-13 % beziffert (SCHULZ, 2004; ALTAYAR et al., 2006; KREUZBERGER et al., 2008; RAU et al., 2009).
Etwa 40-60 % der *B. cereus*-Isolate mit diarrhöischem Toxinbildungsvermögen verfügten über alle HBL-Komponenten, was einer maximalen biologischen Aktivität entspricht (HANSEN et al., 2001; IN'T VELD et al., 2001). Mehrere Studien weisen auf das Vorkommen des vollständigen Nhe-Toxinkomplexes in ≥ 90 % der *B. cereus*-Isolate aus Lebensmitteln hin (HANSEN et al., 2001; IN'T VELD et al., 2001; GUINEBRETIERE et al., 2002; MORAVEK et al., 2006; MOLVA et al., 2009). In Lebensmittelproben einer Gemeinschaftsverpflegung wurden 59 % HBL-Toxinbildner und 99,6 % Nhe-Toxinbildner (davon 41 % reine Nhe-Produzenten) detektiert (KREUZBERGER et al., 2008).
Cereulid bildende Stämme aus Lebensmitteln können auch Anteile des diarrhöischen Toxinkomplexes, v.a. des Nhe-Komplexes, exprimieren (EHLING-SCHULZ et al., 2005; EHLING-SCHULZ et al., 2006; KIM et al., 2010).

2.5.5.3 Tenazität in Lebensmitteln

Vegetative *B. cereus* sind weit weniger resistent als ihre Sporen. Temperaturen von 60 °C länger als 1 Minute töten vegetative Keime ab, Sporen werden bei 95 °C für 2 Minuten inaktiviert (ANDERSEN BORGE et al., 2001; BYRNE et al., 2006). Neben mesophilen Spezies mit einem Wachstumsoptimum von +30 °C bis +40 °C sind auch einzelne psychrophile Stämme beschrieben, die sich bei Temperaturen von +4 °C bis +6 °C mit jedoch stark verlängerten Generationszeiten vermehren können (NOTERMANS et al., 1998; ANDERSEN BORGE et al., 2001). Die

untere Vermehrungsgrenze bei nicht-psychrophilen Stämmen liegt bei +5 °C bis +7 °C (FEHLHABER et al., 1999b). Die Vermehrungsaktivität kann daher über eine ausreichend niedrige Lagertemperatur von Lebensmitteln beeinflusst werden (CARLIN et al., 2000). Bei pH-Werten > 4,5 und a_W-Werten > 0,92 ist mit einer Vermehrung zu rechnen.

Die aerobe Sporenbildung stellt einen komplexen Differenzierungsprozess dar und wird durch Nährstoffmangel und umweltbedingten Stress induziert (MONTVILLE et al., 2001; BAUMGART et al., 2009). Kühlschranktemperaturen scheinen die Sporulation dabei zu verhindern bzw. stark zu verzögen (ANDERSEN BORGE et al., 2001). Die Fähigkeit zur Sporenbildung bedingt eine hohe Tenazität von *B. cereus*. So können diese Keime in dieser Dauerform widrige Umweltverhältnisse, wie Hitze, Kälte oder Trockenheit bis zu einem Jahr überleben (SELTOW, 1994). Die große Hitzeresistenz macht Sporen unempfindlich gegen übliche Pasteurisierungstemperaturen von 60-80 °C (GUINEBRETIERE et al., 2001). Eine effektivere Hitzeinaktivierung kann bei Einsatz von 40 % relativer Luftfeuchte erzielt werden (PFEIFER et al., 1994). In versporter Form können *B. cereus* aufgrund hydrophober Eigenschaften gut an Oberflächen anheften (ANDERSSON et al., 1995), was in einer hohen Widerstandsfähigkeit gegenüber Desinfektionsmitteln resultiert (FAILLE et al., 2001). Des Weiteren sind Sporen in der Lage, verminderte Sauerstoffspannung über lange Zeit zu überstehen (BEUTLING et al., 1998).

Auch bei *B. cereus* wurde über Kreuzprotektion von Stressoren berichtet. Ein subletaler Hitze- oder Kältestress und vorangegangene Behandlung mit Ethanol oder Wasserstoffperoxyd konnten verstärkte Resistenzeigenschaften, v. a. gegenüber Hitze, bewirken (BROWNE et al., 2001). Weil *B. cereus* häufig in fettreichen Matrices (Vollmilch, Sahne, fetthaltiges Fleisch) nachgewiesen wurde, wird ein protektiver Effekt von Fett auf diesen Keim diskutiert (SCHLEGELOVA et al., 2003). Ebenso wurde über eine erhöhte Hitzeresistenz von Isolaten aus ölhaltigen Lebensmitteln berichtet (VAN ASSELT et al., 2006). In Marinaden wirkten vor allem Knoblauchextrakte und Polyphenole aus Rotwein bakterizid auf diesen Keim (FRIEDMAN et al., 2007).

2.5.6 *Clostridium perfringens*

2.5.6.1 Eigenschaften und lebensmittel-assoziierte Erkrankungen

Bei Clostridien handelt es sich um ein weltweit verbreitete sporenbildende, bevorzugt anaerob wachsende, grampositive Stäbchen (SNEATH et al., 1996). Aufgrund ihrer proteolytischen und saccharolytischen Eigenschaften stellen sie einerseits Verderbniskeime, andererseits im Falle von *C. perfringens* und *C. botulinum* bedeutende Lebensmittelintoxikationserreger dar (ANDERSSON et al., 1995). Kulturelle Medien, die gewöhnlich zur Isolierung von mesophilen Clostridien verwendet werden, basieren auf dem Nachweis der Sulfit-Reduktase-Aktivität. Diese Eigenschaft besitzen außer Clostridien nur sehr wenige lebensmittelhygienisch relevante Mikroorganismen. Deshalb ist die Bestimmung der Reduktion von Sulfit zu Sulfid, was makrosko-

pisch durch Bildung von schwarzen Kolonien sichtbar ist, ein diagnostisches Charakteristikum beim Nachweis von Clostridien (EISGRUBER et al., 1995). Innerhalb der Gruppe der mesophilen sulfitreduzierenden Clostridien ist vor allem *C. perfringens* von Bedeutung (vgl. Tabelle 13).

Tabelle 13: Ausgewählte Eigenschaften von einigen lebensmittelhygienisch relevanten, mesophilen, sulfitreduzierenden Clostridien (modifiziert nach EISGRUBER et al., 2005)

Spezies	Zuckerverwertung	Proteinabbau
C. perfringens	saccharolytisch	proteolytisch
C. botulinum	saccharolytisch	proteolytisch
C. bifermentans	saccharolytisch	proteolytisch
C. sporogenes	saccharolytisch	proteolytisch
C. novyi	saccharolytisch	proteolytisch
C. sordellii	saccharolytisch	proteolytisch
C. sphenoides	saccharolytisch	nicht proteolytisch
C. tertium	saccharolytisch	nicht proteolytisch
C. histolyticum	nicht saccharolytisch	proteolytisch

Bei *C. perfringens* lassen sich serologisch und biochemisch die Typen A bis E unterscheiden, wobei noch Untergruppen existieren (GRANUM, 1990; PETIT et al., 1999). Lebensmittelbedingte Erkrankungen werden durch die Typen A und C hervorgerufen. In industrialisierten Ländern, wie Europa und den USA, hat das Diarrhoe auslösende *C. perfringens*-Typ A-Enterotoxin (CPE) Bedeutung (GRANUM et al., 1984; LINDSAY, 1996; HOLTBY et al., 2008).

In Isolaten aus Lebensmittelinfektionen wird CPE chromosomal auf einem hoch konservierten Genabschnitt codiert (WEN et al., 2003). Während der anaerob stattfindenden Sporulation im Dünndarm wird das Enterotoxin bei der Lyse der vegetativen, toxinogenen Mutterzelle freigegeben. Das hitzeempfindliche CPE denaturiert bei Temperaturen > 55 °C und ist gegenüber Säuren und Proteasen nicht beständig (HAUSCHILD et al., 1971; POPOFF et al., 2009).

Dieses Toxin ist nach einer Inkubationszeit von 6-16 Stunden durch Porenbildung an den Mucosazellen für die klinischen Symptome Diarrhoe und Bauchkrämpfe verantwortlich (SHANDERA et al., 1983; MCCLANE et al., 2004; HOLTBY et al., 2008). Selten treten Fieber und Erbrechen auf. Die Erkrankungsdauer beträgt in der Regel einen Tag, wobei Komplikationen selten, und meist nur bei resistenzgeschwächten, insbesondere bei älteren Menschen zu beobachten sind (BRYNESTAD et al., 2002; ERIKSEN et al., 2010). Über Todesfolge wurde bisher in weniger als 0,01 % der Fälle berichtet (MEAD et al., 1999; SCALLAN et al., 2011). Für eine klinische Manifestation ist eine vegetative Zellzahl von 10^5-10^8 KbE/g Lebensmittel Voraussetzung (SHANDERA et al., 1983; HOLTBY et al., 2008).
Die *Clostridium perfringens*-Lebensmittelinfektion ist weltweit sehr häufig und spielt eine große Rolle in Restaurants, Krankenhäusern und Altenheimen (MEAD et al., 1999; SCALLAN et al., 2011). Wegen des unkomplizierten und kurzen Verlaufs ist dabei mit einer hohen Dunkelziffer an Erkrankungen zu rechnen. Es ist davon auszugehen, dass nur Lebensmittel- und Küchenstämme eine für eine Lebensmittelinfektion ausreichende Toxinmenge produzieren können

(GRANUM, 1990). Erkrankungen treten insbesondere nach dem Verzehr von proteinreicher Nahrung, v. a. von Fleisch und Fleischprodukten, auf.

2.5.6.2 Epidemiologie und Vorkommen in Schweinefleisch

Aufgrund der ubiquitären Verbreitung gelangt der Erreger direkt durch fäkale Verunreinigung (meist ausgehend vom Tier) oder indirekt über den Erdboden, Staub oder Abwasser in das Lebensmittel (BRYNESTAD et al., 2002). Bedeutsam sind kontaminierte Lebensmittel aus dem Bereich der Gemeinschaftsverpflegung, wo größere Essensportionen, v. a. zubereitete Speisen wie Geflügel- und Fleischsalate, Fleischpasteten, Fleischmischgerichte u. a., aber auch bei Speisen, die nach der Zubereitung für längere Zeit in Thermophoren aufbewahrt werden (GRANUM, 1990; LABBÉ, 2000; HOLTBY et al., 2008; ERIKSEN et al., 2010). Ausgehend von einer Aufbewahrung bei Zimmertemperatur oder bei ungenügender Kühlung muss somit mit einer massiven Vermehrung der Keime gerechnet werden.
Neben dem Vorkommen von *C. perfringens* in Fleisch- und Fleischprodukten, kann dieser Keim auch über Gewürze in die unterschiedlichsten Lebensmittel übertragen werden (vgl. Tabelle 14). In rohem Schweinefleisch wird das Vorkommen von *C. perfringens* mit 40-60 % beziffert (RODRIGUEZ et al., 2002; WEN et al., 2004; MIKI et al., 2008) (vgl. Tabelle 14).
In Lebensmitteln dominiert insgesamt Typ A. Der Anteil Enterotoxin-produzierender Stämme beträgt dabei ca. 1-5 % an Gesamtnachweisraten von *C. perfringens* in Lebensmitteln (WEN et al., 2004; AGUILERA et al., 2005). Es sind jedoch auch Daten publiziert, bei denen in Lebensmittelisolaten weder molekularbiologisch noch biochemisch Hinweise auf CPE vorlagen (LIN et al., 2003; MIKI et al., 2008).

Tabelle 14: Vorkommen von *C. perfringens* in Fleisch-/ Fleischprodukten und Gewürzen

Produkt	Anzahl untersucht	Positive Proben		Keimzahl (MPN/g)	Referenz
	n	n	(%)		
Fleisch (roh)	142	17	(12,0)	k. A.	(DENG et al., 2006)
Fleisch (roh)	66	24	(36,0)	< 300	(LIN et al., 2003)
Schweinefleisch	1650	5	(0,3)	k. A.	(YEH et al., 2005)
Schweinefleisch	243	99	(40,7)	< 23	(WEN et al., 2004)
Schweinefleisch	63	32	(50,8)	< 3	(MIKI et al., 2008)
Schweinefleisch	49	30	(61,0)	$<10^3$	(RODRIGUEZ et al., 2002)
Gewürze	947	2	(0,2)	$<10^2$	(BECKMANN et al., 1996)
Gewürze	2965	12	(0,4)	$>10^3$	(SAGOO et al., 2009)
Gewürze	115	14	(12,2)	$< 10^3$	(AGUILERA et al., 2005)
Gewürze	35	5	(14,3)	> 100 KbE/g	(PSOMAS et al., 2009)
Gewürze	380	188	(52,0)	< 450 KbE/g	(RODRIGUEZ-ROMO et al., 1998)
Gewürze	154	91	(59,0)	k. A.	(BANERJEE et al., 2003)
Gewürze	170	170	(100,0)	$< 10^3$	(KAHRAMAN et al., 2009)

k. A.: keine Angabe

2.5.6.3 Tenazität in Lebensmitteln

Trotz Fähigkeit zur Sporenbildung ist die Widerstandsfähigkeit insgesamt nicht so hoch wie bei *B. cereus*. Eine Sporenadhäsion findet nicht statt und aufgrund der anaeroben Sporulation ist die Oberflächenbelastung mit Sporen bei Gegenständen in der Lebensmittelverarbeitung nicht von so großer Bedeutung wie bei *B. cereus* (ANDERSSON et al., 1995).

Bei Temperaturen zwischen 43 °C und 47 °C findet eine schnelle Vermehrung von *C. perfringens* statt (LABBÉ, 2000). In zuvor erhitzten Speisen, in denen die Begleitflora bereits abgetötet ist, gehen Sporen schnell in vegetative Zellformen als dominierende Flora über (BRYNESTAD et al., 2002). Diese Bakterienzellen sind dann empfindlich gegenüber Hitze und Gefriertemperaturen. Temperaturen von 65 °C länger als 1 Minute töten vegetative Keime ab. Sporen werden bei 100 °C nach 2,2 Minuten inaktiviert (BYRNE et al., 2006). Subletale Hitzeschocks können dabei jedoch die Thermotoleranz erhöhen (JUNEJA et al., 2003; BYRNE et al., 2006). Die Sporengermination findet in einem Bereich von 3-42 °C mit und ohne Hitzeaktivierung statt (DE JONG et al., 2004). Bei a_W-Werten unter 0,95 sistiert die Vermehrung, unter 0,98 die Versporung. In einem pH-Bereich von 5,0 bis 9,0 erfolgt eine Vermehrung, im Bereich von 6,0 bis 7,0 die Versporung (LABBÉ, 2000; PAREDES-SABJA et al., 2010).

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Referenzstämme

Für die Durchführung aller mikrobiologischen Untersuchungen wurden die in Tabelle 15 aufgeführten Referenzbakterienstämme aus der Stammsammlung des Instituts für Mikrobiologie und Biotechnologie des Max Rubner-Instituts in Kulmbach eingesetzt.

Tabelle 15: Übersicht über die Referenzstämme für Nachweis und Differenzierung von *Salmonella* spp., STEC, *L. monocytogenes*, *S. aureus* und *B. cereus*

Stamm-Nr.	Spezies/Serovar	Virulenz/ Eigenschaften	Herkunft	Quelle
S 689 ATCC 13076	*S.* Choleraesuis	Serogruppe C	Typstamm	DSMZ No. 9898
S 552	*S.* Enteritidis	Serogruppe D	Lebensmittelinfektion	Krankenhaus Kulmbach
E 117	*E. coli* O116:H21	*stx1*- und *stx2*-Gen	k. A.	Prof. Bülte (Gießen)
E 124	*E. coli* O157:H7	*eae*- und *hlyA*-Gen, *stx2*- Gen	Rind	Prof. Baljier
E 165	*E. coli*	apathogen	k. A.	Prof. Bülte (Gießen)
Li 23 NCTC 10527	*L. monocytogenes* 4b		Liquor (Mensch)	E. Weise (BfR Berlin)
Li 258	*L. monocytogenes* 1/2a		Staub	S. Kleta (BfR Berlin)
Li 261	*L. monocytogenes* 1/2c		Hackfleisch (Schwein)	S. Kleta (BfR Berlin)
St 137	*St. aureus*	MRSA	k. A.	DSMZ No. 46320
St 378 ATCC 13565	*St. aureus*	SE A	Schinken	DSMZ No. 18597
St 36	*St. xylosus*	apathogen	Starterkultur Stx50	Fa. Chr. Hansen
B 44 ATCC 9634	*B. cereus* (diarrhöisch)	*hbl*-Operon;	k. A.	DSMZ No. 345
B 174 NCTC 11143	*B. cereus* (emetisch) Serotyp 1	Cereulid	Lebensmittelinfektion	DSMZ No. 4312
B 175 NCTC 11145	*B. cereus* (diarrhöisch)Serotyp2	*nhe*-Operon	Lebensmittelinfektion	DSMZ No. 4313
B 170	*B. thuringienses*	apathogen	Typstamm	DSMZ No. 6095

ATCC: American Type Culture Collection
NCTC: National Collection of Type Cultures
DSMZ: Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
k. A.: keine Angabe

3.1.2 Materialien und Geräte für kulturelle Verfahren

3.1.2.1 Nährmedien

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Nährmedien sind der Tabelle 16 zu entnehmen.

Tabelle 16: Übersicht über Art und Einsatz der verwendeten Nährmedien

Kurz-bezeichnung	Nährmedium	Verwendung
DHL	Desoxycholat-Hydrogensulfid-Lactose-Agar; [Merck; 114350]	Bestimmung der Zahl der Enterobacteriaceen und 2. Selektivnährboden zum Salmonellennachweis nach Anreicherung
MRS	Lactobacillus-Agar nach DE MAN, ROGOSA, SHARPE (pH 5,7); [Merck; 110660]	Bestimmung der Zahl der Milchsäurebakterien
MSE	Mannit- Salz- Eigelb-Agar; [Merck;103979, 107043, 106400, 105679, 105987, 101614; Oxoid, SR 47]	Bestimmung und Nachweis von *Staphylococcus aureus*
m-TSB	Modifizierte Trypton-Soja-Bouillon; [Merck; 105459, 104054, 105104]	Selektives Anreicherungsmedium für *E. coli*
MYP	Mannitol Egg Yolk Polymyxin Agar; [Oxoid; CM 0929, SR 99, SR 47]	Bestimmung Anzahl präsumtiver *B. cereus*
OCLA	Brillance Listeria Agar [Oxoid; Art.Nr. PO5165A]	Isolierung, Nachweis und Zählung von *Listeria* spp.
PW	Gepuffertes Peptonwasser; [Merck; 107143, 106400, 106579, 104873]	Nichtselektive Voranreicherungsbouillon für den Salmonellennachweis
RVS	Rappaport-Vassiliadis soya peptone broth; [Oxoid; CM 0866]	Selektiv-Anreicherungsbouillon für Salmonellen
SC	Selenit-Cystin-Anreicherungsbouillon; [Merck; 107709]	Selektiv-Anreicherungsbouillon für Salmonellen
SMAC	Sorbit-MacConkey-Agar; [Sifin; TN 1220]	Selektivnährboden zum Nachweis von Shigatoxinbildenden *E. coli*
SPS	Sulfit-Polymyxin-Sulfadiazin-(SPS) Perfringens-Selektivagar nach Angelotti; [Merck; 110235]	Bestimmung und Nachweis von sulfitreduzierenden Clostridien
St I	Standard I Nähragar; [Merck; 107881]	Bestimmung der aeroben Gesamtkeimzahl
St II + 1 % Stärkezusatz	Standard II Nähragar mit 1 % Stärkezusatz; [Merck; 107883, 101253]	Nachweis der Stärkehydrolyse von *B. cereus*- Isolaten
St I Bouillon	Standard I Nährbouillon; [Merck; 107882]	Züchtung anspruchsvoller Keime
XLT4	Xylose-Lysin-Tergitol-4-Agar; [Oxoid; CM 1061, SR 0237]	Selektivnährboden zum Nachweis von Salmonellen nach Anreicherung

3.1.2.2 Chemikalien und Geräte

- Analysewaage KB BA 100, Sartorius
- Cryoröhrchen, Nennvolumen 3 ml; Roth [Art.Nr E3171]
- Drigalski - Spatel; Merck [ArtNr. 321G2186]
- Bruträume 30 °C und 37 °C; Weiss
- Glasperlen, Ø 2 mm; Merck [Art.Nr. 104014]
- Glycerin 86-88 %; Riedel de Haen [Art.Nr. 33224]
- Heizbad Typ 1002; GFL
- Hirn-Herz-Bouillon; Merck [Art.Nr. 1.10493]
- Impfösen aus Kunststoff, steril; VWR [Art.Nr. 612-9354]
- Kulturröhrchen, Nennvolumen 20 ml; Schott Duran
- Löffelspatel; Merck [Art.Nr. 231G1313]
- Messpipetten, Nennvolumen 1 ml; VWR [Art.Nr. 612-1126]
- Messpipetten, Nennvolumen 20 ml; VWR [Art.Nr. 612-1135]
- Nährmedien-Abfüllgerät Technomat; Integra Biosciences
- Nadi-Reagenz nach Ehrlich (1885):
    - 50 mM α-Naphthol-Lösung; Merck [Art.Nr. 106223] in 50 Vol- % Ethanol
    - 50 mM N,N-Dimethyl-1,4-Phenylendiamin; Merck [Art.Nr. 822038]
- Natriumchlorid; Merck [Art.Nr. 106404]
- Paraffin Blockform; Riedel de Haen [Art.Nr. 33509]
- Petrischalen; Greiner [Art.Nr. 633180]
- Pipettierhilfe Pipetboy comfort; VWR [Art.Nr. 613-5307]
- Platinimpföse; Mibius [Art.Nr. 601000]
- Purple Broth; Becton Dickinson [Art.Nr. 211558]
- Rhamnose; Merck [Art.Nr. 107361]
- Schüttelinkubator Infors HAT;
- Schüttler Unimax 2010; Heidolph
- Spritzenfilter Rotilabo, 0,22 µm; Roth [Art.Nr. P6681]
- Standard-Pasteurpipetten; Roth [Art.Nr. EA711]
- Stomacher ® Colworth 400;
- Stomacherbeutel mit Filtereinsatz; Interscience [Art.Nr. 43809]
- Vortexer Vortex-Genie 2; Scientific Industries, Inc. [Art.Nr. SI0256]
- Waage 2354; Sartorius
- Waage Labstyle 602; Mettler, Toledo
- Xylose; Merck [Art.Nr. 108689]

3.1.3 Materialien und Geräte für PCR

- A. bidest
- A. dest.
- Agarose PeqGOLD Universalagarose; Peqlab [Art.Nr 351020]
- Becherglas, Nennvolumen 100 ml; Schott Duran
- Desoxynucleoside Triphosphate Set (dNTP-Set); Bioline [Art.Nr. 39025]
- DNA-Isolierungskit E.Z.N.A. Bacterial DNA Kit, Peqlab [Art.Nr. 123450]
- DNA-Leiter, Hyperladder II, 100 bp, äquimolar; Bioline [Art.Nr. 33040]
- Elektrophoresekammer Agargel Midi; Biometra [Art.Nr. 020-000]
- Ethidiumbromidgebrauchslösung:
    - 500 ml Aqua dest
    - 250 µl Ethidiumbromidlösung 1 %; Roth [Art.Nr. 2218.2]
- Geldokumentationssystem BioDoc Analyze; Whatman Biometra
- Gelloadingpuffer:
    - 62,5 mg Bromphenolblau; Merck [Art.Nr. 159102]
    - 62,5 mg Xylencyanol; Merck [Art.Nr. 110590]
    - 6,25 mg Ficoll; Sigma Aldrich [Art.Nr. F4375]

  - ad 250 ml aqua bidest
- Heizblock für Reaktionsgefäße; VLM [Art.Nr. LS1]
- Löffelspatel; Merck [Art.Nr. 231G1313]
- Messkolben; Nennvolumen 100 ml und 1000 ml, Schott Duran
- Mikrowelle; Privileg 8019
- PBS- Puffer, pH=7,5
  - 8,5 g NaCl; Merck [Art.Nr. 106404]
  - 1,14 g Na_2HPO_4x12 H_2O; Merck, [Art.Nr. 106579]
  - 0,5 g KH_2PO_4; Merck [Art.Nr. 104873]
  - ad 1000 ml A. dest
- PCR-Platten, 96-well; neolab [Art.Nr. 74210]
- PCR-Platz captair bio; erlab DFS SA
- Pipette, Volumenbereich 0,1-2 µl; Abimed [Art.Nr. 14002]
- Pipette, Volumenbereich 0,5-10 µl Abimed [Art.Nr. 14004]
- Pipette, Volumenbereich 100-1000 µl Abimed [Art.Nr. 14012]
- Pipette, Volumenbereich 10-100 µl Abimed [Art.Nr. 14008]
- Pipette, Volumenbereich 2-200 µl Abimed [Art.Nr. 14010]
- Pipette, Volumenbereich 2-20 µl Abimed [Art.Nr. 14006]
- Pipettenspitzen 0,1 µl; Roth [Art.Nr. K1381]
- Pipettenspitzen 1 µl; VWR [Art.Nr. 612-5755]
- Pipettenspitzen 10 µl; VWR [Art.Nr. 612-5755]
- Pipettenspitzen 1000 µl; VWR [Art.Nr. 612-5756]
- Power Supply; Biometra [Art.Nr. PS305T]
- Primer 45c1: 5'- GAG GGG CAA ACA GAA GTG AA – 3'; MWG
- Primer 45c2: 5'- TGC GAA CTT TTG ATG ATT CG– 3'; MWG
- Primer BC1: 5'- ATT GGT GAC ACC GAT CAA ACA- 3'; MWG
- Primer BC2r: 5'- TCA TAC GTA TGG ATG TTA TTC- 3'; MWG
- Primer EM1F: 5'- GAC AAG AGA AAT TTC TAC GAG CAA GTA CAA T – 3'; MWG
- Primer EM1R: 5'- GCA GCC TTC CAA TTA CTC CTT CTG CCA CAG T– 3'; MWG
- Primer HB10: 5'-ATT CCA CAC AAC ATA CGA GCC-3'; MWG
- Primer HB11: 5'-GTT TCG CCA CCT CTG ACT TGA G-3'; MWG
- Primer HblA1: 5'- GCT AAT GTA GTT TCA CCT GTA GCA AC – 3'; MWG
- Primer HblA2: 5'- AAT CAT GCC ACT GCG TGG ACA TAT AA – 3'; MWG
- Primer hlyA1: 5'-GGT GCA GCA GAA AAA GTT GTA G – 3'; MWG
- Primer hlyA4: 5'-TCT CGC CTG ATA GTG TTT GGT A – 3'; MWG
- Primer KS7: 5'- CCC GGA TCC ATG AAA AAA ACA TTA TTA ATA GC- 3'; MWG
- Primer KS8: 5'- CCC GAA TTC AGC TAT TCT GAG TCA ACG – 3'; MWG
- Primer L1A: 5'-AAT CAA GAG CTG TCA CGA AT– 3'; MWG
- Primer L1B: 5'- CAC CAA TTG ACC ATG CTA AT – 3'; MWG
- Primer L2aF: 5'- CGA AAA TTA GGT GCG CAA TC – 3'; MWG
- Primer L2aR: 5'- TAA TAT GCC TTG CGC AGT TG – 3'; MWG
- Primer lmo0737F: 5'- AGG GCT TCA AGG ACT TAC CC – 3'; MWG
- Primer lmo0737R: 5'- ACG ATT TCT GCT TGC CAT TC – 3'; MWG
- Primer lmo1118F: 5'- AGG GGT CTT AAA TCC TGG AA – 3'; MWG
- Primer lmo1118R: 5'- CGG CTT GTT CGG CAT ACT TA – 3'; MWG
- Primer LP43: 5' - ATC CTA TTC CCG GGA GTT TAC G – 3'; MWG
- Primer LP44: 5'- GCG TCA TCG TAT ACA CAG GAG C – 3'; MWG
- Primer MK1: 5'- TTT ACG ATA GAC TTC TCG AC – 3'; MWG
- Primer MK2: 5'- CAC ATA TAA ATT ATT TCG CTC – 3'; MWG
- Primer nheBC1: 5'- ACA TTG CGA AAG ATA GCT GGA – 3'; MWG
- Primer nheBC2: 5'- TGT TCT GCT GCA AAA GGA TG – 3'; MWG
- Primer ORF2819F: 5'- AGC AAA ATG CCA AAA CTC GT – 3'; MWG
- Primer ORF2819R: 5'- CAT CAC TAA AGC CTC CCA TTG – 3'; MWG
- Primer ORF2110F: 5'- For: AGT GGA CAA TTG ATT GGT GAA – 3'; MWG
- Primer ORF2110R: 5'- CAT CCA TCC CTT ACT TTG GAC – 3'; MWG

- Primer prsF: 5'- GCT GAA GAG ATT GCG AAA GAA G – 3'; MWG
- Primer prsR: 5'- CAA AGA AAC CTT GGA TTT GCG G – 3'; MWG
- Primer SK1: 5'- CC GAA TTC GGC ACA AGC ATA AGC – 3'; MWG
- Primer SK2: 5'-CCC GGA TCC GTC TCG CCA GTA TTC G – 3'; MWG
- Primer 139: 5'- GTG AAA TTA TCG CCA CGT TCG GGC AA – 3'; MWG
- Primer 141: 5'- TCA TCG CAC CGT CAA AGG AAC C – 3'; MWG
- PUC 19 DNA; Sigma [Art.Nr. D3404]
- Reaktionsgefäße, Nennvolumen 0,2 ml; Biozym [Art.Nr. 710920]
- Reaktionsgefäße, Nennvolumen 0,5 ml; Biozym [Art.Nr. 711090
- Reaktionsgefäße, Nennvolumen 1,5 ml; Eppendorf, [Art.Nr. 300120.086]
- Reaktionsgefäße, Nennvolumen 2 ml; Eppendorf, [Art.Nr. 300120.094]
- Taq DNA Polymerase; fermentas; [Art.Nr. EP0072]
- TBE-Puffer, 10x konzentriert (pH 8,3):
    - 890 mM Tris (hydroxymethyl)-aminomethan, Merck [Art.Nr. 108382]
    - 890 mM Borat, Merck [Art.Nr. 100165]
    - 25 mM EDTA (Titriplex III), Merck [Art.Nr. 108418]
- TBE-Puffer, 1x konzentriert:
    - 100 ml TBE, 10x konzentriert
    - 900 ml Aqua bidest.
- Thermocooler-Rack; Biozym [Art.Nr. 733359]
- Thermal Cycler C1000™; Biorad
- Transilluminator mit Fotoeinheit, Biometra
- Vortexer Vortex Genie 2; Scientific Industries, Inc.
- Waage Labstyle 602; Mettler, Toledo
- Zentrifuge; Labnet [Art.Nr. SN 06050934]
- Zentrifuge; Eppendorf, Modell 5417 R

3.1.4 Materialien und Geräte für ELISA

- A. dest.
- Dispenser Tips; VWR [613-1003]
- ELISA Plate Reader Titertek Multiskan MCC/340; Bartolomay Labortechnik
- Handdispenser Multipette plus 4981, Eppendorf; VWR [Art.Nr. 631-3669]
- Pipette, Volumenbereich 1 – 5 ml; Abimed [Art.Nr. 14216]
- Pipette, Volumenbereich 20 – 200 µl; Abimed [Art.Nr. 14010]
- Pipettenspitzen 200 µl; Eppendorf [Art.Nr. 613-3547]
- Pipettenspitzen 5 ml; Eppendorf [Art.Nr. 612-9459]
- RIDASCREEN® SET Total, r-biopharm [Art.Nr. R4105]
- RIDASCREEN® SET A,B,C,D,E, r-biopharm [Art.Nr. R4101]
- Software RIDA®SOFT Win

3.1.5 Sonstige Materialien und Geräte

- ATB™- Staph 1; biomerieux [Art. Nr. 12297E]
- a_W-Wert- Messgerät a_w- sprint TH 500, novasina
- Autoklav, Zirbus [LSA 500-2]
- Deckgläser 22 x 22 mm, VWR [Art. Nr. 631-1336]
- Edelstahlwannen, Roth [Art. Nr. 8104.1]
- Enteroclons Anti-Salmonella Gruppe B, Sifin [Art. Nr. TR 5201]
- Enteroclons Anti-Salmonella Gruppe C, Sifin [Art. Nr. RT 1202]
- Enteroclons Anti-Salmonella Gruppe D, Sifin [Art. Nr. TR 5203]
- Klimaschrank-Inkubator; Feutron Klimasimulation
- Kühlschrank Profi-line, Liebherr; Modell 4000-12
- Lichtmikroskop Leitz biomed; Leica [Art. Nr. 869450]
- Nitrilhandschuhe, ungepudert, Gr. M, VWR [Art. Nr. 112-2372]

- Objektträger, Marienfeld; VWR [Art.Nr. 631-9460]
- pH-Messgerät pH 537; WTW mit Einstab-Glaselektrode SenTix Sp; WTW
- Singlepath® Salmonella, Merck [Art. Nr. 1.04140.0001]
- Staphytect Plus Test Kit, Oxoid [Art.Nr. DR0850]
- Testplättchen Cefoxitin 30 µg, Mast Diagnostica [Art. Nr. 113133]
- Vakuumverpackungsmaschine autovac, Krämer & Grebe
- Zählkammer nach Thoma, VWR [Art.Nr. 631-1151]

3.1.6 Probenmaterial

Mariniertes Fleisch:

Als Untersuchungsmaterial dienten ausschließlich vakuumverpackte, marinierte Nacken-/ Kammsteaks vom Schwein aus dem SB-Bereich lokaler Supermärkte. Insgesamt wurden 300 Proben von 13 Herstellern aus Deutschland untersucht (vgl. Tabelle 1, 2 und 3 im Anhang).

Die große Produktvielfalt machte eine Kategorisierung des Handelsangebots erforderlich: Diese erfolgte nach vorherrschender Würz- bzw. Geschmacksrichtung in Senf/Bier-Marinaden, Kräuter/Knoblauch-Marinaden und Paprika-Marinaden. Anhand der auf der Packung jeweilig angegebenen Zusatzstoffe der Marinaden wurden alle untersuchten Senf-/Bier-Marinaden als Dispersionsmarinaden auf Wasser-Öl-Basis mit Verdickungsmittel eingestuft. Kräuter-/Knoblauch-Marinaden stellten ausschließlich Öl-Gewürz-Gemische (Würzöle) ohne Wasseranteil dar. Die Kategorie Paprika-Marinaden umfasste reine Würzöle, Emulsions- und Dispersionsmarinaden auf Wasser-Öl-Basis sowie komplexe Mischformen aus diesen (vgl. Tabelle 17).

Tabelle 17: Technologische Marinadentypen der drei Kategorien Senf, Paprika und Kräuter

Kategorie	Senf	Paprika	Kräuter
Marinadentyp	Dispersionsmarinaden	Würzöle, Emulsions- und Dispersionsmarinaden und Mischformen	Würzöle (Öl-Gewürz-Gemische)

Alle erworbenen Proben aus dem SB-Bereich lagen vakuumverpackt in Folienpackungen bzw. Tiefziehpackungen vor. Abbildung 2 zeigt für jede der genannten drei Kategorien je eine Probe aus dem SB-Handel.

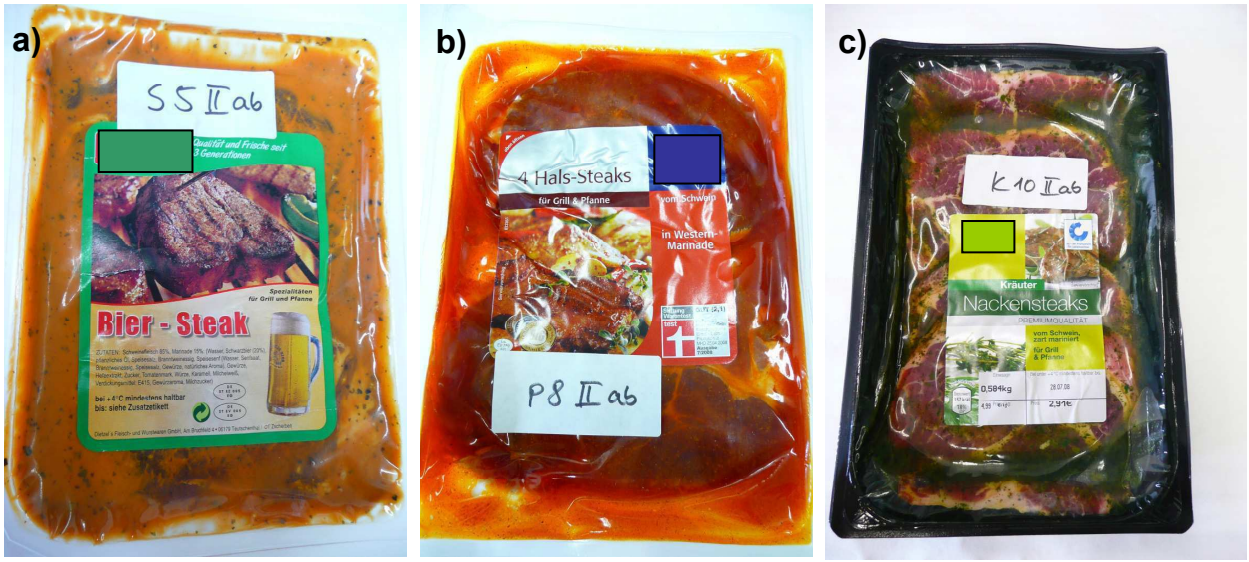

Abbildung 2: Typische Beispiele für das Produktangebot von marinierten Schweinenacken-steaks aus dem SB-Bereich mit:
(a) Senf-/Biermarinade, (b) Paprikamarinade, (c) Kräutermarinade

Marinaden:

Es wurden jeweils zehn industriell hergestellte Marinaden der genannten drei Kategorien von fünf großen Herstellern der Gewürzindustrie und -verarbeitung aus Deutschland untersucht. Es handelte sich um Marinaden, die für die Herstellung marinierter Fleischprodukte verwendet wurden. Anhand ihrer Würzkomposition und technologischen Zusammensetzung wurden auch diese in die Kategorien Senf-/Bier-, Paprika- und Kräutermarinaden unterteilt (vgl. Tabelle 17). Abbildung 3 zeigt Proben der drei genannten Marinadenkategorien.

Abbildung 3: Typische Marinaden für die Marinierung von Schweinenackensteaks aus der Gewürzindustrie:
(a) Senf-/Biermarinade, (b) Paprikamarinade, (c) Kräutermarinade

3.2 Methodik

3.2.1 Untersuchung von marinierten Schweinenackensteaks und Marinaden

3.2.1.1 Logistik

Mariniertes Fleisch:

Die Proben wurden über zwei Zeiträume von Juni bis Oktober 2008 und von März bis Juni 2009 gezogen. Herstellerspektrum und Art der Produkte waren in beiden Probenahmezeiträumen identisch (vgl. Tabelle 18 bzw. Tabelle 1, 2 und 3 im Anhang).

Von insgesamt 13 Herstellern wurden 25 Proben jeder der obengenannten drei Kategorien im Doppelansatz jeweils am Einkaufszeitpunkt und am Ende des MHD untersucht.

Hierfür wurden an jedem Probenziehungstag aus dem Handel je Hersteller zwei Proben mit identischem MHD erworben, ohne Unterbrechung der Kühlkette in das Institut transportiert und bis zur Untersuchung bei +4 °C ± 1°C aufbewahrt.

Die Untersuchung der Proben erfolgte jeweils drei Tage nach dem Erwerb und am Ende des auf der Verpackung angegebenen MHD mit einer Varianz von einem Tag.

Tabelle 18: Übersicht über Art und Umfang der 2008 und 2009 untersuchten, marinierten Schweinenackensteaks sowie der MHD-Fristen gemäß Herstellerangaben

Hersteller-Code	Anzahl untersuchter Proben				MHD-Frist nach Herstellerangaben	Verwendung von gefrorenem Fleisch laut Deklaration
	Senf	Paprika	Kräuter	Gesamt		
A	-	6	6	12	17 Tage	k. A.
B	6	2	4	12	15 Tage	ja
C	-	10	4	14	14 Tage	ja
D	8	6	12	26	15 Tage	ja
E	2	4	6	12	14 Tage	ja
F	-	4	4	8	16 Tage	ja
G	-	2	2	4	18 Tage	ja
H	8	-	-	8	k. A.	k. A.
I	18	2	2	22	18 Tage	k. A.
J	-	4	4	8	k. A.	ja
K	-	2	2	4	18 Tage	ja
L	4	8	4	16	13 Tage	ja
M	4	-	-	4	13 Tage	k. A.

k. A.: keine Angabe

Marinaden:

Von August 2008 bis August 2009 wurden industriell hergestellte Marinaden in Kanistern, versiegelten Eimern oder verschweißten Beuteln von 5 Herstellern (vgl. Tabelle 19) aus der Gewürzindustrie zur Verfügung gestellt und untersucht. Bis zur Untersuchung wurden die Marinaden bei +4 °C ± 1°C aufbewahrt.

Tabelle 19: Übersicht über Art und Umfang der untersuchten Marinadenproben

Hersteller-Code	Anzahl der untersuchten Proben			
	Senf	Paprika	Kräuter	Gesamt
N	1	1	-	2
O	2	-	-	2
P	5	5	6	16
Q	2	1	1	4
R	-	3	3	6

3.2.1.2 Messung von pH- und a_W-Wert

Der pH-Wert wurde potentiometrisch mit einer Glasmesselektrode sowohl im unbehandelten Probenmaterial (Zentrum des Steaks bzw. reine Marinade) als auch in dem Probenhomogenat (vgl. Abschnitt 3.2.1.4) über die Berechnung des Mittelwertes aus Doppelbestimmungen ermittelt.

Die a_W-Wert-Bestimmung erfolgte im Doppelansatz über die Messung des Wasserdampf-Partial-Differenzdruckes mittels a_W-sprint TH 500. Sie wurde bei Marinaden sowohl im Rahmen der Marktstudie als auch parallel zu den mikrobiologischen Untersuchungen der Inokulationsversuche durchgeführt (RÖDEL et al., 1990).

3.2.1.3 Untersuchungsspektrum

Die Probennahme und die mikrobiologischen Untersuchungen erfolgten in Anlehnung an die Methoden der Amtlichen Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 LFGB und wurden jeweils im Doppelansatz durchgeführt.

Bestimmt wurden die aerobe, mesophile Gesamtkeimzahl, die Zahl der *Enterobacteriaceae* und Milchsäurebakterien, die Anzahl von *Listeria monocytogenes, Bacillus cereus, Staphylococcus aureus* und sulfitreduzierenden Clostridien.

Daneben wurden die Proben qualitativ auf das Vorkommen von *Salmonella* spp. und STEC untersucht.

Die dabei gewonnenen präsumtiven Isolate wurden mittels biochemischer, molekularbiologischer und immunologischer Methoden bestätigt und feindifferenziert. Tabelle 20 gibt eine Übersicht der angewandten Verfahren.

Tabelle 20: Übersicht über Verfahren zur Bestätigung und Feindifferenzierung der präsumtiven Isolate

Keim	Verfahren		Referenz
Salmonella spp.	*invA*-Gen-Nachweis (PCR)		(RAHN et al., 1992)
	Serotypisierung/Lysotypie (RKI, Wernigerode)		(RABSCH, 1997; KÄSBOHRER et al., 2000)
L. monocytogenes	Rhamnose-/Xyloseverwertung		(GROVES et al., 1977)
	Hämolyse		
	Hauptserovare (Multiplex-PCR)		(DOUMITH et al., 2004)
B. cereus	*gyrB*-Gen-Nachweis (PCR)		(YAMADA et al., 1999)
	Nachweis der Toxinogenität (PCR)		
	emetisch	Cereulid	(EHLING-SCHULZ et al., 2004b)
	diarrhoeisch	*hblA*	(MÄNTYNEN et al., 1998)
		hblC	(MORAVEK et al., 2004)
		hblD	(RYAN et al., 1997)
		nheA	(MORAVEK et al., 2004)
		nheBC	(DIETRICH et al., 2005)
STEC	*stx1*-Gen-Nachweis (PCR)		(RÜSSMANN et al., 1995)
	stx2-Gen-Nachweis (PCR)		(CEBULA et al., 1995)
	eae- und *hlyA*-Gen-Nachweis (PCR)		(SCHMIDT et al., 1994a; SCHMIDT et al., 1995)
	Serotypisierung, Bestimmung stx2-Subtypen (BfR, Berlin)		(BEUTIN et al., 2007)
St. aureus	Latexagglutinationstest		(ZSCHOCK et al., 2005)
	Enterotoxintest (ELISA)		(PARK et al., 1996)
	MRSA-Screening (Cefoxitin-Agardiffusionstest)		(BOUBAKER et al., 2004; BROEKEMA et al., 2009)

3.2.1.4 Allgemeine mikrobiologische Untersuchungen

Die Proben wurden nach der Methode L06.00-16 (Mikrobiologische Untersuchung von Fleisch- und Fleischerzeugnissen – Vorbereitung der Proben) der Amtlichen Sammlung von Untersuchungsverfahren nach §64 LFGB (1980) aufbereitet. Dazu wurden jeweils 20 ± 0,1 g Fleischstücke in Form von 2 x 2 cm großen Würfeln mit einer sterilen Schere entnommen und in einem sterilen Kunststoffbeutel mit Filtereinsatz eingewogen. Bei diesem Vorgang wurden alle Fleischstücke von jeder Seite nochmals mit Marinade benetzt, weil die Marinadenverteilung in der Verpackung oft nicht gleichmäßig war.

Für die Untersuchung der Marinaden wurden 20 ± 0,1 g löffelweise steril in Stomacherbeutel eingewogen, mit 180 ml auf +10 °C bis + 20 °C temperierter, steriler, physiologischer Kochsalzlösung vermischt und in einem Walkmischgerät 2 Minuten lang homogenisiert.
Aus dieser Erstverdünnung wurde eine dezimale Verdünnungsreihe für die Bestimmung der Gesamtkeimzahl, der *Enterobacteriaceae*-Keimzahl sowie für den quantitativen Nachweis von *L. monocytogenes*, *B. cereus*, *St. aureus* und sulfitreduzierende Clostridien angelegt.

Für den Salmonellennachweis wurden 25 g Probe in 225 ml gepuffertes Peptonwasser und für den STEC-Nachweis 25 g in 225 ml modifizierte Trypton-Soja-Bouillon (mTSB) mit Novobiocin überführt und darin 2 Minuten homogenisiert.

3.2.1.4.1 Bestimmung der aeroben, mesophilen Gesamtkeimzahl

Die Ermittlung der mesophilen, aeroben Gesamtkeimzahl erfolgte nach der Methode L06.00-18 (Spatel- und Plattengussverfahren) der Amtlichen Sammlung der Untersuchungsverfahren nach §64 LFGB (1984) auf Standard I-Nähragar nach einer aeroben Inkubation für 48 Stunden bei +30 °C. In die Auswertung wurden Platten einbezogen, die ein Wachstum von 20 bis 300 Kolonien zeigten. Die Kolonie bildenden Einheiten wurden ausgezählt und der gewichtete arithmetische Mittelwert berechnet.

3.2.1.4.2 Bestimmung der Anzahl der *Enterobacteriaceae*

Die Bestimmung der *Enterobacteriaceae*-Keimzahl erfolgte in Anlehnung an die Methode L06.00-24 (Bestimmung von *Enterobacteriaceae* in Fleisch, Spatelverfahren (Referenzverfahren)) der Amtlichen Sammlung von Untersuchungsverfahren nach §64 LFGB (1987).
Das homogenisierte und verdünnte Probenmaterial wurde auf Desoxycholat-Hydrogen-Sulfid-Agar (DHL) ausgestrichen, für 48 ± 2 Stunden bei +30 °C aerob bebrütet und die gewachsenen Kolonien ausgezählt. Zur Abgrenzung der Pseudomonaden erfolgte der Test auf Cytochromoxidase-Aktivität: Dazu wurde das Koloniematerial auf dem DHL-Agar mit NADI-Reagenz nach Ehrlich (1885) aus einer Pasteurpipette tropfenweise überschichtet. Kolonien, die innerhalb einer Minute eine kräftige Blaufärbung aufwiesen, waren Cytochromoxidase positiv und wurden dementsprechend nicht als *Enterobacteriaceae* gezählt. Von den gezählten KbE der auszählbaren Platten wurde der gewichtete, arithmetische Mittelwert berechnet.

3.2.1.4.3 Bestimmung der Anzahl der Milchsäurebakterien

Für die Untersuchungsserie im Jahr 2009 wurde zusätzlich die Zahl der Milchsäurebakterien gemäß Methode L06.00-35 (Bestimmung von aerob wachsenden Milchsäurebakterien in Fleisch und Fleischerzeugnissen – Spatelverfahren (Referenzverfahren)) der Amtlichen Sammlung von Untersuchungsverfahren nach §64 LFGB (1992) ermittelt.
Als Selektivnährboden diente hierzu der modifizierte Lactobacillus-Agar nach d´Man, Rogosa und Sharpe (MRS-Agar) mit einem pH-Wert von 5,7. Nach aerober, 48-stündiger Bebrütung bei 30 °C wurden weiße bis grauweiße Kolonien als Milchsäurebakterien gewertet, deren Zahl über den gewichteten, arithmetischen Mittelwert berechnet wurde.

3.2.1.5 Spezielle mikrobiologische Untersuchungen

3.2.1.5.1 *Salmonella* spp.

Die Proben wurden qualitativ auf das Vorkommen von Salmonellen in Anlehnung an die Methode L 00.00-20 (Horizontales Verfahren zum Nachweis von *Salmonella* spp. in Lebensmitteln) der Amtlichen Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 LFGB (1998) untersucht.

Zunächst erfolgte die nichtselektive Voranreicherung im gepufferten Peptonwasser bei 37 °C für 16-20 Stunden. Danach wurden aus diesem Medium jeweils 0,1 ml in 10 ml Sojamehl-Pepton-Magnesiumchlorid-Malachitgrün-Medium nach Rappaport-Vassiliadis (RVS) und 20 ml in 200 ml Selenit-Cystin-Anreicherungsbouillon überführt. Die Inkubation erfolgte für ersteres bei 41,5 °C ± 0,5 °C, für letzteres bei 37 °C für jeweils 24 Stunden.
Aus den beiden flüssigen Selektivnährmedien wurden nach 24 Stunden Inkubation fraktionierte Ausstriche jeweils auf XLT4-Agar und Desoxycholat-Hydrogen-Sulfid-Agar (DHL) angefertigt und beide Nährmedien für 24 Stunden bei 37 °C bebrütet. Als Salmonellen-verdächtig wurden diejenigen Kolonien gewertet, die auf den Nährmedien ein farbloses, glasiges Wachstum mit schwarzem Zentrum zeigten. War nach 24 Stunden kein Wachstum auf den Nährböden zu sehen, erfolgte eine weitere Inkubation für 12-18 Stunden bei 37 °C.

Bestätigung und Feindifferenzierung:
Kolonien, die typisches Wachstum auf den Selektivnährböden zeigten, wurden mit einem kommerziellen immunchromatographischen Schnelltest (Singlepath® Salmonella) nach Herstellervorschrift auf Zugehörigkeit zur Gattung *Salmonella* getestet. Durch die Anzeige einer pinkfarbenen Linie im Testbereich konnte das Vorliegen von *Salmonella*-Antigen nachgewiesen werden.
Die so bestätigten, isolierten Einzelkolonien wurden zur Basistypisierung an das Nationale Referenzzentrum für Salmonellen und andere bakterielle Enteritiserreger des Robert-Koch-Instituts in Wernigerode übersandt. Dort erfolgten die Serotypisierung, die biochemische Subspeziesdifferenzierung und Lysotypie (WARD et al., 1987; RABSCH, 1997; KÄSBOHRER et al., 2000).

3.2.1.5.2 Shigatoxin bildende *E. coli* (STEC)

Die Untersuchung auf Shigatoxin-produzierende *E. coli* erfolgte qualitativ in Anlehnung an die Methode L 00.00-92 (Nachweis von verotoxinbildenden *E.coli* in Lebensmitteln tierischer Herkunft) der Amtlichen Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 LFGB (2006). Nach einer Anreicherung der Proben in modifizierter Trypton-Soja-Bouillon mit Novobiocinzusatz unter Schütteln für 16 Stunden bei 37 °C erfolgte eine Subkultivierung auf Sorbitol-MacConkey-Agar (SMAC) für 24 Stunden bei 37 °C. Mittels PCR nach RÜSSMANN et al. (1995) sowie CEBULA et al. (1995) wurde auf das Vorliegen des *stx1*- bzw. *stx2*-Gens untersucht.

Bei positivem Ergebnis wurden von den SMAC-Platten 12 Einzelkolonien abgenommen, erneut auf SMAC subkultiviert und nochmals mit Hilfe der PCR auf das Shigatoxinbildungsvermögen untersucht. Hierzu wurden jeweils 4 Kolonien zu einem Ansatz gepoolt eingesetzt. Kam es hier wiederum zu einem positiven Toxingennachweis, wurden die positiven, gepoolten Kolonien durch einen Verdünnungsausstrich auf SMAC vereinzelt, Reinkulturen auf Standard-I-Agar überimpft und die Reinkulturen nochmals mittels *stx*-PCR überprüft. War es bei positiver Sreening-PCR nicht möglich, durch das Abpicken von 12 bis 24 Kolonien eine shigatoxinpositive Einzelkolonie zu isolieren, wurde die Probe als Screening-positiv bewertet (BREY, 1998; STÖCKER, 2002).

DNA-Extraktion:
Für den molekularbiologischen Nachweis des Shigatoxingens (*stx*) mittels PCR wurde von den Subkultivierungen auf der SMAC-Platte mit einer 1 ml-Glaspipette ca. ¼ des Koloniematerials im dicht bewachsenen Teil des Ausstrichs abgenommen und in 100 µl A. bidest. unter leichtem Vortexen resuspendiert. Die DNA wurde anschließend im Heizblock bei 100 °C für 10 Minuten extrahiert und bei 10000 g kurz zentrifugiert. Aus dem Überstand wurde 1 µl zu dem PCR-Ansatz pipettiert (STÖCKER, 2002).

PCR:
Zum Nachweis des *stx*1-Gens wurden die Primer KS7 und KS8 (RÜSSMANN et al., 1995) und für den Nachweis des *stx*2-Gens das Primerpaar LP43 und LP44 (CEBULA et al., 1995) verwendet. Der Reaktionsansatz und die Amplifikationsbedingungen für den Nachweis der *stx*-Gene 1 und 2 sind Tabelle 21 bzw.
Tabelle **22** zu entnehmen.

Tabelle 21: PCR-Bedingungen für den Nachweis des *stx1*-Gens mit dem Primerpaar KS7/KS8 (RÜSSMANN et al., 1995)

Primer	**Ziel-sequenz**	**Amplifikat-länge**	**Reaktionsansatz (25 µl)**		**Cycler-programm**
KS7 KS8	*stx1*	285 bp	2,5 µl 2 µl 2 µl 0,25 µl 0,25 µl 0,20 µl 16,80 µl + 1 µl bzw. + 1 µl bzw. + 1 µl	10 x PCR Puffer (Mg-frei) $MgCl_2$ (25 mM) dNTP- Mix (40 mM) Primer KS7 (0,1 nmol/µl) Primer KS8 (0,1 nmol/µl) Taq-Polymerase (5 U/µl) Aqua bidest. Proben- DNA Positivkontrolle: DNA-Extrakt E 117 Negativkontrolle: DNA-Extrakt E 163	Denaturierung 5 min bei 94 °C Amplifikation: 30 Zyklen 30 s bei 94 °C 60 s bei 52 °C 40 s bei 72 °C Renaturierung 5 min bei 72 °C

Tabelle 22: PCR-Bedingungen für den Nachweis des stx2-Gens mit dem Primerpaar LP43/44 (CEBULA et al., 1995)

Primer	Ziel-sequenz	Amplifikat-länge	Reaktionsansatz (25 µl)		Cycler-programm
LP43	*stx2*	584 bp	2,5 µl	10 x PCR Puffer (Mg-frei)	Denaturierung
LP44			2 µl	$MgCl_2$ (25 mM)	5 min bei 94 °C
			2 µl	dNTP- Mix (40 mM)	
			0,25 µl	Primer LP43 (0,1 nmol/µl)	Amplifikation:
			0,25 µl	Primer LP44 (0,1 nmol/µl)	30 Zyklen
			0,20 µl	Taq-Polymerase (5 U/µl)	90 s bei 94 °C
			16,80 µl	Aqua bidest.	90 s bei 64 °C
			+ 1 µl	Proben- DNA	90 s bei 72 °C
			bzw.	Positivkontrolle:	Renaturierung
			+ 1 µl	DNA-Extrakt E 117	5 min bei 72 °C
			bzw.	Negativkontrolle:	
			+ 1 µl	DNA-Extrakt E 163	

Bestätigung und Feindifferenzierung:

*Stx*1- bzw. *stx*2-positive Isolate wurden molekularbiologisch mittels PCR auf das Vorliegen der Virulenzfaktoren Enterohämolysin (E*hly*A) und Intimin (*eae*) untersucht (SCHMIDT et al., 1994a; SCHMIDT et al., 1995). Entsprechende Primer, Zielgene, Angaben zum Reaktionsansatz und Cyclerprogramm sind in Tabelle 23 bzw. Tabelle 24 dargestellt.

Tabelle 23: PCR-Bedingungen für den Nachweis der Enterohämolysinbildung in STEC mit dem Primerpaar hlyA1/hlyA2 (SCHMIDT et al., 1995)

Primer	Ziel-sequenz	Amplifikat-länge	Reaktionsansatz (25 µl)		Cycler-programm
hlyA1	E*hly*A	1551 bp	2,5 µl	10 x PCR Puffer (Mg-frei)	Denaturierung
hlyA4			2 µl	$MgCl_2$ (25 mM)	5 min bei 95 °C
			2 µl	dNTP- Mix (40 mM)	
			0,25 µl	Primer hlyA1 (0,1 nmol/µl)	Amplifikation:
			0,25 µl	Primer hlyA4 (0,1 nmol/µl)	30 Zyklen
			0,20 µl	Taq-Polymerase (5 U/µl)	30 s bei 94 °C
			16,8 µl	Aqua bidest.	60 s bei 57 °C
			+ 1 µl	Proben- DNA	90 s bei 72 °C
			bzw.	Positivkontrolle:	Renaturierung
			+ 1 µl	DNA-Extrakt E 124	5 min bei 72 °C
			bzw.	Negativkontrolle:	
			+ 1 µl	DNA-Extrakt E 163	

Tabelle 24: PCR-Bedingungen für den Nachweis der Intiminbildung in STEC mit dem Primerpaar SK1/SK2 (SCHMIDT et al., 1994a)

Primer	Ziel- sequenz	Amplifikat-länge	Reaktionsansatz (25 µl)		Cycler-programm
SK1	*eae*A	864 bp	2,5 µl	10 x PCR Puffer (Mg-frei)	Denaturierung
SK2	konstanter		2 µl	$MgCl_2$ (25 mM)	4 min bei 95 °C
	Bereich		0,5 µl	dNTP- Mix (40 mM)	
			0,25 µl	Primer SK1 (0,1 nmol/µl)	Amplifikation:
			0,25 µl	Primer SK1 (0,1 nmol/µl)	30 Zyklen
			0,25 µl	Taq-Polymerase (5 U/µl)	30 s bei 95 °C
			18,25 µl	Aqua bidest.	60 s bei 52 °C
			+ 1 µl	Proben- DNA	60 s bei 72 °C
			bzw.	Positivkontrolle:	Renaturierung
			+ 1 µl	DNA-Extrakt E 124	5 min bei 72 °C
			bzw.	Negativkontrolle:	
			+ 1 µl	DNA-Extrakt E 163	

Im Anschluss an die PCR wurden die Amplifikate zur Visualisierung und Auswertung in einer Gelektrophorese eingesetzt. Hierfür wurden jeweils nach Zugabe von 2 µl Gel-Loading-Puffer 10 µl des Amplifikats in die Taschen des 2 %igen Agarosegels pipettiert und unter Mitführung eines Längenstandards elektrophoretisch bei 125 V für 45 min aufgetrennt. Nach Färbung in Ethidiumbromidlösung und anschließender Spülung in A. dest. wurden die aufgetrennten PCR-Produkte im Transilluminator unter UV-Licht visualisiert und ausgewertet.

Die Isolate wurden anschließend zwecks Serotypisierung anhand ihrer O- und H-Antigene und Feincharakterisierung der geno-(PCR) und phänotypischen Toxinbildungseigenschaften (EIA, Verozelltest) an das Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR) Berlin übersandt (BEUTIN et al., 2007).

3.2.1.5.3 *Listeria* spp. und *Listeria monocytogenes*

Die quantitative Untersuchung auf *Listeria* spp. und *L. monocytogenes* erfolgte in Anlehnung an Methode L00.00-22 (Horizontales Verfahren für Nachweis und Zählung von *Listeria monocytogenes* in Lebensmitteln Teil 2: Zählverfahren) der Amtlichen Sammlung von Untersuchungsverfahren nach §64 LFGB (2006). Das Probenmaterial wurde auf Oxoid-Chromogen-Listeria-Selektivnährboden (OCLA) ausgestrichen und aerob für 48 Stunden bei 37 °C inkubiert.
Bei dieser Untersuchung auf *L. monocytogenes* wurde die Zahl der *Listeria* spp., die sich auf OCLA nach 48 Stunden Inkubation als blaue, runde, glänzende Kolonien darstellten, miterfasst und dokumentiert.
L. monocytogenes-verdächtige Kolonien zeigten auf OCLA-Agar ein Wachstum als blaue, runde Kolonien mit opakem Hof.

Bestätigung und Feindifferenzierung:

Als *L. monocytogenes* wurden diejenigen präsumtiven Isolate definiert, die nach Subkultivierung auf Columbia Schafblutagar PLUS® eine α-Hämolyse aufwiesen und im Zuckerverwertungstest Rhamnose, jedoch nicht Xylose fermentativ verstoffwechselten. Für die letztgenannte Untersuchung wurden 10 ml Purple Broth mit je 1 ml 10%iger, sterilfiltrierter Rhamnose- bzw. Xyloselösung versetzt und schließlich 5 Tropfen einer Übernachtkultur in Standard-I-Bouillon des zu testenden Isolats zugegeben. Die fermentative Umsetzung des jeweiligen Zuckers wurde aufgrund der Säurebildung mittels Farbumschlag der Bouillon von lila nach gelb angezeigt.

Die Zugehörigkeit zu den Hauptserovaren 1/2a, 1/2b, 1/2c und 4b wurde mittels Multiplex-PCR nach DOUMITH et al. (2004) überprüft. Das Material einer einzelnen Kolonie auf der OCLA-Platte wurde dabei direkt ohne separaten DNA-Extraktionsschritt als Template eingesetzt (LICK et al., 1999). Die verwendeten Primer mit zugehöriger Zielsequenz, Reaktionsansatz und Amplifikationsbedingungen gibt Tabelle 25 wieder.

Nach abgeschlossener PCR erfolgte die elektrophoretische Auftrennung der Amplifikate mit anschließender Visualisierung wie in Abschnitt 3.2.1.5.2 dargestellt.

Tabelle 25: Multiplex-PCR zur Differenzierung der *L. monocytogenes*-Serovare mit den Primerpaaren 140/141, 142/143, 144/145, 146/147, 148/149 (DOUMITH et al., 2004)

Primer	Zielsequenz	Amplifikatlänge	Reaktionsansatz (50 µl)		Cyclerprogramm
140	*lmo0737*	691 bp	5 µl	10 x PCR Puffer (Mg-frei)	Denaturierung
141			4 µl	$MgCl_2$ (25 mM)	3 min bei 94 °C
142	*lmo1118*	906 bp	1 µl	dNTP- Mix (40 mM)	
143			0,5 µl	Primer 140 (0,1 nmol/µl)	Amplifikation:
144	ORF2819	471 bp	0,5 µl	Primer 141 (0,1 nmol/µl)	35 Zyklen
145			0,75 µl	Primer 142 (0,1 nmol/µl)	24 s bei 94 °C
146	ORF2110	597 bp	0,75 µl	Primer 143 (0,1 nmol/µl)	75 s bei 53 °C
147			0,5 µl	Primer 144 (0,1 nmol/µl)	75 s bei 72 °C
148	*prs*	370 bp	0,5 µl	Primer 145 (0,1 nmol/µl)	
149			0,5 µl	Primer 146 (0,1 nmol/µl)	Renaturierung
			0,5 µl	Primer 147 (0,1 nmol/µl)	7 min bei 72 °C
			0,1 µl	Primer 148 (0,1 nmol/µl)	
			0,1 µl	Primer 149 (0,1 nmol/µl)	
			1 µl	Taq-Polymerase (5 U/µl)	
			30 µl	Aqua bidest.	
			+ 1	Kolonie der Probe	
			bzw. + 1	Kolonie der Positivkontrollen: Li 2, Li 258, Li261	
			bzw. + 1 µl	Negativkontrolle: A. bidest.	

3.2.1.5.4 *Staphylococcus aureus*

Für den Nachweis von *St. aureus* wurden in Anlehnung an Methode L 00.00-55 (Zählung von Koagulase-positiven Staphylokokken in Lebensmitteln – Teil 1: Verfahren mit Baird-Parker-Medium) der Amtlichen Sammlung von Untersuchungsverfahren nach §64 LFGB (2000) Aliquote der Probenanreicherungen auf Mannitol-Salz-Eigelb-Agar (MSE) ausgestrichen. Verdächtige Kolonien zeigten nach aerober Inkubation bei 37 °C für 48 Stunden eine gewölbte, glänzend gelbe, mit einem opalisierenden Präzipitationshof umgebene Koloniemorphologie.

Bestätigung und Feindifferenzierung:
Zur Bestätigung wurden die verdächtigen Kolonien auf das Vorliegen des zellwandgebundenen, plasmakoagulierenden Enzyms Clumping-Faktor und des zellwandständigen Proteins A mittels Latexagglutinationstest untersucht (ZSCHOCK et al., 2005; DAVIES et al., 2008). Als *Staphylococcus aureus* zugehörig wurden diejenigen Isolate gewertet, die Lecithinase- (opaker Hof auf MSE-Agar) sowie Clumping-Faktor/ Protein A- (Verklumpung in der Latexagglutination) positiv waren.

Das Vermögen zur Bildung von Staphylokokken-Enterotoxinen (SE) wurde mittels RIDASCREEN® SET ELISA, einem Double-Antibody-Sandwich-Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) ermittelt, mit dem die Gesamterfassung von Staphylokokken-Enterotoxinen A-E möglich war. Hierfür wurden 2-3 Kolonien des zu analysierenden Isolats in 5 ml Hirn-Herz-Bouillon überführt und für 18 Stunden bei 37 °C unter leichtem Schütteln (80 rpm) inkubiert. Nach anschließender Zentrifugation für 5 min bei 3500 rpm wurde der Überstand mit Spritzenfiltern (Porengröße 0,22 µm) steril filtriert, von dem jeweils 100 µl in die Vertiefungen der Mikrotiterplatte pipettiert wurden. Die weitere Durchführung des ELISA fand nach Herstellervorschrift statt. Neben im Testsystem mitgelieferten Positiv- und Negativkontrollen wurden ein definierter Enterotoxin A- Bildner (St 378) als Positivkontrolle und ein *S. xylosus*-Stamm (St 36) als Negativkontrolle eingesetzt.

Die Auswertung erfolgte photometrisch unter Verwendung eines Plate Readers bei einer Wellenlänge von 450 nm. Der Test wurde als auswertbar angesehen, wenn die mitgeführte Positivkontrolle (interner Standard) eine Absorption von $\geq$ 1,0 und die Negativkontrolle eine Absorption $\leq$ 0,2 aufwiesen. Der cut-off-Wert wurde durch Addition von 0,15 zu dem Mittelwert des Negativstandards ermittelt. Werte darüber galten als SE-positiv, Werte darunter als negativ.

SE-positive Isolate wurden mittels eines zweiten ELISA, dem RIDASCREEN® SET A,B,C,D,E, anhand ihres Verteilungsmusters der Toxintypen SE A bis E individuell erfasst und weiter charakterisiert (PARK et al., 1996). Probenvorbereitung und Testdurchführung erfolgten analog des RIDASCREEN® SET A-E. Dieser Test wurde als auswertbar angesehen, wenn der interne Positivstandard (Standardgemisch der Toxine A, B, C, D, E) eine Absorption von $\geq$ 0,5 und die Negativkontrolle (Blankwert) eine Absorption von $\leq$ 0,3 aufwiesen. Der cut-off-Wert wurde durch Addition von 0,15 zu dem Mittelwert der Negativstandards ermittelt. Werte darüber galten als positiv für das jeweilige Toxin, Werte darunter als negativ.

Als Screening-Untersuchung auf das Vorliegen von MRSA-Stämmen wurde ein Agardiffusionstest nach BOUBAKER et al (2004) mittels Cefoxitin-Testplättchen basierend auf Vorgaben der AVID- „Arbeitsanleitung für die Resistenzbestimmung schnell wachsender Bakterien in der Veterinärmedizin“ und DIN-Norm 58940 (1992-1996) durchgeführt. Als festes Nährmedium diente der MSE-Agar, auf dem 0,1 ml einer in 1 ml NaCl-Lösung resuspendierten *St. aureus*-Kolonie flächig ausgespatelt wurde. Nach leichtem Antrocknen wurden die Agarplatten mit den Cefoxitin-Testplättchen (30 µg) beladen (JAIN et al., 2008; BROEKEMA et al., 2009). Die Auswertung des Hemmhofdurchmessers erfolgte nach Inkubation für 24 Stunden bei 37 °C. Als resistent gegen Cefoxitin galt ein Stamm bei einem Hemmhofdurchmesser von kleiner als 19 mm bzw. als sensibel bei größer als 20 mm (BADDOUR et al., 2007). Als Positiv- und Negativkontrollen wurden der MRSA-Stamm St 137 bzw. das Isolat St 378 aus der Stammsammlung des Max Rubner-Instituts Kulmbach eingesetzt.

Wurden positive Isolate detektiert, fand eine weitergehende Resistenzbestimmung mittels ATB™ Staph 1 statt. Hierbei wurde eine Bakteriensuspension mit den im Lieferumfang enthaltenen ATB- Nährlösungen auf 10^7 KbE/ml eingestellt. Davon wurden jeweils 135 µl in die Kavitäten des Teststreifens pipettiert und 24 Stunden bei 37 °C inkubiert. Trat Keimwachstum (Trübung) in beiden geprüften Antibiotikakonzentrationen auf, galt der Keim als resistent. War die Kavität mit der niedrigen Konzentration bewachsen, die Kavität mit der hohen Konzentration jedoch unbewachsen, war der Keim als intermediär gegenüber dem getesteten Antibiotikum einzustufen. Als sensibel erwiesen sich Keime mit gehemmtem Wachstum (klare Lösung) in beiden Antibiotikakonzentrationen.

3.2.1.5.5 *Bacillus cereus*

Die Bestimmung der Zahl an präsumtiven *Bacillus cereus* erfolgte in Anlehnung an die Methode L 00.00-25 (Bestimmung präsumtiver *Bacillus cereus* in Lebensmitteln – Koloniezählverfahren) der Amtlichen Sammlung von Untersuchungsverfahren nach §64 LFGB (1992). Berücksichtigt wurden dabei nur Kolonien, die nach aerober Inkubation für 24 Stunden bei 37 °C auf Mannitol-Eigelb-Polymyxin-(MYP)-Agar ein für *B. cereus* typisches Wachstum zeigten. Auf MYP-Agar wurden als *B. cereus*-verdächtige Kolonien 2-5 mm große, rosafarbene Kolonien mit einem unregelmäßigen, wurzelartig gekerbten Rand und zum Teil hellerem Zentrum gewertet, die von einem deutlichen bis zu 5 mm breiten Präzipitationshof umgeben waren.

Bestätigung und Feindifferenzierung:
Sowohl die Überprüfung der verdächtigen Kolonien auf Zugehörigkeit zur Spezies *B. cereus* als auch die Untersuchung des Toxinbildungsvermögens erfolgten molekularbiologisch mittels PCR.

DNA-Extraktion:
Die DNA für alle im folgenden beschriebenen PCR-Analysen wurde gewonnen, indem das Material einer verdächtigen Kolonie nach MESSELHÄUSSER et al. (2007) mit einer sterilen Platin-

Öse abgenommen und in 500 µl steriler, isotoner NaCl-Lösung unter leichtem Vortexen resuspendiert und für 10 Minuten bei 100 °C erhitzt wurde. Nach kurzem Zentrifugieren bei 10000 g wurden 5 µl des Überstandes zu dem jeweiligen PCR-Ansatz pipettiert.

PCR:
Die präsumtiven *B. cereus*-Isolate wurden mittels PCR nach YAMADA et al. (1999) durch das Primerpaar BC1 und BC2r bestätigt. Die PCR basiert auf dem Nachweis eines für *B. cereus* spezifischen Fragments des Gyrase B Gens (*gyrB*), das die Untereinheit B des Enzyms DNA-Gyrase codiert. In Tabelle 26 sind der Reaktionsansatz und die Amplifkationsbedingungen aufgeführt.

Tabelle 26: PCR-Bedingungen für den *B. cereus*-Nachweis mit dem Primerpaar BC1/BC2r (YAMADA et al., 1999)

Primer	**Zielsequenz**	**Amplifikatlänge**	**Reaktionsansatz (50 µl)**		**Cyclerprogramm**
BC1	*gyr*B	365 bp	5 µl	10 x PCR Puffer (Mg-frei)	Denaturierung
BC2r			7 µl	$MgCl_2$ (25 mM)	5 min bei 95 °C
			1 µl	dNTP- Mix (40 mM)	
			0,25 µl	Primer BC1 (0,1 nmol/µl)	Amplifikation:
			0,25 µl	Primer BC2r (0,1 nmol/µl)	35 Zyklen
			0,25 µl	Taq-Polymerase (5 U/µl)	60 s bei 94 °C
			31,25 µl	Aqua bidest.	90 s bei 58 °C
			+ 5 µl	Proben- DNA	150 s bei 72 °C
			bzw.	Positivkontrolle:	Renaturierung
			+ 5 µl	DNA-Extrakt B 190	5 min bei 72 °C
			bzw.	Negativkontrolle:	
			+ 5 µl	DNA-Extrakt B 170	

Die als *B. cereus* bestätigten Isolate wurden hinsichtlich ihres diarrhöischen und emetischen Toxinbildungsvermögens charakterisiert. Mittels PCR-Analysen wurden die codierenden Gene der diarrhöischen Enterotoxine Hämolysin BL (*hbl*-Operon mit *hbl*A, *hbl*C, *hbl*D) und Non-hemolytic-Enterotoxin (*nhe*-Operon mit *nhe*A, *nhe*B und *nhe*C) nachgewiesen. In den Tabellen 27 bis 31 sind hierzu jeweils verwendete Primer, Zielsequenz, Zusammensetzung des Reaktionsansatzes und Cyclerprogramm dargestellt.

Tabelle 27: PCR-Bedingungen für den Nachweis des *hblA*-Gens in *B. cereus* mit dem Primerpaar HblA1/HblA2 (MÄNTYNEN et al., 1998)

Primer	**Zielsequenz**	**Amplifikatlänge**	**Reaktionsansatz (50 µl)**		**Cyclerprogramm**
HblA1	*hbl*A	883 bp	5 µl	10 x PCR Puffer (Mg-frei)	Amplifikation 1:
HblA2			4 µl	$MgCl_2$ (25 mM)	5 Zyklen
			1 µl	dNTP- Mix (40 mM)	
			0,25 µl	Primer HblA1 (0,1 nmol/µl)	30 s bei 94 °C
			0,25 µl	Primer HblA2 (0,1 nmol/µl)	60 s bei 60,5 °C
			0,25 µl	Taq-Polymerase (5 U/µl)	90 s bei 72 °C
			34,25 µl	Aqua bidest.	
			+ 5 µl	Proben- DNA	Amplifikation 2:
					30 Zyklen
			bzw.	Positivkontrolle:	
			+ 5 µl	DNA-Extrakt B44	30 s bei 94 °C
			bzw.	Negativkontrolle:	60 s bei 56 °C
			+ 5 µl	DNA-Extrakt B170	90 s bei 72 °C

Tabelle 28: PCR-Bedingungen für den Nachweis des *hblC*-Gens in *B. cereus* mit dem Primerpaar L2aF/L2aR (MORAVEK et al., 2004)

Primer	**Zielsequenz**	**Amplifikatlänge**	**Reaktionsansatz (50 µl)**		**Cyclerprogramm**
L2aF	*hbl*C	411 bp	5 µl	10 x PCR Puffer (Mg-frei)	Denaturierung:
L2aR			7,2 µl	$MgCl_2$ (25 mM)	5 min bei 95 °C
			1 µl	dNTP- Mix (40 mM)	
			0,25 µl	Primer L2aF (0,1 nmol/µl)	Amplifikation:
			0,25 µl	Primer L2aR (0,1 nmol/µl)	35 Zyklen
			0,25 µl	Taq-Polymerase (5 U/µl)	60 s bei 94 °C
			31,05 µl	Aqua bidest.	60 s bei 51 °C
			+ 5 µl	Proben- DNA	60 s bei 72 °C
			bzw.	Positivkontrolle:	
			+ 5 µl	DNA-Extrakt B 44	
			bzw.	Negativkontrolle:	
			+ 5 µl	DNA-Extrakt B 170	

Tabelle 29: PCR-Bedingungen für den Nachweis des *hblD*-Gens in *B. cereus* mit dem Primerpaar L1A/L1B (RYAN et al., 1997)

Primer	Zielsequenz	Amplifikatlänge	Reaktionsansatz (50 µl)		Cyclerprogramm
L1A	*hbl*D	417 bp	5 µl	10 x PCR Puffer (Mg-frei)	Denaturierung
L1B			4,8 µl	$MgCl_2$ (25 mM)	5 min bei 95 °C
			1 µl	dNTP- Mix (40 mM)	
			0,125 µl	Primer L1A (0,1 nmol/µl)	Amplifikation:
			0,125 µl	Primer L1B (0,1 nmol/µl)	33 Zyklen
			0,3 µl	Taq-Polymerase (5 U/µl)	60 s bei 95 °C
			33,65 µl	Aqua bidest.	60 s bei 56 °C
			+ 5 µl	Proben- DNA	120 s bei 72 °C
			bzw.	Positivkontrolle:	Renaturierung
			+ 5 µl	DNA-Extrakt B 44	10 min bei
			bzw.	Negativkontrolle:	72 °C
			+ 5 µl	DNA-Extrakt B 170	

Tabelle 30: PCR-Bedingungen für den Nachweis des *nheA*-Gens in *B. cereus* mit dem Primerpaar 45c1/45c2 (MORAVEK et al., 2004)

Primer	Zielsequenz	Amplifikatlänge	Reaktionsansatz (50 µl)		Cyclerprogramm
45c1	*nhe*A	186 bp	5 µl	10 x PCR Puffer (Mg-frei)	Denaturierung
45c2			5,4 µl	$MgCl_2$ (25 mM)	5 min bei 95 °C
			1 µl	dNTP- Mix (40 mM)	
			0,125 µl	Primer 45c1 (0,1 nmol/µl)	Amplifikation:
			0,125 µl	Primer 45c2 (0,1 nmol/µl)	30 Zyklen
			0,3 µl	Taq-Polymerase (5 U/µl)	60 s bei 94 °C
			33,05 µl	Aqua bidest.	60 s bei 52 °C
			+ 5 µl	Proben- DNA	60 s bei 72 °C
			bzw.	Positivkontrolle:	
			+ 5 µl	DNA-Extrakt B 175	
			bzw.	Negativkontrolle:	
			+ 5µl	DNA-Extrakt B 170	

Tabelle 31: PCR-Bedingungen für den Nachweis des *nheB/ nheC*-Gens in *B. cereus* mit dem Primerpaar nheBC1/nheBC2 (DIETRICH et al., 2005)

Primer	Ziel-sequenz	Amplifi-katlänge	Reaktionsansatz (50 µl)		Cycler-programm
nheBC1	*nhe*B/C	300 bp	5 µl	10 x PCR Puffer (Mg-frei)	Denaturierung:
nheBC2			5,4 µl	$MgCl_2$ (25 mM)	5 min bei 95 °C
			1 µl	dNTP- Mix (40 mM)	Amplifikation :
			0,125 µl	Primer nheBC1 (0,1 nmol/µl)	35 Zyklen
			0,125 µl	Primer nheBC2 (0,1 nmol/µl)	60 s bei 94 °C
			0,3 µl	Taq-Polymerase (5 U/µl)	60 s bei 48 °C
			33,05 µl	Aqua bidest.	120 s bei 72 °C
			+ 5 µl	Proben- DNA	
			bzw.	Positivkontrolle:	
			+ 5 µl	DNA-Extrakt B 175	
			bzw.	Negativkontrolle:	
			+ 5 µl	DNA-Extrakt B 170	

Nach der Amplifikation erfolgte die elektrophoretischer Auftrennung und Visualisierung der Banden gemäß Abschnitt 3.2.1.5.2.

Um das emetische Toxinbildungsvermögen zu untersuchen, wurden die Isolate zunächst einem Stärkehydrolysetest unterzogen, da nur Stärkehydrolyse-negative *B. cereus* in der Lage sind, das emetische Toxin Cereulid zu bilden (AGATA et al., 1995b).
Hierzu wurden die Isolate auf Standard II- Nähragar (mit 1 % Stärkezusatz) subkultiviert und für 24 Stunden bei 30 °C inkubiert. Nach Auftropfen von 1:5 verdünnter Lugol´scher Lösung wurden Einzelkolonien mit tiefblauer Färbung um die Kolonien herum als Stärke-negativ beurteilt, während Kolonien mit deutlichem bräunlichen Hof als Stärke-positiv gewertet wurden.

Alle Stärkehydrolyse-negativen Isolate wurden mittels PCR, die auf dem Nachweis eines Fragments der nichtribosomalen Peptidsynthase (NRPS) basiert, hinsichtlich der Fähigkeit zur Cereulidbildung untersucht (EHLING-SCHULZ et al., 2004b). Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten PCR-Bedingungen sind in Tabelle 32 dargestellt.

Tabelle 32: PCR-Bedingungen für den Nachweis emetischer *B. cereus* mittels Primerpaar EM1F/EM1R (EHLING-SCHULZ et al., 2004b)

Primer	**Ziel-sequenz**	**Amplifikat-länge**	**Reaktionsansatz (50 µl)**		**Cycler-programm**
EM1F EM1R	Struktur-Gen der NRPS	635 bp	5 µl	10 x PCR Puffer (Mg-frei)	Denaturierung
			3 µl	$MgCl_2$ (25 mM)	5 min bei 95 °C
			1 µl	dNTP- Mix (40 mM)	
			0,25 µl	Primer EM1F (0,1 nmol/µl)	Amplifikation:
			0,25 µl	Primer EM1R (0,1 nmol/µl)	35 Zyklen
			0,25 µl	Taq-Polymerase (5 U/µl)	60 s bei 94 °C
			35,25 µl	Aqua bidest.	90 s bei 58 °C
			+ 5 µl	Proben- DNA	150 s bei 72 °C
			bzw.	Positivkontrolle:	Renaturierung
			+ 5 µl	DNA-Extrakt B174	5 min bei 72 °C
			bzw.	Negativkontrolle:	
			+ 5 µl	DNA-Extrakt B170	

Nach erfolgter Amplifikation wurde die elektrophoretischer Auftrennung und Visualisierung der Banden gemäß Abschnitt 3.2.1.5.2 durchgeführt.

3.2.1.5.6 Sulfitreduzierende Clostridien

Für den quantitativen Nachweis von sulfitreduzierenden Clostridien wurden 1 ml der Probenverdünnungen (vgl. Abschnitt 0) in 9 ml flüssigen, auf etwa 50 °C abgekühlten und in Röhrchen abgefüllten Sulfit-Polymyxin-Sulfadiazin-Agar (SPS) pipettiert und mit dem Agar vermischt. Nach dem Erstarren des Agars wurde dieser luftdicht durch Übergießen mit flüssiger Paraffinschicht abgeschlossen. Als sulfitreduzierende Clostridien wurden rundliche schwarze Kolonien mit oder ohne Gasbildung nach einer Inkubation bei 37 °C für 48 Stunden gezählt (ANGELOTTI et al., 1962; EISGRUBER et al., 1995).

3.2.2 Tenazität von *Salmonella* spp. und *L. monocytogenes* in Marinaden

3.2.2.1 Probenmaterial

Für die Durchführung der Beimpfungsversuche mit *L. monocytogenes* und *Salmonella* spp. wurde aus den unter Punkt 3.2.1.1 aufgeführten 30 Marinaden je Kategorie eine Marinade ausgewählt, deren Beschaffenheit, a_W- und pH-Wert dem jeweiligen Kategorie-Mittelwert entsprach und somit diese Kategorie am besten repräsentierte. Es handelte sich dabei um eine Dijon-Senfmarinade, ein Paprikawürzöl und ein Kräuterwürzöl eines einzigen Herstellers.

Vor der Inokulation wurden die Marinaden qualitativ mittels PCR auf eine native Belastung mit dem für die Beimpfung vorgesehenen Lebensmittelinfektionserreger getestet. Die verwendeten Primer und Amplifikationsbedingungen sind für *L. monocytogenes* der Tabelle 25 in Abschnitt 3.2.1.5.3 zu entnehmen. Im Falle von *Salmonella* spp. wurde der PCR-Nachweis des *inv*A-Gens, einem Invasion-assoziiertem Gen, nach RAHN et al. (1992) gewählt (vgl. Tabelle 33). Die PCR erfolgte nach Aufreinigung aus der nicht-selektiven Anreicherung in 225 ml gepuffertem Peptonwasser (siehe Schema in Abbildung 4).

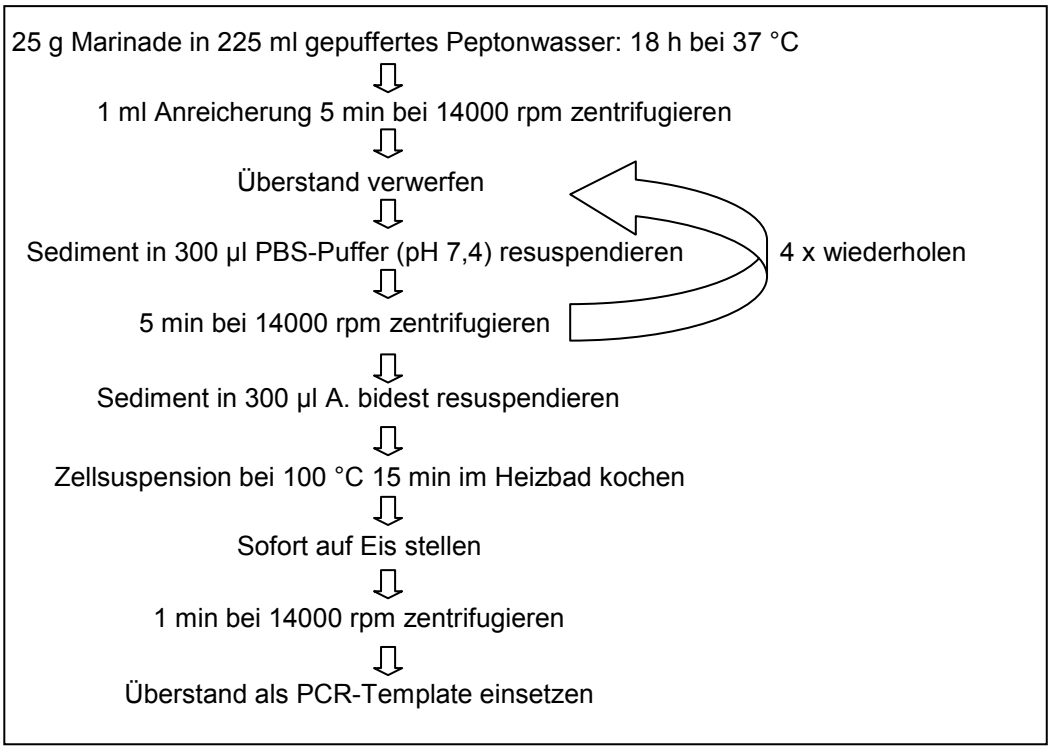

Abbildung 4: Schema der DNA-Aufreinigung für den Salmonellennachweis mit PCR (DE MEDICI et al., 2003)

Tabelle 33: PCR-Bedingungen für den Nachweis von *Salmonella* spp. mittels Primerpaar 139/141 (RAHN et al., 1992)

Primer	Ziel-sequenz	Amplifikat-länge	Reaktionsansatz (50 µl)		Cycler-programm
139 141	*inv*A	284 bp	5 µl 1,04 µl 0,8 µl 0,075 µl 0,075 µl 0,625 µl 37,385 µl + 5 µl bzw. + 5 µl bzw. + 5 µl	10 x PCR Puffer (Mg-frei) $MgCl_2$ (25 mM) dNTP- Mix (40 mM) Primer 139 (0,1 nmol/µl) Primer 141 (0,1 nmol/µl) Taq-Polymerase (5 U/µl) Aqua bidest. Proben- DNA Positivkontrolle: DNA-Extrakt S 689 Negativkontrolle: A. bidest.	Denaturierung 5 min bei 95 °C Amplifikation: 25 Zyklen 70 s bei 94 °C 100 s bei 60 °C 102 s bei 72 °C Renaturierung 7 min bei 72 °C

Nach erfolgter Amplifikation wurde die elektrophoretische Auftrennung und Visualisierung der Banden gemäß Abschnitt 3.2.1.5.2 durchgeführt.

3.2.2.2 Herstellung des Inokulats

Zur Herstellung des jeweiligen Beimpfungspools (Inokulum) wurden die aus Tabelle 34 ersichtlichen Stämme von *Salmonella* spp. bzw. *L. monocytogenes* so ausgewählt, dass jeweils ein Stamm einen Referenzstamm aus einer internationalen Stammsammlung (ATCC oder NCTC), ein Stamm ein klinisches Isolat und ein Stamm ein Lebensmittelisolat aus mariniertem Fleisch repräsentierte.

Tabelle 34: Zusammensetzung des Beimpfungspools für die Inokulation von Marinaden mit *Salmonella* spp. oder *L. monocytogenes*

Stamm-Nr.	Serotyp	Herkunft	Quelle
Li23 NCTC 10527	*L. monocytogenes* 4b	Liquor (Mensch)	E. Weise (BfR Berlin)
Li 258	*L. monocytogenes* 1/2a	Staub/Umwelt	S. Kleta (BfR Berlin)
Isolat 27	L. monocytogenes 1/2c	Mariniertes Fleisch	C. Schönheit (MRI Kulmbach)
S 689 ATCC 13076	*S.* Choleraesuis Serogruppe C	Typstamm	DSMZ No. 9898
S 552	*S*. Enteritidis Serogruppe D	Stuhl (Mensch), Lebens-mittelinfektion	Krankenhaus Kulmbach
Isolat 8	*S*. Typhimurium Serogruppe B	Mariniertes Fleisch	C. Schönheit (MRI Kulmbach)

Die Kultivierung dieser Stämme erfolgte durch die Entnahme einer Kolonie der Nähragarkultur und Überführung in 5 ml Standard-I-Nährbouillon mit anschließender Inkubation für 16 Stunden bei 37 °C.

Je Keim wurde aus jeweils 2 ml Bakteriensuspension ein Drei-Stamm-Pool für die Beimpfung der unter 3.2.2.1 genannten Marinaden hergestellt.

3.2.2.3 Inokulation der Marinaden

Das Inokulum wurde durch eine dezimale Verdünnungsreihe mit physiologischer Kochsalzlösung auf eine Dosis von ca. 1 x 10^7 KbE/ml eingestellt, was durch direkte Keimzählung mittels Thoma-Kammer verifiziert wurde. Aus dieser Verdünnung wurden 2 ml für die Beimpfung von 2000 g Marinade eingesetzt. Dies entsprach einer Inokulationsdosis von ca. 1 x 10^4 KbE/g, was durch Untersuchung der frisch beimpften Marinade mittels Spatelverfahren zusätzlich überprüft wurde (vgl. Abschnitt 3.2.1.5.1 bzw. 3.2.1.5.3).

Nach Inokulation der Marinade wurde der Ansatz über 5 Minuten mit sterilen Nitril-Handschuhen gründlich durchmischt.
Jeweils 20 g bzw. 25 g für Ansätze mit Anreicherung dieser beimpften Marinade wurden in sterile Kunststoffbeutel mit Filtereinsatz eingewogen und mittels Schweißnaht am oberen Beutelrand luftdicht und auslaufsicher verschlossen.

3.2.2.4 Stammdifferenzierung der überlebenden Isolate

Um das Verhalten der einzelnen Stämme innerhalb des Inokulationspools während der gesamten Versuchsdauer zu analysieren, wurden die bei der Keimzählung gewonnenen Kolonien den jeweils eingesetzten, in Tabelle 34 dargestellten Serotypen zugeordnet. Im Falle der Inokulation mit *L. monocytogenes* wurde dies mittels Multiplex-PCR (vgl. Tabelle 25 aus Abschnitt 3.2.1.5.3) umgesetzt. Um die Salmonellen der entsprechenden Serogruppe B, C oder D zuzuordnen, wurde eine Objektträgeragglutination mit gruppenspezifischen Anti-Salmonellen-Seren durchgeführt. Dazu wurde das Material einer Kolonie mit Hilfe einer sterilen Impföse auf einem Objektträger in einen Tropfen Anti-Serum gerieben. Das Vorliegen der entsprechenden Serogruppe wurde durch eine makroskopisch sichtbare Agglutination angezeigt.

3.2.2.5 Probennahmeschema und durchgeführte Untersuchungen

Die Ausgangskeimzahl direkt nach Beimpfung, der Verlauf der Keimzahl sowie des pH- und a_W-Wertes wurden im Triplikat durch sechs Messungen (Tag 0, Tag 2, Tag 7, Tag 14, Tag 28, Tag 42) jeweils für die Lagerung bei 4 °C und bei 22 °C aufgezeichnet.

Analog zu den beimpften Proben erfolgte die Messung der physikalisch-chemischen Parameter (a_W-, pH-Wert) sowie die Ermittlung von Gesamtkeimzahl, Zahl der Enterobakterien und Milchsäurebakterien an den unbeimpften Kontrollchargen ebenfalls im Dreifachansatz.

Zudem wurden am Tag 0 bzw. am Tag 42 die Negativkontrollen im Dreifachansatz darauf überprüft (vgl. Methoden aus Abschnitt 3.2.2.1), dass der entsprechend inokulierte Keim nicht nachweisbar und somit eine Nativkontamination bzw. eine Kreuzkontamination während des Beimpfungsvorganges ausgeschlossen war.

Abbildung 5 gibt das Untersuchungsschema in beimpften und unbeimpften Proben wieder.

Insgesamt wurden für einen Untersuchungsdurchgang je inokulierten Keim und je Marinadentyp 63 Ansätze hergestellt. Ein Dreifachansatz wurde dabei für die Untersuchung des Beimpfungserfolges verwendet, während die restlichen 60 Ansätze je zur Hälfte unter kontrollierten Bedingungen parallel bei 4 °C bzw. 22 °C bis zum Untersuchungszeitpunkt gelagert wurden. Für jeden Untersuchungszeitpunkt lagen hierbei je drei Ansätze sowohl für den Direktnachweis mittels Spatelverfahren als auch für Anreicherungsverfahren im Falle eines negativ ausfallenden Direktnachweises vor.

Dieser Versuchsdurchgang wurde für jeden inokulierten Keim zweimal wiederholt.

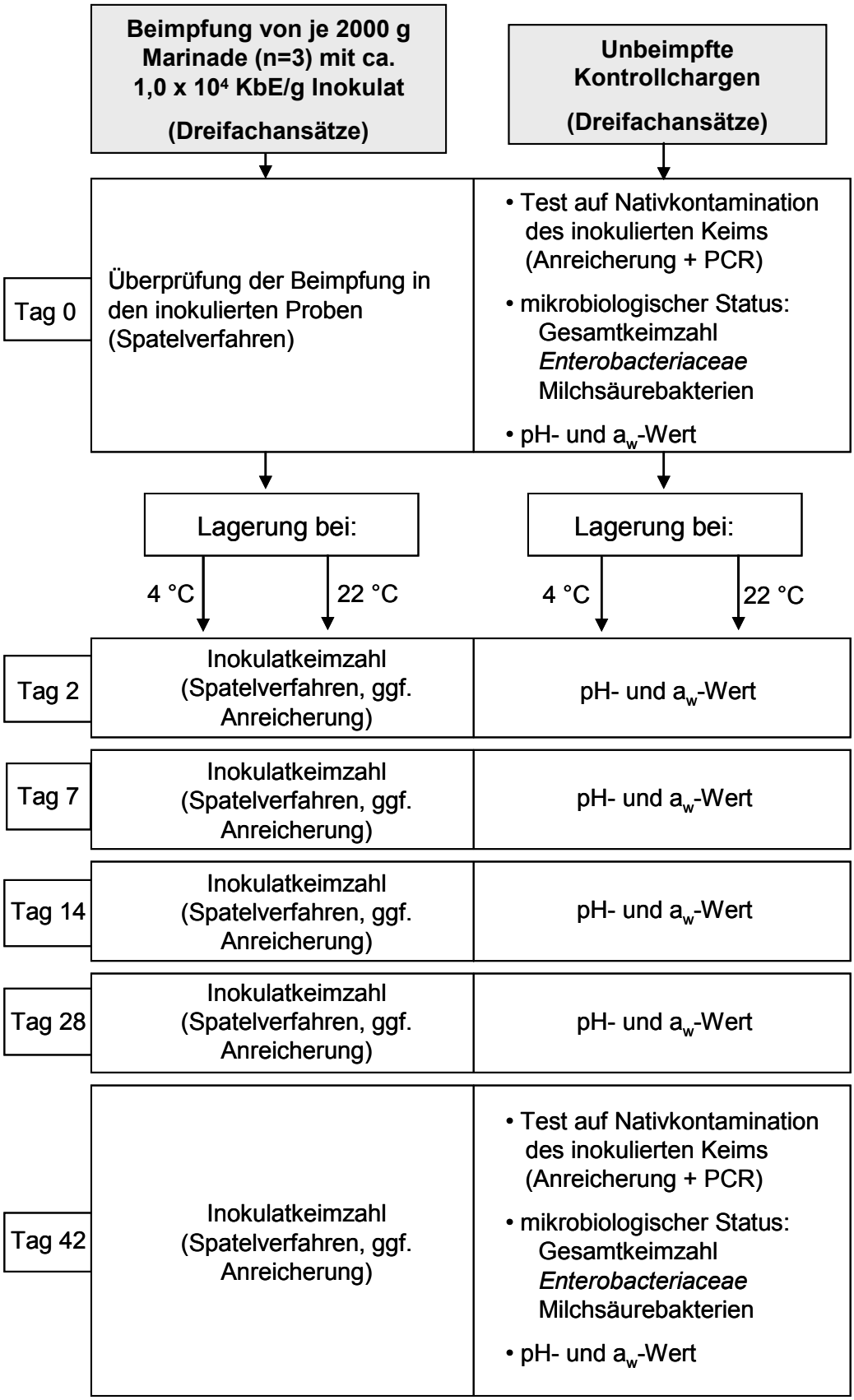

Abbildung 5: Untersuchungsschema der Tenazitätsstudie mit inokulierten Marinaden der drei Marinadenkategorien Senf, Paprika und Kräuter

4 Ergebnisse

4.1 Marktstudie

Es wurden sowohl marinierte Schweinenackensteaks aus dem SB-Bereich als auch Marinaden mikrobiologisch untersucht. Neben dem allgemeinen mikrobiologischen Status (Gesamtkeimzahl, *Enterobacteriaceae*, *Listeria* spp.) und den chemisch-physikalischen Parametern pH- und a_W-Wert wurden die Proben auf das Vorhandensein der wichtigsten Lebensmittelinfektionserreger geprüft.

4.1.1 Marinierte Schweinenackensteaks

Von Juni bis Oktober 2008 und März bis Juni 2009 wurden insgesamt 300 Proben von kommerziell erhältlichen marinierten Schweinenackensteaks gezogen und mikrobiologisch untersucht. Das Herstellerspektrum war dabei in beiden Probennahmezeiträumen identisch.
Aufgrund der großen Produktvielfalt erfolgte eine Einteilung in die drei Kategorien Senf/Bier-, Paprika- und Kräutermarinaden. Diese Kategorien unterschieden sich neben der Würzung auch in der technologischen Zusammensetzung, was mit unterschiedlichen Produkteigenschaften einherging.

4.1.1.1 pH-Wert

Im marinierten Schweinefleisch wurden pH-Werte von 5,07 bis 6,46 ermittelt. Abbildung 6 zeigt in der Gesamtdarstellung der Daten von 2008 und 2009 in allen drei Produktkategorien zum Ende des MHD eine pH-Wert-Absenkung. Dabei unterschieden sich die einzelnen Werte innerhalb der Kategorien und Untersuchungszeitpunkte (Anfang bzw. Ende MHD) um nicht mehr als eine Einheit. Die stärkste pH-Wertabsenkung bis zum Ende des MHD war bei Senfmarinaden zu finden: Hier sanken die Medianwerte im Probennahmezeitraum 2008 von 5,96 auf 5,73 bzw. 2009 von 5,74 auf 5,57. Die Werte in den einzelnen Box-Plots lagen normal um den Median verteilt. Zwischen den beiden Probenziehungszeiträumen wurden in den pH-Werten der Produkte keine statistisch relevanten Unterschiede festgestellt (vgl. Abbildung 6)

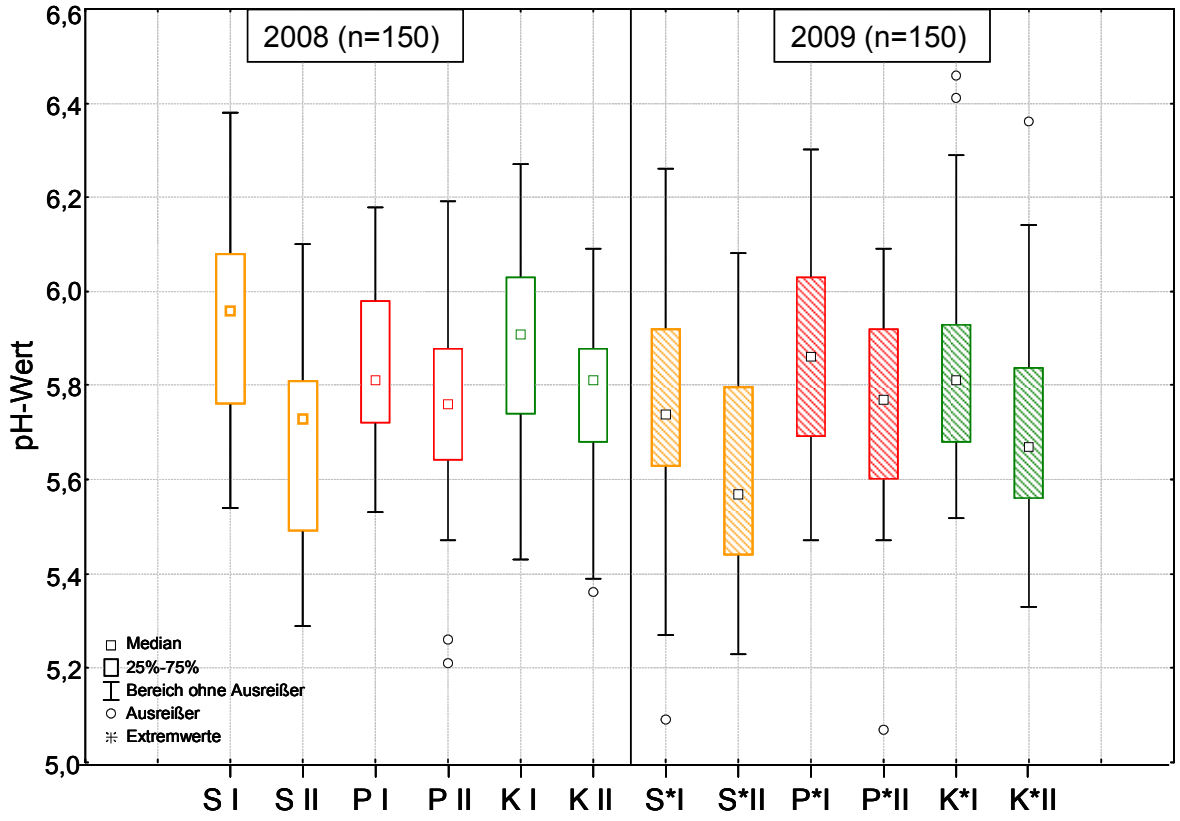

Abbildung 6: Box-Plot-Darstellung der pH-Werte in marinierten Schweinesteaks (n=300) der drei Produktkategorien Senf (S), Paprika (P) und Kräuter (K).

(I)	Zeitpunkt des Einkaufs
(II)	Ende des MHD
Ohne *-Kennzeichnung:	Daten des Probennahmezeitraums 2008 (n=150)
S*, P*, K*:	Daten des Probennahmezeitraums 2009 (n=150)

4.1.1.2 Allgemeine mikrobiologische Untersuchungen

4.1.1.2.1 Aerobe, mesophile Gesamtkeimzahl

Insgesamt wurden aerobe mesophile Gesamtkeimzahlen zwischen 2,8 x 10^3 und 9,7 x 10^8 KbE/g festgestellt. In allen Produktkategorien stieg die Gesamtkeimzahl bis zum Ende des MHD um eine, zum Teil bis zu zwei Zehnerpotenzen an. Unabhängig vom Probennahmezeitraum waren die Keimzahlanstiege mit Medianveränderungen von 4,0 x 10^5 auf 2,4 x 10^7 KbE/g im Jahr 2008 bzw. von 3,7 x 10^5 auf 1,1 x 10^7 KbE/g im Jahr 2009 bei Produkten mit Senfmarinade am höchsten. Die Medianwerte der Gesamtkeimzahlen bei Steaks mit Paprikamarinade erhöhten sich im Probennahmezeitraum 2008 von 1,7 x 10^5 auf 4,0 x 10^6 KbE/g bzw. 2009 von 1,1 x 10^5 auf 2,6 x 10^6 KbE/g. Am Ende des MHD ergaben sich für Produkte mit Kräutermarinade Medianveränderungen von 3,7 x 10^5 auf 1,5 x 10^7 KbE/g im Jahr 2008 bzw. von 1,4 x 10^5 auf 4,8 x 10^6 KbE/g. Innerhalb der einzelnen Kategorien wurden in beiden Probennahmezeiträumen je Untersuchungszeitpunkt vergleichbare Keimzahlanstiege ermittelt (vgl. Abbildung 7).

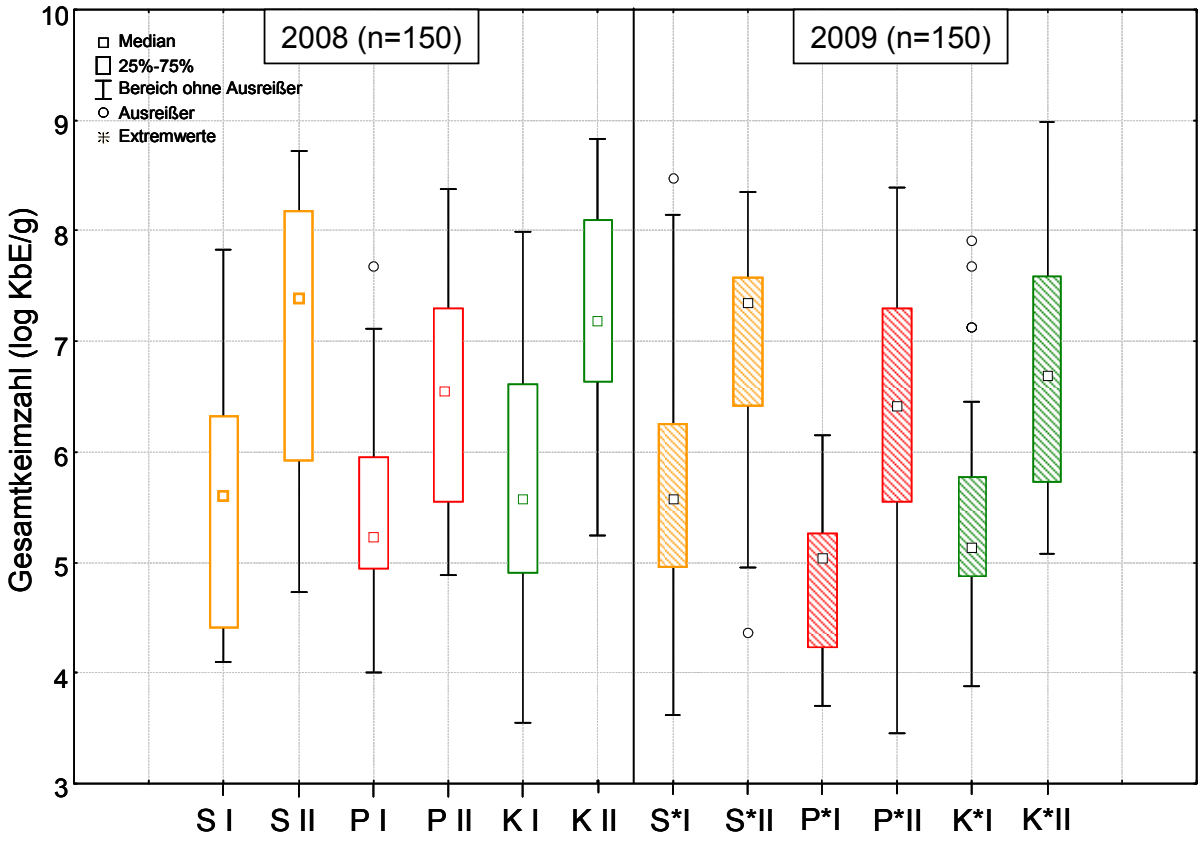

Abbildung 7: Box-Plot-Darstellung der Gesamtkeimzahl in marinierten Schweinesteaks (n=300) der drei Produktkategorien Senf (S), Paprika (P) und Kräuter (K).

(I)	Zeitpunkt des Einkaufs
(II)	Ende des MHD
Ohne *-Kennzeichnung:	Daten des Probennahmezeitraums 2008 (n=150)
S*, P*, K*:	Daten des Probennahmezeitraums 2009 (n=150)

4.1.1.2.2 *Enterobacteriaceae*

Die *Enterobacteriaceae*-Keimzahlen lagen in allen Produktkategorien zwischen <10 und 3,6 x 10^8 KbE/g. Über 50 % der Proben enthielten dabei weniger als 1000 KbE *Enterobacteriaceae*/g. Im Mittel wiesen Produkte mit Senfmarinade Belastungen von 5,6 x 10^5 KbE/g am Anfang bzw. 8,3 x 10^5 KbE/g am Ende des MHD auf. Bei acht Proben dieser Kategorie belief sich der Anteil der *Enterobacteriaceae* an der Gesamtkeimzahl auf mehr als 5 %. In Schweinesteaks mit Paprikamarinade waren Keimzahlen von 1,5 x 10^3 KbE/g zum Zeitpunkt des Erwerbs bzw. 3,2 x 10^5 KbE/g am Ende des MHD festzustellen. Bei einer Probe lag dabei der *Enterobacteriaceae*-Anteil an der Gesamtkeimzahl bei über 5 %. Eine mittlere Belastung mit *Enterobacteriaceae* von 3,0 x 10^5 KbE/g war am Anfang bzw. 1,5 x 10^7 KbE/g am Ende in Produkten mit Kräutermarinade nachweisbar. Bei 20 Proben lag der *Enterobacteriaceae*-Anteil bei mehr als 5 %. Die Schwankungsbreite zwischen minimal und maximal festgestellten Keimzahlen belief sich auf bis zu acht Zehnerpotenzen. Die Standardabweichung wies Werte bis zu 2,43 auf (vgl.Tabelle 35).

Tabelle 35: *Enterobactericeae*-Keimzahlen (log KbE/g) in marinierten Schweinesteaks (n=300) der Kategorien Senf, Paprika und Kräuter jeweils zum Zeitpunkt des Erwerbs und am Ende des MHD

Kategorie	n	Untersuchungs-zeitpunkt	log KbE/g			
			Minimum	Maximum	Mittelwert $\bar{x}$	Standard-abweichung ± s
Senf	50	Erwerb	<1	7,06	2,99	1,71
	50	Ende MHD	<1	7,41	2,79	1,87
Paprika	50	Erwerb	<1	4,30	2,24	1,02
	50	Ende MHD	<1	7,06	2,48	1,42
Kräuter	50	Erwerb	<1	6,91	2,94	1,46
	50	Ende MHD	<1	8,56	3,96	2,43

4.1.1.2.3 Milchsäurebakterien

Für die Milchsäurebakterien, die im Probennahmezeitraum 2009 zusätzlich erfasst wurden, ergaben sich in mariniertem Fleisch insgesamt Keimzahlen zwischen 10 und 9,5 x 10^8 KbE/g. In allen Produktkategorien waren dabei Anstiege der Milchsäurebakterienzahl bis zum Ende des MHD um zwei, teils bis zu drei Zehnerpotenzen zu verzeichnen. Der Medianwert erhöhte sich bei Steaks mit Kräutermarinade von 1,8 x 10^3 auf 1,4 x 10^6 KbE/g am stärksten. Aus Abbildung 8 wird die Verteilung der Keimzahlen und der Anstieg der Milchsäurebakterienzahl in allen drei Produktkategorien zum Ende des MHD im Probennahmezeitraum März-Juni 2009 deutlich.

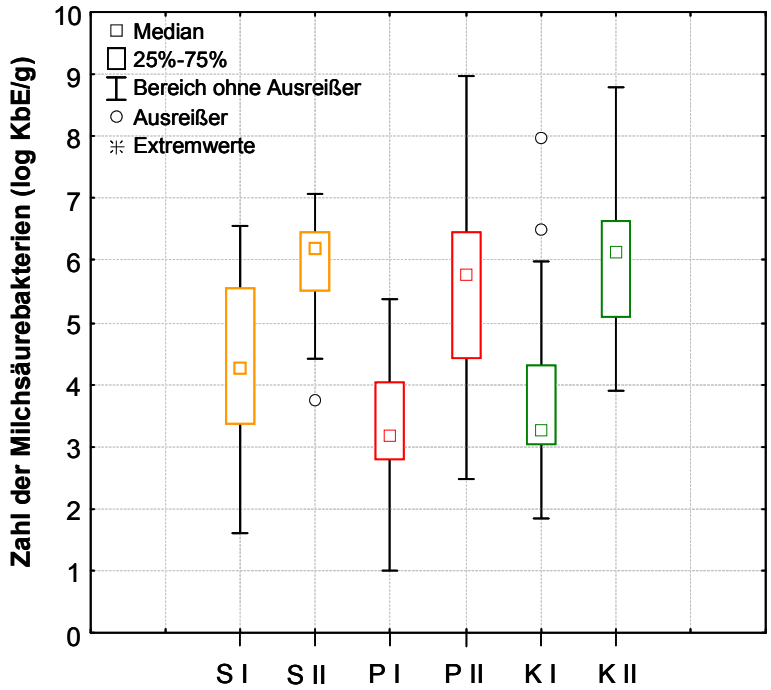

Abbildung 8: Box-Plot-Darstellung der Milchsäurebakterienanzahl in marinierten Schweinesteaks (n=150) der Kategorien Senf (S), Paprika (P), Kräuter (K) jeweils am Einkaufsdatum (I) und am Ende des MHD (II) aus dem Untersuchungszeitraum März bis Juni 2009

4.1.1.3 Spezielle mikrobiologische Untersuchungen

Insgesamt 300 Handelsproben, davon 100 je Produktkategorie, wurden auf das Vorkommen der Lebensmittelinfektionserreger *Salmonella* spp., STEC, *L. monocytogenes*, *St. aureus*, *B. cereus* und sulfitreduzierende Clostridien untersucht.

Wie aus Tabelle 36 hervorgeht, wurden in Produkten mit Senfmarinaden keine Salmonellen und *L. monocytogenes* nachgewiesen. STEC und *St. aureus* waren hier in je 2 % der Proben zu detektieren. Für *B. cereus* und sulfitreduzierende Clostridien ergaben sich 13 % bzw. 17 % positive Befunde. In 73 % der Proben waren keine der aufgeführten Pathogene nachweisbar.

Produkte mit Paprikamarinade lieferten 5 % positive Befunde für Salmonellen und 1 % für STEC. *L. monocytogenes* waren in dieser Produktkategorie nicht nachweisbar. 12 % der Proben enthielten *St. aureus*, 23 % *B. cereus* und 29 % sulfitreduzierende Clostridien. In 52 % der Proben waren keine der genannten Pathogene zu detektieren (vgl. Tabelle 36).

Der Anteil positiver Befunde für Salmonellen in Steaks mit Kräutermarinade belief sich auf 1 %. In 4 % der Proben waren STEC nachweisbar. *L. monocytogenes* wurde in 5 % der Proben detektiert. 11 % der Proben enthielten *St. aureus*, 28 % *B. cereus* und 27 % sulfitreduzierende Clostridien. In 46 % der Steaks mit Kräutermarinade verlief der Pathogennachweis negativ (vgl. Tabelle 36).

Tabelle 36: Übersicht zur Nachweishäufigkeit von pathogenen Mikroorganismen in marinierten Schweinenackensteaks

Kategorie	Gesamtzahl untersuchter Proben n	Anzahl positiver Proben n (%) für:						Anzahl negativer Proben n (%)
		Salmonella spp.	STEC	*L. monocytogenes*	*St. aureus*	*B. cereus*	Sulfitreduzierende Clostridien	
Senf	100	0 (0)	2 (2)	0 (0)	2 (2)	13 (13)	17 (17)	73 (73)
Paprika	100	5 (5)	1 (1)	0 (0)	12 (12)	23 (23)	29 (29)	52 (52)
Kräuter	100	1 (1)	4 (4)	5 (5)	11 (11)	28 (28)	27 (27)	46 (46)
Total	300	6 (2)	7 (2)	5 (2)	25 (8)	64 (21)	73 (24)	171 (57)

4.1.1.3.1 *Salmonella* spp.

Salmonella spp. wurden in sechs (2 %) von 300 mariniertem Schweinefleisch-Proben im Untersuchungszeitraum 2009 detektiert. Dabei wurden die positiven Befunde in fünf Proben (5 %) mit Paprikamarinade (n=100) erhoben. Eine Probe (1 %) mit Kräutermarinade (n=100) war zum Zeitpunkt des Erwerbs *Salmonella*-positiv. In mariniertem Schweinefleisch mit Senfmarinade waren qualitativ keine Salmonellen nachweisbar.

Aus diesen sechs *Salmonella*-positiven Proben wurden 13 Isolate gewonnen (vgl. Tabelle 37). Die Basistypisierung am Nationalen Referenzzentrum für Salmonellen des RKI ergab für alle gewonnenen Isolate den Serotyp Typhimurium. Bei den elf Isolaten aus Paprikamarinade, die aus fünf Proben desselben Herstellers stammten, handelte es sich um monophasische Varianten mit dem O-Antigen 4 und dem Lysotyp DT 193. Zwei Isolate aus Kräutermarinade, die aus einer Probe eines anderen Herstellers stammten, waren biphasisch und besaßen die O-Antigene 4, 5, 12. Die Lysotypie erbrachte den Typ DT 120 (vgl. Tabelle 37).

Tabelle 37: Herkunft, Art und Anzahl der *Salmonella*-Isolate (n=13) aus marinierten Schweinesteaks

Untersuchungszeitraum	Untersuchungszeitpunkt I	Untersuchungszeitpunkt II	Kategorie	Anzahl positiver Proben	Anzahl der Isolate	Ergebnis der Typisierung
2009	X		Paprika	2[a)]	3	*S*. Typhimurium, O:4, monophasisch, Lysotyp DT 193
		X	Paprika	3[a)]	8	*S*. Typhimurium, O:4, monophasisch, Lysotyp DT 193
	X		Kräuter	1[b)]	2	*S*. Typhimurium, O:4, 5,12, biphasisch (i:1,2), Lysotyp DT 120

I: Zeitpunkt des Erwerbs
II: Ende MHD

[a)] Proben des Herstellers C
[b)] Proben des Herstellers F

4.1.1.3.2 Shigatoxinbildende *E. coli* (STEC)

In sieben Proben (2 %) aller drei Produktkategorien (n=300) wurden STEC mittels PCR-Nachweis des *stx*1- bzw. *stx*2-Gens nach RÜSSMANN et al. (1995) sowie CEBULA et al. (1995) (Abbildung 9 und Abbildung 10) qualitativ detektiert.

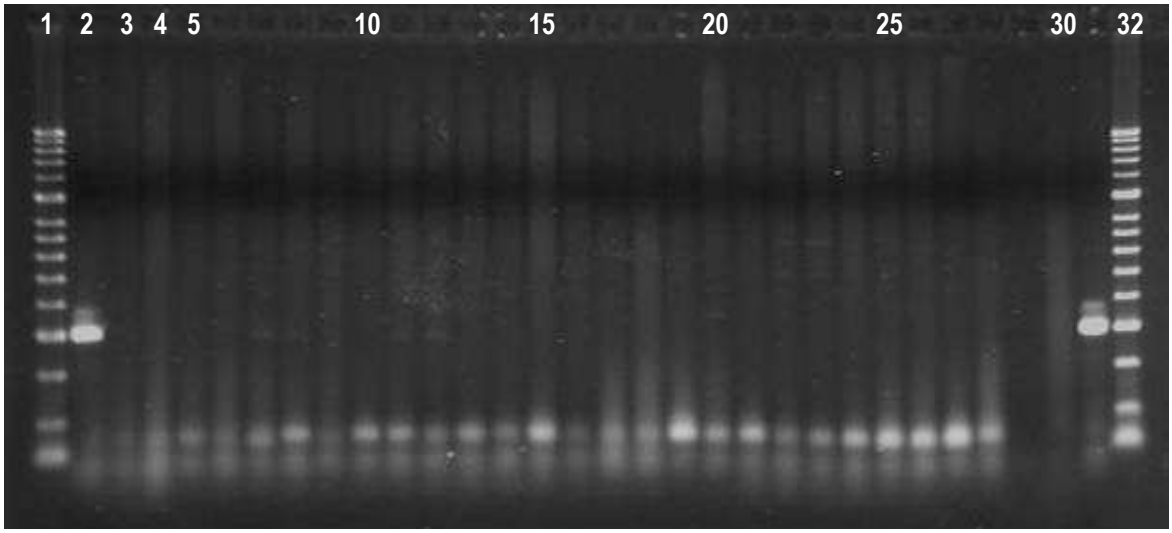

Abbildung 9: Elektrophoresegel der *stx1*-PCR (RÜSSMANN et al., 1995) für den STEC-Nachweis in marinierten Schweinesteaks der Proben S17-S18, P17-P21, K18-K23, Amplifikatnachweis (285 bp) nur in den Positivkontrollen

Bahnen	(1)	DNA-Molekulargewichtsmarker
	(2)	Positivkontrolle E 117
	(3)-(28)	Proben S17-S18, P17-P21, K18-K23 im Doppelansatz
	(29)	Leerwert
	(30)	Negativkontrolle E 163
	(31)	Positivkontrolle E 117
	(32)	DNA-Molekulargewichtsmarker

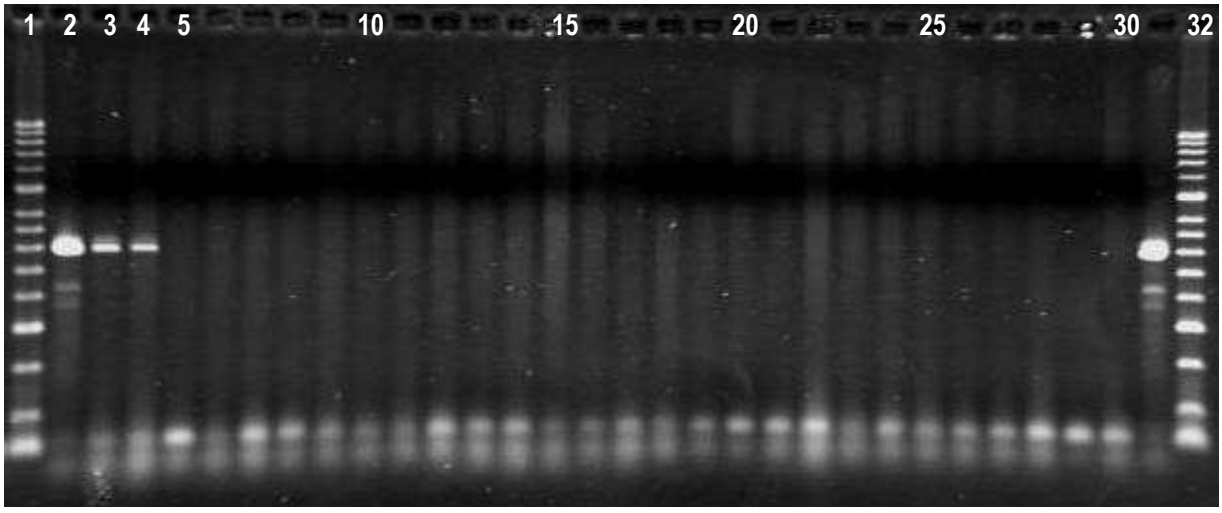

Abbildung 10: Elektrophoresegel der *stx2*-PCR (CEBULA et al., 1995) zum STEC-Nachweis in marinierten Schweinesteaks der Proben S17-S18, P17-P21, K18-K23; Amplifikatnachweis (584 bp) in Probe S17 (Bahn 3 und 4)

Bahnen	(1)	DNA-Molekulargewichtsmarker
	(2)	Positivkontrolle E 117
	(3)-(28)	Proben S17-S18, P17-P21, K18-K23 im Doppelansatz
	(29)	Leerwert
	(30)	Negativkontrolle E 163
	(31)	Positivkontrolle E 117
	(32)	DNA-Molekulargewichtsmarker

Bei positivem Ergebnis in dieser Screening-PCR wurden Einzelkolonien subkultiviert, mittels PCR nochmals auf das *stx*-Gen überprüft und positive Reinkulturen weiter differenziert. Auf diese Weise wurden aus einer Probe mit Kräutermarinade vier STEC- Stämme isoliert, die *hlyA*- und *eae*-Gen-negativ waren. Sie wiesen das *stx2e*-Gen auf und waren alle dem Serotyp ONT:H19 zuzuordnen.

Bei zwei Proben (2 %) mit Senfmarinade (n=100), einer Probe (1 %) mit Paprikamarinade (n=100) und drei Proben (3 %) mit Kräutermarinade (n=100) wurden keine subkultivierbaren STEC-Isolate gewonnen.

Tabelle 38 gibt eine Übersicht über die Ergebnisse der Feindifferenzierung von STEC-Isolaten aus mariniertem Schweinefleisch.

Tabelle 38: Herkunft, Art und Anzahl der STEC-Isolate aus marinierten Schweinesteaks

Untersuchungszeitraum	Untersuchungszeitpunkt I	Untersuchungszeitpunkt II	Kategorie	Anzahl positiver Proben	Anzahl der Isolate	Ergebnis der Typisierung
2008		X	Senf	1[a)]	-*	Stx2-Screening-positiv (PCR)
		X	Kräuter	2[b)]	-*	Stx2-Screening-positiv (PCR)
2009	X		Senf	1[c)]	-*	Stx2-Screening-positiv (PCR)
		X	Paprika	1[d)]	-*	Stx2-Screening-positiv (PCR)
	X		Kräuter	1[c)]	-*	Stx1/Stx2-Screening-positiv (PCR)
	X		Kräuter	1[b)]	4	Serotyp ONT:H19, *stx2e*-Gen

I: Zeitpunkt des Erwerbs
II: Ende MHD

*: keine subkultivierbaren Isolate gewonnen
[a)] Proben des Herstellers M
[b)] Proben des Herstellers A
[c)] Proben des Herstellers E
[d)] Proben des Herstellers J

4.1.1.3.3 *Listeria* spp. und *Listeria monocytogenes*

Listeria spp. waren insgesamt in zwei Dritteln der marinierten Schweinefleischprodukte nachweisbar. Dabei wurden *Listeria*-Belastungen von <10 bis 4,4 x 10^3 KbE/g detektiert. Die Keimdichte lag in 28 Proben (9 %) bei über 1000 KbE/g. Im Mittel wiesen Produkte mit Senfmarinade Belastungen von 168 KbE/g am Anfang bzw. 159 KbE/g am Ende des MHD auf. In Schweinesteaks mit Paprikamarinade waren *Listeria*-Keimzahlen von 471 KbE/g zum Zeitpunkt des Erwerbs bzw. 405 KbE/g am Ende des MHD feststellbar. Eine mittlere Belastung mit *Listeria* spp. von 302 KbE/g war am Anfang bzw. 171 KbE/g am Ende des MHD in Produkten mit Kräutermarinade nachweisbar. Die Standardabweichung der ermittelten *Listeria*-Zahlen ergab Werte bis zu 1,21 (vgl. Tabelle 39).

Tabelle 39: Zahl an *Listeria* spp. (log KbE/g) in marinierten Schweinesteaks (n=300) der Kategorien Senf, Paprika und Kräuter jeweils zum Zeitpunkt des Erwerbs und am Ende des MHD

Kategorie	n	Untersuchungs-zeitpunkt	log KbE/g			
			Minimum	Maximum	Mittelwert $\bar{x}$	Standard-abweichung ± s
Senf	50	Erwerb	<1	2,99	1,34	1,15
	50	Ende MHD	<1	3,60	1,13	1,04
Paprika	50	Erwerb	<1	3,51	1,81	1,18
	50	Ende MHD	<1	3,30	1,65	1,21
Kräuter	50	Erwerb	<1	3,64	1,38	1,13
	50	Ende MHD	<1	3,31	1,20	1,09

In fünf Proben (5 %) mit Kräutermarinade (n=100) wurden *L. monocytogenes* detektiert. Dies entsprach einer gesamten Nachweisrate in mariniertem Schweinefleisch (n=300) von 1,7 %. Die höchste ermittelte Belastung mit diesem Keim lag bei 95 KbE/g.
Aus diesen positiven Proben, die von drei unterschiedlichen Herstellern stammten, wurden insgesamt 39 präsumtive *L. monocytogenes* –Isolate gewonnen. Mittels Zuckerverwertungstest (Rhamnose und Xylose) und Prüfung der Fähigkeit zur Hämolyse wurden 35 Isolate (90 %) als *L. monocytogenes* bestätigt.
Durch Multiplex-PCR-Analyse nach DOUMITH et al. (2004) (vgl. Abbildung 11) wurden 34 Isolate dem Serotyp 1/2a und ein Isolat dem Serotyp 1/2c zugeordnet (vgl. Tabelle 40).

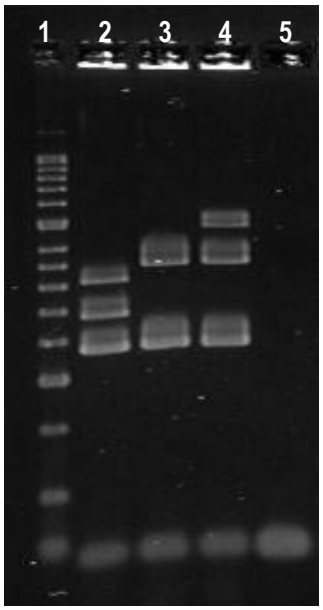

Abbildung 11: Elektrophoresegel der Multiplex-PCR zur Differenzierung der klinisch relevanten Serovare von *L. monocytogenes*-Isolaten aus mariniertem Schweinefleisch

Bahnen (1) DNA-Molekulargewichtsmarker
(2) *L. monocytogenes* 4b (370, 471, 597 bp)
(3) *L. monocytogenes* 1/2a (370, 691 bp)
(4) *L. monocytogenes* 1/2c (370, 691, 906 bp)
(5) Leerwert

Tabelle 40: Herkunft, Art und Anzahl der *L. monocytogenes*-Isolate (n=35) aus marinierten Schweinesteaks

Untersuchungszeitraum	Untersuchungszeitpunkt I	Untersuchungszeitpunkt II	Kategorie	Anzahl positiver Proben	Anzahl der Isolate	Ergebnis der Typisierung
2008		X	Kräuter	1[a)]	23	*L. monocytogenes* 1/2a
		X	Kräuter	1[b)]	1	*L. monocytogenes* 1/2c
2009	X		Kräuter	1[b)]	2	*L. monocytogenes* 1/2a
		X	Kräuter	2[c)]	9	*L. monocytogenes* 1/2a

I: Zeitpunkt des Erwerbs
II: Ende MHD

[a)] Proben des Herstellers I
[b)] Proben des Herstellers A
[c)] Proben des Herstellers F

4.1.1.3.4 *Staphylococcus aureus*

In 28 (9,3 %) von 300 untersuchten Proben wurden präsumtive, Lecithinase-positive *St. aureus* nachgewiesen. Insgesamt wurden daraus 239 Isolate gewonnen, von denen 212 (88,7 %) durch positive Latexagglutination (Clumping-Faktor und Protein A) der Spezies *St. aureus* zugeordnet wurden.

Nach dieser Bestätigungsreaktion lag der Anteil *St. aureus*-positiver Proben in allen Produktkategorien bei 25 (8 %). Mit zwei positiven Proben (2 %) wurde die geringste Nachweisrate für Produkte mit Senfmarinade (n=100) ermittelt. Der Anteil positiver *St. aureus*-Nachweise betrug für mariniertes Schweinefleisch in Paprikamarinade (n=100) 12 %. Bei Produkten mit Kräutermarinade (n=100) wurde dieser Keim in 11 % der Proben nachgewiesen. Es wurden dabei Keimdichten von <10 bis 340 KbE/g detektiert. 28 % der Proben mit positivem *St. aureus*-Nachweis wiesen dabei Keimzahlen über 100 KbE/g auf.

Diese *St. aureus*-Isolate wurden mittels ELISA auf das Bildungsvermögen der Staphylokokken-Enterotoxine (SE) A bis E untersucht. Wie aus Tabelle 41 ersichtlich, zeigten 138 (65 %) der *St. aureus*-Isolate SE-Bildung.

Tabelle 41: Übersicht zum Enterotoxinbildungsvermögen der analysierten *St. aureus*-Isolate (n=212) aus marinierten Schweinenackensteaks

Kategorie	Zahl untersuchter Isolate	SET positive Resultate (%)
Senf	11	9 (82)
Paprika	53	93 (63)
Kräuter	148	36 (68)
Total	212	138 (65)

Alle *St. aureus*-Isolate, die im ersten ELISA SE-positive Ergebnisse mit einer Extinktion größer 0,5 aufwiesen, wurden mittels eines weiteren ELISA auf das Verteilungsmuster der einzelnen Staphylokokken-Enterotoxine SEA, B, C, D und E untersucht. Wie aus Abbildung 12 hervorgeht, war SED mit 59,0 % der häufigste Toxintyp in den analysierten *St. aureus*-Isolaten (n=44) aus mariniertem Schweinefleisch. SEA wurde in 45,5 % und SEC in 50,0 % der Isolate detektiert. In 18,2 % der Fälle lag SED in Kombination mit SEA und SEC vor, 15,9 % der Isolate wiesen die Kombination SEB, C, D auf. Das Staphylokokken-Enterotoxin E wurde von 6,8 % Isolaten gebildet und trat stets in Kombination mit anderen der genannten Toxintypen auf. Bei 13,6 % der im ersten ELISA positiv getesteten Isolate wurde keine messbare Toxinbildung in dem Toxin-differenzierenden zweiten ELISA-System beobachtet (vgl. Abbildung 12).

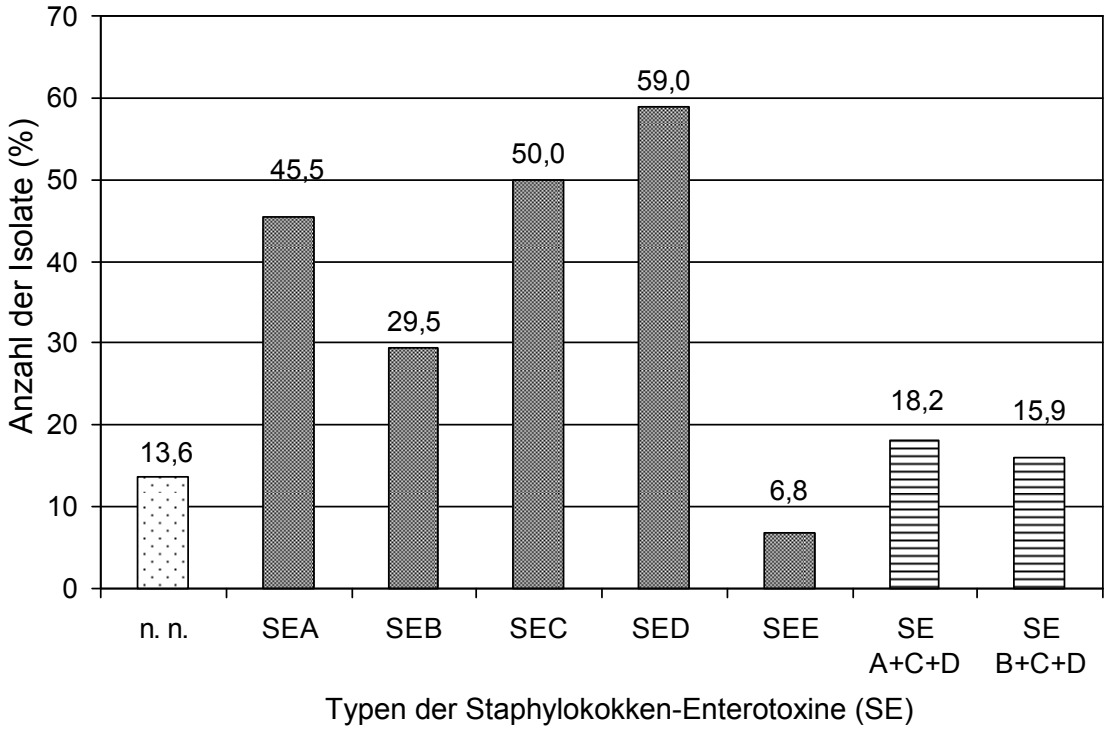

Abbildung 12: Vorkommen und Verteilung der SE-Typen A, B, C, D und E in den analysierten *St. aureus*-Isolaten (n=44); n. n.: nicht nachweisbar

Weiterhin wurden die *St. aureus*-Isolate mittels Cefoxitin-Agardiffusionstest auf das Vorliegen von MRSA-verdächtigen Stämmen getestet. Von 212 Isolaten zeigte ein Isolat (0,5 %) einen Hemmhofdurchmesser von 12 mm. Eine Enterotoxinbildung wurde bei diesem Isolat nicht festgestellt. Um weitere Antibiotikaresistenzen abzuklären, wurde dieses Isolat mittels ATB™ Staph 1-Teststreifen weitergehend analysiert. Dabei wurden multiple Resistenzen gegen Penicillin, Oxacillin, Gentamicin, Erythromycin, Clindamycin, Cotrimoxazol, Tetracyclin und Minocyclin festgestellt. In Abbildung 13 ist das Testergebnis im direkten Vergleich mit einem MRSA-Referenzstamm (oberer Teststreifen) dargestellt.

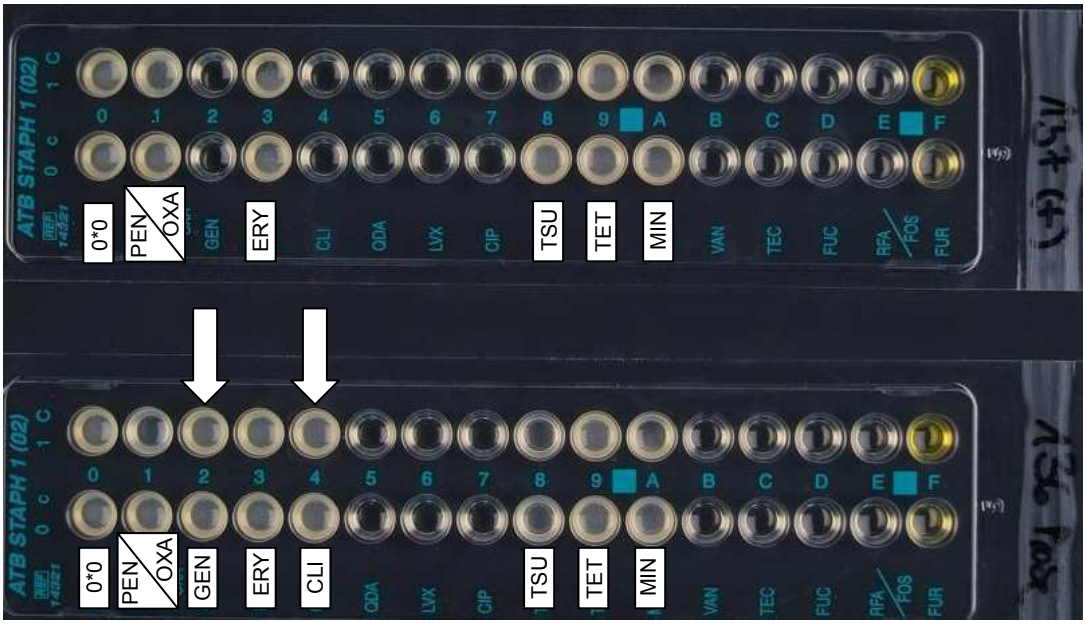

Abbildung 13: Antibiotikaresistenzbestimmung mittels ATB™ Staph 1-Streifen des MRSA-Referenzstammes St 137 (Stammsammlung MRI Kulmbach) (oben) und des Isolats aus mariniertem Schweinefleisch (unten).
Neben Resistenzen (Trübung der Kavität) beider Stämme gegen Penicillin (PEN), Oxacillin (OXA), Erythromycin (ERY), Cotrimoxazol (TSU), Tetracyclin (TET) und Minocyclin (MIN) weist das Isolat auch Resistenzen gegen Gentamicin (GEN) und Clindamycin (CLI) (siehe Pfeile) auf. 0*0 entspricht Kontrollkavitäten ohne Antibiotikum.

4.1.1.3.5 *Bacillus cereus*

Insgesamt wurden in 72 (24 %) von 300 untersuchten Proben präsumtive *B. cereus* nachgewiesen. Daraus wurden 183 präsumtive Isolate gewonnen, von denen mittels *gyr*B-PCR nach YAMADA et al. (1999) (vgl. Abbildung 14) 127 Isolate (69,4 %) als *B. cereus* bestätigt wurden.

Die Zahl *B. cereus*-positiver Proben lag somit in allen Kategorien von mariniertem Schweinefleisch bei 64 (21,3 %). Davon enthielten 13 % der Produkte mit Senfmarinade (n=100), 23 % der Proben mit Paprikamarinade (n=100) und 28 % der Steaks mit Kräutermarinade *B. cereus*. Es wurden dabei Keimdichten von <10 bis 450 KbE/g ermittelt, wobei 15 % der Proben Keimzahlen über 100 KbE *B. cereus*/g aufwiesen.

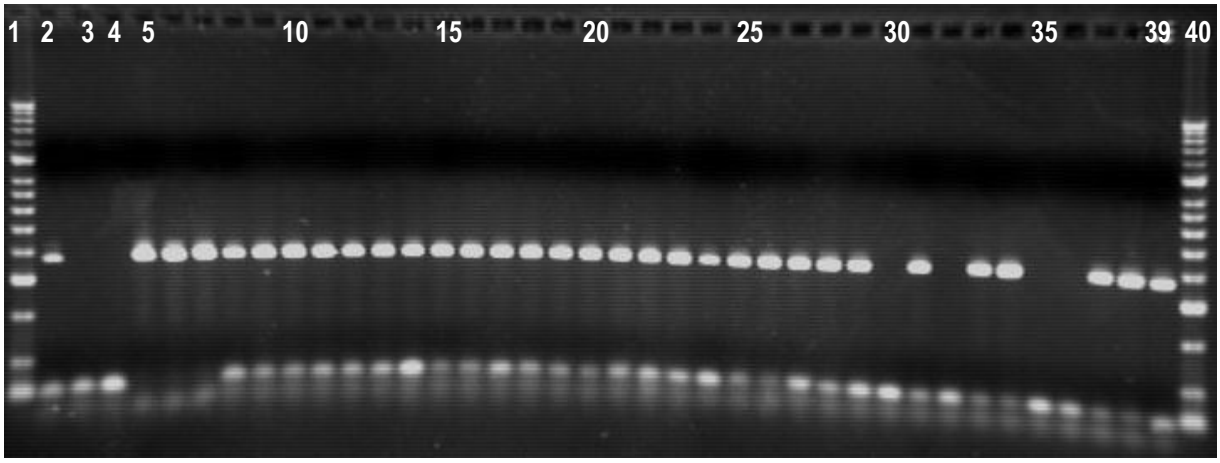

Abbildung 14: Elektrophoresegel der *gyr*B-PCR nach YAMADA et al. (1999) zur Bestätigung von *B. cereus*-Isolaten aus marinierten Schweinenackensteaks; Amplifikatnachweis (365 bp) in Bahnen 2, 5-29, 31, 33, 34, 37-39

Bahnen	(1)	DNA-Molekulargewichtsmarker
	(2)	Positivkontrolle B 190
	(3)	Negativkontrolle B 170
	(4)	Leerwert
	(5)-(38)	Isolate 1-34
	(39)	Positivkontrolle B 190
	(40)	DNA-Molekulargewichtsmarker

Das *nheA*-Gen wurde in 121 Isolaten (95,3 %) nachgewiesen. Die Gene *nheB* und *nhe*C wurden in 123 Isolaten (96,8 %) detektiert. Dabei wiesen alle analysierten Isolate mit *nheA* gleichzeitig auch die Gene *nheB* und *nheC* auf. Das *hblA*-Gen lag in 101 *B. cereus*-Isolaten (79,5 %) vor. Die Gene *hblC* und *hblD* waren in 100 (78,7 %) bzw. 102 (80,3 %) Isolaten nachweisbar. Bei 96 Isolaten (75,6 %), die die gesamten Anteile des *hbl*-Operons aufwiesen, wurden auch alle Anteile des *nhe*-Operons detektiert (vgl. Abbildung 15).

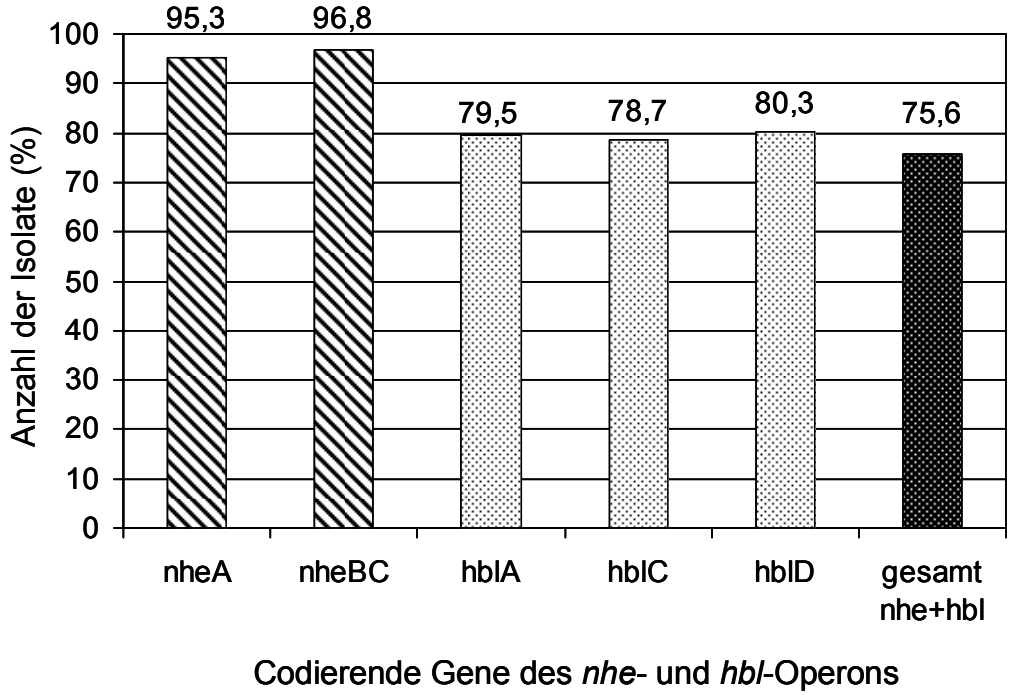

Abbildung 15: Vorkommen codierender Gene des *nhe*- und *hbl*-Operons in den analysierten *B. cereus*-Isolaten (n=127) aus marinierten Schweinenackensteaks

In Tabelle 42 sind die Ergebnisse der molekularbiologischen Analysen bezogen auf die Toxinogenität der untersuchten *B. cereus*-Isolate zusammenfassend dargestellt. In 2 % der Isolate wurden weder Anteile des *nhe*- noch des *hbl*-Operons detektiert. 80 % der Proben wiesen Anteile des *nhe*- und *hbl*-Operons auf. Ausschließlich codierende Gene des *nhe*-Operons zeigten 15 % der analysierten Isolate. In 1 % der *B. cereus*-Isolate wurden ausschließlich Genanteile des *hbl*-Operons nachgewiesen.
In drei Isolaten (2 %) wurden keine Hinweise auf das Vorliegen einer diarrhöischen Toxinogenität gefunden (vgl. Tabelle 42).

Tabelle 42: Übersicht zur Toxinogenität der analysierten *B. cereus*-Isolate (n=127) aus marinierten Schweinenackensteaks

Kategorie	Zahl untersuchter Isolate n (%)	Anzahl positiver Resultate (%) für			Ohne nachweisbare Toxinogenität
		Ausschließlich *nhe*-Operon	Auschließlich *hbl*-Operon	*nhe*- und *hbl*-Operon	
Senf	19 (15)	6 (32)	0 (0)	12 (63)	1 (5)
Paprika	56 (44)	9 (16)	0 (0)	46 (82)	1 (2)
Kräuter	52 (41)	6 (32)	1 (2)	44 (85)	1 (2)
Total	127 (100)	21 (17)	1 (1)	102 (80)	3 (2)

Zur Untersuchung der emetischen Toxinogenität wurden alle *B. cereus*-Isolate einem Stärkehydrolysetest unterzogen. 26 Isolate (20,4 %) zeigten dabei keinen Stärkeabbau und wurden in einem auf der Detektion von nichtribosomaler Peptidsynthetase (NRPS) basierenden PCR-Nachweis eingesetzt. In keinem der Isolate wurde eine spezifische positive Reaktion festgestellt.

4.1.1.3.6 Sulfitreduzierende Clostridien

Sulfitreduzierende Clostridien wurden in insgesamt 73 Proben (24,3 %) der marinierten Schweinesteaks (n=300) nachgewiesen. Davon waren 17 Produkte (17 %) mit Senfmarinade (n=100), 29 Proben (29 %) gehörten zu der Produktkategorie Paprika- und 27 Proben (27 %) zu der Kategorie mit Kräutermarinade (je n=100). Die ermittelten Keimdichten lagen zwischen <10 und 500 KbE/g. Dabei wiesen 18 (24 %) der positiven Proben (n=73) Belastungen mit sulfitreduzierenden Clostridien von über 100 KbE/g auf. In 227 Proben (76 %) waren diese Mikroorganismen nicht zu detektieren. Tabelle 43 veranschaulicht die prozentuale Verteilung der Belastung von mariniertem Schweinefleisch mit sulfitreduzierenden Clostridien.

Tabelle 43: Belastung von marinierten Schweinenackensteaks der drei Kategorien (n=300) mit sulfitreduzierenden Clostridien

Kategorie	Anzahl untersucht n	Anzahl von Proben n (%) mit		
		< 10 KbE/g	10 KbE/g	10^2 KbE/g
Senf	100	83 (83)	11 (11)	6 (6)
Paprika	100	71 (71)	21 (21)	8 (8)
Kräuter	100	73 (73)	23 (23)	4 (4)
Total	300	227 (76)	55 (18)	18 (6)

4.1.2 Marinaden

4.1.2.1 pH-Wert und a_W-Wert

Die potentiometrische pH-Wert-Messung war aufgrund des Fett-/Ölanteils der Marinaden in 8 Proben (27 %) mit Paprika- bzw. Kräutermarinade nicht durchführbar. In diesen Fällen wurde auf die potentiometrische Messung des pH- Wertes im Probenhomogenat (1:10 Verdünnung mit NaCl-Lösung) zurückgegriffen. In Senfmarinaden (n=10) lag der pH-Wert zwischen 3,68 und 4,52 mit einem Median von 4,10. Paprikamarinaden (n=10) wiesen pH-Werte zwischen 3,57 und 5,42 mit einem Median von 4,45 auf. In Kräutermarinaden (n=10) wurden pH-Werte von 3,96 bis 6,53 mit einem Median von 4,55 wurden ermittelt (vgl. Abbildung 16).

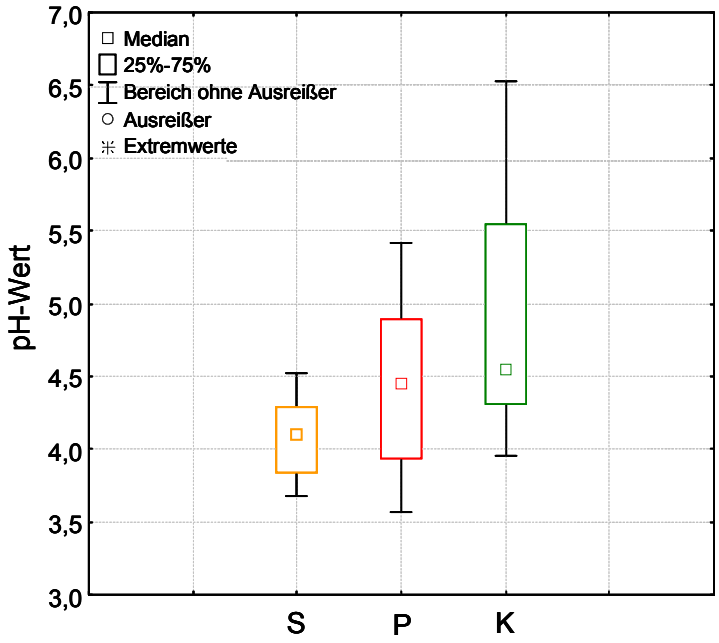

Abbildung 16: Box-Plot-Darstellung der pH-Werte in den Marinaden (n=30) der Kategorien Senf (S), Paprika (P) und Kräuter (K)

Die Messung des a_W-Werts war mit Schwierigkeiten verbunden. So dauerte die Mess-Gleichgewichtseinstellung am a_W-sprint-Gerät teilweise bis zu vier Tagen.

Die ermittelten a_W-Werte lagen in Senfmarinaden (n=10) im Bereich von 0,72 bis 0,94 mit einem Median von 0,91. In Marinaden der Kategorie Paprika (n=10) wurden Wasseraktivitäten von 0,35 bis 0,89 mit einem Median von 0,51 gemessen. Kräutermarinaden (n=10) wiesen a_W-Werte von 0,20 bis 0,89 mit einem Median von 0,57 auf (vgl. Abbildung 17).

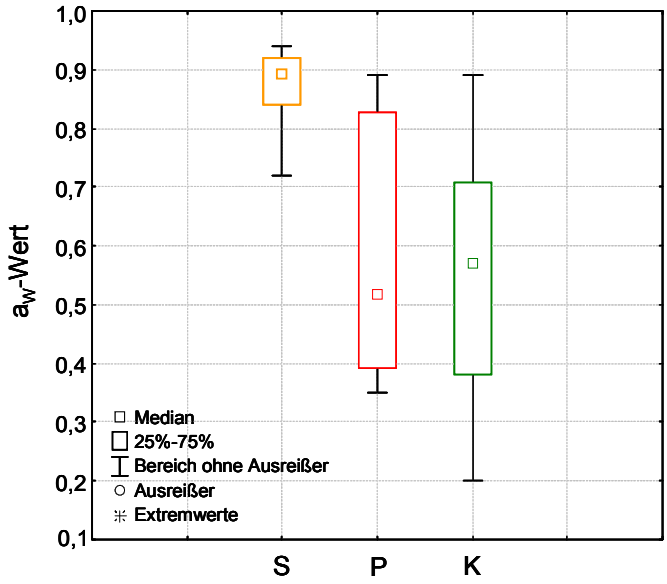

Abbildung 17: Box-Plot-Darstellung der a_W-Werte in den Marinaden (n=30) der Kategorien Senf (S), Paprika (P) und Kräuter (K)

4.1.2.2 Allgemeine mikrobiologische Untersuchungen

4.1.2.2.1 Aerobe, mesophile Gesamtkeimzahl

Die ermittelten Gesamtkeimzahlen lagen in einem Bereich von 1,3 x 10^2 bis 4,2 x 10^5 KbE/g. Dabei belief sich in Senfmarinaden (n=10) die mittlere aerobe Keimbelastung auf 3,7 x 10^4 KbE/g. In Paprikamarinaden (n=10) wurden Gesamtkeimzahlen zwischen 2,5 x 10^3 und 4,2 x 10^5 KbE/g mit einem Median von 3,1 x 10^4 KbE/g und in Kräutermarinaden im Mittel eine Keimbelastung von 2,4 x 10^4 KbE/g festgestellt (vgl. Abbildung 18).

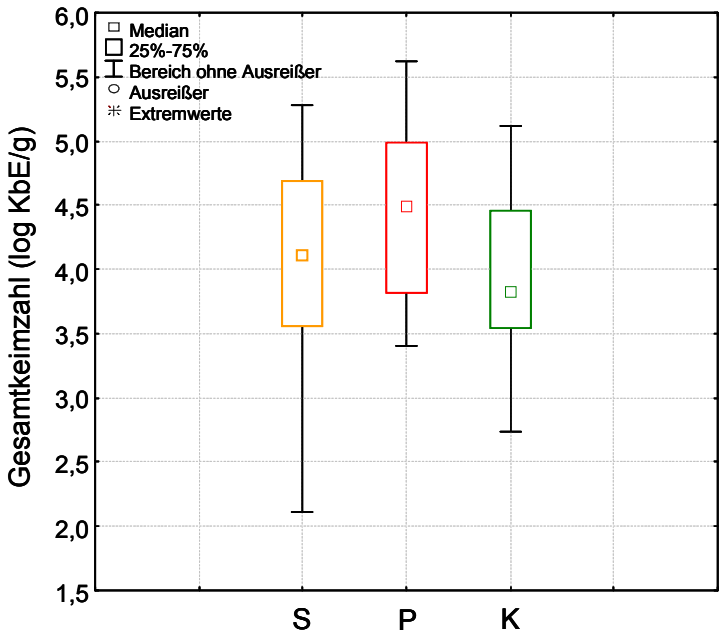

Abbildung 18: Box-Plot-Darstellung der aeroben Keimbelastung in den Marinaden (n=30) der Kategorien Senf (S), Paprika (P) und Kräuter (K)

4.1.2.2.2 *Enterobacteriaceae* und Milchsäurebakterien

Enterobacteriaceae wurden in zwei (6,7 %) der insgesamt 30 Marinaden nachgewiesen. Die ermittelte Keimzahl lag dabei bei 40 KbE/g (Paprikamarinade) bzw. 180 KbE/g (Kräutermarinade).

Milchsäurebakterien wurden ausschließlich in Paprika- und Kräutermarinaden detektiert. Aus Paprikamarinaden (n=10) waren aus zwei Proben Milchsäurebakterien anzüchtbar. Die ermittelte Keimdichte lag dabei bei 90 bzw. 140 KbE/g. Bei Kräutermarinaden waren in 50 % der Proben Milchsäurebakterien nachweisbar. Es wurden dabei Milchsäurebakterienzahlen von 20 bis 750 KbE/g ermittelt.

4.1.2.3 Spezielle mikrobiologische Untersuchungen

4.1.2.3.1 *Salmonella* spp., STEC und *St. aureus*

Salmonella spp., STEC waren in 25 g und *St. aureus* in 20 g Marinade nicht nachweisbar.

4.1.2.3.2 *Listeria* spp. und *L. monocytogenes*

Listeria spp. wurden in zwei (20 %) Senfmarinaden (n=10) und jeweils drei (30 %) Paprika- bzw. Kräutermarinaden (je n=10) nachgewiesen. Die Belastung mit *Listeria* spp. lag dabei zwischen 20 und 300 KbE/g. *L. monocytogenes* wurde in keiner Marinadenprobe detektiert.

4.1.2.3.3 *Bacillus cereus*

Aus zehn Marinadenproben wurden 77 präsumtive Stämme isoliert. Davon wurden mittels PCR (vgl. Abschnitt 4.1.1.3.5) 31 Isolate (40,3 %) als *B. cereus* bestätigt.
B. cereus waren in vier (40 %) Senfmarinaden und jeweils in sechs (60 %) Paprika- bzw. Kräutermarinaden nachweisbar. Die ermittelten Belastungen mit diesem Keim lagen dabei zwischen 20 und 230 KbE/g. 31 % der positiven Proben enthielten dabei über 100 KbE *B. cereus*/g.
Vorkommen und Verbreitung codierender Gene des *nhe*- und des *hbl*-Operons in den *B. cereus*-Isolaten wurden molekularbiologisch untersucht. Alle Isolate aus Marinaden wiesen die gesamten drei Genanteile des *nhe*-Operons auf. Das *hblA*-Gen lag in 22 *B. cereus*-Isolaten (71,0 %) vor. Die Gene *hblC* und *hblD* waren in 24 (77,4 %) bzw. 25 (80,6 %) Isolaten nachweisbar. Bei 21 Isolaten (67,7 %), die die gesamten codierenden Gene des *hbl*-Operons aufwiesen, wurden zusätzlich alle Anteile des *nhe*-Operons detektiert (vgl. Abbildung 19).

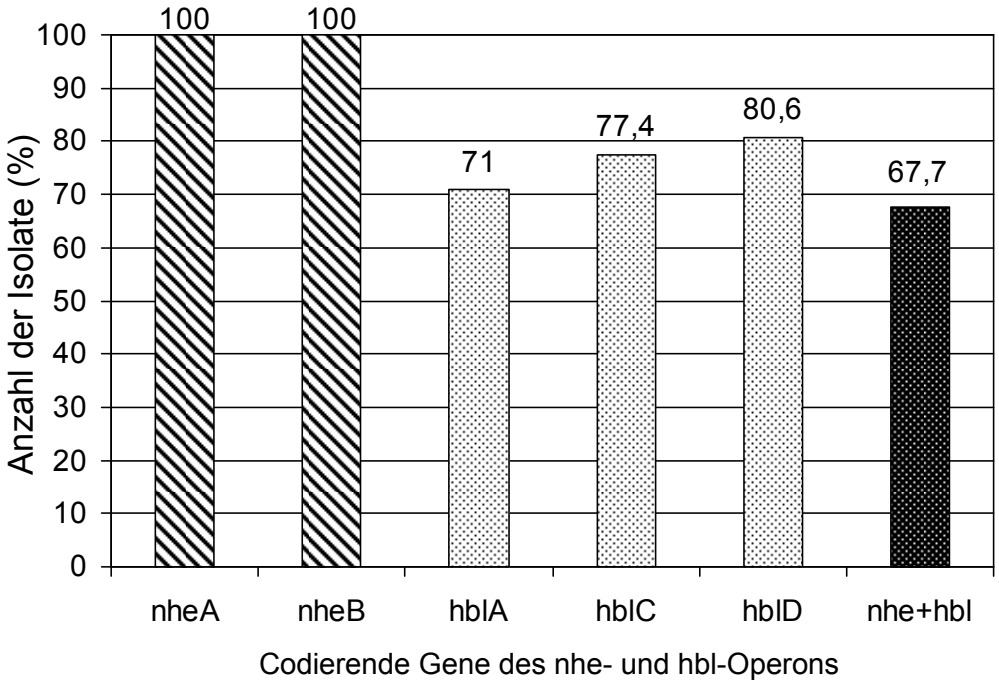

Abbildung 19: Vorkommen codierender Gene des *nhe*- und *hbl*-Operons in den analysierten *B. cereus*-solaten (n= 31) aus Marinaden

Der Anteil von ausschließlichen *nhe*-Bildnern an der Gesamtzahl der Isolate betrug 19 %. In 81 % der Isolate waren codierende Gene des *nhe*- und *hbl*-Operons vertreten (vgl. Tabelle 44). Keines der Isolate zeigte eine spezifische positive Reaktion bei der Untersuchung auf das emetische Toxinbildungsvermögen.

Tabelle 44: Übersicht zur Toxinogenität der analysierten *B. cereus*-Isolate (n=31) aus Marinaden

Kategorie	Zahl untersuchter Isolate n (%)	Anzahl positiver Resultate (%) für			Ohne nachweisbare Toxinogenität
		Ausschließlich *nhe*-Operon	Auschließlich *hbl*-Operon	*nhe*- und *hbl*-Operon	
Senf	5 (16)	1 (20)	0 (0)	4 (80)	0 (0)
Paprika	13 (42)	2 (15)	0 (0)	11 (85)	0 (0)
Kräuter	13 (42)	3 (23)	0 (0)	10 (77)	0 (0)
Total	31 (100)	6 (19)	0 (0)	25 (81)	0 (0)

4.1.2.3.4 Sulfitreduzierende Clostridien

Der Anteil an positiven Proben lag bei Senf- und Paprikamarinaden bei jeweils vier (40 %), bei Kräutermarinaden bei sechs (60 %) (vgl. Tabelle 45). Es wurden dabei Keimzahlen von 20 bis 120 KbE/g ermittelt. 10 % der positiven Proben wiesen Belastungen mit sulfitreduzierenden Clostridien von über 100 KbE/g auf. In 16 Proben (52 %) waren diese Mikroorganismen nicht zu detektieren.

Tabelle 45: Belastung von Marinaden der drei Kategorien (n=300) mit sulfitreduzierenden Clostridien

Kategorie	Anzahl untersucht n	Anzahl von Proben n (%) mit		
		< 10 KbE/g	10 KbE/g	10^2 KbE/g
Senf	10	6 (60)	2 (20)	2 (20)
Paprika	10	6 (60)	4 (40)	0 (0)
Kräuter	10	4 (40)	5 (50)	1 (10)
Total	30	16 (52)	11 (37)	3 (10)

4.2 Tenazität von *Salmonella* spp und *L. monocytogenes* in Marinaden

Die Marinaden der drei Kategorien wurden artifiziell mit Salmonellen bzw. *L. monocytogenes* belastet und über einen Zeitraum von 42 Tagen bei unterschiedlichen Lagerungstemperaturen (4 °C und 22 °C) untersucht.

4.2.1 Überlebensfähigkeit von *Salmonella* spp.

Für die Inokulation wurde ein Pool von drei *Salmonella*-Stämmen mit einer Dosis von ca. 10^4 KbE/g verwendet (vgl. Abschnitt 3.2.2.2). Der Beimpfungserfolg wurde direkt nach der Inokulation mittels Spatelverfahren überprüft. Die Wiederfindung der inokulierten Keime in der Paprikamarinade lag in allen drei Versuchsdurchgängen mit 4,3 x 10^3 KbE/g etwa eine halbe Zehnerpotenz unter der Keimzahl in Senfmarinade (1,3 x 10^4 KbE/g) und fast eine halbe Zehnerpotenz über der Keimzahl in Kräutermarinade (2,1 x 10^3 KbE/g) (vgl. Abbildung 20).

Analog zu den Keimzahlbestimmungen der Salmonellen wurden in den Negativkontrollen der mikrobiologische Status sowie pH- und a_W- Werte während der Lagerung ermittelt.

Wie aus Abbildung 20 hervorgeht, nahm die Zahl der *Salmonella* spp. in allen Marinaden über den Zeitraum von 42 Tagen bei beiden Lagerungstemperaturen ab. Die Keimreduktion betrug in den ersten sieben Tagen dabei im Mittel zwei Zehnerpotenzen. In der Senfmarinade waren bei einer Lagerung bei 22 °C am Tag 2 und bei 4 °C am Tag 28 Salmonellen qualitativ nicht mehr nachweisbar. Der Salmonellengehalt lag in Paprikamarinaden bei 22 °C ab Tag 28 unter der quantitativen Nachweisgrenze von 1 KbE/g. In Paprikamarinade bei 4 °C wurden Salmonellen qualitativ bis Tag 42 wiedergefunden. Der Salmonellennachweis verlief in Kräutermarinade bei 22 °C Lagerung bis Tag 14 quantitativ, ab diesem Zeitpunkt bis Tag 42 nur qualitativ positiv. In Kräutermarinade bei 4 °C Lagertemperatur waren *Salmonella* spp. bis Tag 42 direkt nachweisbar. Die höchste ermittelte Keimzahl am Tag 42 lag dabei bei 40 KbE/g.
Bei allen drei Marinadenkategorien verlief die Absterbekurve bei Lagerung von 22 °C jeweils mindestens eine Zehnerpotenz unterhalb der zugehörigen Kurve bei Lagerung von 4 °C (vgl. Abbildung 20).

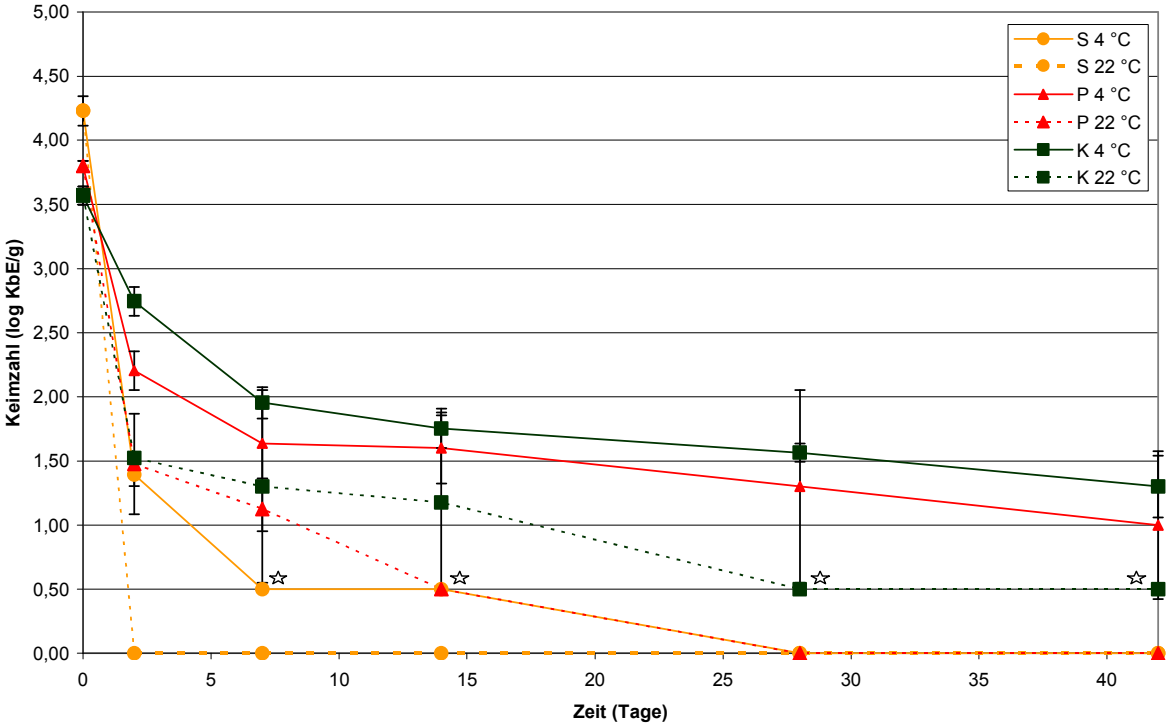

Abbildung 20: Überlebensfähigkeit von Salmonellen in Marinaden der Kategorien Senf (S), Paprika (P) und Kräuter (K) bei Lagerung bei 4 °C und 22 °C.

☆: Keimzahlen < 1 log KbE/g lagen unter der quantitativen Nachweisgrenze; ein positiver qualitativer Nachweis nach Anreicherung in gepuffertem Peptonwasser entspricht dem frei gewählten Wert 0,5)

Jeweils zum Zeitpunkt des letztmöglichen positiven Nachweises wurden je 45 Kolonien (15 pro Platte im Triplikat) einem Objektträgeragglutinationstest unterzogen. Eine Zuordnung der Salmonellen zu Serogruppe B, C oder D war somit möglich. Aufgrund der kurzen Überlebenszeit der Salmonellen (< 2 Tage) konnte dies in Senfmarinade bei 22 °C Lagerung nicht überprüft werden. In Senfmarinaden bei 4 °C Lagerung und Paprikamarinaden bei 22 °C Lagerung erfolgte diese Untersuchung am Tag 14. Am Tag 42 wurde die Serotypbestimmung in Paprikamarinaden bei 4 °C und bei Kräutermarinaden beider Lagerungstemperaturen durchgeführt.

In Senfmarinaden gehörten 91 % der überprüften Salmonellen der Serogruppe B und 9 % der Serogruppe C an.
Aus Paprikamarinaden wurden nach Lagerung bei 4 °C zu 33 % Salmonellen der Serogruppe B, zu 40 % der Gruppe C und zu 27 % der Serogruppe D reisoliert. In Paprikamarinade bei 22 °C ergab die Objektträgeragglutination 33 % Serogruppe B, 11 % C und 56 % D.
Salmonellen der Serogruppe B wurden in Kräutermarinade bei 4 °C zu 31 %, bei Lagerungstemperatur von 22 °C zu 22 % nachgewiesen. Der Anteil von Serogruppe C betrug in Kräutermarinade bei 4 °C 38 % und bei 22 °C 29 %. *Salmonella* Serogruppe D waren in der Marinadenkategorie Kräuter bei 4 °C zu 31 %, bei 22 °C Lagerung zu 49 % innerhalb der überlebenden Isolate vertreten (vgl. Abbildung 21).

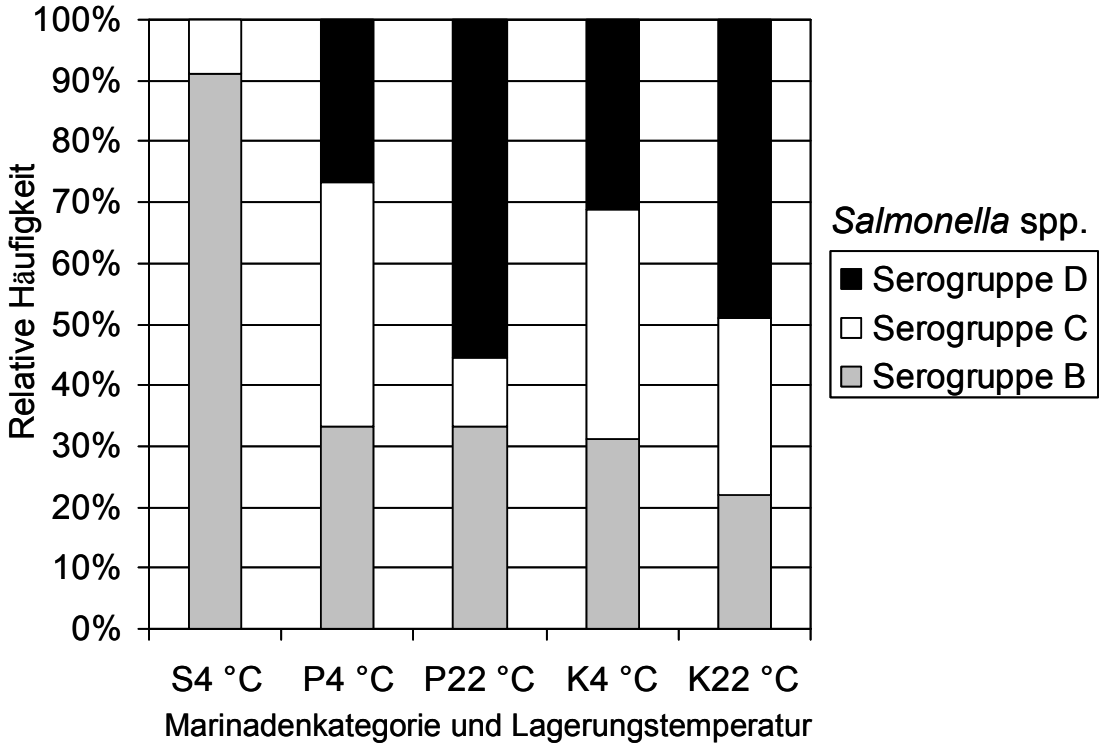

Abbildung 21: Relative Häufigkeiten inokulierter *Salmonella*-Stämme der Serogruppe B, C und D in Marinaden der Kategorie Senf (S), Paprika (P) und Kräuter (K) bei Lagerungstemperaturen von 4 °C und 22 °C.

Die Zuordnung zu den Serogruppen erfolgte dabei jeweils zum Zeitpunkt des letztmöglichen Nachweises von überlebenden Keimen im Verlauf der Versuchsreihe (S4 °C: Tag 14; P4 °C: Tag 42, P22 °C: Tag 14; K4 °C: Tag 42; K22 °C: Tag 42)

4.2.2 Überlebensfähigkeit von *L. monocytogenes*

Die Zahl der inokulierten *L. monocytogenes* direkt *post inoculationem* lag bei allen drei Versuchsdurchgängen in Paprikamarinaden mit 2,5 x 10^3 KbE/g circa eine Zehnerpotenz unter der Keimzahl in Senfmarinade (1,3 x 10^4 KbE/g) und etwa eine viertel Zehnerpotenz unter der Keimzahl in Kräutermarinade (4,0 x 10^3 KbE/g) (vgl. Abbildung 22).

Analog zu den Keimzahlbestimmungen von *L. monocytogenes* wurden in den Negativkontrollen der mikrobiologische Status sowie pH- und a_W-Wert ermittelt.

In allen Ansätzen war eine Absenkung der Belastung mit *L. monocytogenes* bis zum Tag 42 zu beobachten. Der stärkste Abfall von einer bis drei Zehnerpotenzen fand dabei in den ersten sieben Tagen statt. In der Senfmarinade bei 4 °C war ab Tag 28, bei Lagerung von 22 °C ab Tag 7 kein positiver *L. monocytogenes*-Nachweis mehr möglich. Dieser Keim war in Paprikamarinaden bei beiden Temperaturen bis Tag 2 direkt nachweisbar. Danach war der Nachweis nur noch qualitiv nach Anreicherung positiv, bei Lagerungstemperatur von 4 °C bis Tag 42, bei 22 °C bis Tag 28. In Kräutermarinade bei 22 °C Lagerung verlief die Detektion von *L. monocytogenes* bis Tag 14 quantitativ, danach bis Tag 28 nur qualitativ positiv. Eine quantitative Bestim-

mung dieses Keims war in Kräutermarinade bei Lagerungstemperatur von 4 °C bis Tag 42 möglich (vgl. Abbildung 22). Die höchste ermittelte Keimzahl am Tag 42 lag dabei bei 80 KbE/g.
Die Keimzahlkurven aus Ansätzen mit Senf- und Kräutermarinade bei Lagerung von 22 °C verliefen mindestens eine Zehnerpotenz unterhalb der zugehörigen Kurve bei 4 °C (vgl. Abbildung 22).

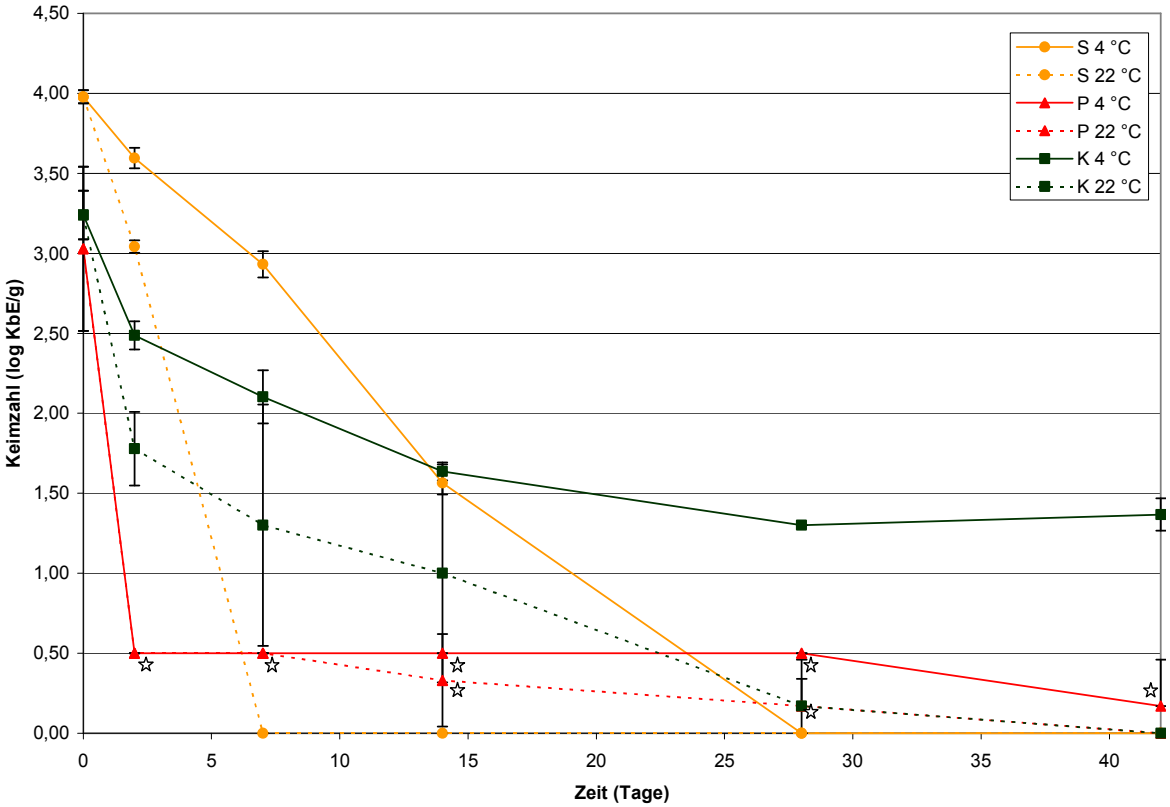

Abbildung 22: Überlebensfähigkeit von *L. monocytogenes* in Marinaden der Kategorien Senf (S), Paprika (P) und Kräuter (K) bei Lagerung bei 4 °C und 22 °C.
☆: Keimzahlen < 1 log KbE/g lagen unter der quantitativen Nachweisgrenze; ein positiver qualitativer Nachweis nach Anreicherung in gepuffertem Peptonwasser entspricht dem frei gewählten Wert 0,5)

Jeweils zum Zeitpunkt des letztmöglichen positiven Nachweises wurden je 45 Kolonien (15 pro Platte im Triplikat) mittels Multiplex-PCR nach DOUMTIH et al. (2004) analysiert. Unterschiede im Bandenmuster ermöglichten mit dieser Methode eine Differenzierung zwischen Serotyp 1/2a, 1/2c und 4b. Diese Untersuchung erfolgte bei Senfmarinaden bei 4 °C Lagerung am Tag 14 und bei 22 °C Lagerung am Tag 2. Überlebende Isolate aus Paprika- und Kräutermarinaden wurden bei einer Lagerungstemperatur von 4 °C am Tag 42 und bei einer Temperatur von 22 °C am Tag 28 den entsprechenden Serotypen zugeordnet.

In Senfmarinaden bei 4 °C lag zu 91 % der Serotyp 1/2a, zu 7 % der Serotyp 1/2c und zu 2 % der Serotyp 4b vor. Bei einer Lagerungstemperatur von 22 °C wurden zu 78 % der Serotyp 1/2a, zu 13 % 1/2c und zu 9 % 4b ermittelt.

Aus Paprikamarinaden bei Lagerung von 4 °C wurden *L. monocytogenes* zu 2 % dem Serotyp 1/2a und zu 98 % dem Serotyp 4b zugeordnet. In Paprikamarinade bei 22 °C ergab das Bandenmuster zu je 2 % Serotyp 1/2a und 1/2c sowie zu 96 % den Typ 4b.
L. monocytogenes 1/2a wurden in Kräutermarinade bei 4 °C zu 47 %, bei Lagerungstemperatur von 22 °C zu 53 % nachgewiesen. Der Anteil von Serotyp 1/2c betrug in Kräutermarinade bei 4 °C 51 % und bei 22 °C 34 %. Der Serotyp 4b wurde in der Marinadenkategorie Kräuter bei 4 °C zu 2 % und bei 22 °C Lagerung zu 13 % detektiert (vgl. Abbildung 23).

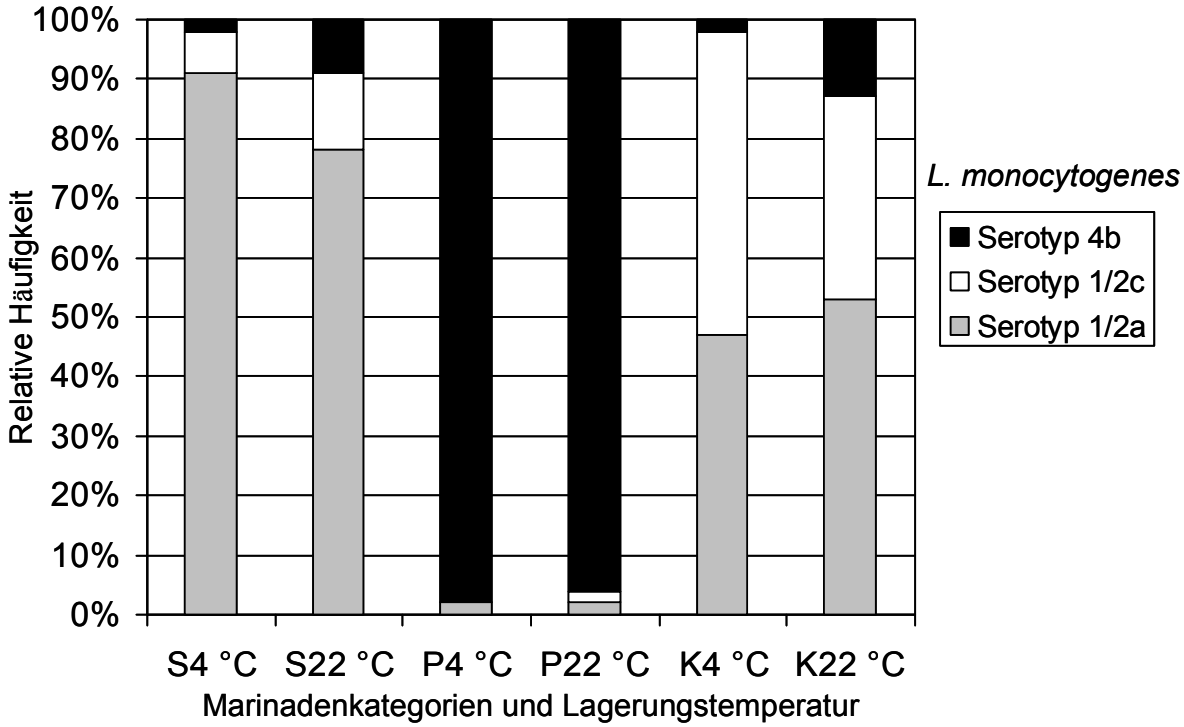

Abbildung 23: Relative Häufigkeiten inokulierter *L. monocytogenes*-Stämme des Serotyps 1/2a, 1/2c und 4b in Marinaden der Kategorie Senf (S), Paprika (P) und Kräuter (K) bei Lagerungstemperaturen von 4 °C und 22 °C.

Die Zuordnung erfolgte dabei jeweils zum Zeitpunkt des letztmöglichen Nachweises von überlebenden Keimen im Verlauf der Versuchsreihe (S4 °C: Tag 14; S22 °C: Tag 2; P4 °C: Tag 42, P22 °C: Tag 28; K4 °C: Tag 42; K22 °C: Tag 28)

4.3 Übersicht der Ergebnisse

In Tabelle 46 sind Ergebnisse aus der Feindifferenzierung der aus den Untersuchungen von mariniertem Schweinefleisch und Marinaden gewonnenen pathogenen Isolate zusammengefasst.

Tabelle 46: Ergebnisse der Feindifferenzierung aller pathogenen Isolaten aus marinierten Schweinenackensteaks (n=300) und Marinaden (n=30)

Keim	Gesamtzahl positiver Proben		Anzahl von Isolaten	Ergebnis der Feindifferenzierung der Isolate		
	n	(%)		n	(%)	
Salmonella spp.	6	(2)	13	11	(85)	*S*. Typhimurium DT 193; O:4, monophasisch
				2	(15)	*S*. Typhimurium DT 210; O:4,5,12; biphasisch
STEC	7	(2)	4	4	(100)	Serotyp ONT:H19, *stx2e*-Gen
L. monocytogenes	5	(2)	35	34	(97)	Serotyp 1/2a
				1	(3)	Serotyp 1/2c
St. aureus	25	(8)	212	74	(35)	Ohne Toxinogenität im ELISA
				138	(65)	Staphylokokken-Enterotoxinbildung
				1	(1)	Multiresistenz gegen diverse Antbiotika
B. cereus	80	(24)	158	3	(2)	Ohne molekurgenetische Toxinogenität
				38	(24)	Genanteile des *hbl*- und/oder *nhe*-Operons
				117	(74)	Alle Genanteile des *hbl*- und *nhe*-Operons
				0	(0)	Cereulidbildung

Die Gesamtdaten zu Nachweishäufigkeiten und prozentualer Verteilung der Keimzahlbereiche der einzelnen mikrobiologischen Untersuchungsparameter sind in Tabelle 47 zusammenfassend dargestellt. Als Grundlage dienten Mittelwerte aus jeweils zusammengehörenden Proben des Untersuchungszeitraums 2008 und 2009. Dabei wurden die Daten aus Untersuchungen zum Zeitpunkt des Erwerbs denen am Ende des MHD gegenübergestellt und als Gesamttendenz bewertet. Unabhängig von Produktkategorie stiegen Gesamtkeimzahl und Zahl der Milchsäurebakterien bis zum Ende des MHD an, während die Zahl an *Listeria* spp. weitgehend konstant blieb. Ein allgemeingültiger Trend für die Entwicklung der *Enterobacteriaceae* lässt sich aufgrund der breiten Streuung der Keimzahlen nicht ableiten. Die Eruierung einer Gesamttendenz der Keimzahlentwicklung der pathogenen Mikroorganismen erscheint aufgrund der teils niedrigen Nachweisraten bzw. niedrigen Keimdichten schwierig.

Tabelle 47: Übersicht über Nachweishäufigkeiten (N in %) und prozentuale Keimzahlverteilung mit Ableitung der Tendenz von Anfang bis Ende MHD. Als Datenbasis dienten Mittelwerte der Daten jeweilig zusammengehörender Proben aus den Probennahmezeiträumen 2008 und 2009.
↑: Keimzahlanstieg ≥10 bzw. Anstieg der Nachweishäufigkeit von >10 %;→: Keimzahlveränderung <10 bzw. Veränderung der Nachweishäufigkeit <10 %; ↓: Keimzahlabfall ≥10 oder Reduktion der Nachweishäufigkeit >10 %; n. n.: nicht nachweisbar

	Keim	Zeitpunkt des Erwerbs									Ende MHD									Tendenz
		N (%)	1,0 – 9,9 x <10^2	10^2	10^3	10^4	10^5	10^6	10^7	10^8	N (%)	1,0 – 9,9 x <10^2	10^2	10^3	10^4	10^5	10^6	10^7	10^8	
Kategorie Senf	Gesamtkeimzahl	100	-	-	-	24	40	32	4	-	100	-	-	-	8	8	24	52	8	↑
	Enterobacteriaceae	100	20	32	20	24	4	-	-	-	96	21	29	25	21	4	-	-	-	→
	Milchsäurebakterien	100	12	8	24	16	28	12	-	-	100	-	-	12	16	12	52	8	-	↑
	Salmonella spp.	0	n. n.								0	n. n.								→
	STEC	4	1 *stx*2-Screening-positive Probe								4	1 *stx*2-Screening-positive Probe								→
	Listeria spp.	80	35	65	-	-	-	-	-	-	80	65	30	5	-	-	-	-	-	→
	L. monocytogenes	0	n. n.								0	n. n.								→
	St. aureus	4	100	-	-	-	-	-	-	-	4	100	-	-	-	-	-	-	-	→
	B. cereus	20	80	20	-	-	-	-	-	-	28	86	14	-	-	-	-	-	-	→
	Sulfitred. Clostridien	32	63	37	-	-	-	-	-	-	20	80	20	-	-	-	-	-	-	↓
Kategorie Paprika	Gesamtkeimzahl	100	-	-	4	36	48	12	-	-	100	-	-	-	12	16	32	36	4	↑
	Enterobacteriaceae	100	28	48	24		-	-	-	-	100	24	48	20	4	-	4	-	-	→
	Milchsäurebakterien	100	12	28	32	16	12	-	-	-	100	-	12	8	12	28	24	12	4	↑
	Salmonella spp.	8	2 positive Proben								12	3 positive Proben								↑
	STEC	0	n. n.								4	1 *stx*2-Screening positive Probe								↑
	Listeria spp.	100	36	36	28	-	-	-	-	-	92	64	16	20	-	-	-	-	-	→
	L. monocytogenes	0	n. n.								0	n. n.								→
	St. aureus	28	100	-	-	-	-	-	-	-	20	60	40	-	-	-	-	-	-	→
	B. cereus	36	100	-	-	-	-	-	-	-	52	85	15	-	-	-	-	-	-	↑
	Sulfitred. Clostridien	48	92	8	-	-	-	-	-	-	48	58	42							↑
Kategorie Kräuter	Gesamtkeimzahl	100	-	-	-	20	48	24	8	-	100	-	-	-	-	16	16	52	16	↑
	Enterobacteriaceae	100	8	52	24	12	4	-	-	-	100	8	12	24	32	8	12	4	-	↑
	Milchsäurebakterien	100	4	20	36	20	12	4	4	-	100	-	-	4	12	28	44	8	4	↑
	Salmonella spp.	4	1 positive Probe								0	n. n.								↓
	STEC	8	1 *stx*1- , 2 *stx*2-Screening-positive Proben								8	2 *stx*2-Screening positive Proben.								→
	Listeria spp.	88	50	45	5	-	-	-	-	-	88	68	27	5	-	-	-	-	-	→
	L. monocytogenes	4	100	-	-	-	-	-	-	-	16	100	-	-	-	-	-	-	-	↑
	St. aureus	24	50	50	-	-	-	-	-	-	16	75	25	-	-	-	-	-	-	→
	B. cereus	48	92	8	-	-	-	-	-	-	56	86	14	-	-	-	-	-	-	↑
	Sulfitred. Clostridien	52	92	8	-	-	-	-	-	-	44	73	27	-	-	-	-	-	-	↓

4.4 Ableitung von Empfehlungen für mikrobiologische Richtwerte

Im Rahmen des vorbeugenden Verbraucherschutzes sollen Empfehlungen für produktspezifische mikrobiologische Richtwerte abgeleitet werden. Unter Berücksichtigung der Ergebnisse dieser Studie und basierend auf den von der DGHM (2010) empfohlenen Warn- und Richtwerten für rohes, ungewürztes Schweinefleisch und Kräutern und Gewürzen werden folgende Richtwerte bezüglich Lebensmittelinfektionserregern in marinierten Schweinenackensteaks bis zum Ende des MHD vorgeschlagen:

Salmonellen:	nicht nachweisbar in 25 g
STEC:	nicht nachweisbar in 25 g
L. monocytogenes:	$< 10^2$ KbE/g
St. aureus:	$1{,}0 \times 10^2$ KbE/g
B. cereus:	$1{,}0 \times 10^4$ KbE/g
Sulfitreduzierende Clostridien:	$1{,}0 \times 10^4$ KbE/g

Für die in dieser Arbeit untersuchten Produkte wurden teilweise MHD-Fristen von bis zu 18 Tagen angegeben. Hinsichtlich des Vorkommens von pathogenen Keimen in marinierten Schweinesteaks erscheint eine solch lange MHD-Frist vertretbar zu sein.

5 Diskussion

Gegenwärtig erlangen marinierte SB-Grillfleischprodukte als typisches Convenience-Produkt eine zunehmende Marktbedeutung. Aufgrund der zeitsparenden, erleichterten Zubereitung und der breiten Produktpalette an Geschmacksrichtungen, die auch innovative Markttrends mit einbeziehen, zeichnet sich eine hohe Verbraucherakzeptanz ab. Dem stehen allerdings sehr wenig repräsentative Daten zur mikrobiologischen Qualität und Unbedenklichkeit dieser Lebensmittel für den Verbraucher gegenüber. Fragen zur mikrobiologischen Sicherheit ergeben sich dabei insbesondere für marinierte Schweinenackensteaks, die den größten Marktanteil im Grillfleischsektor besitzen (ANON., 2007) und für die keine Richtwerte bezüglich der MHD-Frist verfügbar sind. Lebensmittelinfektionserreger können dabei auf vielfältigem Wege über das verwendete Ausgangsmaterial Schweinefleisch und Marinade, die durch den Gehalt an Gewürzen mit pathogenen Keimen kontaminiert sein kann (HAMMON, 2008), in das Endprodukt eingetragen werden. Problematisch erscheint hierbei, dass verschiedene Hersteller für im Handel erhältliche marinierte SB-Schweinesteaks eine MHD-Frist von bis zu 18 Tagen angeben.

Ziel dieser Arbeit war daher, im Rahmen des vorbeugenden Verbraucherschutzes die mikrobiologische Qualität und Sicherheit solcher Produkte sowohl zum Zeitpunkt des Erwerbs als auch am Ende der jeweilig angegebenen MHD-Frist zu ermitteln. Um Aufschluss über mögliche Kontaminationsquellen und das Vorkommen pathogener Mikroorganismen zu erhalten, wurden sowohl marinierte Schweinenackensteaks aus dem lokalen SB-Handel als auch industrielle Marinaden, die für die Herstellung dieser Produkte verwendet werden, mikrobiologisch untersucht. Basierend auf diesen Daten wurde zudem die Überlebensfähigkeit von pathogenen Keimen in Marinaden mittels artifizieller Kontamination zweier ausgewählter Lebensmittelinfektionserreger, *Salmonella* spp. und *L. monocytogenes*, bei zwei unterschiedlichen Temperaturen über einen Zeitraum von 42 Tagen überprüft. Die Ergebnisse sollten anschließend als Grundlage für eine Empfehlung mikrobiologischer Richtwerte für diese Produkte hinsichtlich der Belastung mit Lebensmittelinfektionserregern dienen.

Im Rahmen der Marktstudie wurden in zwei Probennahmezeiträumen (Juni-Oktober 2008 und März-Juni 2009) die wichtigsten mikrobiologischen Parameter und Lebensmittelinfektionserreger untersucht. Als Probenmaterial wurden marinierte Schweinenackensteaks aus dem SB-Bereich der lokalen Supermärkte erworben. Art und Umfang der einzelnen untersuchten Proben von 13 Herstellern aus Deutschland waren in beiden Untersuchungszeiträumen identisch. So war ein direkter Vergleich der Daten und eine Abschätzung saisonaler Einflüsse durch Witterungsbedingungen und Kaufverhalten der Verbraucher auf die Qualität der untersuchten Produkte möglich. Aufgrund der großen Produktvielfalt erfolgte eine Einteilung des Handelsangebots basierend auf der Würzung bzw. Hauptgeschmacksrichtung in die drei Produkttypen Senf/Bier, Paprika und Kräuter-/Knoblauch. Dies erschien auch daher sinnvoll, weil die Marinaden dieser drei Kategorien aufgrund jeweils unterschiedlicher Rezepturen auch technologisch unterschiedliche Eigenschaften aufwiesen. So waren gemäß der Einteilung nach FREY (1999) (vgl. Abschnitt 2.2) Kräuter-/Knoblauchmarinaden vorwiegend reine Würzöle, während Senf-

Biermarinaden in erster Linie Dispersionsmarinaden mit dem Zusatz von Verdickungsmitteln darstellen. Paprikamarinaden umfassten in dieser Arbeit vorwiegend reine Würzöle, aber auch Dispersionsmarinaden, komplexe Emulsionsmarinaden und Mischformen daraus.

In den marinierten Produkten sanken die pH-Werte bis zum Ende des MHD um durchschnittlich 0,45 Einheiten ab. Gleichzeitig stieg die aerobe Gesamtkeimzahl bis zum Ende des MHD hin mindestens um eine, teils auch um zwei Zehnerpotenzen auf Werte bis zu 10^9 KbE/g an. Der Anstieg der Gesamtkeimzahl bei sinkendem pH-Wert korrelierte dabei mit der Vermehrung der Milchsäurebakterien. Die hier festgestellte Zunahme der Milchsäurebakterienzahl auf bis zu 10^8 KbE/g bei marinierten Produkten am Ende des MHD wurde auch von anderen Autoren dokumentiert (BJÖRKROTH, 2005; SCHIRMER et al., 2009). Diese Prozesse finden sich regulär auch in nicht marinierten, vakuumverpackten Schweinenacken. Milchsäurebakterien werden nach 3-4 Wochen Kühllagerung mit Keimzahlen bis 10^8 KbE/g zur zahlenmäßig vorherrschenden Mikrobiota, was in einer Erniedrigung des pH-Werts und einem Anstieg der Gesamtkeimzahl resultiert (BLIXT et al., 2002; HOLLEY et al., 2004). Zwischen pH-Wert-Abfall, Anstieg der Gesamtkeimzahlen und Milchsäurebakterienzahlen bestanden zu beiden Probennahmezeiträumen keine statistisch relevanten Unterschiede. Saisonale Unterschiede durch variierende Witterungsbedingungen und Kaufbereitschaft durch Verbraucher scheinen daher keinen signifikanten Einfluss auf die mikrobiologische Qualität zu haben.

Die Zahl der *Enterobacteriaceae* stieg im Durchschnitt geringgradig um eine halbe bis eine Zehnerpotenz, bei einzelnen Proben jedoch deutlich auch über 2-3 Zehnerpotenzen an. Innerhalb der Probenkategorien wurden in beiden Untersuchungszeiträumen sowohl zum Zeitpunkt des Kaufes als auch am Ende des MHD zum Teil sehr unterschiedliche Werte festgestellt. Dabei zeigten Proben jeweils desselben Herstellers vergleichbare *Enterobacteriaceae*-Gehalte, was durch einen unterschiedlichen Hygienestatus der einzelnen fleischverarbeitenden Betriebe begründet sein könnte. Nach HOLLEY et al. (2004) ist die Fraktion der *Enterobacteriaceae* als nützlicher Indikator für die Effektivität der Hygienepraxis anzusehen. Anteile von < 5 % an der aeroben Gesamtkeimzahl reflektieren dabei akzeptable Hygienebedingungen bei der Herstellung. Bei Produkten mit Paprika- und Senfmarinade machte der *Enterobacteriaceae*-Anteil nur ausnahmsweise (eine bzw. acht von 100 Proben) über 5 % der Gesamtkeimzahl aus. Hingegen wurde dieser 5 %-Grenzwert von 20 (20 %) Proben mit Kräutermarinade überschritten, was auf eine schlechtere lebensmittelhygienische Qualität hindeutet (HOLLEY et al., 2004).

Da für das Vorkommen von Salmonellen in verkaufsfertigen Produkten eine Nulltoleranz vorliegt (VO (EG) 2073/2005), wurden diese Keime qualitativ nach Anreicherung der Proben erfasst. Dabei wurden *Salmonella* spp. nur im zweiten Probennahmezeitraum, der Grillsaison 2009, in sechs (4 %) der 150 Proben detektiert. Dieser Wert korreliert mit dem in der Literatur angegebenen Vorkommen von Salmonellen in Schweinefleisch von 2-6 % (STOCK et al., 2001; YEH et al., 2005; BUSANI et al., 2005; PRENDERGAST et al., 2008; MEYER et al., 2010). Die hier beobachtete Diskrepanz der Nachweishäufigkeit zwischen 2008 und 2009 kann durch Wechsel der Zulieferbetriebe oder Veränderungen in Rezeptur und Herstellungsprozess im Vergleich zum Vorjahr begründet sein. Es muss auch berücksichtigt werden, dass Änderungen in den eingesetzten Gewürzen der Marinaden Konsequenzen für die Nachweisbarkeit von Salmonel-

len haben kann. So können antimikrobiell wirksame Substanzen in Gewürzen, wie in Knoblauch, Zwiebeln oder Nelken, die Vermehrung dieser Keime während der Analyse hemmen (GRAUBAUM et al., 2005).
Die gewonnenen Isolate waren alle dem Serotyp Typhimurium zuzuordnen, der in der Bedeutung als Lebensmittelinfektionserreger in den letzten Jahren zunehmend von *S*. Enteritidis verdrängt wurde (ANON., 2010a). Die Nachweishäufigkeit des Serotyps *S*. Typhimurium in den hier untersuchten Produkten ist damit zu begründen, dass diese Serovarietät in Schweinefleischprodukten mit Anteilen bis 51 % den Hauptserotyp darstellt (STOCK et al., 2001; FRIEDRICH et al., 2010). In fünf Produkten mit Paprikamarinade, die von einem einzigen Hersteller stammten, wurden am Anfang und auch am Ende des MHD monophasische Isolate der O:4-Gruppe und Lysotyp DT 193 detektiert. Das Überleben von Salmonellen war in diesen Produkten also auch nach einer Lagerung bei 4 °C nach 18 Tagen möglich. Ein Produkt mit Kräutermarinade eines anderen Herstellers lieferte zum Zeitpunkt des Einkaufs *S*. Typhimurium O:4,5,12 als biphasische Variante mit i:1,2 und Lysotyp DT 120. Herstellerbedingte Unterschiede der Isolate lassen sich am wahrscheinlichsten auf unterschiedliche Herkunftsbetriebe der Schlachtschweine zurückführen.

Weiterhin wurden die Proben qualitativ auf STEC mittels PCR nach Anreicherung untersucht. Target-Gene für die PCR waren dabei die codierenden Gene für Shigatoxin 1 und 2, die wichtige Virulenzfaktoren der hochpathogenen EHEC (enterohämorrhagische *E. coli*), einer Untergruppe der STEC, darstellen (SCHMIDT et al., 1994b; CEBULA et al., 1995; KARCH et al., 1996). Derzeit werden mangels detaillierter Erkenntnisse zu Pathomechanismus und eindeutiger labordiagnostischer Differenzierung von EHEC alle STEC aus Lebensmitteln als potentielle EHEC angesehen. Da die Screening-PCR nach KARCH und MAYER (1989) durch die Anwesenheit von anderen Enterobacteriaceen wie *Hafnia* spp. oder *Citrobacter* spp. falschpositive Resultate liefern kann (ALBERT et al., 1992; SCHMIDT et al., 1993), wurden das Shigatoxin-1- bzw. Shigatoxin-2-Gen direkt über zwei PCR-Systeme nachgewiesen. Dabei wurden insgesamt 11 *stx2*-Screening-positive Proben und eine *stx1*-Screening positive Probe ermittelt. Aus einer Probe mit Kräutermarinade konnten vier STEC-Isolate in Reinkultur gewonnen werden, die dem Serotyp ONT:H19 angehörten und das codierende Gen für die Bildung von Shigatoxin 2e besaßen. Weitere Virulenzfaktoren waren nicht nachweisbar. *Stx2e*-positive Isolate sind als Schwein-spezifische Spezies anzusehen, können bei diesen Tieren die Ödemkrankheit hervorrufen und werden in Schweinefleisch mit Anteilen von 60-89 % nachgewiesen (BOUVET et al., 2002; FRATAMICO et al., 2004; BEUTIN et al., 2007). Diese Stämme können sich nach Infektion des Menschen als unkomplizierte Diarrhoeformen, selten als schwerere Erkrankungen manifestieren (FRIEDRICH et al., 2002). Marinierte Schweinenackensteaks scheinen also kein relevantes Reservoir für hochvirulente EHEC-Stämme zu sein.

Bei der Untersuchung auf *L. monocytogenes* wurden zunächst alle Listerienarten erfasst. Die Listerien-Anzahl ließ Rückschlüsse auf die Verarbeitungshygiene zu, da diese Keime sich gut an Bedingungen in Fleisch verarbeitenden Betrieben anpassen können (JEMMI et al., 2006). Bei hohen Nachweisraten von *Listeria* spp. steigt auch die Wahrscheinlichkeit des Auftretens von pathogenen Listerienspezies. Gerade in Mischkontaminationen mit hohen Keimzahlen an *L. innocua* kann der tatsächliche Gehalt an *L. monocytogenes* maskiert werden (BECKER et al.,

1998). In der hier vorliegenden Arbeit wurden *Listeria* spp. in fast allen Produkten unabhängig von der Produktkategorie und Probennahmezeitraum, teils mit Keimdichten bis zu 10^3 KbE/g gefunden. *L. monocytogenes* wurde dabei in fünf Produkten mit Kräutermarinade mit einer maximalen Keimdichte von 95 KbE/g nachgewiesen. Da es sich bei marinierten Schweinesteaks nicht um ein verzehrfertiges Lebensmittel handelt, ist dieser Keimgehalt auf der Basis der Lebensmittelsicherheitskriterien der VO (EG) 2073/2005 nicht zu beanstanden. Das hier festgestellte Vorkommen von 1,7 % liegt eher im Bereich der unteren Grenze der Nachweishäufigkeit aus früheren Arbeiten über das Vorkommen von *L. monocytogenes* in Schweinefleisch (1-36 %) (YEH et al., 2005; BUSANI et al., 2005; MENGESHA et al., 2009; NETSCHAJEW et al., 2009). *L. monocytogenes* war dabei in vier der fünf Proben am Ende des MHD, also nach Ablauf einer Restlaufzeit von bis zu 18 Tagen, nachweisbar. Ein Überleben dieser Keime ist also in marinierten Produkten über eine recht lange Zeit möglich. Vor diesem Hintergrund erscheint eine Reduktion der Ausgangskeimzahl an *L. monocytogenes* und *Listeria* spp. in den Rohwaren und bei Herstellung des fertig marinierten Produkts höchst bedeutsam. Die aus den Analysen gewonnenen Isolate von *L. monocytogenes* gehörten überwiegend dem Serotyp 1/2a an, der bisher am häufigsten aus Schweinefleischprodukten isoliert wurde (HELLSTROM et al., 2007; HONG et al., 2007). Ein Isolat erwies sich als Serotyp 1/2c, der in Lebensmitteln tierischer Herkunft weit verbreitet ist und daher gelegentlich auch in Fleischprodukten nachweisbar ist (VAZQUEZ-BOLAND et al., 2001; HONG et al., 2007).

Die Kontamination der untersuchten Proben mit *St. aureus* war mit einem Vorkommen von 8 % in allen Produktkategorien und einer Keimzahl von max. 340 KbE/g relativ gering. Eine Gefährdung für den Verbraucher wäre nur bei einer Aufnahme von hitzestabilen Enterotoxinen in einer Dosis von 0,1 bis 1 µg/kg Körpergewicht gegeben. Für die Bildung dieser toxischen Dosis sind allerdings Zellzahlen über 10^5-10^6 KbE/g nötig (BENNETT, 2005; HENNEKINNE et al., 2010). Bei konsequenter adäquater Kühllagerung der marinierten Produkte ist daher nicht mit einer für eine Intoxikation ausreichenden Keimvermehrung zu rechnen.
Im ELISA zeigten 65 % der hier gewonnenen Isolate Enterotoxinbildung. Die Häufigkeit von SE-produzierenden *St. aureus* wird in der Literatur für Lebensmittel allgemein mit 40-51 % und für rohes Fleisch mit 35-60 % beziffert (ATANASSOVA et al., 2001; NORMANNO et al., 2007; NITZSCHE et al., 2007; PEREIRA et al., 2009), was nur leicht unter dem hier festgestellten Wert liegt. Dies könnte darin begründet sein, dass für die verwendeten Isolate nicht geklärt ist, ob es sich um genetisch verwandte Stämme handelte. Die Mehrfachuntersuchung eines Klons könnte somit das Gesamtergebnis verfälschen.
Mittels eines zweiten ELISA, der die SE-Typen individuell erfasste (PARK et al., 1996), wurde als häufigster Enterotoxintyp SED (59 %), gefolgt von SEC (50 %) und SEA (45 %) identifiziert. Diese drei Toxintypen lagen am häufigsten in Kombination zusammen vor. Auch in der Studie von NORMANNO et al. (2007) wurden in Milch- und Fleischerzeugnissen hauptsächlich SED-Bildner (33,6 %) detektiert, während SEA (18,4 %) und SEC (15,2 %) deutlich seltener nachgewiesen wurden. Hingegen dominierten in der Arbeit von PEREIRA et al. (2009) mit 38 % Isolate mit den Genen für SEA. Die Zahl positiver molekularbiologischer Befunde liegt jedoch insgesamt bei weitem höher als die tatsächliche Toxinexpression (NAJERA-SANCHEZ et al., 2003). Die hier detektierten Toxintypen SEA und SED korrelieren beim Menschen in erster Linie mit SE-bedingten Lebensmittelintoxikationen (CHA et al., 2006; KEROUANTON et al., 2007). Bei

Einhaltung der Kühltemperatur ist hier jedoch nicht mit einer für eine Intoxikation ausreichenden Keimvermehrung zu rechnen.
Innerhalb der *St. aureus*-Stämme zeigte sich nur ein Isolat (0,5 %) im Cefoxitin-Agardiffusionstest (BOUBAKER et al., 2004) als MRSA-verdächtig, was in Anbetracht des Umfangs der untersuchten *St. aureus*-Isolate doch ein geringer Anteil ist. Um dieses Isolat definitiv als MRSA zu beschreiben, müsste noch eine molekularbiologische Analyse zum Nachweis des *mecA*-Gens angeschlossen werden (BADDOUR et al., 2007; BROEKEMA et al., 2009). In der Literatur wurden bisher für Schweinfleisch 0,3-10,7 % MRSA-positive Resultate beschrieben (DE BOER et al., 2009; LIM et al., 2010; SCHILLING et al., 2010). Das Ergebnis aus den eigenen Untersuchungen liegt also eher im unteren Bereich bisheriger Nachweise, was möglicherweise auch durch eine wie oben beschriebene Mehrfachuntersuchung von Nicht-MRSA-Klonen verfälscht sein kann.

Insgesamt in 64 Proben (21 %) wurden *B. cereus*-Belastungen festgestellt. Die höchste Kontaminationsrate war dabei in Schweinesteaks mit Kräutermarinade zu finden. In keinem Fall waren dabei Keimzahlen über 10^3 KbE *B. cereus*/g nachzuweisen, was einer relativ geringen Belastung entspricht. Für eine Intoxikationserkrankung wäre die Dosis nicht ausreichend. Hierzu müsste eine Unterbrechung der Kühlkette erfolgen, so dass sich toxin-bildende Stämme auf die kritische Keimzahl von 10^5-10^6 KbE/g vermehren könnten (GRANUM et al., 1997; EHLING-SCHULZ et al., 2004a). Da mariniertes Fleisch vor dem Verzehr in der Regel durcherhitzt wird, was eine Inaktivierung der diarrhöischen Enterotoxinkomplexe bewirkt, könnte in einem solchen Produkt *B. cereus* einzig durch die Bildung des hitzestabilen Emetic-Toxins eine Verbrauchergefährdung entstehen (RAJKOVIC et al., 2008). In der vorliegenden Studie wurden jedoch keine Stämme mit emetischer Toxinogenität innerhalb der 26 Stärkehydrolyse-negativen Isolate aus mariniertem Fleisch nachgewiesen. Dies ist bemerkenswert, da laut Literaturangaben in Lebensmitteln mit Cereulid bildenden Stämmen von 0,6-13 % zu rechnen ist (SCHULZ, 2004; ALTAYAR et al., 2006; KREUZBERGER et al., 2008; RAU et al., 2009). Die Ursache für den negativen Nachweis könnte darin liegen, dass emetische *B. cereus*-Stämme ein höheres Temperaturoptimum zu besitzen scheinen als nicht-emetische Stämme und sich daher in unter 10 °C gekühlten Lebensmitteln nicht vermehren können (CARLIN et al., 2006).
Auffallend war, dass 98 % der analysierten *B. cereus*-Isolate codierende Gene für diarrhöische Toxine/ Toxinkomplexe aufwiesen. Diese Beobachtung korreliert mit Angaben aus einer Studie, die in 99,6 % der Lebensmittelisolate diarrhöische Toxinbildner nachwies (KREUZBERGER et al., 2008). Den größten Anteil (95,3 %) machten dabei die Isolate aus, die alle drei codierenden Gene des NhE-Komplexes exprimierten. Auch andere Studien beziffern das Vorkommen von NhE-bildenden Isolaten aus Lebensmitteln mit maximaler biologischer Toxinaktivität von über 90 % (HANSEN et al., 2001; IN'T VELD et al., 2001; GUINEBRETIERE et al., 2002; MORAVEK et al., 2006; MOLVA et al., 2009). In den eigenen Untersuchungen waren in 82 % der Isolate Anteile des NhE- und HBL-Komplexes in Kombination nachweisbar. Die Ausprägung aller drei für die maximale biologische Aktivität nötigen Gensegmente für HBL wurde in 75,6 % der Isolate detektiert. Dieses Ergebnis liegt etwas höher als in der Literatur mit 40-60 % angegeben (HANSEN et al., 2001; IN'T VELD et al., 2001). Zum Teil wurden aus einer Probe mehrere Stämme isoliert, die u. U. genetisch eng verwandt waren und somit Einfluss auf die Nachweisrate haben könnten. Alle Isolate, die die gesamten codierenden Gene des HBL-Komplexes

aufwiesen, waren gleichzeitig für alle drei Genanteile des NhE-Komplexes positiv und hatten somit das Potential, beide Toxinkomplexe in maximaler biologischer Aktivität zu bilden.

Sulfitreduzierende Clostridien, zu denen auch der Lebensmittelinfektionserreger *C. perfringens* gehört, waren in mariniertem Fleisch zu 24 % mit Keimzahlen von höchstens 500 KbE/g, vor allem in Produkten mit Paprika- und Kräutermarinade, nachweisbar. Da marinierte Schweinenackensteaks in der Regel nur durcherhitzt verzehrt werden und die von *C. perfringens* gebildeten Toxine nicht hitzestabil sind (LABBÉ, 2000; BRYNESTAD et al., 2002), wäre selbst bei einer Toxinbildung das Risiko für den Verbraucher gering.

In den untersuchten Marinaden (n=30) wurden pH-Werte von 3,28 bis 4,68, a_W-Werte von 0,38 bis 0,91, ein teilweise sehr hoher, die physikalisch-chemischen Messungen störenden Fett-Öl-Anteil und Gesamtkeimzahlen von 2,3 x 10^3 bis 4,3 x 10^5 KbE/g festgestellt.

Von den potentiell pathogenen Mikroorganismen wurden lediglich die Sporenbildner *B. cereus* und sulfitreduzierende Clostridien mit Keimzahlen bis zu 230 KbE/g detektiert. Der Eintrag dieser Keime in Marinaden findet dabei möglicherweise über Gewürze statt, in denen Sporenbildner die dominierende Mikrobiota ausmachen (LITTLE et al., 2003; HAMMON, 2008; PSOMAS et al., 2009). Die molekularbiologische Analyse der Toxinogenität der *B. cereus*-Isolate ergab in Marinaden und mariniertem Fleisch sehr ähnliche Resultate. Keines der Isolate konnte als Cereulidbildner identifiziert werden, wohingegen bei allen Isolaten die gesamten drei Genanteile für die Expression des NhE-Komplexes nachgewiesen werden konnten. 94 % der Isolate wiesen Anteile des NhE und HBL-Komplexes in Kombination auf. Die Fähigkeit zur Bildung des NhE-und HBL-Komplexes in maximaler biologischer Aktivität wurde bei 67,7 % der Isolate beobachtet. Die Ähnlichkeit des Toxinprofils zu Isolaten aus mariniertem Fleisch lässt die Vermutung zu, dass *B. cereus* zum überwiegenden Anteil über Marinaden bzw. der darin verwendeten Gewürze in das marinierte Endprodukt eingetragen werden. Um hierüber jedoch verlässliche Aussagen treffen zu können, wären weitere Untersuchungen nötig, wie z.B. Fluoreszenz-amplifizierter Fragmentlängen-Polymorphismus oder random amplification of polymorphic DNA (RAPD) bzw. multilocus sequence typing (MLST) (MATAR et al., 1996; EHLING-SCHULZ et al., 2005; GUINEBRETIERE et al., 2008).

Zusammenfassend lässt sich aus den bisherigen Untersuchungen zum mikrobiologischen Status ableiten, dass in marinierten Schweinenackensteaks pathogene Keime wie *Salmonella* spp., STEC, *L. monocytogenes, St. aureus, B. cereus* und sulfitreduzierende Clostridien vorkommen können. In den untersuchten Marinaden waren nur potentiell pathogene Sporenbildner nachweisbar. Allerdings wurden bei allen quantitativ erfassten Pathogenen in keinem Fall – auch nicht am Ende des MHD – gesundheitsbedenkliche Keimzahlen erreicht.

Um die Überlebensfähigkeit von pathogenen Keimen in Marinaden bzw. das antimikrobiell wirksame Potential von Marinaden zu überprüfen, wurden repräsentative Vertreter der drei Marinadenkategorien sowohl mit 10^4 KbE/g *Salmonella* spp. als auch mit *L. monocytogenes* artifiziell belastet.
Diese beiden Pathogenen wurden deshalb für die Tenazitätsstudie in Marinaden ausgewählt, weil sie bei der Untersuchung der Handelsprobenstudie mehrfach am Ende des MHD nachgewiesen wurden und Lebensmittelsicherheitskriterien nach VO (EG) 2073/2005 darstellen. Außerdem können diese beiden Keime in tiefgefrorenem Fleisch, wie es im Falle von marinierten SB-Schweinenackensteaks verwendet wird, lange Zeit überleben (GIANFRANCESCHI et al., 1996; ESCARTIN et al., 2000; BEAUCHAMP et al., 2010). Mit dieser Studie sollte geklärt werden, wie lange ein Überleben der Inokulate in Flüssigmarinaden möglich ist und ob deren Tenazität im marinierten Produkt möglicherweise auf protektive Effekte der Fleischmatrix zurückzuführen ist. Für beide Keime sind bislang keine fundierten Daten aus Tenazitätsstudien mit mariniertem Grillfleisch bzw. hierfür verwendeten Marinaden verfügbar. Bisherige Untersuchungen konzentrierten sich vielmehr auf das Produkt Beef Jerky, das nach Marinierung getrocknet wird und daher niedrige a_W-Werte aufweist (vgl. Tabelle 5 aus Abschnitt 2.5.1.3 bzw. Tabelle 9 aus Abschnitt 2.5.3.3). Aus Untersuchungen mit diesen Produkten ließ sich eine Keimhemmung insbesondere durch Essigsäurezusatz, also durch deutliche pH-Wert-Absenkung erreichen (CALICIOGLU et al., 2003a; CALICIOGLU et al., 2003b; PORTO-FETT et al., 2008; YOON et al., 2009).

Die Ergebnisse der hier vorliegenden Tenazitätsstudien zeigten für beide Pathogene deutliche Keimzahlreduktionen von mindestens zwei Zehnerpotenzen. Unterschiede in der Absterbekinetik ergaben sich dabei vor allem im Hinblick auf die eingesetzte Marinade. Dabei schien ein niedriger pH-Wert einen größeren bakteriziden Effekt zu besitzen als ein sehr niedriger a_W-Wert als einzige Hürde. So waren beide Pathogene in Senfmarinaden mit pH-Werten um 4,1 bis zu 14 Tage nachweisbar. In Ölmarinaden mit sehr niedrigem a_W-Wert (bis 0,20), wie den hier eingesetzten Kräuter-Würzölen, war dagegen ein Überleben bis zu 42 Tagen möglich. Dies könnte durch protektive Effekte aufgrund des hohen Öl-/Fettanteils bedingt sein (D´AOUST, 1994; JUNEJA et al., 2000; MURPHY et al., 2004). Da gerade diese Marinaden ohne Konservierungsstoffe und Schutzbegasung belassen werden, ist wegen der langen Überlebenszeit der hier untersuchten pathogenen Keime eine Kontamination der Rohware unbedingt zu vermeiden. Zwar fand bei beiden Keimen in allen Marinadenkategorien eine Reduktion der initialen Keimdosis von 10^4 KbE/g statt. Dennoch konnten gerade bei *L. monocytogenes* nach 42 Tagen in Kräutermarinaden noch Keimgehalte von 80 KbE/g detektiert werden, die bei Risikogruppen durchaus eine Erkrankung hervorrufen könnten.
Auffallend war weiterhin, dass beide Spezies in den drei Marinadenkategorien bei 22 °C Lagerungstemperatur ein schnelleres Absterben zeigten als bei 4 °C. Dieser Effekt wurde bereits in früheren Studien beschrieben und scheint auf temperaturbedingte Veränderungen der Membranfluidität und des Proteinstoffwechsels zurückzuführen zu sein (BENEY et al., 2001; HOLLIDAY et al., 2003; FRIEDMAN et al., 2007; BYELASHOV et al., 2009; PATHANIA et al., 2010).
Für die Inokulation wurde jeweils ein Pool aus drei pathogenen Stämmen verwendet, der aus einem Isolat aus mariniertem Fleisch, einem humanpathogenen Isolat und einem Referenz-

stamm bestand. Somit konnte überprüft werden, inwiefern milieuadaptierte Stämme einen selektiven Überlebensvorteil hatten und deshalb an der langen Überlebenszeit beteiligt waren. Es zeigte sich jedoch, dass auch die anderen, nicht-milieuadaptierten Stämme über längere Zeit in den Marinaden überlebten. So kamen auch ähnliche Studien mit Beef Jerky zu dem Ergebnis, dass milieuadaptierte Stämme nicht zwangsläufig einen Überlebensvorteil besitzen (CALICIOGLU et al., 2002; CALICIOGLU et al., 2003a). Im Falle von *L. monocytogenes* in Paprikamarinaden erwies sich sogar der humanpathogene 4b-Stamm als das Isolat mit der höchsten Tenazität. In Senfmarinaden war das Umweltisolat *L. monocytogenes* 1/2a bei beiden Lagerungstemperaturen am widerstandsfähigsten. Der Stamm *S*. Typhimurium, der zuvor aus marinierten Steaks mit Paprikamarinade isoliert wurde, zeigte in Senfmarinaden bei 4 °C Lagerungstemperatur eine deutlich höhere Überlebensrate als die anderen beiden Salmonellenteststämme (*S*. Choleraesuis und *S*. Enteritidis). Die Isolate scheinen also eine vom Marinadentyp abhängige Tenazität zu besitzen.
Inwieweit diese Beobachtungen auf die unterschiedlichen technologischen Eigenschaften der verwendeten Marinadenarten zurückgeführt werden können, sollte in weiterführenden Studien geklärt werden.
Die Ergebnisse der hier durchgeführten Tenazitätsstudie lassen sich nicht unmittelbar in die Praxis der Herstellung von marinierten Fleischprodukten übertragen, da durch das Einbringen der Matrix Fleisch Veränderungen im gesamten Milieu zu erwarten sind. Neben Pufferreaktionen und Neutralisationen von Fetten und Säuren (BJÖRKROTH, 2005) muss mit der Möglichkeit der Translokation von Keimen in das Fleischinnere gerechnet werden (WARSOW et al., 2008; VELASQUEZ et al., 2010). Das Ausmaß dieser Prozesse und die Abhängigkeit von Faktoren, wie z. B. Marinadenart und –menge, sollten in weiteren Studien untersucht werden.

Fasst man alle in dieser Studie ermittelten Resultate abschließend zusammen, ergeben sich diese Schlussfolgerungen:

Lebensmittelinfektionserreger (*Salmonella* spp., STEC, *L. monocytogenes, St. aureus, B. cereus*, sulfitreduzierende Clostridien) waren in mariniertem Schweinefleisch sowohl zum Zeitpunkt des Erwerbs als auch am Ende des MHD nachweisbar. Dennoch ist bei den festgestellten Keimzahlen von 10^2 KbE/g bei bestimmungsgemäßem Verzehr dieser Lebensmittel nicht von einer direkten Verbrauchergefährdung auszugehen. Saisonale Effekte bedingt durch Witterung und Kaufverhalten der Verbraucher scheinen keinen nennenswerten Einfluss auf die mikrobiologische Qualität des marinierten Grillfleisches zu haben.
65 % der *St. aureus*- Isolate und 98 % der *B. cereus*-Isolate wiesen ein toxinogenes Potential auf. Für klinisch manifeste Erkrankungen beim Verbraucher sind jedoch Keimzahlen von 10^5-10^6 KbE/g nötig, die hier nicht erreicht wurden. Solche Keimvermehrungen wären nur bei unsachgemäßer Lagerung, wie z. B. bei Kühlkettenunterbrechung, vorstellbar.

Marinaden wirken über einen niedrigen pH-Wert stärker bakterizid als über einen niedrigen a_W-Wert bei sehr hohen Ölanteilen; dennoch werden dadurch pathogene Keime im Rahmen handelsüblicher Restlaufzeiten nicht sicher eliminiert.

Da Lebensmittelinfektionserreger trotz Marinierung im Fleisch nachweisbar sind, sind die Einhaltung der Kühlkette und eine möglichst kurze Lagerung bis zum Verzehr von Bedeutung.

Basierend auf den Ergebnissen dieser Studie werden die unter Punkt 4.4 dargestellten Empfehlungen für mikrobiologische Richtwerte für vorverpackte, marinierte Schweinenackensteaks bis zum Ende des MHD vorgeschlagen. Hinsichtlich des Vorkommens von pathogenen Keimen in diesen Produkten erscheint auch eine MHD-Frist von 18 Tagen vertretbar.

Allerdings wurden in der vorliegenden Arbeit Gesamtkeimzahlen von über 10^7 KbE/g, Milchsäurebakterienzahlen über 10^6 KbE/g und Enterobakteriaceengehalte von über 10^4 KbE/g am Ende des MHD ermittelt. Solche Keimzahlen korrelieren häufig bereits mit ersten Verderbnisanzeichen (BLIXT et al., 2002; HOLLEY et al., 2004). Demnach sollte die MHD-Frist auf maximal 7-10 Tagen begrenzt werden. Die Marinierung scheint die Haltbarkeit von Schweinenackensteaks nicht zu verlängern. Ab wann Verderbsprozesse einsetzen und die Produkte für den Verbraucher inakzeptabel machen, müsste in weiteren Studien unter Einbezug sensorischer Parameter eruiert werden. Dies erscheint auch vor dem Hintergrund einer möglichen Verbrauchertäuschung durch eine Maskierung von beginnendem Verderb durch geschmacksintensive Marinierung bedeutungsvoll.

6 Zusammenfassung

Clien Schönheit

Untersuchungen zur mikrobiologischen Sicherheit von marinierten, vorverpackten Schweinefleischzubereitungen

Institut für Lebensmittelhygiene der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig

Eingereicht im Juni 2011

101 S., 23 Abb., 47 Tab., 432 Lit., Anhang (3 Tab.)

Schlüsselwörter: Marinade, mariniertes Fleisch, Schweinenackensteaks, Convenience

Gegenwärtig erlangen marinierte, vorverpackte Schweinefleischzubereitungen als typisches Convenience-Produkt eine zunehmende Marktbedeutung. Dem stehen allerdings wenig repräsentative Daten zur mikrobiologischen Sicherheit und Haltbarkeit dieser Produkte gegenüber.
Ziel dieser Arbeit war es daher, im Interesse eines hohen Verbraucherschutzniveaus fundierte Daten über das Vorkommen und die Überlebensfähigkeit pathogener und toxinogener Mikroorganismen in vorverpackten marinierten Schweinefleischzubereitungen zu gewinnen. Darauf basierend sollten Empfehlungen für produktspezifische mikrobiologische Kriterien und Mindesthaltbarkeitsfristen abgeleitet werden.

Während der Grillsaison der Jahre 2008 und 2009 wurden hierfür zwei Marktstudien über marinierte, vorverpackte Schweinenackensteaks (jeweils n=150) aus dem lokalen SB-Handel durchgeführt. Dabei erfolgte aufgrund der großen Produktvielfalt eine Einteilung der Produkte in Nackensteaks mit Senf-/Biermarinaden, Paprikamarinaden und Kräutermarinaden. Bei der Untersuchung wurden der pH-Wert, der mikrobiologische Status und das Vorkommen von verschiedenen pathogenen Keimen jeweils zum Zeitpunkt des Erwerbs und am Ende des MHD erfasst. Zudem wurden je Produktgruppe 10 für die industrielle Herstellung dieser Fleischzubereitungen verwendeten Flüssigmarinaden (n=30) mikrobiologisch auf die gleichen Parameter untersucht sowie pH- und a_W-Werte in den Marinaden bestimmt. Auf Grundlage der Ergebnisse der Marktstudien wurde darüber hinaus die Überlebensfähigkeit von *Salmonella* spp. und *Listeria monocytogenes* in artifiziell kontaminierten Flüssigmarinaden jeder Kategorie während einer Lagerung für 42 Tage bei 4 und 22 °C überprüft.

Die Gesamtkeimzahlen in den marinierten Schweinfleischsteaks lagen in einem Bereich von 2,8 x 10^3 bis 9,7 x 10^8 KbE/g, die Anzahl der Milchsäurebakterien zwischen 10 und 9,5 x 10^8 KbE/g und die der *Enterobacteriaceae* zwischen < 10 und 3,6 x 10^8 KbE/g. Bis zum Ende des MHD

fand ein Anstieg der Gesamtkeimzahl und der Milchsäurebakterien bei gleichzeitigem pH-Wert-Abfall statt. Vermehrungsfähige Salmonellen wurden in 6 von 300 Proben (2,0 %) und Shigatoxin bildende *Escherichia coli* in 7 von 300 Proben (2,3 %) nachgewiesen. In 5 Proben (1,7 %) wurde *Listeria monocytogenes* mit bis zu 95 KbE/g und in 25 Proben (8,3 %) *Staphylococcus aureus* mit Keimzahlen bis 340 KbE/g detektiert. *Bacillus cer*eus wurde in 64 Handelsproben (21,3 %) mit Keimzahlen bis zu 450 KbE/g und sulfitreduzierende Clostridien in 73 marinierten Schweinenackensteaks (24,3 %) mit Werten bis 500 KbE/g gefunden.

Die Untersuchung der Flüssigmarinaden der drei Kategorien (n=30) erbrachte Gesamtkeimzahlen von 1,3 x 10^2 bis 4,2 x 10^5. *Enterobacteriaceae* und Milchsäurebakterien wurden jeweils nur in zwei Marinadenproben mit bis zu 180 bzw. 750 KbE/g nachgewiesen. Keine der Marinaden enthielt Salmonellen, Shigatoxin bildende *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* oder *Staphylococcus aureus*. Positive Befunde wurden nur für *Bacillus cereus* und sulfitreduzierende Clostridien erhoben: 16 Proben (53,3 %) enthielten *Bacillus cereus* mit Keimzahlen von bis zu 230 KbE/g und 14 Proben (46,7 %) sulfitreduzierende Clostridien mit maximalen Keimzahlen von 120 KbE/g. Die a_W-Werte der Marinaden variierten zwischen 0,2 und 0,94, die pH-Werte zwischen 3,57 und 6,53.

Bei den Tenazitätsstudien in Marinaden wurde eine kontinuierliche Keimreduktion für beide Pathogene festgestellt: Sowohl *L. monocytogenes* als auch *Salmonella* spp. zeigten in Senfmarinaden sowie bei 22 °C Lagerungstemperatur eine deutlichere Absterbekinetik als in Paprika- bzw. Kräutermarinaden und bei 4 °C Lagerungstemperatur.

Basierend auf den Ergebnissen dieser Arbeit können vorverpackte, marinierte Schweinenackensteaks auch nach MHD-Fristen von 18 Tagen als lebensmittelhygienisch sicher beurteilt werden. Allerdings können Lebensmittelinfektionserreger in den Produkten vorkommen und zum Teil bis zum Ende des MHD überleben. Im Hinblick auf den vorbeugenden Verbraucherschutz können folgende Empfehlungen für mikrobiologische Richtwerte von marinierten Schweinenackensteaks abgeleitet werden:

Salmonellen:	nicht nachweisbar in 25 g
STEC:	nicht nachweisbar in 25 g
L. monocytogenes:	< 10^2 KbE/g
St. aureus:	1,0 x 10^2 KbE/g
B. cereus:	1,0 x 10^4 KbE/g
Sulfitreduzierende Clostridien:	1,0 x 10^4 KbE/g

Aufgrund von teils starken Zunahmen der Gesamtkeimzahl und der Keimzahlen von Milchsäurebakterien und *Enterobacteriaceae* sollte die MHD-Frist auf maximal 7-10 Tage beschränkt werden, um eine mikrobiologisch annehmbare Qualität für den Verbraucher garantieren zu können. Bei der Zubereitung sollte auf eine Vermeidung von Kreuzkontaminationen und vor dem Verzehr auf eine vollständige Durcherhitzung geachtet werden.

7 Summary

Clien Schönheit

Investigations on the microbial safety of marinated, prepacked pork preparations

Institute of Food Hygiene, Faculty of Veterinary Medicine, University of Leipzig

Submitted in June 2011

101 pp., 23 fig., 47 tables, 432 ref., app. (3 tables)

Keywords: marinade, marinated meat, pork collar steaks, convenience

Prepacked and marinated pork preparations as typical convenience food have recently gained an increased market share. However, little efforts were made in terms of research to determine reliable data on microbiological safety in conjunction with shelf life.
The aim of the study was to acquire data of the prevalence and survivability of pathogenic and toxinogenic microorganisms in prepacked and marinated pork preparations on behalf of consumer protection. Based on these data, recommendations for guidelines concerning microbial quality and shelf life should be derived.

In both 2008 and 2009 two studies were conducted with samples (150 samples each year, 300 samples in total) of prepacked and marinated pork collar steaks out of retail grocery. Because of the variety of products the steaks were classified into pork steaks with mustard/beer flavoured marination, paprika marination and herb/garlic marination. All samples were analyzed for pH-value, the microbial status and the occurrence of foodborne pathogens at the date of purchase and at the end of shelf life. Additionally, the same parameters including the water activity (a_W) were examined in the sole marinades (10 samples each respective class, 30 samples in total) which are used in the production of these pork collar steaks. Based on these results the survival of *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* was monitored in artificially contaminated marinades of the three respective classes during 42 day-storage at 4 degree Celsius and 22 degree Celsius.

In marinated pork collar steaks aerobic colony counts ranged between 2,8 x 10^3 and 9,7 x 10^8 cfu/g. Lactic acid bacteria were present at 10 to 9,5 x 10^8 cfu/g and *Enterobacteriaceae* were present at < 10 to 3,6 x 10^8 cfu/g. Culturable *Salmonellae* were detected in 6 out of 300 samples (2.0 %) and Shigatoxin-producing *Escherichia coli* in 7 out of 300 samples (2.3 %). 5 samples (1.7 %) contained *Listeria monocytogenes* up to 95 cfu/g and 25 samples (8.3 %) con-

tained *Staphylococcus aureus* in counts up to 340 cfu/g. *Bacillus cereus* was found in 64 retail samples (21.3 %) in counts up to 450 cfu/g and sulfite reducing clostridia were found in 73 marinated products (24.3 %) in counts up to 500 cfu/g.

The aerobic germ counts in marinades of the three classes (n=30) varied between 1,3 x 10^2 and 4,2 x 10^5 cfu/g. *Enterobactericeae* and lactic acid bacteria were detected each in only two samples of marinade with counts up to 180 and 750 cfu/g, respectively. Until the end of shelf life, an increase of numbers of total aerobic bacteria and lactic acid bacteria with a simultaneous decrease of pH could be observed. None of the samples contained any *Salmonellae*, Shigatoxin-producing *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* or *Staphylococcus aureus.* Only *Bacillus cereus* and sulfite reducing clostridia could be detected: 16 samples (53.3 %) contained *Bacillus cereus* up to 230 cfu/g and 14 samples (46.7 %) contained sulfite reducing clostridia with numbers up to 120 cfu/g. The water activity (a_W) in marinades varied between 0,2 and 0,94. The pH value ranged between 3,57 and 6,53.

The challenge study of marinades showed a continuous decline of numbers of the two pathogens within a period of 42 days. Both *Salmonellae* and *L. monocytogenes* died faster in mustard marinade than in paprika and herb marinade and the decrease was more distinct and faster at a storage temperature of 22 degree Celsius than at 4 degree Celsius.

Based on the results of this study prepacked marinated pork collar steaks can be classified as safe in terms of food hygiene, also with a shelf life of 18 days. Nevertheless, foodborne pathogens could be present in these products and could possibly survive until the end of shelf life.
With regard to preventative consumer protection these recommendations for microbial guidelines of prepacked and marinated pork collar steaks can be derived:

Salmonellae:	not detectable in 25 g
STEC:	not detectable in 25 g
L. monocytogenes:	< 10^2 cfu/g
St. aureus:	1,0 x 10^2 cfu/g
B. cereus:	1,0 x 10^4 cfu/g
Sulfite reducing clostridia:	1,0 x 10^4 cfu/g

Because of increasing total aerobic cell counts and counts of lactic acid bacteria and *Enterobacteriaceae*, the date of shelf life should be restricted to maximum 7 to 10 days in order to guarantee acceptable microbiological quality for consumers.
For final consumption the avoidance of cross-contamination and the necessity of thorough cooking before consumption should be minded.

8 Literaturverzeichnis

Acheson DWK. How does *Escherichia coli* O157:H7 testing in meat compare with what we are seeing clinically? Journal of Food Protection 2000;63(6):819-21.

Agata N, Ohta M, Arakawa Y, Mori M. The *bcet* gene of *Bacillus cereus* encodes an enterotoxic protein. Microbiology-Uk 1995a;141:983-8.

Agata N, Ohta M, Mori M, Isobe M. A novel dodecadepsipeptide, cereulide, is an emetic toxin of *Bacillus cereus*. Fems Microbiology Letters 1995b;129(1):17-9.

Aguilera MO, Stagnitta PV, Micalizzi B, de Guzman AMS. Prevalence and characterization of *Clostridium perfringens* from spices in Argentina. Anaerobe 2005;11(6):327-34.

Aktas N, Kaya M. The influence of marinating with weak organic acids and salts on the intramuscular connective tissue and sensory properties of beef. European Food Research and Technology 2001;213(2):88-94.

Albert MJ, Faruque SM, Ansaruzzaman M, Islam MM, Haider K, Alam K, et al. Sharing of virulence-associated properties at the phenotypic and genetic levels between enteropathogenic *Escherichia coli* and *Hafnia alvei*. Journal of Medical Microbiology 1992;37(5):310-4.

Altayar M, Sutherland AD. *Bacillus cereus* is common in the environment but emetic toxin producing isolates are rare. Journal of Applied Microbiology 2006;100(1):7-14.

Andersen Borge GI, Skeie M, Sorhaug T, Langsrud T, Granum PE. Growth and toxin profiles of *Bacillus cereus* isolated from different food sources. International Journal of Food Microbiology 2001;69(3):237-46.

Andersson A, Ronner U, Granum PE. What problems does the food industry have with the spore-forming pathogens *Bacillus cereus* and *Clostridium perfringens*? International Journal of Food Microbiology 1995;28(2):145-55.

Angelotti R, Hall HE, Lewis KH, Foter MJ. Quantitation of *Clostridium Perfringens* in Foods. Applied Microbiology 1962;10(3):193-8.

Anon. Marktpotenziale für Convenience-Produkte in Deutschland (zitiert vom 12.12.2008). Zentrale Markt- und Preisberichtsstelle für Erzeugnisse der Land-,Forst- und Ernährungswirtschaft GmbH (ZMP) in Zusammenarbeit mit CMA,Centrale Marketinggesellschaft der deutschen Agrarwirtschaft mbH; 2002. Report No.: ZMP 7/2002.

Anon. ZMP-Rohdatenanalyse auf Basis des ZMP-Haushaltspanels (zitiert vom 12.12.2008). Zentrale Markt und Preisberichtsstelle für Erzeugnisse der Land-,Forst- und Ernährungswirtschaft GmbH (ZMP); 2007. Report No.: ZMP 223/2007.

Anon. Grundlagenstudie zur Erhebung der Prävalenz von Salmonellen in Mastschweinen. Bericht vom 20.02.2008 (zitiert vom 28.10.2010). http://www.bfr.bund.de/cm/208/grundlagenstudie_zur_erhebung_der_praevalenz_von_salmonellen_in_mastschweinen.pdf: Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR); 2008a.

Anon. Ratgeber Infektionskrankheiten - Merkblätter für Ärzte. Erkrankungen durch Enterohämorrhagische *E. coli* (EHEC) (zitiert vom 14.10.2010). http://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Merkblaetter/Ratgeber__Mbl__EHEC.html: Robert-Koch-Institut (RKI); 2008b.

Anon. Schwein gehabt. Stiftung Warentest 2008c;7:18-23.

Anon. Ratgeber Infektionskrankheiten - Merkblätter für Ärzte. Salmonellose (Salmonellen-Gastro-Enteritis) (zitiert vom 14.10.2010). http://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Merkblaetter/Ratgeber__Mbl__Salmonellose.html: Robert-Koch-Institut (RKI); 2009a.

Anon. Was kaufen die Deutschen zum Grillen ein? Allgemeine Fleischerzeitung afz 2009b;39:13.

Anon. An Krankheitsausbrüchen beteiligte Lebensmittel in Deutschland im Jahr 2009, Information Nr. 033/2010 (zitiert vom 28.10.2010). http://www.bfr.bund.de/cm/208/an_krankheitsausbruechen_beteiligte_lebensmittel_in_deutschland_im_jahr_2009.pdf: Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR); 2010a.

Anon. Erreger von Zoonosen in Deutschland im Jahr 2008. BfR-Wissenschaft 06/2010 (zitiert vom 28.10.2010). http://www.bfr.bund.de/cm/238/erreger_von_zoonosen_in_deutschland_im_jahr_2008.pdf: Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR); 2010b.

Anon. Infektionsepidemiologisches Jahrbuch meldepflichtiger Krankheiten für 2009 (Stand:1.3.2010) (zitiert vom 28.10.2010). http://www.rki.de/DE/Content/Infekt/Jahrbuch/Jahrbuch__2009,templateId=raw,property=publicationFile.pdf/Jahrbuch_2009.pdf: Robert-Koch-Institut (RKI); 2010c.

Anon. Ratgeber Infektionskrankheiten - Merkblätter für Ärzte. Listeriose (zitiert vom 14.10.2010).http://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Merkblaetter/Ratgeber__Mbl__Listeriose.html: Robert-Koch-Institut (RKI); 2010d.

Argudin MA, Mendoza M, Rodicio M. Food poisoning and *Staphylococcus aureus* enterotoxins. Toxins 2010;2(7):1751-73.

Asano S, Nukumizu Y, Bando H, Iizuka T, Yamamoto T. Cloning of novel enterotoxin genes from *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis*. Applied and Environmental Microbiology 1997;63(3):1054-7.

Atanassova V, Meindl A, Ring C. Prevalence of *Staphylococcus aureus* and staphylococcal enterotoxins in raw pork and uncooked smoked ham—a comparison of classical culturing detection and RFLP-PCR. International Journal of Food Microbiology 2001;68(1-2):105-13.

Aureli P, Fiorucci GC, Caroli D, Marchiaro G, Novara O, Leone L, et al. An outbreak of febrile gastroenteritis associated with corn contaminated by *Listeria monocytogenes*. New England Journal of Medicine 2000;342(17):1236-41.

Autio T, Markkula A, Hellstrom S, Niskanen T, Lunden J, Korkeala H. Prevalence and genetic diversity of *Listeria monocytogenes* in the tonsils of pigs. Journal of Food Protection 2004;67(4):805-8.

Baddour MM, AbuElKheir MM, Fatani AJ. Comparison of mecA polymerase chain reaction with phenotypic methods for the detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Current Microbiology 2007;55(6):473-9.

Balaban N, Rasooly A. Staphylococcal enterotoxins. International Journal of Food Microbiology 2000;61(1):1-10.

Baljer G, Wieler LH. Animals as a source of infections for humans - diseases caused by EHEC. Deutsche Tierärztliche Wochenschrift 1999;106(8):339-43.

Banerjee M, Sarkar PK. Microbiological quality of some retail spices in India. Food Research International 2003;36(5):469-74.

Bania J, Dabrowska A, Korzekwa K, Zarczynska A, Bystron J, Chrzanowska J, et al. The profiles of enterotoxin genes in *Staphylococcus aureus* from nasal carriers. Letters in Applied Microbiology 2006;42(4):315-20.

Bauerfeind R, Barth S, Tscholchiew A, Vallejo G, Weiß R. Nachweis und Charakterisierung von Shigatoxin-bildenden *Escherichia coli* bei Zucht- und Mastschweinen in Deutschland. 2004. Report No.: Tagungsband I. EHEC-Workshop 2004. Wildbad Kreuth, 22.-24. Juli 2004.

Baumgart J, Bockemühl J, Lehmacher A. Nachweis von pathogenen und toxinogenen Mikroorganismen. In: Baumgart J, Becker B, editors. Mikrobiologische Untersuchung von Lebensmitteln. Grundwerk 1994, 45. Aktualisierungslieferung 05/2009 ed. Hamburg: Behr´s Verlag; 2009.

Beauchamp CS, Byelashov O, Geornaras I, Kendall PA, Scanga J, Belk KE, et al. Fate of *Listeria monocytogenes* during freezing, thawing and home storage of frankfurters. Food Microbiology 2010;27(1):144-9.

Becker H, Burk C, Märtlbauer E. *Staphylococcus* enterotoxins: Formation, characteristics and detection. Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit - Journal of Consumer Protection and Food Safety 2007;2(2):171-89.

Becker H, Schaller G, Farouq M, Märtlbauer E. Detection of some types of pathogenic microorganisms in food using commercially available testkits. Part 2: Detection of *Listeria*. Archiv für Lebensmittelhygiene 1998;49(2):30-4.

Beckmann G, Koszegi D, Sonnenschein B, Leimbeck R. On the microbial status of herbs and spices. Fleischwirtschaft 1996;76(3):240-3.

Bedi S, Sharma C, Gill J, Aulakh R, Sharma J. *Bacillus cereus* in meat and meat products: isolation, enumeration and enterotoxigenicity. Journal of Veterinary Public Health 2004;2(1/2).

Beecher DJ, Macmillan JD. A novel bicomponent hemolysin from *Bacillus cereus*. Infection and Immunity 1990;58(7):2220-7.

Beney L, Gervais P. Influence of the fluidity of the membrane on the response of microorganisms to environmental stresses. Applied Microbiology and Biotechnology 2001;57(1-2):34-42.

Bennett RW. Staphylococcal enterotoxin and its rapid identification in foods by enzyme-linked immunosorbent assay-based methodology. Journal of Food Protection 2005;68(6):1264-70.

Betley MJ, Borst DW, Regassa LB. Staphylococcal enterotoxins, toxic shock syndrome toxin and streptococcal pyrogenic exotoxins: a comparative study of their molecular biology. Chemical Immunology 1992;55:1-35.

Betriu C, Fuentemilla S, Mendez R, Picazo JJ, Garcia-Sanchez J. Endophthalmitis caused by *Listeria monocytogenes*. Journal of Clinical Microbiology 2001;39(7):2742-4.

Bettelheim KA. Development of a rapid method for the detection of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC). Letters in Applied Microbiology 2001;33(1):31-5.

Bettelheim KA. The non-O157 shiga-toxigenic (verocytotoxigenic) *Escherichia coli*; under-rated pathogens. Critical Reviews in Microbiology 2007;33(1):67-87.

Beutin L, Miko A, Krause G, Pries K, Haby S, Steege K, et al. Identification of human-pathogenic strains of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* from food by a combination of serotyping and molecular typing of Shiga toxin genes. Applied and Environmental Microbiology 2007;73(15):4769-75.

Beutin L, Niemer U. Erkennung, Verhütung und Bekämpfung von Infektionen durch enterohämorrhagische *E. coli* (EHEC). Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforschung - Gesundheitsschutz 1995;38(11):422-7.

Beutling D, Böttcher C. *Bacillus cereus* - a risk factor in foods. Archiv für Lebensmittelhygiene 1998;49(4-5):90-6.

Bhagwat AA, Chan L, Han R, Tan J, Kothary M, Jean-Gilles J, et al. Characterization of enterohemorrhagic *Escherichia coli* strains based on acid resistance phenotypes. Infection and Immunity 2005;73(8):4993-5003.

Bidet P, Mariani-Kurkdjian P, Grimont F, Brahimi N, Courroux C, Grimont P, et al. Characterization of *Escherichia coli* O157:H7 isolates causing haemolytic uraemic syndrome in France. Journal of Medical Microbiology 2005;54(1):71-5.

Birk T, Knochel S. Fate of food-associated bacteria in pork as affected by marinade, temperature, and ultrasound. Journal of Food Protection 2009;72(3):549-55.

Björkroth J. Microbiological ecology of marinated meat products. Meat Science 2005;70(3):477-80.

Blaha T. MRSA for pigs "equal" seriously taken. Fleischwirtschaft 2008;88(2):8-12.

Blixt Y, Borch E. Comparison of shelf life of vacuum-packed pork and beef. Meat Science 2002;60(4):371-8.

Bockemühl J, Karch H. Zur aktuellen Bedeutung der enterohämorrhagischen *Escherichia coli* (EHEC) in Deutschland. Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforschung - Gesundheitsschutz 1996;39.

Boerlin P, Piffaretti JC. Typing of human, animal, food and environmental isolates of *Listeria monocytogenes* by Multilocus Enzyme Electrophoresis. Applied and Environmental Microbiology 1991;57(6):1624-9.

Boers RH, Dijkmann KE, Wijngaards G. Shelf-Life of vacuum-packaged wild boar meat in relation to that of vacuum-packaged pork - relevance of intrinsic-factors. Meat Science 1994;37(1):91-102.

Bohaychuk VM, Gensler GE, King RK, Manninen KI, Sorensen O, Wu JT, et al. Occurrence of pathogens in raw and ready-to-eat meat and poultry products collected from the retail marketplace in Edmonton, Alberta, Canada. Journal of Food Protection 2006;69(9):2176-82.

Borch E, KantMuermans ML, Blixt Y. Bacterial spoilage of meat and cured meat products. International Journal of Food Microbiology 1996;33(1):103-20.

Borucki MK, Peppin JD, White D, Loge F, Call DR. Variation in biofilm formation among strains of *Listeria monocytogenes*. Applied and Environmental Microbiology 2003;69(12):7336-42.

Botteldoorn N, Heyndrickx M, Rijpens N, Grijspeerdt K, Herman L. *Salmonella* on pig carcasses: positive pigs and cross contamination in the slaughterhouse. Journal of Applied Microbiology 2003;95(5):891-903.

Boubaker IBB, Ben Abbes R, Ben Abdallah H, Mamlouk K, Mahjoubi F, Kammoun A, et al. Evaluation of a cefoxitin disk diffusion test for the routine detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Clinical Microbiology and Infection 2004;10(8):762-5.

Bouvet J, Montet MP, Rossel R, Le Roux A, Bavai C, Ray-Gueniot S, et al. Prevalence of verotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC) and *E-coli* O157 : H7 in French pork. Journal of Applied Microbiology 2002;93(1):7-14.

Brey NS. Monitoring von zwei fleischverarbeitenden Betrieben auf EHEC/VTEC durch Untersuchung von Umgebungstupfern und Stuhlproben. Dissertation vet. med., Ludwig-Maximilians-Universität München; 1998.

Broekema NM, Van TT, Monson TA, Marshall SA, Warshauer DM. Comparison of Cefoxitin and Oxacillin disk diffusion methods for detection of mecA-mediated resistance in *Staphylococcus aureus* in a large-scale study. Journal of Clinical Microbiology 2009;47(1):217-9.

Brooks HJ, Mollison BD, Bettelheim KA, Matejka K, Paterson KA, Ward VA. Occurrence and virulence factors of non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in retail meat in Dunedin, New Zealand. Letters in Applied Microbiology 2001;32:118-22.

Brown MR, Smith AW, Barker J, Humphrey TJ, Dixon B. *Escherichia coli* persistance in the environment. Microbiology 2002;148:1-2.

Browne N, Dowds BCA. Heat and salt stress in the food pathogen *Bacillus cereus*. Journal of Applied Microbiology 2001;91(6):1085-94.

Brynestad S, Granum PE. *Clostridium perfringens* and foodborne infections. International Journal of Food Microbiology 2002;74(3):195-202.

Buchwald DS, Blaser MJ. A review of human salmonellosis. 2. Duration of excretion following infection with nontyphi *Salmonella*. Reviews of Infectious Diseases 1984;6(3):345-56.

Bülte M. Infections by enterohaemorrhagic *E. coli* (EHEC) strains - veterinary aspects. Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforschung - Gesundheitsschutz 2002;45(6):484-90.

Bülte M. Enterovirulente *Escherichia coli* (EVEC). In: Fehlhaber K, Kleer J, Kley F, editors. Handbuch Lebensmittelhygiene. 1. Aktualisierungslieferung Juli 2005 ed. Hamburg: Behr´s Verlag; 2005. p. 18-23.

Burow H, Weber A, Patel J. Detection of *Listeria* spp. in faecal samples of farm animals and in food samples of animal origin. Fleischwirtschaft 1996;76(7):745-8.

Busani L, Cigliano A, Taioli E, Caligiuri V, Chiavacci L, Di Bella C, et al. Prevalence of *Salmonella enterica* and *Listeria monocytogenes* contamination in foods of animal origin in Italy. Journal of Food Protection 2005;68(8):1729-33.

Buses H, Thompson L. Dip application of phosphates and marinade mix on shelf life of vacuum-packaged chicken breast fillets. Journal of Food Protection 2003;66(9):1701-3.

Byelashov O, Carlson B, Geornaras I, Kendall P, Scanga J, Sofos J. Fate of post-processing inoculated *Listeria monocytogenes* on vacuum-packaged pepperoni stored at 4, 12 or 25° C. Food Microbiology 2009;26(1):77-81.

Byrne B, Dunne G, Bolton DJ. Thermal inactivation of *Bacillus cereus* and *Clostridium perfringens* vegetative cells and spores in pork luncheon roll. Food Microbiology 2006;23(8):803-8.

Calicioglu M, Sofos JN, Kendall PA. Influence of marinades on survival during storage of acid-adapted and nonadapted *Listeria monocytogenes* inoculated post-drying on beef jerky. International Journal of Food Microbiology 2003a;86(3):283-92.

Calicioglu M, Sofos JN, Samelis J, Kendall PA, Smith GC. Inactivation of acid-adapted and nonadapted *Escherichia coli* O157:H7 during drying and storage of beef jerky treated with different marinades. Journal of Food Protection 2002;65(9):1394-405.

Calicioglu M, Sofos JN, Samelis J, Kendall PA, Smith GC. Effect of acid adaptation on inactivation of *Salmonella* during drying and storage of beef jerky treated with marinades. International Journal of Food Microbiology 2003b;89(1):51-65.

Cannon JE, Mckeith FK, Martin SE, Novakofski J, Carr TR. Acceptability and shelf life of marinated fresh and precooked pork. Journal of Food Science 1993;58(6):1249-53.

Caprioli A, Morabito S, Brugere H, Oswald E. Enterohaemorrhagic *Escherichia coli*: emerging issues on virulence and modes of transmission. Veterinary Research 2005;36(3):289-311.

Carlin F, Fricker M, Pielaat A, Heisterkamp S, Shaheen R, Salonen MS, et al. Emetic toxin-producing strains of *Bacillus cereus* show distinct characteristics within the *Bacillus cereus* group. International Journal of Food Microbiology 2006;109:132-8.

Carlin F, Girardin H, Peck MW, Stringer SC, Barker GC, Martinez A, et al. Research on factors allowing a risk assessment of spore-forming pathogenic bacteria in cooked chilled foods containing vegetables: a FAIR collaborative project. International Journal of Food Microbiology 2000;60(2-3):117-35.

Carpentier B, Cerf O. Biofilms and their consequences, with particular reference to hygiene in the food industry. Journal of Applied Bacteriology 1993;75(6):499-511.

Casarin LS, Tondo EC, Klein MP, Brandelli A. Survival of *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Salmonella* Enteritidis in frozen chicken hamburger. Journal of Muscle Foods 2009;20(4):478-88.

Cebula TA, Payne WL, Feng P. Simultaneous identification of strains of *Escherichia coli* serotype O157:H7 and their Shiga-like toxin type by mismatch amplification mutation assay-multiplex PCR. Journal of Clinical Microbiology 1995;33(1):248-50.

Cha JO, Lee JK, Jung YH, Yoo JI, Park YK, Kim BS, et al. Molecular analysis of *Staphylococcus aureus* isolates associated with staphylococcal food poisoning in South Korea. Journal of Applied Microbiology 2006;101(4):864-71.

Chambers HF. Methicillin resistance in staphylococci: Molecular and biochemical basis and clinical implications. Clinical Microbiology Reviews 1997;10(4):781-&.

Chan YC, Wiedmann M. Physiology and genetics of *Listeria monocytogenes* survival and growth at cold temperatures. Critical Reviews in Food Science and Nutrition 2009;49(3):237-53.

Chapman PA. Verotoxin-producing *Escherichia coli:* an overview with emphasis on the epidemiology and prospects for control of *E. coli* O157. Food Control 1995;6:187-93.

Chiang YC, Liao WW, Fan CM, Pai WY, Chiou CS, Tsen HY. PCR detection of staphylococcal enterotoxins (SEs) N, O, P, Q, R, U, Y and survey of SE types in *Staphylococcus aureus* isolates from food-poisoning cases in Taiwan. International Journal of Food Microbiology 2008;121(1):66-73.

Chokesajjawatee N, Pornaem S, Zo YG, Kamdee S, Luxananil P, Wanasen S, et al. Incidence of *Staphylococcus aureus* and associated risk factors in Nham, a Thai fermented pork product. Food Microbiology 2009;26(5):547-51.

Choma C, Granum PE. The enterotoxin T (BcET) from *Bacillus cereus* can probably not contribute to food poisoning. Fems Microbiology Letters 2002;217(1):115-9.

Chung HJ, Bang W, Drake MA. Stress response of *Escherichia coli*. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety 2006;5(3):52-64.

Conraths FJ. Zoonosen der Nutz- und Wildtiere und ihre Bedeutung in Deutschland. Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforschung - Gesundheitsschutz 2004;47(7):633-46.

Davies S, McIntyre SM, Mckinven A. Evaluation of a new *Staphylococcus aureus* latex agglutination kit, Prolex Staph Xtra, against other third-generation kits. British Journal of Biomedical Science 2008;65(3):142-4.

de Boer E, Zwartkruis-Nahuis JTM, Wit B, Huijsdens XW, de Neeling AJ, Bosch T, et al. Prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in meat. International Journal of Food Microbiology 2009;134(1-2):52-6.

de Jong AEI, Rombouts FM, Beumer RR. Behavior of *Clostridium perfringens* at low temperatures. International Journal of Food Microbiology 2004;97(1):71-80.

De Martinis ECP, Franco BDGM. Inhibition of *Listeria monocytogenes* in a pork product by a *Lactobacillus sake* strain. International Journal of Food Microbiology 1998;42(1-2):119-26.

De Medici D, Croci L, Delibato E, Di Pasquale S, Filetici E, Toti L. Evaluation of DNA extraction methods for use in combination with SYBR Green I Real-Time PCR to detect *Salmonella enterica* Serotype Enteritidis in poultry. Applied and Environmental Microbiology 2003;69(6):3456-61.

de Valk H, Valliant V, Jacquet C, Rocourt J, Le Querrec F, Stainer F, et al. Two consecutive nationwide outbreaks of listeriosis in France, October 1999-February 2000. American Journal of Epidemiology 2001;154(10):944-50.

Deng Z, Li X, Li C, Zhang J, Zhang X, Pang X, et al. Identification and genotyping of *Clostridium perfringens* isolated from the food samples. Journal of Tropical Medicine (Guangzhou) 2006;6(6).

Denny J, McLauchlin J. Human *Listeria monocytogenes* infections in Europe - an opportunity for improved European surveillance. Eurosurveillance 2008;13(13):32-6.

Dierick K, Van Coillie E, Swiecicka I, Meyfroidt G, Devlieger H, Meulemans A, et al. Fatal family outbreak of *Bacillus cereus*-associated food poisoning. Journal of Clinical Microbiology 2005;43(8):4277-9.

Dietrich R, Moravek M, Burk C, Granum PE, Märtlbauer E. Production and characterization of antibodies against each of the three subunits of the *Bacillus cereus* nonhemolytic enterotoxin complex. Applied and Environmental Microbiology 2005;71(12):8214-20.

Do Carmo LS, Cummings C, Linardi VR, Dias RS, De Souza JM, De Sena MJ, et al. A case study of a massive staphylococcal food poisoning incident. Foodborne Pathogens and Disease 2004;1(4):241-6.

Doganay M. Listeriosis: clinical presentation. Fems Immunology and Medical Microbiology 2003;35(3):173-5.

Dominguez SA, Schaffner DW. Survival of *Salmonella* in processed chicken products during frozen storage. Journal of Food Protection 2009;72(10):2088-92.

Doumith M, Buchrieser C, Glaser P, Jacquet C, Martin P. Differentiation of the major *Listeria monocytogenes* serovars by multiplex PCR. Journal of Clinical Microbiology 2004;42(8):3819-22.

Duffy EA, Belk KE, Sofos JN, Bellinger GR, Pape A, Smith GC. Extent of microbial contamination in United States pork retail products. Journal of Food Protection 2001;64(2):172-8.

D´Aoust JY. *Salmonella* and the International Food Trade. International Journal of Food Microbiology 1994;24(1-2):11-31.

D´Aoust JY. *Salmonella* species. In: Doyle MP, Beuchat LR, Montville TJ, editors. Food Microbiology - Fundamentals and Frontiers. 2nd edition ed. Washington D.C., USA: ASM Press; 2001. p. 141-78.

EFSA. Opinion on the scientific panel on biological hazards on *Bacillus cereus* and other *Bacillus* spp. in foodstuff. The EFSA Journal 2004;175:1-49.

EFSA. Analyse der Grundlagenstudie zur Erhebung der Prävalenz methicillinresistenter *Staphylococcus aureus*-Bakterien (MRSA) in Haltungsbetrieben mit Zuchtschweinebeständen in der EU im Jahre 2008. The EFSA Journal 2009a;7(11):1376-8.

EFSA. The community summary report on trends and sources of zoonoses and zoonotic agents in the European Union in 2007. The EFSA Journal 2009b;223:1-215.

Ehling-Schulz M, Fricker M, Scherer S. *Bacillus cereus*, the causative agent of an emetic type of food-borne illness. Molecular Nutrition & Food Research 2004a;48(7):479-87.

Ehling-Schulz M, Fricker M, Scherer S. Identification of emetic toxin producing *Bacillus cereus* strains by a novel molecular assay. Fems Microbiology Letters 2004b;232(2):189-95.

Ehling-Schulz M, Guinebretiere MH, Monthan A, Berge O, Fricker M, Svensson B. Toxin gene profiling of enterotoxic and emetic *Bacillus cereus*. Fems Microbiology Letters 2006;260(2):232-40.

Ehling-Schulz M, Svensson B, Guinebretiere MH, Lindback T, Andersson M, Schulz A, et al. Emetic toxin formation of *Bacillus cereus* is restricted to a single evolutionary lineage of closely related strains. Microbiology-Sgm 2005;151:183-97.

Eisgruber H, Reuter G. A selective medium for the detection and enumeration of mesophilic sulfite-reducing *Clostridia* in food monitoring programs. Food Research International 1995;28(3):219-26.

Eriksen J, Zenner D, Anderson SR, Grant K, Kumar D. *Clostridium perfringens* in London, July 2009: two weddings and an outbreak. Eurosurveillance 2010;15(25):2-7.

Eriksson E, Nerbrink E, Aspan EBA, Gunnarsson A. Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 in the Swedish pig population. Veterinary Record 2003;152(23):712-7.

Escartin EF, Lozano JS, Garcia OR. Quantitative survival of native *Salmonella* serovars during storage of frozen raw pork. International Journal of Food Microbiology 2000;54(1-2):19-25.

Evenson ML, Hinds MW, Bernstein RS, Bergdoll MS. Estimation of human dose of staphylococcal enterotoxin A from a large outbreak of staphylococcal food poisoning involving chocolate milk. International Journal of Food Microbiology 1988;7(4):311-6.

Faille C, Fontaine F, Benezech T. Potential occurrence of adhering living *Bacillus* spores in milk product processing lines. Journal of Applied Microbiology 2001;90(6):892-900.

Fain ARjr, Line JE, Moran AB, Martin LM, Lechowich RV, Carosella JM, et al. Lethality of heat to *Listeria monocytogenes* Scott A: D-value and Z-value determinations in ground beef and turkey. Journal of Food Protection 1991;54(8):756-61.

Fairbrother JM, Nadeau E. *Escherichia coli*: on-farm contamination of animals. Revue Scientifique et Technique-Office International des Epizooties 2006;25(2):555-69.

Faleiro ML, Andrew PW, Power D. Stress response of *Listeria monocytogenes* isolated from cheese and other foods. International Journal of Food Microbiology 2003;84(2):207-16.

Farber JM, Peterkin PI. *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen. Microbiological Reviews 1991;55(3):476-511.

Feder I, Wallace FM, Gray JT, Fratamico P, Fedorka-Cray PJ, Pearce RA, et al. Isolation of *Escherichia coli* O157:H7 from intact colon fecal samples of swine. Emerging Infectious Diseases 2003;9(3):380-3.

Fehlhaber K, Alter T. Microbial consequences of premortal stress in slaughter pigs. Fleischwirtschaft 1999a;79(6):86-90.

Fehlhaber K, Kunze A. Growth of aerobic spore forming bacteria isolated from meat products at low temperatures. Archiv für Lebensmittelhygiene 1999b;50(6):128-31.

Fenlon DR, Wilson J, Donachie W. The incidence and level of *Listeria monocytogenes* contamination of food sources at primary production and initial processing. Journal of Applied Microbiology 1996;81(6):641-50.

Fischer B. Ethnic food - An opportunity for successful product innovation. Fleischwirtschaft 1997;77(10):881.

Foster JW, Spector MP. How *Salmonella* survive against the odds. Annual Review of Microbiology 1995;49:145-74.

Franco W, Hsu WY, Simonne AH. Survival of *Salmonella* and *Staphylococcus aureus* in Mexican Red Salsa in a Food Service Setting. Journal of Food Protection 2010;73(6):1116-20.

Fratamico PM, Bagi LK, Bush EJ, Solow BT. Prevalence and characterization of Shiga toxin producing *Escherichia coli* in swine feces recovered in the National Animal Health Monitoring System´s Swine 2000 study. Applied and Environmental Microbiology 2004;70:7173-8.

Frey W. Marinades give increased value. Fleischwirtschaft 1999;79(9):57-61.

Fricker M, Messelhausser U, Busch U, Scherer S, Ehling-Schulz M. Diagnostic real-time PCR assays for the detection of emetic *Bacillus cereus* strains in foods and recent food-borne outbreaks. Applied and Environmental Microbiology 2007;73(6):1892-8.

Friedman M, Henika PR, Levin CE, Mandrell RE. Recipes for antimicrobial wine marinades against *Bacillus cereus*, *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enterica*. Journal of Food Science 2007;72(6):M207-M213.

Friedrich A, Dorn C, Schroeter A, Szabo I, Jaber M, Berendonk G, et al. Report on *Salmonella* isolates in livestock, food and feed, received at the German National Reference Laboratory for Salmonella during 2004-2008. Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift 2010;123(7-8):265-77.

Friedrich AW, Bielaszewska M, Zhang L, Pulz T, Kuczius A, Ammon A, et al. *Escherichia coli* harboring Shiga toxin 2 gene variants: frequency and association with clinical symptoms. Journal of Infectious Diseases 2002;185:74-84.

Frohn H. Prepacked products are increasing in popularity. Market prognosis for the self-service sector for fresh meat and meat products. Fleischwirtschaft 2000;80(9):87-9.

Frohn H. Meat sales. The growth and convenience food market. Fleischwirtschaft 2002;82(6).

Garcia S, Iracheta F, Galvan F, Heredia N. Microbiological survey of retail herbs and spices from Mexican markets. Journal of Food Protection 2001;64(1):99-103.

Gareis M, Pichner R, Brey N, Steinrück H. Nachweis Verotoxin-bildender *E. coli* (VTEC) bei gesunden Mitarbeitern eines Fleisch verarbeitenden Betriebs. Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforschung - Gesundheitsschutz 2000;43(10):781-7.

Gawande PV, Bhagwat AA. Protective effects of cold temperature and surface-contact on acid tolerance of *Salmonella* spp. Journal of Applied Microbiology 2002;93(4):689-96.

Genigeorgis CA. Present state of knowledge on staphylococcal intoxication. International Journal of Food Microbiology 1989;9(4):327-60.

Ghelardi E, Celandroni F, Salvetti S, Barsotti C, Baggiani A, Senesi S. Identification and characterization of toxigenic *Bacillus cereus* isolates responsible for two food-poisoning outbreaks. Fems Microbiology Letters 2002;208(1):129-34.

Gianfranceschi M, Aureli P. Freezing and frozen storage on the survival of *Listeria monocytogenes* in different foods. Italian Journal of Food Science 1996;8(4):303-9.

Gill C, Dussault R, Holley RA, Houde A, Jones T, Rheault N, et al. Evaluation of the hygienic performances of the processes for cleaning, dressing and cooling pig carcasses at eight packing plants. International Journal of Food Microbiology 2000;58(1-2):65-72.

Goetz F. *Staphylococcus* and biofilms. Molecular Microbiology 2002;43(6):1367-78.

Goulet V, Rocourt J, Rebiere I, Jacquet C, Moyse C, Dehaumont P, et al. Listeriosis outbreak associated with the consumption of rillettes in France in 1993. Journal of Infectious Diseases 1998;177(1):155-60.

Granum PE. *Clostridium perfringens* toxins involved in food poisoning. International Journal of Food Microbiology 1990;10(2):101-12.

Granum PE, Andersson A, Gayther C, Giffel MT, Larsen H, Lund T, et al. Evidence for a further enterotoxin complex produced by *Bacillus cereus*. Fems Microbiology Letters 1996;141(2-3):145-9.

Granum PE, Lund T. *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins. Fems Microbiology Letters 1997;157(2):223-8.

Granum PE, O'Sullivan K, Lund T. The sequence of the non-haemolytic enterotoxin operon from *Bacillus cerceus*. Fems Microbiology Letters 1999;177(2):225-9.

Granum PE, Telle W, Olsvik O, Stavn A. Enterotoxin formation by *Clostridium perfringens* during sporulation and vegetative growth. International Journal of Food Microbiology 1984;1(1):43-9.

Grau FH. Microbial growth on fat and lean surfaces of vacuum-packaged chilled beef. Journal of Food Science 1983;48(2):326-8.

Graubaum D, Kleer J, Hildebrandt G. The suitable relation between sample and buffered peptonwater for the pre-enrichment of *Salmonella* in spices. Fleischwirtschaft 2005;85:105-9.

Griffin PM, Tauxe RV. The epidemiology of infections caused by *Escherichia coli* O157:H7, other enterohaemorrhagic *E. coli* and the associated haemolytic uremic syndrome. Epidemiological Reviews 1991;3:60-8.

Groves RD, Welshimer HJ. Separation of pathogenic from apathogenic *Listeria monocytogenes* by 3 in vitro reactions. Journal of Clinical Microbiology 1977;5(6):559-63.

Guibourdenche M, Roggentin P, Mikoleit M, Fields PI, Bockemühl J, Grimont PA, et al. Supplement 2003-2007 (no. 47) to the White-Kauffmann-LeMinor scheme. Research in microbiology 2010;161(1):26-9.

Guinebretiere MH, Berge O, Normand P, Morris C, Carlin F, Nguyen-The C. Identification of bacteria in pasteurized zucchini purees stored at different temperatures and comparison with those found in other pasteurized vegetable purees. Applied and Environmental Microbiology 2001;67(10):4520-30.

Guinebretiere MH, Broussolle V, Nguyen-The C. Enterotoxigenic profiles of food-poisoning and food-borne *Bacillus cereus* strains. Journal of Clinical Microbiology 2002;40(8):3053-6.

Guinebretiere MH, Nguyen-The C. Sources of *Bacillus cereus* contamination in a pasteurized zucchini puree processing line, differentiated by two PCR-based methods. Fems Microbiology Ecology 2003;43(2):207-15.

Guinebretiere MH, Thompson FL, Sorokin A, Normand P, Dawyndt P, Ehling-Schulz M, et al. Ecological diversification in the *Bacillus cereus* group. Environmental Microbiology 2008;10(4):851-65.

Gursky SH. Convenience - A growing market with high profitability. Fleischwirtschaft 1997;77(10):879.

Güven K, Mutlu MB, Avci O. Incidence and characterization of *Bacillus cereus* in meat and meat products consumed in Turkey. Journal of Food Safety 2006;26(1):30-40.

Gyles CL. Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: An overview. Journal of Animal Science 2007;85:E45-E62.

Hammon A. Untersuchungen zum Vorkommen und zur Toxizität von *Bacillus cereus* in Gewürzen. Dissertation vet. med., Ludwig-Maximilians-Universität München; 2008.

Hansen BM, Hendriksen NB. Detection of enterotoxic *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* strains by PCR analysis. Applied and Environmental Microbiology 2001;67(1):185-9.

Hartwig H, Schlosser A, Rabsch W, Beckmann G. Occurrence of *Salmonella* in herbs and spices - A long-time survey of a microbiological contract-laboratory. Fleischwirtschaft 2006;86(3):150-4.

Hauschild AHW, Hilsheimer R. Purification and characteristics of enterotoxin of *Clostridium perfringens* type A. Canadian Journal of Microbiology 1971;17(11):1425-&.

Hellstrom S, Laukkanen R, Siekkinen KM, Ranta J, Maijala R, Korkeala H. *Listeria monocytogenes* contamination in pork can originate from farms. Journal of Food Protection 2010;73(4):641-8.

Hellstrom S, Mayrhofer S, Rippel-Rachle B, Smulders FJM, Korkeala H. Prevalence and genetic diversity of *Listeria monocytogenes* in foods marketed in Vienna, Austria. Archiv für Lebensmittelhygiene 2007;58(4):116-20.

Hennekinne J, Ostyn A, Guillier F, Herbin S, Prufer A, Dragacci S. How should staphylococcal food poisoning outbreaks be characterized? Toxins 2010;2(8):2106-16.

Heyndrickx M, Scheldeman P. Bacilli associated with spoilage in dairy and other food products. In: Berkeley, editor. Applications and systematics of *Bacillus cereus* and relatives.Oxford: Blackwell Science; 2002. p. 64.

Hof H. *Listeria monocytogenes*: A causative agent of gastroenteritis? European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases 2001;20(6):369-73.

Hof H. History and epidemiology of listeriosis. Fems Immunology and Medical Microbiology 2003;35(3):199-202.

Holley RA, Peirson MD, Lam J, Tan KB. Microbial profiles of commercial, vacuum-packaged, fresh pork of normal or short storage life. International Journal of Food Microbiology 2004;97(1):53-62.

Holliday SL, Adler BB, Beuchat LR. Viability of *Salmonella, Escherichia coli* O157 : H7, and *Listeria monocytogenes* in butter, yellow fat spreads, and margarine as affected by temperature and physical abuse. Food Microbiology 2003;20(2):159-68.

Holtby I, Tebbutt GM, Grant KA, McLauchlin J, Kett J, Pinkney S. A *Clostridium perfringens* food poisoning outbreak associated with consumption of chicken curry supplied by a home caterer. Public Health 2008;122(12):1311-4.

Hong E, Doumith M, Duperrier S, Giovannacci I, Morvan A, Glaser P, et al. Genetic diversity of *Listeria monocytogenes* recovered from infected persons and pork, seafood and dairy products on retail sale in France during 2000 and 2001. International Journal of Food Microbiology 2007;114(2):187-94.

Huber H, Koller S, Giezendanner N, Stephan R, Zweifel C. Prevalence and characteristics of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in humans in contact with farm animals, in livestock, and in food of animal origin, Switzerland, 2009. Eurosurveillance 2010;15(16).

Humphrey TJ, Wilde SJ, Rowbury RJ. Heat tolerance of *Salmonella* Typhimurium DT104 isolates attached to muscle tissue. Letters in Applied Microbiology 1997;25(4):265-8.

Hussein HS. Prevalence and pathogenicity of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in beef cattle and their products. Journal of Animal Science 2007;85:E63-E72.

ICMSF. Microbial ecology of food commodities. Microorganisms in food 6. 2nd edition ed. Chapman & Hall; 2005.

in't Veld PH, Ritmeester WS, Delfgou-van Asch EHM, Dufrenne JB, Wernars K, Smit E, et al. Detection of genes encoding for enterotoxins and determination of the production of enterotoxins by HBL blood plates and immunoassays of psychrotrophic strains of *Bacillus cereus* isolated from pasteurised milk. International Journal of Food Microbiology 2001;64(1-2):63-70.

Ingham SC, Searls G, Buege DR. Inhibition of *Salmonella* serovars, *Escherichia coli* O157 : H7 and *Listeria monocytogenes* during dry-curing and drying of meat: A case study with basturma. Journal of Food Safety 2006a;26(2):160-72.

Ingham SC, Searls G, Mohanan S, Buege DR. Survival of *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes* on vacuum-packaged beef jerky and related products stored at 21 degrees C. Journal of Food Protection 2006b;69(9):2263-7.

Isigidi BK, Mathieu A-M, Devriese LA, Godard C. Enterotoxin production in different *Staphylococcus aureus* biotypes isolated from food and meat plants. Journal of Applied Microbiology 1992;72(1):16-20.

Jain A, Agarwal A, Verma RK. Cefoxitin disc diffusion test for detection of methicillin-resistant *staphylococci*. Journal of Medical Microbiology 2008;57(8):957-61.

Jansen A, Frank C, Stark K. Pork and pork products as a source for human salmonellosis in Germany. Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift 2007;120(7-8):340-6.

Jay JM. Modern Food Microbiology. London UK: Chapman & Hall; 1996.

Jemmi T, Stephan R. *Listeria monocytogenes*: food-borne pathogen and hygiene indicator. Revue Scientifique et Technique-Office International des Epizooties 2006;25(2):571-80.

Jeremiah LE, Gibson LL, Argnosa GC. The influence of controlled-atmosphere and vacuum packaging upon chilled pork keeping quality. Meat Science 1995;40(1):79-92.

Jo MY, Kim JH, Lim JH, Kang MY, Koh HB, Park YH, et al. Prevalence and characteristics of *Escherichia coli* O157 from major food animals in Korea. International Journal of Food Microbiology 2004;95(1):-41.

Jöckel J, Weber H. Marinaden für geschnetzeltes Fleisch. In: Weber H, editor. Mikrobiologie der Lebensmittel - Fleisch - Fisch - Feinkost. 1. Auflage ed. Hamburg: Behr´s Verlag; 2003a.

Jöckel J, Weber H. Marinierte geschnetzelte Erzeugnisse: Fleisch-Gemüse-Mischungen (Pfannengerichte, Fleischpfannen) und gyrosähnliche Erzeugnisse. In: Weber H, editor. Mikrobiologie der Lebensmittel - Fleisch - Fisch - Feinkost. 1. Auflage ed. Hamburg: Behr´s Verlag; 2003b.

Johanson L, Underdal B, Grosland K, Whelehan OP, Roberts TA. A survey of the hygienic quality of beef and pork carcasses in Norway. Acta Veterinaria Scandinavica 1983;24:1-13.

Johnson KE, Thorpe CM, Sears CL. The emerging clinical importance of non-O157 Shiga toxin - producing *Escherichia coli*. Clinical Infectious Diseases 2006;43(12):1587-95.

Jones TF, Kellum ME, Porter SS, Bell M, Schaffner W. An outbreak of community-acquired foodborne illness caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Emerging Infectious Diseases 2002;8(1):82-4.

Juneja VK, Eblen BS. Heat inactivation of *Salmonella* typhimurium DT104 in beef as affected by fat content. Letters in Applied Microbiology 2000;30(6):461-7.

Juneja VK, Novak JS, Huang LH, Eblen BS. Increased thermotolerance of *Clostridium perfringens* spores following sublethal heat shock. Food Control 2003;14(3):163-8.

Junttila JR, Niemela SI, Hirn J. Minimum growth temperatures of *Listeria monocytogenes* and non-hemolytic *Listeria*. Journal of Applied Bacteriology 1988;65(4):321-7.

Kahraman T, Ozmen G. Quality of selected spices and herbs consumed in Turkey. Archiv für Lebensmittelhygiene 2009;60(11-12):185-91.

Kaneko A, Mori T, Fujino T, Nakamura A, Naiki Y, Mutoh M, et al. An outbreak of enteritis induced by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* producing enterotoxin types A and C, toxic shock syndrome toxin-1 and coagulase type II. Japanese Journal of Infectious Diseases 2000;53(5):212-4.

Kanuganti SR, Wesley IV, Reddy PG, McKean J, Hurd HS. Detection of *Listeria monocytogenes* in pigs and pork. Journal of Food Protection 2002;65(9):1470-4.

Kaper JB, O´Brien AD. *Escherichia coli* O157:H7 and other Shiga toxin producing *E. coli* strains. Washington: ASM Press; 1998.

Karakolev R. Incidence of *Listeria monocytogenes* in beef, pork, raw-dried and raw-smoked sausages in Bulgaria. Food Control 2009;20(10):953-5.

Karch H, Bielaszewska M, Bitzan M, Schmidt H. Epidemiology and diagnosis of shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease 1999;34(3):229-43.

Karch H, Janetzki-Mittmann C, Aleksic S, Datz M. Isolation of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 strains from patients with hemolytic uremic syndrome by using immunomanetic separation. DNA based methods and direct culture. Journal of Clinical Microbiology 1996;34:516-9.

Karch H, Meyer T. Single primer pair for amplifying segments of distinct Shiga-like-toxin genes by polymerase chain reaction. Journal of Clinical Microbiology 1989;27(12):2751-7.

Käsbohrer A, Protz D, Helmuth R, Nockler K, Blaha T, Conraths FJ, et al. *Salmonella* in slaughter pigs of German origin: An epidemiological study. European Journal of Epidemiology 2000;16(2):141-6.

Kathariou S. *Listeria monocytogenes* virulence and pathogenicity, a food safety perspective. Journal of Food Protection 2002;65(11):1811-29.

Kaur J, Ledward DA, Park RWA, Robson RL. Factors affecting the heat resistance of *Escherichia coli* O157:H7. Letters in Applied Microbiology 1998;26(4):325-30.

Keen JE, Wittum TE, Dunn JR, Bono JL, Durso LM. Shiga-toxigenic *Escherichia coli* O157 in agricultural fair livestock, United States. Emerging Infectious Diseases 2006;12(5):780-6.

Kern J. Convenience - The new trend. Fleischwirtschaft 1997;77(10):857.

Kerouanton A, Hennekinne JA, Letertre C, Petit L, Chesneau O, Brisabois A, et al. Characterization of *Staphylococcus aureus* strains associated with food poisoning outbreaks in France. International Journal of Food Microbiology 2007;115(3):369-75.

Khanna T, Friendship R, Dewey C, Weese JS. Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* colonization in pigs and pig farmers. Veterinary Microbiology 2008;128(3-4):298-303.

Kim J, Kim J, Kim C, Seo K, Park Y, Choi N, et al. Emetic toxin producing *Bacillus cereus* Korean isolates contain genes encoding diarrheal-related enterotoxins. International Journal of Food Microbiology 2010;144(1):182-6.

King LA, Mailles A, Mariani-Kurkdjian P, Vernozy-Rozand C, Montet MP, Grimont F, et al. Community-wide outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 associated with consumption of frozen beef burgers. Epidemiology and Infection 2009;137(6):889-96.

Kinsella KJ, Rowe TA, Blair IS, McDowell DA, Sheridan JJ. The influence of attachment to beef surfaces on the survival of cells of *Salmonella* enterica serovar Typhimurium DT104, at different a(w) values and at low storage temperatures. Food Microbiology 2007;24(7-8):786-93.

Kiss R, Tirczka T, Szita G, Bernath S, Csiko G. *Listeria monocytogenes* food monitoring data and incidence of human listeriosis in Hungary, 2004. International Journal of Food Microbiology 2006;112(1):71-4.

Kleer J, Bartholoma A, Levetzow R, Reiche T, Sinell HJ, Teufel P. Foodborne bacterial infections and intoxications in German catering systems from 1985 to 2000. Archiv für Lebensmittelhygiene 2001;52(4-5):76-9.

Kluytmans J, Vanleeuwen W, Goessens W, Hollis R, Messer S, Herwaldt L, et al. Food-initiated outbreak of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* analyzed by phenotyping and genotyping. Journal of Clinical Microbiology 1995;33(5):1121-8.

Kneifel W, Berger E. Microbiological criteria of random samples of spices and herbs retailed on the Austrian market. Journal of Food Protection 1994;57(10):893-901.

Kock R, Becker K, Cookson B, van Gemert-Pijnen JE, Harbarth S, Kluytmans J, et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): burden of disease and control challenges in Europe. Eurosurveillance 2010;15(41):12-20.

Koelensmid W, Van Rhee R. Salmonella in porcine meat products. Ann Inst Pasteur Lille 1964;15:85-97.

Kornacki JL, Gurtler JB. Incidence and control of listeria in food processing facilities. In: Ryser ET, Marth EH, editors. Listeria, listeriosis and food safety.Boca Raton, FL: CRC Press; 2007. p. 681-766.

Kotiranta A, Lounatmaa K, Haapasalo M. Epidemiology and pathogenesis of *Bacillus cereus* infections. Microbes and Infection 2000;2(2):189-98.

Kouakou P, Ghalfi H, Dortu C, Evrard P, Thonart P. Combined use of bacteriocin-producing strains to control *Listeria monocytogenes* regrowth in raw pork meat. International Journal of Food Science and Technology 2010;45(5):937-43.

Koutsoumanis KP, Kendall PA, Sofos JN. Effect of food processing-related stresses on acid tolerance of *Listeria monocytogenes*. Applied and Environmental Microbiology 2003;69(12):7514-6.

Koutsoumanis KP, Kendall PA, Sofos JN. A comparative study on growth limits of *Listeria monocytogenes* as affected by temperature, pH and a(w) when grown in suspension or on a solid surface. Food Microbiology 2004;21(4):415-22.

Kreuzberger C, Moravek M, Dietrich R, Scheurer R, Märtlbauer E. Characterisation of the toxicity of *Bacillus cereus* isolates from food supply facilities of the German Federal Armed Forces. Archiv für Lebensmittelhygiene 2008;59(3):92-8.

Kuchenbecker J, Weber H. Market importance of marinated meat products. Differences between Germany, the Netherlands and Denmark. Fleischwirtschaft 2001;81(9):49-50.

Labbé RG. *Clostridium perfringens*. In: Lund B, Baird-Parker T, Gould T, editors. The Microbiological Safety and Quality of Food.MD, USA: Aspen Publishers; 2000. p. 1110-35.

Lawrynowicz-Paciorek M, Kochman M, Piekarska K, Grochowska A, Windyga B. The distribution of enterotoxin and enterotoxin-like genes in *Staphylococcus aureus* strains isolated from nasal carriers and food samples. International Journal of Food Microbiology 2007;117(3):319-23.

Lee GY, Jang HI, Hwang IG, Rhee MS. Prevalence and classification of pathogenic *Escherichia coli* isolated from fresh beef, poultry, and pork in Korea. International Journal of Food Microbiology 2009;134(3):196-200.

LeLoir Y, Baron F, Gautier M. *Staphylococcus aureus* and food poisoning. Genetics and Molecular Research 2003;2(1):63-76.

Leonard FC, Markey BK. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in animals. Veterinary Journal 2008;175(1):27-36.

Lick SSKWA, Heller KJ. Detection without sample processing of yoghurt starters and DNA in milk products by PCR. Kieler Milchwirtschaftliche Forschungsberichte 1999;51:15-25.

Lim SK, Nam HM, Park HJ, Lee HS, Choi MJ, Jung SC, et al. Prevalence and characterization of Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in raw meat in Korea. Journal of Microbiology and Biotechnology 2010;20(4):775-8.

Lin CM, Takeuchi K, Zhang L, Dohm CB, Meyer JD, Hall PA, et al. Cross-contamination between processing equipment and deli meats by *Listeria monocytogenes*. Journal of Food Protection 2006;69(1):71-9.

Lin J, Yeh KS, Liu HT, Lin JH. *Staphylococcus aureus* isolated from pork and chicken carcasses in Taiwan: prevalence and antimicrobial susceptibility. Journal of Food Protection 2009;72(3):608-11.

Lin JS, Smith MP, Chapin KC, Baik HS, Bennett GN, Foster JW. Mechanisms of acid resistance in enterohemorrhagic *Escherichia coli*. Applied and Environmental Microbiology 1996;62(9):3094-100.

Lin YT, Labbe R. Enterotoxigenicity and genetic relatedness of *Clostridium perfringens* isolates from retail foods in the United States. Applied and Environmental Microbiology 2003;69(3):1642-6.

Lindbäck T, Okstad OA, Rishovd AL, Kolsto AB. Insertional inactivation of hblC encoding the L-2 component of *Bacillus cereus* ATCC 14579 haemolysin BL strongly reduces enterotoxigenic activity, but not the haemolytic activity against human erythrocytes. Microbiology-Uk 1999;145:3139-46.

Lindsay JA. *Clostridium perfringens* type A enterotoxin (CPE): More than just explosive diarrhea. Critical Reviews in Microbiology 1996;22(4):257-77.

Little CL, Omotoye R, Mitchell RT. The microbial quality of ready-to-eat foods with added spices. International Journal of Environmental Health Research 2003;13:31-42.

Loncarevic S, DanielssonTham ML, Martensson L, Ringner A, Runehagen A, Tham W. A case of foodborne listeriosis in Sweden. Letters in Applied Microbiology 1997;24(1):65-8.

Lou YQ, Yousef AE. Adaptation to sublethal environmental stresses protects *Listeria monocytogenes* against lethal preservation factors. Applied and Environmental Microbiology 1997;63(4):1252-5.

Lund T, De Buyser ML, Granum PE. A new cytotoxin from *Bacillus cereus* that may cause necrotic enteritis. Molecular Microbiology 2000;38(2):254-61.

Lund T, Granum PE. Comparison of biological effect of the two different enterotoxin complexes isolated from three different strains of *Bacillus cereus*. Microbiology-Uk 1997;143:3329-36.

Lynch BA. Flavorful functionality of marinades. Prepared Foods 2010;179(2):35-42.

Mackey BM, Pritchet C, Norris A, Mead GC. Heat-resistance of *Listeria* - strain differences and effects of meat type and curing salts. Letters in Applied Microbiology 1990;10(6):251-5.

Mahler C. Untersuchungen zur hygienischen und mikrobiologischen Qualität von marinierten Fleischzubereitungen zur Festlegung von Richtwerten bei der Kontrolle des Mindesthaltbarkeitsdatums (MHD). . Dissertation vet. med., Ludwig-Maximilians-Universität München; 2004.

Mahler H, Pasi A, Kramer JM, Schulte P, Scoging AC, Bar W, et al. Fulminant liver failure in association with the emetic toxin of *Bacillus cereus*. New England Journal of Medicine 1997;336(16):1142-8.

Mainil J. Shiga verocytotoxins and Shiga verotoxigenic *Escherichia coli* in animals. Veterinary Research 1999;30(2-3):235-57.

Mainil J, Daube G. Verotoxigenic *Escherichia coli* from animals, humans and foods: who's who? Journal of Applied Microbiology 2005;98(6):1332-44.

Mäntynen V, Lindström K. A rapid PCR-based DNA test for enterotoxic *Bacillus cereus*. Applied and Environmental Microbiology 1998;64(5):1634-9.

Marg H, Scholz HC, Arnold T, Rösler U, Hensel A. Influence of long-time transportation stress on reactivation of *Salmonella* Typhimurium DT 104 in experimentally infected pigs. Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift 2001;114(9-10):385-8.

Martin MC, Fueyo JM, Gonzalez-Hevia MA, Mendoza M. Genetic procedures for identification of enterotoxigenic strains of *Staphylococcus aureus* from three food poisoning outbreaks. International Journal of Food Microbiology 2004;94(3):279-86.

Martins A, Cunha MDRS. Methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci: Epidemiological and molecular aspects. Microbiology and Immunology 2007;51(9):787-95.

Matar GM, Slieman TA, Nabbut NH. Subtyping of *Bacillus cereus* by total cell protein patterns and arbitrary primer polymerase chain reaction. European Journal of Epidemiology 1996;12(3):309-14.

Mataragas M, Skandamis PN, Drosinos EH. Risk profiles of pork and poultry meat and risk ratings of various pathogen/product combinations. International Journal of Food Microbiology 2008;126(1-2):1-12.

Mattick KL, Jorgensen F, Legan JD, Cole MB, Porter J, Lappin-Scott HM, et al. Survival and filamentation of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis PT4 and *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT104 at low water activity. Applied and Environmental Microbiology 2000;66(4):1274-9.

Maule A. Survival of verocytotoxigenic *Escherichia coli* O157 in soil, water and on surfaces. Journal of Applied Microbiology 2000;88:71S-8S.

McClane BA, Chakrabarti G. New insights into the cytotoxic mechanisms of *Clostridium perfringens* enterotoxin. Anaerobe 2004;10(2):107-14.

Mcdaniel TK, Jarvis KG, Donnenberg MS, Kaper JB. A genetic locus of enterocyte effacement conserved among diverse enterobacterial pathogens. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 1995;92(5):1664-8.

Mcevoy JH. The might of marinades. Prepared Foods 2003;172(9):49-58.

McLauchlin J. The relationship between *Listeria* and listeriosis. Food Control 1996;7(4-5):187-93.

McLauchlin J, Mitchell RT, Smerdon WJ, Jewell K. *Listeria monocytogenes* and listeriosis: a review of hazard characterisation for use in microbiological risk assessment of foods. International Journal of Food Microbiology 2004;92(1):15-33.

Mead PS, Dunne EF, Graves L, Wiedmann M, Patrick M, Hunter S, et al. Nationwide outbreak of listeriosis due to contaminated meat. Epidemiology and Infection 2006;134(4):744-51.

Mead PS, Slutsker L, Dietz V, Mccaig LF, Bresee JS, Shapiro C, et al. Food-related illness and death in the United States. Emerging Infectious Diseases 1999;5(5):607-25.

Meldrum RJ, Tucker D, Smith RMM, Edwards C. Survey of *Salmonella* and *Campylobacter* contamination of whole, raw poultry on retail sale in Wales in 2003. Journal of Food Protection 2005;68(7):1447-9.

Mengesha D, Zewde BM, Toquin MT, Kleer J, Hildebrandt G, Gebreyes WA. Occurence and distribution of *Listeria monocytogenes* and other *Listeria* species in ready-to-eat and raw meat products. Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift 2009;122(1-2):20-4.

Messelhäusser U, Fricker M, Ehling-Schulz M, Ziegler H, Elmer-Englhard D, Kleih W, et al. Real-time-PCR-System for detection of *Bacillus cereus* (emetic type) in the food. Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit - Journal of Consumer Protection and Food Safety 2007;2(2):190-3.

Meyer C, Thiel S, Ullrich U, Stolle A. *Salmonella* in raw meat and by-products from pork and beef. Journal of Food Protection 2010;73(10):1780-4.

Meyer H. Animals as sources of infections in humans - Salmonelloses. Deutsche Tierärztliche Wochenschrift 1999;106(8):344-51.

Michels P. Sommerhits bei Fleisch - Graphiken zur Grillsaison (zitiert vom 12.12.2008). Zentrale Markt- und Preisberichtsstelle für Erzeugnisse der Land-,Forst- und Ernährungswirtschaft GmbH (ZMP) in Zusammenarbeit mit CMA,Centrale Marketinggesellschaft der deutschen Agrarwirtschaft mbH; 2007. Report No.: ZMP 338/2007.

Miki Y, Miyamoto K, Kaneko-Hirano I, Fujiuchi K, Akimoto S. Prevalence and characterization of enterotoxin gene-carrying *Clostridium perfringens* isolates from retail meat products in Japan. Applied and Environmental Microbiology 2008;74(17):5366-72.

Mikkola R, Saris NEL, Grigoriev PA, Andersson MA, Salkinoja-Salonen MS. Ionophoretic properties and mitochondrial effects of cereulide - The emetic toxin of *B. cereus*. European Journal of Biochemistry 1999;263(1):112-7.

Moeller S, Rahn M, Schneider F. Juicy steaks as a result of seasoning marinade. Addition of phosphate and its effects on sensory properties of frozen partially prepared products. Fleischwirtschaft 2003;83(2):45-7.

Molva C, Sudagidan M, Okuklu B. Extracellular enzyme production and enterotoxigenic gene profiles of *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* strains isolated from cheese in Turkey. Food Control 2009;20(9):829-34.

Montville TJ, Matthews KR. Spores and their significance. Food Microbiology - Fundamentals and Frontiers. 2nd edition ed. Washington D.C., USA: ASM Press; 2001.

Moravek M, Dietrich R, Buerk C, Broussolle V, Guinebretiere MH, Granum PE, et al. Determination of the toxic potential of *Bacillus cereus* isolates by quantitative enterotoxin analyses. Fems Microbiology Letters 2006;257(2):293-8.

Moravek M, Wegscheider M, Schulz A, Dietrich R, Burk C, Martlbauer E. Colony immunoblot assay for the detection of hemolysin BL enterotoxin producing *Bacillus cereus*. Fems Microbiology Letters 2004;238(1):107-13.

Moreira P, Lourencao T, Pinto J, Rall V. Microbiological quality of spices marketed in the city of Botucatu, Sao Paulo, Brazil. Journal of Food Protection 2009;72(2):421-4.

Murphy RY, Osaili T, Duncan LK, Marcy JA. Thermal inactivation of *Salmonella* and *Listeria monocytogenes* in ground chicken thigh/leg meat and skin. Poultry Science 2004;83(7):1218-25.

Murray RJ. Recognition and management of *Staphylococcus aureus* toxin-mediated disease. Internal Medicine Journal 2005;35:S106-S119.

Najera-Sanchez G, Maldonado-Rodriguez R, Olvera PR, de la Garza LM. Development of two multiplex polymerase chain reactions for the detection of enterotoxigenic strains of *Staphylococcus aureus* isolated from foods. Journal of Food Protection 2003;66(6):1055-62.

Nataro JP, Kaper JB. Diarrheagenic *Escherichia coli*. Clinical Microbiology Reviews 1998;11(1):142-54.

Neeling A, Broek M, Spalburg E, Santen-Verheuvel M, Dam-Deisz W, Boshuizen H, et al. High prevalence of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* in pigs. Veterinary Microbiology 2007;122(3/4):366-72.

Netschajew A, Fredriksson-Ahomaa M, Sperner B, Stolle A. Detection of Listeria monocytogenes in vacuum-packed meat products using real-time PCR, immunoassay and culturing. Archiv für Lebensmittelhygiene 2009;60(1):12-7.

Ngutter C, Donnelly C. Nitrite-induced injury of *Listeria monocytogenes* and the effect of selective versus nonselective recovery procedures on its isolation from frankfurters. Journal of Food Protection 2003;66(12):2252-7.

Nightingale KK, Schukken YK, Nightingale CR, Fortes ED, Ho AJ, Her Z, et al. Ecology and transmission of *Listeria monocytogenes* infecting ruminants and in the farm environment. Applied and Environmental Microbiology 2004;70(8):4458-67.

Nitzsche S, Zweifel C, Stephan R. Phenotypic and genotypic traits of *Staphylococcus aureus* strains isolated from pig carcasses. Veterinary Microbiology 2007;120(3-4):292-9.

Normanno G, Firinu A, Virgilio S, Mula G, Dambrosio A, Poggiu A, et al. Coagulase-positive *Staphylococci* and *Staphylococcus aureus* in food products marketed in Italy. International Journal of Food Microbiology 2005;98(1):73-9.

Normanno G, La Salandra G, Dambrosio A, Quaglia NC, Corrente M, Parisi A, et al. Occurrence, characterization and antimicrobial resistance of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* isolated from meat and dairy products. International Journal of Food Microbiology 2007;115(3):290-6.

Norrung B. Microbiological criteria for *Listeria monocytogenes* in foods under special consideration of risk assessment approaches. International Journal of Food Microbiology 2000;62(3):217-21.

Notermans S, Batt CA. A risk assessment approach for foodborne *Bacillus cereus* and its toxins. Journal of Applied Microbiology 1998;84:51S-61S.

Notermans S, Heuvelman CJ. Combined effect of water activity, pH and suboptimal temperature on growth and enterotoxin production of *Staphylococcus aureus*. Journal of Food Science 1983;48(6):1832-8.

Ojo OE, Ajuwape ATP, Otesile EB, Owoade AA, Oyekunle MA, Adetosoye AI. Potentially zoonotic shiga toxin-producing *Escherichia coli* serogroups in the faeces and meat of food-producing animals in Ibadan, Nigeria. International Journal of Food Microbiology 2010;142(1-2):214-21.

Olsen SJ, MacKinnon LC, Goulding JS, Bean NH, Slutsker L. Surveillance for foodborne-disease outbreaks - United States,1993-1997. Morbidity and mortality weekly report CDC surveillance summaries 2000;49(1):1-62.

Orta-Ramirez A, Marks BP, Warsow CR, Booren AM, Ryser ET. Enhanced thermal resistance of *Salmonella* in whole muscle compared to ground beef. Journal of Food Science 2005;70(7):M359-M362.

Osek J. Prevalence of shiga toxin genes among *Escherichia coli* strains isolated from pigs. Veterinary Record 1999;145(19):557-8.

O´Donnell CD. Banking on barbecue. Prepared Foods 2004;173(2):13-8.

O´Mahony R, Abbott Y, Leonard FC, Markey BK, Quinn PJ, Pollock PJ, et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) isolated from animals und veterinary personnel in Ireland. Veterinary Microbiology 2005;109:285-96.

Paredes-Sabja D, Torres JA. Modeling of the germination of spores from *Clostridium perfringens* food poisoning isolates. Journal of Food Process Engineering 2010;33:150-67.

Park CE, Akhtar M, Rayman K. Efficacy of a commercial enzyme immunoassay kit for the detection of staphylococcal enterotoxins in foods. Washington, USA: American Chemical Society; 1996.

Pathania A, McKee SR, Bilgili SF, Singh M. Antimicrobial activity of commercial marinades against multiple strains of *Salmonella* spp. International Journal of Food Microbiology 2010;139(3):214-7.

Peacock E, Jacob VW, Fallone SM. *Escherichia coli* O157:H7: etiology, clinical features, complications and treatments. Nephrology nursing journal: journal of the American Nephrology Nurses´ Association 2001;28(5):547-50.

Pereira V, Lopes C, Castro A, Silva J, Gibbs R, Teixeira P. Characterization for enterotoxin production, virulence factors, and antibiotic susceptibility of *Staphylococcus aureus* isolates from various foods in Portugal. Food Microbiology (London) 2009;26(3):278-82.

Petit L, Gibert M, Popoff MR. *Clostridium perfringens*: toxinotype and genotype. Trends in Microbiology 1999;7(3):104-10.

Pfeifer J, Kessler HG. Effect of relative humidity of hot air on the heat resistance of *Bacillus cereus* spores. Journal of Applied Bacteriology 1994;77(2):121-8.

Pichler J, Much P, Kasper S, Fretz R, Auer B, Kathan J, et al. An outbreak of febrile gastroenteritis associated with jellied pork contaminated with *Listeria monocytogenes*. Wiener Klinische Wochenschrift 2009;121(3-4):149-56.

Pirttijarvi TSM, Andersson MA, Salkinoja-Salonen MS. Properties of *Bacillus cereus* and other bacilli contaminating biomaterial-based industrial processes. International Journal of Food Microbiology 2000;60(2-3):231-9.

Podolak R, Enache E, Stone W, Black DG, Elliott PH. Sources and risk factors for contamination, survival, persistence, and heat resistance of *Salmonella* in low-moisture foods. Journal of Food Protection 2010;73(10):1919-36.

Popoff MR, Bouvet P. Clostridial toxins. Future Microbiology 2009;4(8):1021-64.

Porto-Fett ACS, Call JE, Luchansky JB. Validation of a commercial process for inactivation of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* Typhimurium, and *Listeria monocytogenes* on the surface of whole muscle beef jerky. Journal of Food Protection 2008;71(5):918-26.

Prendergast DM, Duggan SJ, Fanning S, Cormican M, Gonzales-Barron U, Butler F, et al. Prevalence and numbers of *Salmonella* spp. and *Enterobacteriaceae* on pork cuts in abattoirs in the Republic of Ireland. Journal of Applied Microbiology 2008;105(4):1209-19.

Psomas E, Papantoniou D, Petridis D, Panou E. Evaluation of the microbiological quality of Greek oregano samples. Archiv für Lebensmittelhygiene 2009;60(3):98-103.

Pu S, Han F, Ge B. Isolation and characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains from Louisiana retail meats. Applied and Environmental Microbiology 2009;75(1):265-7.

Rabsch W. Complex typing of *Salmonella* Enteritidis and *Salmonella* Typhimurium as a tool for the epidemiological surveillance of salmonellosis from 1976-1996 in Germany. Epidemiologie et Sante Animale 1997;(31/32):12.

Raghubeer EV, Matches R. Temperature range for growth of *Escherichia coli* serotype O157:H7 and selected coliforms in *E. coli* medium. Journal of Clinical Microbiology 1990;28(4):803-5.

Rahn K, Degrandis SA, Clarke RC, Mcewen SA, Galan JE, Ginocchio C, et al. Amplification of an *invA* gene sequence of *Salmonella* Typhimurium by polymerase chain reaction as a specific method of detection of *Salmonella*. Molecular and Cellular Probes 1992;6(4):271-9.

Rajkovic A, Uyttendaele M, Vermeulen A, Andjelkovic M, Fitz-James I, in't Veld P, et al. Heat resistance of *Bacillus cereus* emetic toxin, cereulide. Letters in Applied Microbiology 2008;46(5):536-41.

Rau J, Perz R, Klittich G, Contzen M. Cereulide forming presumptive *Bacillus cereus* strains from food - differentiating analyses using cultural methods, LC-MS/MS, PCR, and infrared spectroscopy in consideration of thermotolerant isolates. Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift 2009;122(1-2):25-36.

Rode TM, Langsrud S, Holck A, Moretro T. Different patterns of biofilm formation in *Staphylococcus aureus* under food-related stress conditions. International Journal of Food Microbiology 2007;116(3):372-83.

Rode TM, Moretro T, Langsrud S, Langsrud O, Vogt G, Holck A. Responses of *Staphylococcus aureus* exposed to HCl and organic acid stress. Canadian Journal of Microbiology 2010;56(9):777-92.

Rödel W, Scheuer R, Wagner H. A new method of determining water activity in meat products. Fleischwirtschaft 1990;70(8):905-7.

Rodriguez E, Vargas MDGY. *Clostridium perfringens* in raw and cooked meats and its relation with the environment in Costa Rica. Archivos Latinoamericanos de Nutricion 2002;52(2):155-9.

Rodriguez-Romo LA, Heredia NL, Labbe RG, Garcia-Alvarado JS. Detection of enterotoxigenic *Clostridium perfringens* in spices used in Mexico by dot blotting using a DNA probe. Journal of Food Protection 1998;61(2):201-4.

Rosenquist H, Smidt L, Andersen SR, Jensen GB, Wilcks A. Occurrence and significance of *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* in ready-to-eat food. Fems Microbiology Letters 2005;250(1):129-36.

Rüssmann H, Kothe E, Schmidt H, Franke S, Harmsen D, Caprioli A, et al. Genotyping of Shiga-like toxin genes in non-O157 *Escherichia coli* strains associated with haemolytic uraemic syndrome. Journal of Medical Microbiology 1995;42:404-10.

Russo F, Ercolini D, Mauriello G, Villani F. Behaviour of *Brochothrix thermosphacta* in presence of other meat spoilage microbial groups. Food Microbiology 2006;23(8):797-802.

Ryan PA, Macmillan JD, Zilinskas BA. Molecular cloning and characterization of the genes encoding the L(1) and L(2) components of hemolysin BL from *Bacillus cereus*. Journal of Bacteriology 1997;179(8):2551-6.

Sagoo SK, Little CL, Greenwood M, Mithani V, Grant KA, McLauchlin J, et al. Assessment of the microbiological safety of dried spices and herbs from production and retail premises in the United Kingdom. Food Microbiology 2009;26(1):39-43.

Scallan E, Hoekstra RM, Angulo FJ, Tauxe RV, Widdowson MA, Roy SL, et al. Foodborne illness acquired in the United States - major pathogens. Emerging Infectious Diseases 2011;17(1):7-15.

Schilling C, Tenhagen BA, Guerra B, Fetsch A. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in meat and meat products. Results of a survey study. Fleischwirtschaft 2010;90(5):88-91.

Schirmer B, Heir E, Langsrud S. Characterization of the bacterial spoilage flora in marinated pork products. Journal of Applied Microbiology 2009;106(6):2106-16.

Schlech WF. Foodborne listeriosis. Clinical Infectious Diseases 2000;31(3):770-5.

Schlegelova J, Brychta J, Klimova E, Napravnikova E, Babak V. The prevalence of and resistance to antimicrobial agents of *Bacillus cereus* isolates from foodstuffs. Veterinarni Medicina 2003;48(11):331-8.

Schlievert PM, Case LC. Molecular analysis of staphylococcal superantigens. Methods in molecular biology 2007;391:113-26.

Schmid D, Fretz R, Winter P, Mann M, Hoger G, Stoger A, et al. Outbreak of staphylococcal food intoxication after consumption of pasteurized milk products, June 2007, Austria. Wiener Klinische Wochenschrift 2009;121(3-4):125-31.

Schmidt H, Beutin L, Karch H. Molecular analysis of the plasmid-encoded hemolysin of *Escherichia coli* O157:H7 strain Edl-933. Infection and Immunity 1995;63(3):1055-61.

Schmidt H, Montag M, Bockemuhl J, Heesemann J, Karch H. Shiga-like toxin II related cytotoxins in *Citrobacter freundii* strains from humans and beef samples. Infection and Immunity 1993;61(2):534-43.

Schmidt H, Plaschke B, Franke S, Russmann H, Schwarzkopf A, Heesemann J, et al. Differentiation in virulence patterns of *Escherichia coli* possessing *eae* genes. Medical Microbiology and Immunology 1994a;183(1):23-31.

Schmidt H, Russmann H, Schwarzkopf A, Aleksic S, Heesemann J, Karch H. Prevalence of attaching and effacing *Escherichia coli* in stool samples from patients and controls. Zentralblatt für Bakteriologie - International Journal of Medical Microbiology Virology Parasitology and Infectious Diseases 1994b;281(2):201-13.

Schmidt H, Scheef J, Huppertz HI, Frosch M, Karch H. *Escherichia coli* O157 : H7 and O157 : H- strains that do not produce Shiga toxin: Phenotypic and genetic characterization of isolates associated with diarrhea and hemolytic-uremic syndrome. Journal of Clinical Microbiology 1999;37(11):3491-6.

Schmidt U. Behaviour of *Salmonella* during cold storage. Mitteilungsblatt der Bundesanstalt fuer Fleischforschung, Kulmbach 1985;88:6458-64.

Schmitt M, Schulerschmid U, Schmidtlorenz W. Temperature limits of growth, TNase and enterotoxin production of *Staphylococcus aureus* strains isolated from foods. International Journal of Food Microbiology 1990;11(1):1-20.

Schoeni JL, Wong ACL. *Bacillus cereus* food poisoning and its toxins. Journal of Food Protection 2005;68(3):636-48.

Schuchat A, Deaver KA, Wenger JD, Plikaytis BD, Mascola L, Pinner RW, et al. Role of foods in sporadic listeriosis. I. Case-control study of dietary risk factors. The Listeria Study Group. The Journal of the American Medical Association 1992;267(15):2041-5.

Schulz A. Zum Nachweis des emetischen Toxins von *Bacillus cereus*. Dissertation vet. med., Ludwig-Maximilians-Universität München; 2004.

Schweiggert U, Carle R, Schieber A. Conventional and alternative processes for spice production - a review. Trends in Food Science & Technology 2007;18:260-8.

Seidler T, Alter T, Krüger M, Fehlhaber K. Transport stress - consequences for bacterial translocation, endogenous contamination and bactericidal activity of serum of slaughter pigs. Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift 2001;114(9-10):375-7.

Seltow P. Mechanism which contribute to the long-term survival of spores of *Bacillus cereus* species. Journal of Applied Bacteriology 1994;76:49-60.

Shandera WX, Tacket CO, Blake PA. Food poisoning due to *Clostridium perfringens* in the United States. Journal of Infectious Diseases 1983;147(1):167-70.

Shimizu A, Fujita V, Igarashi H, Takagi M, Nagase N, Sasaki A, et al. Characterization of *Staphylococcus aureus* coagulase type VII isolates from staphylococcal food poisoning outbreaks (1980-1995) in Tokyo, Japan, by pulsed-field gel electrophoresis. Journal of Clinical Microbiology 2000;38(10):3746-9.

Shinagawa K, Konuma H, Sekita H, Sugii S. Emesis of rhesus-monkeys induced by intragastric administration with the Hep-2 vacuolation factor (Cereulide) produced by *Bacillus cereus*. Fems Microbiology Letters 1995;130(1):87-90.

Siegman-Igra Y, Levin R, Weinberger M, Golan Y, Schwartz D, Samra Z, et al. *Listeria monocytogenes* infection in Israel and review of cases worldwide. Emerging Infectious Diseases 2002;8(3):305-10.

Sinell H-J, Kleer J. *Salmonella* spp. In: Fehlhaber K, Kleer J, Kley F, editors. Handbuch Lebensmittelhygiene. Grundwerk 2005, 1. Aktualisierungslieferung Juli 2005 ed. Hamburg: Behr´s Verlag; 2005. p. 1-15.

Skandamis PN, Yoon DY, Stopforth JD, Kendall PA, Sofos JN. Heat and acid tolerance of *Listeria monocytogenes* after exposure to single and multiple sublethal stresses. Food Microbiology 2008;25(2):294-303.

Smith BS. The role of functional ingredients in marinated meat and poultry. Journal of Animal Science 2007;85:601.

Smith SE, Maurer JL, Orta-Ramirez A, Ryser ET, Smith DM. Thermal inactivation of *Salmonella* spp., *Salmonella* Typhimurium DT104, and *Escherichia coli* O157:H7 in ground beef. Journal of Food Science 2001;66(8):1164-8.

Sneath PHA, Mair M, Sharpe E, Holt JG. Systematic Bacteriology. Bergey´s Manual of Systematic Bacteriology. Baltimore, London, Los Angeles, Sydney: Williams & Wilkins; 1996.

Sorrells KM, Enigel DC, Hatfield JR. Effect of pH, acidulant, time, and temperature on the growth and survival of *Listeria monocytogenes*. Journal of Food Protection 1989;52(8):571-3.

Steinbach G, Hartung M. An attempt to estimate the share of human cases of salmonellosis attributable to *Salmonella* orginating from swine. Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift 1999;112(8):296-300.

Stock K, Stolle A. Incidence of *Salmonella* in minced meat produced in a European Union-approved cutting plant. Journal of Food Protection 2001;64:1435-8.

Stöcker CF. Vorkommen von shigatoxinbildenden *Escherichia coli* (STEC) bei verschiedenen Nutz- und Kleintieren. Dissertation vet. med., Ludwig-Maximilians-Universität München; 2002.

Swaminathan B, Gerner-Smidt P. The epidemiology of human listeriosis. Microbes and Infection 2007;9(10):1236-43.

Tarr PI, Gordon CA, Chandler WL. Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* and haemolytic uraemic syndrome. Lancet 2005;365(9464):1073-86.

Tatini SR. Influence of food environments on growth of *Staphylococcus aureus* and production of various enterotoxins. Journal of Milk and Food Technology 1973;36(11):559-63.

Tenhagen BA, Fetsch A, Käsbohrer A, Braunig J, Appel B. Prevalence of MRSA in farm animals and food. Deutsche Tierärztliche Wochenschrift 2009;116(8):307-11.

Thevenot D, Dernburg A, Vernozy-Rozand C. An updated review of *Listeria monocytogenes* in the pork meat industry and its products. Journal of Applied Microbiology 2006;101(1):7-17.

Thomas DY, Jarraud S, Lemercier B, Cozon G, Echasseriau K, Etienne J, et al. Staphylococcal enterotoxin-like toxins U2 and V, two new staphylococcal superantigens arising from recombination within the enterotoxin gene cluster. Infection and Immunity 2006;74:4724-34.

Tranter HS. Foodborne staphylococcal illness. Lancet 1990;336(8722):1044-6.

Tschäpe H, Bockemühl J. Lebensmittelübertragene Salmonellose in Deutschland. Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforschung - Gesundheitsschutz 2002;45:491-6.

Tsigarida E, Skandamis P, Nychas GJE. Behaviour of *Listeria monocytogenes* and autochthonous flora on meat stored under aerobic, vacuum and modified atmosphere packaging conditions with or without the presence of oregano essential oil at 5 degrees C. Journal of Applied Microbiology 2000;89(6):901-9.

Valero A, Perez-Rodriguez F, Carrasco E, Fuentes-Alventosa JM, Garcia-Gimeno RM, Zurera G. Modelling the growth boundaries of *Staphylococcus aureus*: Effect of temperature, pH and water activity. International Journal of Food Microbiology 2009;133(1-2):186-94.

van Asselt ED, Zwietering MH. A systematic approach to determine global thermal inactivation parameters for various food pathogens. International Journal of Food Microbiology 2006;107(1):73-82.

van Belkum A, Melles DC, Peeters JK, van Leeuwen WB, van Duijkeren E, Huijsdens XW, et al. Methicillin-resistant and -susceptible *Staphylococcus aureus* sequence type 398 in pigs and humans. Emerging Infectious Diseases 2008;14(3):479-83.

Van Coillie E, Werbrouck H, Heyndrickx M, Herman L, Rijpens N. Prevalence and typing of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat food products on the Belgian market. Journal of Food Protection 2004;67(11):2480-7.

Vazquez-Boland JA, Kuhn M, Berche P, Chakraborty T, Dominguez-Bernal G, Goebel W, et al. *Listeria* pathogenesis and molecular virulence determinants. Clinical Microbiology Reviews 2001;14(3):584-96.

Velasquez A, Breslin TJ, Marks BP, Orta-Ramirez A, Hall NO, Booren AM, et al. Enhanced thermal resistance of *Salmonella* in marinated whole muscle compared with ground pork. Journal of Food Protection 2010;73(2):372-5.

Wallin-Carlquist N, Marta D, Borch E, Radstrom P. Prolonged expression and production of *Staphylococcus aureus* enterotoxin A in processed pork meat. International Journal of Food Microbiology 2010;141:S69-S74.

Ward LT, de Sa JHD, Rowe B. A phage-typing scheme for *Salmonella* Enteritidis. Epidemiology and Infection 1987;99(2):291-4.

Warsow CR, Orta-Ramirez A, Marks BP, Ryser ET, Booren AM. Single directional migration of *Salmonella* into marinated whole muscle turkey breast. Journal of Food Protection 2008;71(1):153-6.

Weese JS, Reid-Smith R, Rousseau J, Avery B. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) contamination of retail pork. Canadian Veterinary Journal-Revue Veterinaire Canadienne 2010;51(7):749-52.

Wei QK, Hwang SL, Chen TR. Microbiological quality of ready-to-eat food products in southern Taiwan. Journal of Food and Drug Analysis 2006;14(1):68-73.

Weinberg H. From packaging to dispatch. Increasing sales of self-service packaged products requires efficient logistics. Fleischwirtschaft 1999;79(8):43-5.

Weinstein DL, Jackson MP, Samuel JE, Holmes RK, O´Brien AD. Cloning and sequencing of a Shiga-like toxin typ II variant from Escherichia coli strain responsible for edema disease of swine. Journal of Bacteriology 1988;170(9):4223-30.

Wen QY, McClane BA. Detection of enterotoxicogenic *Clostridium perfringens* type A isolates in American retail foods. Applied and Environmental Microbiology 2004;70(5):2685-91.

Wen QY, Miyamoto K, McClane BA. Development of a duplex PCR genotyping assay for distinguishing *Clostridium perfringens* type A isolates carrying chromosomal enterotoxin *cpe* genes from those carrying plasmid-borne enterotoxin *cpe* genes. Journal of Clinical Microbiology 2003;41(4):1494-8.

Wesley IV, Larsen S, Hurd HS, Mckean JD, Griffith R, Rivera F, et al. Low prevalence of *Listeria monocytogenes* in cull sows and pork. Journal of Food Protection 2008;71(3):545-9.

Williams-Campbell A, Solomon M, Wynn M. The effect of retail marinades on *E. coli* O157:H7 B6914 on beef stew pieces. Abstracts of the General Meeting of the American Society for Microbiology 2001;101.

Witte W, Cuny C, Strommenger B, Braulke C, Heuck D. Emergence of a new community acquired MRSA strain in Germany. Eurosurveillance 2004;9(1):16-8.

Wong TL, Carey-Smith GV, Hollis L, Hudson JA. Microbiological survey of prepackaged pate and ham in New Zealand. Letters in Applied Microbiology 2005;41(2):106-11.

Yamada S, Ohashi E, Agata N, Venkateswaran K. Cloning and nucleotide sequence analysis of *gyrB* of *Bacillus cereus*, *B. thuringinesis, B. mycoides* and *B. anthracis* and their application to the detection of *B. cereus* in rice. Applied and Environmental Microbiology 1999;65(4):1483-90.

Yeh KS, Chen SP, Lin JH. One-year (2003) nationwide pork carcass microbiological baseline data survey in Taiwan. Journal of Food Protection 2005;68(3):458-61.

Yifan Z, Yeh E, Hall G, Cripe J, Bhagwat AA, Meng J. Characterization of *Listeria monocytogenes* isolated from retail foods. International Journal of Food Microbiology 2007;113(1):47-53.

Yoon Y, Calicioglu M, Kendall PA, Smith GC, Sofos JN. Influence of inoculum level and acidic marination on inactivation of *Escherichia coli* O157 : H7 during drying and storage of beef jerky. Food Microbiology 2005;22(5):423-31.

Yoon Y, Geornaras I, Kendall P, Sofos J. Modeling the effect of marination and temperature on *Salmonella* inactivation during drying of beef jerky. Journal of Food Science 2009;74(4).

Yuste M, Orden JA, De La Fuente R, Ruiz-Santa-Quiteria JA, Cid D, Martinez-Pulgarin S, et al. Polymerase chain reaction typing of genes of the locus of enterocyte effacement of ruminant attaching and effacing *Escherichia coli*. Canadian Journal of Veterinary Research-Revue Canadienne de Recherche Veterinaire 2008;72(5):444-8.

Zhou ZJ, Nishikawa Y, Zhu P, Hong S, Hase A, Cheasty T, et al. Isolation and characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157 : H7 from beef, pork and cattle fecal samples in Changchun, China. Journal of Veterinary Medical Science 2002;64(11):1041-4.

Zimmerhackl LB, Rosales A, Hofer J, Riedl M, Jungraithmayr T, Mellmann A, et al. Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O26:H11-associated hemolytic uremic syndrome: bacteriology and clinical presentation. Seminars in Thrombosis and Hemostasis 2010;36(6):586-93.

Zouharova M, Rysanek D. Multiplex PCR and RPLA identification of *Staphylococcus aureus* enterotoxigenic strains from bulk tank milk. Zoonoses and Public Health 2008;55(6):313-9.

Zschock M, Nesseler A, Sudarwanto I. Evaluation of six commercial identification kits for the identification of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis. Journal of Applied Microbiology 2005;98(2):450-5.

Zweifel C, Baltzer D, Stephan R. Microbiological contamination of cattle and pig carcasses at five abattoirs determined by swab sampling in accordance with EU Decision 2001/471/EC. Meat Science 2005;69(3):559-66.

Zweifel C, Nauer T, Stephan R. Growth and persistence of *Escherichia coli* O26:H11, O157:H7, O157:H45 and O159:H- related to acid stress. Archiv für Lebensmittelhygiene 2009;60(4):135-40.

Gesetze, Verordnungen, Normen und amtliche Methoden:

Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 LFGB (1980)
Untersuchung von Lebensmitteln, Methode L06.00-3:
Messung des pH-Wertes in Fleisch und Fleischerzeugnissen
Beuth, Berlin

Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 LFGB (1980)
Untersuchung von Lebensmitteln, Methode L20.01/02-1:
Messung des pH-Wertes in Mayonnaisen und emulgierten Soßen
Beuth, Berlin

Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 LFGB (1980)
Untersuchung von Lebensmitteln, Methode L06.00-16:
Mikrobiologische Untersuchung von Fleisch und Fleischerzeugnissen –
Vorbereitung der Proben
Beuth, Berlin

Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 LFGB (1984)
Untersuchung von Lebensmitteln, Methode L06.00-18:
Bestimmung der aeroben Keimzahl bei + 30 °C in Fleisch und Fleischerzeugnissen –
Spatel- und Plattengussverfahren
Beuth, Berlin

Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 LFGB (1987)
Untersuchung von Lebensmitteln, Methode L06.00-24:
Bestimmung der *Enterobacteriaceae* in Fleisch
Spatelverfahren (Referenzverfahren)
Beuth, Berlin

Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 LFGB (1990)
Untersuchung von Lebensmitteln, Methode L20.01-3:
Vorbereitung der Proben für die mikrobiologische Untersuchung von Mayonnaisen,
emulgierten Soßen und kalten Fertigsoßen
Beuth, Berlin

Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 LFGB (1990)
Untersuchung von Lebensmitteln, Methode L20.01-5:
Bestimmung der aeroben Keimzahl bei + 30 °C in Mayonnaisen, emulgierten Soßen
und kalten Fertigsoßen – Spatel- und Plattengussverfahren
Beuth, Berlin

Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 LFGB (1992)
Untersuchung von Lebensmitteln, Methode L00.00-25:
Bestimmung präsumtiver *Bacillus cereus* in Lebensmitteln –
Koloniezählverfahren
Beuth, Berlin

Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 LFGB (1992)
Untersuchung von Lebensmitteln, Methode L06.00-35:
Bestimmung von aerob wachsenden Milchsäurebakterien in Fleisch und Fleischer-
zeugnissen – Spatelverfahren (Referenzverfahren)
Beuth, Berlin

Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 LFGB (1998)
Untersuchung von Lebensmitteln, Methode L00.00-20:
Horizontales Verfahren für den Nachweis von Salmonellen
Beuth, Berlin

Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 LFGB (2000)
Untersuchung von Lebensmitteln, Methode L00.00-55:
Zählung von Koagulase-positiven Staphylokokken in Lebensmitteln –
Teil 1: Verfahren mit Baird-Parker-Medium
Beuth, Berlin

Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 LFGB (2006)
Untersuchung von Lebensmitteln, Methode L00.00-22:
Horizontales Verfahren für Nachweis und Zählung von *Listeria monocytogenes* in Lebensmitteln
Teil 2: Zählverfahren
Beuth, Berlin

Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 LFGB (2006)
Untersuchung von Lebensmitteln, Methode L00.00-92:
Nachweis von verotoxinbildenden *Escherichia coli* in Lebensmitteln tierischer Herkunft
Beuth, Berlin

Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 LFGB (1994)
Untersuchung von Lebensmitteln, Methode L06.00-39:
Bestimmung von mesophilen sulfitreduzierenden Clostridien in Fleisch und Fleischerzeugnissen – Plattengussverfahren (Referenzverfahren)
Beuth, Berlin

Deutsches Lebensmittelbuch-Leitsätze (2009)
Leitsätze für Fisch, Krebs- und Weichtiere und Erzeugnisse daraus
i.d.F. vom 10. und 11. März 1966
Bek. v. 26.7.1966 (GMBl S. 404, Fortsetzung GMBl 1969 S. 42 GMBl 1970 S. 27 und GMBl 1972 S. 612)
Zuletzt geändert durch Nr. 2 Bek. Von weiteren Leitsätzen des Deutschen Lebensmittelbuches v. 19.10.1993 (Bek. v. 25.4.1994)

Deutsches Lebensmittelbuch (2009)
Leitsätze für Gewürze und andere würzende Zutaten
i.d.F. vom 27. Mai 1998
Bek. V. 25.8.1998 (GMBl S. 577)

DIN 58940, 1992-1996
Medizinische Mikrobiologie und Methoden zur Empfindlichkeitsprüfung von bakteriellen Krankheitserregern (außer Mykobakterien) gegen Chemotherapeutika.
Berlin, Beuth-Verlag, Teil 1-20.

VERORDNUNG (EG) Nr. 2073/2005 DER KOMMISSION über mikrobiologische Kriterien für Lebensmittel vom 15. November 2005
Amtsblatt der Europäischen Union L 338/1

9 Anhang

Tab.1: Probencodierung der untersuchten Schweinenackensteaks in Senfmarinade im Probennahmezeitraum 2008 und 2009

Nr. in 2008	Nr. in 2009	Bezeichnung	Hersteller-Code	Supermarkt
S 1	S 35	Biersteaks vom Schwein mit Schwarzbier	B	Netto
S 2	S 38	Schweine-Nackensteaks in Senfmarinade	D	REWE
S 3	S 39	Schweine-Nackensteaks in Senfmarinade	D	REWE
S 4	S 48	Schwarzbiersteaks	E	Plus
S 5	S 42	Bier-Steak	H	Diska
S 6	S 46	Senf-Steak	H	Diska
S 7	S 36	Biersteaks vom Schwein mit Schwarzbier	B	Netto
S 8	S 37	Biersteaks vom Schwein mit Schwarzbier	B	Netto
S 9	S 29	Nackensteaks in Biermarinade	I	E-center
S 10	S 30	Nackensteaks in Biermarinade	I	E-center
S 11	S 44	Schweine-Nackensteaks in Biermarinade	D	REWE
S 12	S 45	Schweine-Nackensteaks in Biermarinade	D	REWE
S 13	S 43	Bier-Steak	H	Diska
S 14	S 47	Bier-Steak	H	Diska
S 15	S 49	Biersteak vom Schweinenacken/ -kamm	L	Kaufland
S 16	S 50	Biersteak vom Schweinenacken/ -kamm	L	Kaufland
S 17	S 40	Grillbuffet-Nackensteaks in Biermarinade	M	real
S 18	S 41	Grillbuffet-Nackensteaks in Biermarinade	M	real
S 19	S 31	Nackensteaks in Biermarinade	I	E-center
S 20	S 32	Nackensteaks in Biermarinade	I	E-center
S 21	S 33	Nackensteaks in Biermarinade	I	E-center
S 22	S 34	Nackensteaks in Biermarinade	I	E-center
S 23	S 26	Nackensteaks in Senfmarinade	I	E-center
S 24	S 27	Nackensteaks in Senfmarinade	I	E-center
S 25	S 28	Nackensteaks in Senfmarinade	I	E-center

Tab.2: Probencodierung der untersuchten Schweinenackensteaks in Paprikamarinade im Probennahmezeitraum 2008 und 2009

Nr. in 2008	Nr. in 2009	Bezeichnung	Hersteller-Code	Supermarkt
P 1	P 31	Schwenksteak	A	real
P 2	P 38	Schweine-Nackensteaks, mariniert, Paprika	C	LIDL
P 3	P 42	Schweine-Nackensteaks, mariniert, Paprika	C	LIDL
P 4	P 49	Schweine-Nackensteaks Paprika	E	Plus
P 5	P 39	Schweine-Nackensteaks in Chilimarinade	D	REWE
P 6	P 46	Paprika-Nackensteaks	F	ALDI
P 7	P 37	Paprika-Steaks	G	Norma
P 8	P 34	Hals-Steaks in Western-Marinade	B	Netto
P 9	P 41	Paprika-Steaks	J	Norma
P 10	P 47	Paprika-Nackensteaks	F	ALDI
P 11	P 30	Nackensteaks in Paprikamarinade	I	E-center
P 12	P 36	Schweine-Nacken-Steaks in Paprikamarinade	K	REWE
P 13	P 40	Schweine-Nackensteaks in Chilimarinade	D	REWE
P 14	P 35	Schweine-Nackensteaks in Paprikamarinade	D	REWE
P 15	P 32	Schwenksteak	A	Real
P 16	P 26	Steak Mexico	L	Kaufland
P 17	P 50	Schweine-Nackensteaks Paprika	E	Plus
P 18	P 48	Paprika-Steaks	J	Norma
P 19	P 43	Schweine-Nackensteaks, mariniert, Paprika	C	LIDL
P 20	P 33	Schwenksteak	A	Real
P 21	P 27	Steak Mexico	L	Kaufland
P 22	P 28	Steak Mexico	L	Kaufland
P 23	P 29	Steak Mexico	L	Kaufland
P 24	P 44	Schweine-Nackensteaks, mariniert, Paprika	C	LIDL
P 25	P 45	Schweine-Nackensteaks, mariniert, Paprika	C	LIDL

Tab.3: Probencodierung der untersuchten Schweinenackensteaks in Kräutermarinade im Probennahmezeitraum 2008 und 2009

Nr. in 2008	Nr. in 2009	Bezeichnung	Hersteller-Code	Supermarkt
K 1	K 33	Hals-Steaks in Kräuter-Marinade	B	Netto
K 2	K 48	Hals-Steaks in Bärlauch-Marinade	B	Netto
K 3	K 45	Schweine-Nackensteaks, mit Kräutern der Provence	C	LIDL
K 4	K 37	Nackensteaks in Knoblauch-Sahnemarinade	D	REWE
K 5	K 34	Schweine-Nackensteaks in Bärlauchmarinade	D	REWE
K 6	K 26	Schweine-Nackensteaks Kräuter	E	Plus
K 7	K 46	Kräuter-Nackensteaks	F	ALDI
K 8	K 43	Kräuter-Steaks	G	Norma
K 9	K 44	Kräuter-Steaks	J	Norma
K 10	K 47	Kräuter-Nackensteaks	F	ALDI
K 11	K 32	Nackensteaks in Kräutermarinade	I	E-center
K 12	K 28	Schweinenackensteaks Kräuter	E	Plus
K 13	K 35	Schweine-Nackensteaks in Bärlauchmarinade	D	REWE
K 14	K 40	Schweine-Nacken-Steaks in Kräutermarinade	K	REWE
K 15	K 39	Nackensteaks in Knoblauch-Sahnemarinade	D	REWE
K 16	K 27	Gyros-Steak	A	real
K 17	K 31	Farmer-Steak	A	real
K 18	K 41	Steak Provence	L	Kaufland
K 19	K 42	Steak Provence	L	Kaufland
K 20	K 30	Gyros-Steak	A	real
K 21	K 49	Kräuter-Steaks	J	Norma
K 22	K 29	Schweine-Nackensteaks Kräuter	E	Plus
K 23	K 38	Schweine-Nackensteaks in Kräuterbuttermarinade	D	REWE
K 24	K 50	Schweine-Nackensteaks, mit Kräutern der Provence	C	LIDL
K 25	K 36	Schweine-Nackensteaks in Bärlauchmarinade	D	REWE

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dir. und Prof. Dr. Dr. habil. M. Gareis, Leiter des Instituts für Mikrobiologie und Biotechnologie am Max Rubner-Institut, Kulmbach, für die Überlassung des Themas, die Bereitstellung des Arbeitsplatzes mit hervorragenden Arbeitsbedingungen sowie die konstruktive Hilfestellung bei der Bearbeitung der Thematik.

Herrn Prof. Dr. Dr. h. c. K. Fehlhaber, Direktor des Instituts für Lebensmittelhygiene der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig, danke ich vielmals für die Übernahme des Themas, das Interesse und den stets freundlichen Rat.

Bei Frau Dr. R. Pichner möchte ich mich ganz herzlich für die jederzeit gewährte Beratung und Unterstützung bei der Umsetzung der Arbeit sowie das unermüdliche Korrekturlesen dieser Dissertationsschrift bedanken.

Den Mitarbeitern des Instituts für Mikrobiologie und Biotechnologie am Max Rubner-Institut, Kulmbach, möchte ich für ihre Hilfsbereitschaft und das hervorragende Arbeitsklima großen Dank aussprechen. Besonders bedanken möchte ich mich bei Frau G. Krappmann, Frau L. Weber, Frau H. Ponert für ihre stets ausgezeichnete technische Assistenz und dem großen Arbeitseifer bei der Bewältigung der umfangreichen Untersuchungen. Mein herzlicher Dank richtet sich auch an Frau E. Gardill und Frau H. Loske für die Hilfestellung bei molekularbiologischen Arbeiten.

Des Weiteren möchte ich mich bei der Adalbert-Raps-Stiftung, Kulmbach, für die Ermöglichung des Forschungsprojekts durch die finanzielle Unterstützung bedanken.

Last but not least möchte ich mich von ganzem Herzen bei meiner Familie und meinem Freund Henrik für die stete Unterstützung bedanken. Auch bei chronisch überstrapazierten Nerven sprachen sie mir immer wieder Mut zu und haben daher den wohl wichtigsten Beitrag zum Gelingen dieser Dissertation geleistet.