

Vorkommen und Verhalten von Lebensmittelinfektionserregern in Minisalamis Teil 1: Ergebnisse einer Marktanalyse zum Vorkommen von *Salmonella* spp., shigatoxinbildenden/enterohämorrhagischen *E. coli* (STEC/EHEC), *Listeria monocytogenes* und Koagulase-positiven Staphylokokken in Minisalami-Produkten

Occurrence and behaviour of food borne pathogens in minisalami
Part 1: Results of a market study on the occurrence of *Salmonella* spp., Shiga toxin
producing/enterohemorrhagic *E. coli* (STEC/EHEC), *Listeria monocytogenes*
and coagulase-positive *Staphylococci* in minisalami

M. GAREIS, J. KABISCH, R. PICHNER und H. HECHELMANN

Zusammenfassung

Im Sommer 2007 wurde von einer überregionalen Häufung von Salmonellosen durch *Salmonella enterica* ssp. *enterica* Serovar Panama (S. Panama) bei Kindern und Kleinkindern mit insgesamt 52 gemeldeten Erkrankten aus zwölf Bundesländern berichtet (Epidemiologisches Bulletin, Nr. 5, 2008, Robert Koch-Institut). Als Ausbruchsvehikel wurden bei einer epidemiologischen Untersuchung (u. a. Fragebogenaktion zum Verzehr- und Einkaufsverhalten bei Fall- und Kontrollpersonen) „Minisalami-Sticks in Tüten“ einer bestimmten Firma („Firma X“) identifiziert und damit Minisalami-Produkte als Risikolebensmittel klassifiziert. Als Reaktion darauf wurde von uns im Rahmen eines vom BMELV initiierten Projektes überprüft, inwieweit pathogene Keime in Minisalamis vorkommen („Marktstudie“) und wie sich die wichtigsten Lebensmittelinfektionserreger (*Salmonella* spp. inkl. des Ausbruchstammes S. Panama, shigatoxinbildende *Escherichia coli* (STEC), *Listeria monocytogenes* und Koagulase-positiven Staphylokokken) in diesen Produkten verhalten („Challengeuntersuchungen“). Die Ergebnisse der Studie dienen als Basis für eine Risikobewertung.

Für die Marktstudie, über die wir in diesem Beitrag berichten, wurden im Mai 2008, Oktober 2008 und Januar 2009 insgesamt 206 Minisalami-Sticks unterschiedlicher Hersteller und Kategorien aus dem Handel erworben und untersucht. Hierzu wurden die Produkte in fünf Gruppen eingeteilt, welche den Hauptanteil der am Markt befindlichen Minisalamierzeugnisse darstellen: geräucherte Minisalami aus Schweinefleisch (n=66), geräucherte Minisalami aus Schweine- und Rindfleisch (n=25), geräucherte Minisalami aus Geflügelfleisch (n=35), luftgetrocknete Minisalami (n=25) und schimmelpilzgereifte Minisalami (n=55).

Die medianen Wasseraktivitätswerte waren bei den geräucherten und luftgetrockneten Minisalamis niedrig (a_w -Werte zwischen 0,82 und 0,84) und bei den schimmelpilzgereiften Produkten mit $a_w=0,69$ deutlich niedriger. Für diese wurden mediane pH-Werte von 5,83 ermittelt. In den geräucherten und luftgetrockneten Produkten wurden mediane pH-Werte um 5,45 bzw. 5,75 gemessen. In keiner der untersuchten Proben wurden Salmonellen, STEC oder *L. monocytogenes* nachgewiesen. In zehn Produkten wurden Koagulase-positiven Staphylokokken mit Keimzahlen um ca. $1,0 \times 10^2$ KbE/g detektiert.

Diese Ergebnisse der am Markt befindlichen Minisalami-Produkte lassen insgesamt auf einen guten hygienischen Qualitätsstandard der verwendeten Rohmaterialien und auf durchweg gute Reife- und Herstellungstechnologien schließen.

Schlüsselwörter	Minisalami – <i>Salmonella</i> spp. – shigatoxinbildende <i>Escherichia coli</i> – <i>Listeria monocytogenes</i> – <i>Staphylococcus</i> spp.
Key Words	raw fermented sausage – <i>Salmonella</i> spp. – Shiga toxin producing <i>Escherichia coli</i> – <i>Listeria monocytogenes</i> – <i>Staphylococcus</i> spp.

Summary

In summer 2007, the Robert Koch Institute reported a supra-regional prevalence of salmonellosis caused by *Salmonella enterica* ssp. *enterica* Serovar Panama (S. Panama) for infants and children. An epidemiological survey identified minisalami of a certain manufacturer ("company X") as a possible carrier and classified this type of raw fermented sausages as being potentially hazardous. Initiated by the Federal Ministry of Food, Agriculture and Consumer Protection, we examined the occurrence and behaviour of the most important food borne pathogens in these products (*Salmonella* spp., Shiga toxin producing *Escherichia coli* (STEC), *Listeria monocytogenes*, coagulase-positive *Staphylococci*) in order to clarify whether minisalami are really food of a high risk.

For the market survey, a total of 206 minisalami sticks of different manufacturers were bought from the retail in May 2008, October 2008 and January 2009: smoked minisalami produced only with pork (n=66), smoked minisalami produced with beef and pork (n=25), smoked minisalami produced with poultry meat (n= 35), air dried minisalami (n=25) and mould ripened minisalami (n=55). *Salmonellae*, STEC as well as *L. monocytogenes* could not be found in any of the 206 sausages examined. Coagulase-positive *Staphylococci* were detected in 10 products with low germ counts (1.0×10^2 cfu/g). Overall, the results document proper hygiene standards of the raw material as well as good production and manufacturing technologies.

Einleitung

Im Juli/August 2007 kam es in Deutschland zu einer überregionalen Häufung von Infektionen mit *Salmonella enterica* ssp. *enterica* Serovar Panama bei Kindern und Kleinkindern mit insgesamt 52 gemeldeten Erkrankten aus zwölf Bundesländern (RKI, 2008). In einer Fall-Kontroll-Studie (22 Fallpersonen bzw. deren Eltern, 62 Kontrollen bzw. deren Eltern) wurden mit Hilfe eines kurzen Fragebogens demographische Basisdaten sowie Verzehr- und Einkaufsverhalten unter Einbeziehung möglicher Expositionsquellen (neben Minisalami-Produkten auch Roheiprodukte, rohes Hackfleisch, Streichmettwurst, Geflügel, panierte Hähnchenteile) ermittelt. Für die 22 Fallpersonen wurde ein Altersmedian von 20 Monaten festgestellt. Als statistisches Ergebnis der epidemiologischen Studie zeigten sich Minisalami-Sticks als hochsignifikanter Risikofaktor.

Die Charakterisierung der isolierten *Salmonella*-Stämme mit Hilfe der Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE) und Multiple-Locus Variable-Number Tandem Repeat Analysis (MLVA) ergab, dass alle elf verfügbaren Isolate von Fallpersonen zu einem Ausbruchstamm gehörten. Ebenfalls dazu gehörig war ein Isolat eines nicht erkrankten Ausscheiders, der als Mitarbeiter

bei der „Firma X“ beschäftigt war, sowie ein Isolat des 10 Monate alten Enkelkindes einer Mitarbeiterin der „Firma X“. Bei Betriebsbegehungen durch die zuständigen Behörden wurden dort weder Hygienemängel noch Mängel der Produktsicherheit in der „Firma X“ festgestellt. Sämtliche Untersuchungen von Lebensmitteln aus der „Firma X“ zeigten, dass Salmonellen in den Minisalami-Produkten in keinem Falle nachweisbar waren.

Im Februar 2008 wurde darüber im Epidemiologischen Bulletin 5/2008 des Robert Koch-Institutes berichtet (*Salmonella*-Panama-Erkrankungen: Zu einem überregionalen Ausbruch bei Kindern durch Minisalami-Sticks). Im Diskussionsabschnitt dieses Artikels wurden die von der „Firma X“ produzierten Minisalami-Sticks aus epidemiologischer Sicht als das wahrscheinlichste Infektionsvehikel für S. Panama bei Kindern und Kleinkindern im Juli/August 2007 angesprochen und dabei bemerkt, dass sich derzeit nicht abschätzen lässt, wie risikobehaftet die spezielle Art der Reifung in Bezug auf kleinkalibrige Minisalamis ist.

Eine Definition für das Produkt Minisalami nach den Leitsätzen des Deutschen Lebensmittelbuchs für Fleisch und Fleisch-erzeugnisse gibt es nicht (Leitsätze für

Tab. 1: Einteilung des Handelsangebotes für Minisalamis nach Produkttypen

Typ	Rohstoff	Anzahl untersucht	
A	Minisalami geräuchert	Schweinefleisch	n = 66
B	Minisalami geräuchert	Schweine-/Rindfleisch	n = 25
C	Minisalami geräuchert	Geflügelfleisch	n = 35
D	Minisalami luftgetrocknet	Schweinefleisch	n = 25
E	Minisalami schimmelpilzgereift	Schweinefleisch	n = 55

Fleisch und Fleischerzeugnisse, 2008). Somit werden diese Erzeugnisse nach dem Leitsatz 2.211 zu den schnittfesten Rohwürsten gezählt. Minisalamis sind damit fermentierte Rohwurstzeugnisse mit einem sehr kleinen Kaliber von 16 bis 25 mm. Rohwurstprodukte wie die Minisalami werden ausschließlich über einen geeigneten Fermentationsprozess stabilisiert. Ablauf und Bedingungen dieses Prozesses sowie Zusatzstoffe und Qualität der Ausgangsmaterialien entscheiden dabei letztlich über die mikrobiologische Stabilität und die Sicherheit des Endproduktes.

Auf dem Markt erhältlich sind eine Reihe unterschiedlicher Minisalami-Produkte, die sich anhand des verwendeten Rohmaterials (Schweine-, Rind- und Geflügelfleisch) und der Herstellungsart (geräuchert, luftgetrocknet, schimmelpilzgereift) differenzieren lassen. Trotz der großen Vielfalt werden alle mit Nitritpökelsalz hergestellt.

Da Minisalami-Produkte aufgrund der zuvor geschilderten Salmonelloseproblematik vom Robert Koch-Institut als Risikolebensmittel klassifiziert wurden, sollte von uns im Rahmen eines vom BMELV initiierten Projektes überprüft werden, inwieweit pathogene Keime in Minisalamis vorkommen („Marktstudie“) und wie sich die wichtigsten Lebensmittelinfektionserreger (*Salmonella* spp. inkl. des Ausbruchstammes *S. Panama*, shigatoxinbildende *Escherichia coli* (STEC), *Listeria monocytogenes* und Koagulase-positive *Staphylococcus* spp.) in diesen Produkten verhalten („Challengeuntersuchungen“). Über die Ergebnisse der Marktstudie wird zunächst berichtet.

Material und Methoden

Um einen Überblick über die Belastung von handelsüblichen Minisalamierzeugnis-

sen zu erhalten, wurden in den Monaten Mai und Oktober 2008 sowie im Januar 2009 eine Marktanalyse durchgeführt und insgesamt 206 Minisalamiprodukte von 13 unterschiedlichen Herstellern und Anbietern untersucht. Hierzu wurden die Produkte in fünf Gruppen eingeteilt, welche den Hauptanteil der am Markt befindlichen Minisalamierzeugnisse darstellen (Tab. 1).

Die mikrobiologische Untersuchung konzentrierte sich auf *Salmonella* spp., shigatoxinbildende *Escherichia coli* (STEC), *Listeria monocytogenes* und Koagulase-positive *Staphylococcus* spp.. Erfasst wurden zudem die aerobe mesophile Gesamtkeimzahl sowie die Anzahl der Milchsäure- und Enterobakterien. Gemessen wurden zudem die jeweiligen pH- und a_w -Werte. Bei den schimmelpilzgereiften Produkten wurde zudem das Vorkommen des Mykotoxins Ochratoxin A untersucht.

Physikalisch-chemische Parameter

Messung des Säuregrades (pH-Wert). Die pH-Wertmessung der Proben wurde an allen Untersuchungstagen elektrometrisch mit einem pH-Meter durchgeführt. Die pH-Elektrode wurde einmal täglich mit Standard-Pufferlösungen mit pH 4 und pH 7 bei Raumtemperatur kalibriert.

Messung der Wasseraktivität (a_w -Wert). Die Wasseraktivitätswerte wurden mit einem a_w -Kryometer über eine Dreifachmessung ermittelt (RÖDEL *et al.*, 1989).

Ochratoxin A-Analyse. Die Ochratoxin A-Messung der Proben erfolgte nach Extraktaufreinigung über Immunitätssäulen und HPLC-Trennung mit Fluoreszenzdetektor (GAREIS and SCHEUER, 2000). Die Nachweisgrenze der Methode wurde mit 0,01 µg/kg bestimmt.

Mikrobiologische Diagnostik

Aerobe mesophile Gesamtkeimzahl, Pseudomonaden-, Enterobacteriaceae- und Milchsäurebakterienkeimzahl. Von jedem Minisalami-Produkt wurden jeweils 3 Würste untersucht. Von diesen wurden 25 Gramm in sterile Stomacherbeutel eingewogen und mit 225 ml steriler, physiologischer Kochsalzlösung verdünnt und homogenisiert. Nach Anlegen einer dezimalen Verdünnungsreihe wurden für die Bestimmung der Gesamtkeimzahl jeweils 0,1 ml der Erstverdünnung bzw. der entsprechenden Verdünnungsstufe auf Standard I Agar ausgespatelt und für 48 Stunden bei 30 °C inkubiert. Die *Enterobacteriaceae*-Keimzahl wurde auf DHL-Agar (Merck) nach 24 h bei 37 °C und die Milchsäurebakterien-Anzahl auf MRS-Agar (Oxoid) nach 48 h bei 30 °C bestimmt. Der Nachweis von Pseudomonaden wurde mit Hilfe der Cytochromoxidase-Reaktion durchgeführt. Hierzu wurden die auf DHL-Agar gewachsenen Kolonien mit Nadi-Reagenz benetzt. Kolonien, die nach ca. 1 min eine gleichmäßig tiefblaue Farbe aufwiesen, wurden als Pseudomonaden gezählt. Die Berechnung der Keimdichte der eingepfachten Stämme sowie die Zahl aerober Milchsäurebakterien und der aeroben mesophilen Keimflora erfolgte wie unter der Methode L 06.00 nach der amtlichen Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 LFGB Punkt 8 beschrieben.

***Salmonella* spp.**

Kultureller Nachweis nach DIN EN ISO 6579:2003: Die Rohwürste wurden mit

einem sterilen Skalpell senkrecht in der Mitte aufgeschnitten. Jeweils 25 g Probe wurde, unter sterilen Bedingungen, sowohl aus der Wurstmitte als auch aus dem Randbereich entnommen und in einen Stomacherbeutel mit Seitenfilter überführt. Da in den Produkten nur mit geringen Keimdichten gerechnet werden konnte, erfolgte eine selektive Anreicherung. Dazu wurden 25 g Probe in 225 ml gepuffertes Peptonwasser (Sifin) (+FerriOx) überführt, zerkleinert und für 18 Stunden bei 37 °C bebrütet. Von der Voranreicherung wurden anschließend 0,1 ml zu 10 ml RVS-Bouillon (Merck) pipettiert. Die beimpfte RVS-Bouillon wurde für 24 h unter ständigem Schütteln (180 rpm) bei 41 °C inkubiert. Aus der RVS-Bouillon erfolgte ein Verdünnungsausstrich mit einer Impföse auf dem XLD- (Oxoid) und DHL-Agar. Parallel zur selektiven Anreicherung wurde zur Bestätigung des Ergebnisses auch ein molekularbiologischer Nachweis durchgeführt.

Molekularbiologischer Nachweis: Für den genotypischen Nachweis von *Salmonella enterica* wurden die Proben nach einer von MIKO *et al.* (2000) modifizierten Methode nach RAHN *et al.* (1992) auf das Vorliegen des *invA*-Gens untersucht. Für die DNA-Extraktion wurde 1 ml des inkubierten Voranreicherungsmediums für 15 min bei 100 °C erhitzt, durch Zentrifugieren für 5 min bei 8000 rpm Zellbruchstücke von der genomischen DNA getrennt, 5 µl des Überstandes entnommen und dem Ansatz für die PCR (siehe Tab. 2) zugeführt.

Tab. 2: Reaktionsansatz und Cyclerprogramm zum Nachweis des *invA*-Gens

PCR-Reaktionsansatz	PCR-Cyclerprogramm
37,78 µl Aqua bidest.	<u>Denaturierung:</u>
5 µl Puffer (Mg-frei; PeqLab)	5 min 95 °C
0,65 µl MgCl ₂ (PeqLab)	<u>Amplifikation: 25 Zyklen</u>
0,8 µl dNTP-Mix (PeqLab)	70 sec 90 °C
0,075 µl Primer 139 (Biometra)	100 sec 60 °C
0,075 µl Primer 141 (Biometra)	102 sec 72 °C
0,625 µl Polymerase (PeqLab)	<u>Renaturierung:</u>
5 µl genomische DNA	7 min 72 °C

Tab. 3: Reaktionsansatz für die Amplifikationskontrolle

PCR-Reaktionsansatz	PCR-Cyclerprogramm
16,60 µl Aqua bidest.	<u>Denaturierung:</u> 5 min 95 °C
3,13 µl Puffer (Mg-frei; PeqLab)	<u>Amplifikation: 25 Zyklen</u>
0,60 µl MgCl ₂ (PeqLab)	30 sec 95 °C
2,0 µl dNTP-Mix (PeqLab)	30 sec 65 °C
0,1 µl Primer HB 10 (Biometra)	60 sec 72 °C
0,1 µl Primer HB 11 (Biometra)	<u>Renaturierung:</u>
0,2 µl Taq-Polymerase (PeqLab)	7 min 72 °C
1 µl puC 19 DNA	

Nach dem Ablauf des Cyclerprogrammes (vgl. Tab. 2) wurden die Amplifikate mit je 5 µl Gel-Loading-Puffer gemischt, 10 µl einer Probe auf ein 2%iges Agarosegel aufgetragen und gelelektrophoretisch getrennt. Je Gel wurden zwei Positivkontrollen und der Molecular Weight Marker XIII (Roche), je Reaktionsansatz eine Negativkontrolle mitgeführt. Nach Färben der Gele in Ethidiumbromidlösung wurden die Laufbanden unter UV-Licht sichtbar gemacht. Ein spezifisches Amplifikat auf Höhe der Positivkontrolle (284 Basenpaare) galt als positiver *Salmonella*-Nachweis. Als Positivkontrolle diente ein Pool von Stämmen der Serovarietäten *Salmonella* Typhimurium und *Salmonella* Panama.

Um falsch negative Ergebnisse durch PCR-Inhibitoren auszuschließen, wurden für alle Proben externe Amplifikationskontrollen mitgeführt (siehe Tab. 3). Ein spezifisches Amplifikat auf Höhe der Positivkontrolle (429 Basenpaare) galt als Bestätigung für eine nicht inhibierte PCR.

Shigatoxinbildene/enterohämorrhagische *E. coli* (STEC/EHEC)

Kultureller Nachweis: Das Probenmaterial (25 g) wurde steril aus dem Produkt entnommen und in 225 ml Trypton-Soja-Bouillon (TSB; Merck) überführt und für 18 Stunden bei 37 °C geschüttelt. Anschließend erfolgte nach Überpipettieren von 1,0 ml dieser Kultur in 4 ml sterile TSB mit 10 mg Novobiocin/l eine erneute Anreicherung für 16 Stunden bei 180 rpm

geschüttelt. Am nächsten Tag wurde von diesem Homogenat eine dezimale Verdünnungsreihe angelegt und auf SMAC (Merck) die Verdünnungsstufen 10⁻¹, 10⁻² und 10⁻³ ausplattiert und für 24 Stunden bei 37 °C inkubiert. In regelmäßigen Abständen wurden verdächtige Kolonien von den SMAC- und DHL Nährböden abgenommen und auf einem chromogenen Medium (Fluorocult; Merck) für 24 Stunden bei 30 °C subkultiviert. β-D-Glucuronidase-positive Kolonien wurden als *E. coli* gewertet.

Molekularbiologischer Nachweis: Für den genotypischen Nachweis von enterohämorrhagischen *Escherichia coli* (EHEC) wurden die Proben molekularbiologisch mittels PCR auf die Fähigkeit zur Shigatoxinbildung, in Anlehnung an die Methode L07.18-1 der Amtlichen Sammlung nach § 64 LFGB untersucht. Von den Anreicherungen wurden verdächtige Kolonien mit Hilfe einer sterilen Impföse entnommen und in 1 ml physiologischer Kochsalzlösung in einem 2 ml Eppendorfgefäß suspendiert. Die Suspension wurde 10 min bei 100 °C gekocht. Anschließend wurde der Ansatz für 5 min bei 8000 rpm zentrifugiert, um grobe Zellbestandteile zu sedimentieren. Jeweils 1 µl des Überstandes wurde in einem folgenden Schritt den Reaktionsansätzen (siehe Tabellen 4 und 5) zugegeben. In zwei separaten PCR-Ansätzen wurden sowohl das stx 1- als auch das stx 2-Gen nachgewiesen.

Tab. 4: Reaktionsansatz und Cyclerprogramm für stx 1 Screening

PCR-Reaktionsansatz	PCR-Cyclerprogramm
20,25 µl Aqua bidest.	<u>Denaturierung:</u> 5 min 94 °C
2,5 µl Puffer (blau; PeqLab)	<u>Amplifikation: 30 Zyklen</u>
0,50 µl dNTP-Mix (PeqLab)	30 sec 94 °C
0,25 µl Primer KS 7 (Biometra)	60 sec 52 °C
0,25 µl Primer KS 8 (Biometra)	40 sec 72 °C
0,25 µl Polymerase DyNAzyme II (PeqLab)	<u>Renaturierung:</u> 5 min 72 °C
1 µl genomische DNA	
1 µl Aqua bidest. für Negativkontrolle	

Tab. 5: Reaktionsansatz und Cyclerprogramm für stx 2 Screening

PCR-Reaktionsansatz	PCR-Cyclerprogramm
20,25 µl Aqua bidest.	<u>Denaturierung:</u> 5 min 94 °C
2,5 µl Puffer (blau; PeqLab)	<u>Amplifikation: 30 Zyklen</u>
0,50 µl dNTP-Mix (PeqLab)	90 sec 94 °C
0,25 µl Primer LP 43 (Biometra)	90 sec 64 °C
0,25 µl Primer LP 44 (Biometra)	90 sec 72 °C
0,25 µl Polymerase DyNAzyme II (PeqLab)	<u>Renaturierung:</u> 5 min 72 °C
1 µl genomische DNA	
1 µl Aqua bidest. für Negativkontrolle	

Nach Ablauf des Cyclerprogrammes (siehe Tabellen 4 und 5) wurden den Amplifikaten ca. 4 µl Gel-Loading-Puffer zugesetzt. Jeweils 10 µl der Proben-Puffer Mischung wurden unter Mitführung des Molecular Weight Markers XIII in einem 2%igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt, mit Ethidiumbromidlösung gefärbt, in Aqua dest. gewaschen und unter UV-Licht sichtbar gemacht. Als positiv wurden Amplifikate bewertet, die sich auf Höhe der Positivkontrolle befanden und im Fall von stx 1 eine Länge von 285 Basenpaaren und im Fall von stx 2 PCR eine Größe von 584 bp hatten.

Listeria monocytogenes

Kultureller Nachweis: Die Rohwürste wurden mit einem sterilen Skalpell in der Mitte senkrecht aufgeschnitten, anschließend unter sterilen Bedingungen 10 g Probenmaterial entnommen und zusammen mit 90 ml Peptonwasser für 2 min im Stomacher homogenisiert und für 24 h angereichert. Der Nachweis von *Listeria monocytogenes* erfolgte auf PALCAM-Medium (Merck) und parallel dazu auf Chromogen-Listeria-Agar (OCLA; bio-

Mérieux). Kolonien von *Listeria monocytogenes* erscheinen auf diesem Agar türkis und sind von einem hellen Hof umgeben. Die Agarplatten wurden für 48 Stunden bei 37 °C aerob bebrütet. Verdächtige Kolonien wurden zur Bestätigung auf Standard I-Agar subkultiviert. Zur Bestätigung wurden die HENRY'sche Beleuchtung und der CAMP-Test durchgeführt sowie das Hämolyseverhalten und die Rhamnose- sowie die Xyloseverwertung überprüft.

Koagulase-positive Staphylokokken/ *Staphylococcus aureus*

Kultureller Nachweis: Jeweils 20 g Probe wurden in 180 ml physiologischer Kochsalzlösung homogenisiert. Für den quantitativen Nachweis wurde eine dezimale Verdünnungsreihe angelegt und auf MSE-Agar sowie auf RPF-Medium ausgespatelt. Die Agarplatten wurden anschließend für 24 Stunden bei 37 °C aerob bebrütet. Dabei zeigten typische, auf MSE-Agar gewachsene, Staphylokokken-Kolonien ein goldgelbes Koloniezentrum und eine weiße Randzone. Im Gegensatz dazu konnten auf dem RPF-Nährboden für *Sta-*

phylococcus aureus charakteristische schwarz-graue, glänzende, gewölbte Kolonien mit umgebendem, opakem Präzipitationshof nachgewiesen werden (LFGB § 64.00.00-55:2004-12). War kein direkter Nachweis möglich, wurden 25 g Probe in 225 ml Peptonwasser aufgenommen und

24 h bei 37 °C bebrütet. Anschließend erfolgte ein Nachweis der Keime auf MSE-Agar und parallel auf dem RPF-Nährboden. Zur Bestätigung wurde der Test auf Clumping Factor mit fünf typischen Kulturen durchgeführt.

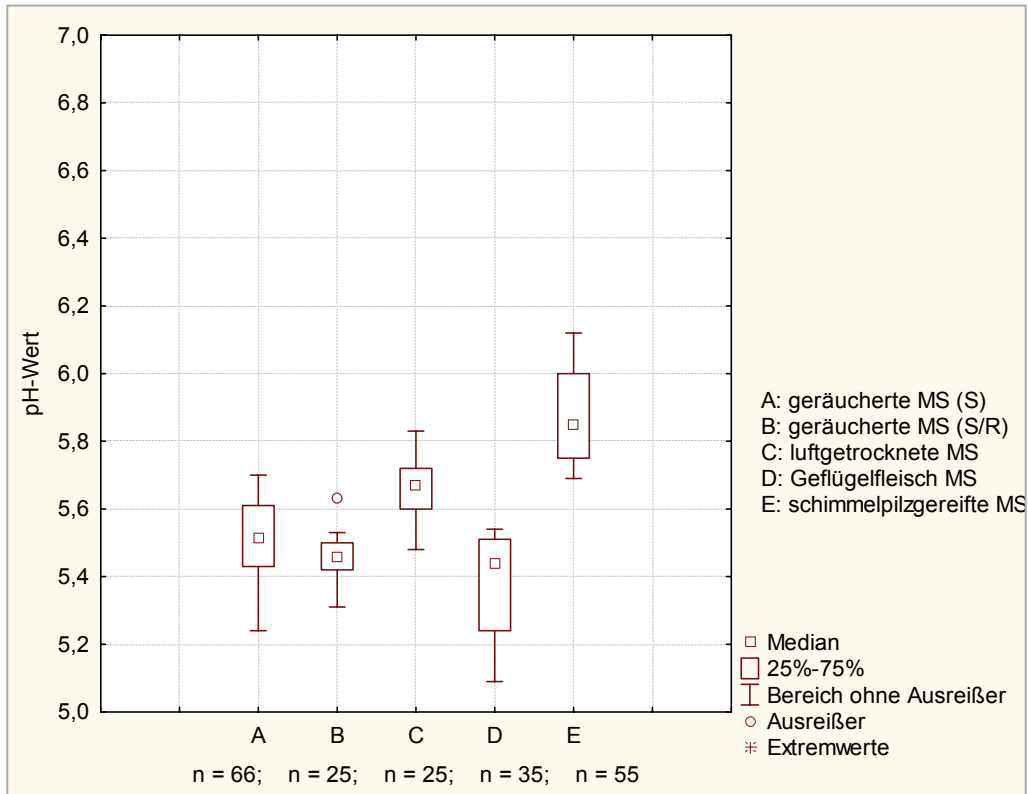


Abb. 1: Ergebnisse der pH-Wertmessungen in Minisalami-Produkten aus dem Handel

Ergebnisse

Marktanalyse

In den Abbildungen 1 und 2 sind die Messergebnisse zu den pH- und a_w -Werten dargestellt. Die medianen pH-Werte liegen in einem produkttypischen Bereich zwischen 5,45 und 5,83, wobei sie zwischen den Produkttypen differieren. Erwartungsgemäß wurden die höchsten pH-Werte beim Produkttyp E, den schimmelpilzgereiften Minisalamis, gemessen. In den mit Geflügelfleisch hergestellten Minisalami-Sticks (Typ D) wurden mediane pH-Werte von 5,42 festgestellt. Damit wies diese Produktgruppe die niedrigsten pH-Werte auf. In den luftgetrockneten und

geräucherten Proben lagen die medianen pH-Werte bei 5,45 bzw. 5,75. Die niedrigsten Wasseraktivitätswerte wurden bei den schimmelpilzgereiften Produkten (Typ E; medianer a_w -Wert 0,69) ermittelt (Abb. 2). Bei den anderen Produkten lagen diese in einem Bereich zwischen 0,82 (Typ D) und 0,84 (Typ A, B, C).

Eine Übersicht zu den mikrobiologischen Befunden der Marktanalyse geht aus der Tabelle 6 hervor. In keiner der insgesamt untersuchten 206 Würste wurden *Salmonellen*, *STEC/EHEC* oder *Listeria monocytogenes* detektiert. *Staphylococcus* spp. wurde in 10 Produkten nachgewiesen, die Keimzahl der positiven Proben lag im Mittel bei 1×10^2 KbE/g.

Überschreitungen nach den Kriterien der VO (EG) Nr. 2073/2005 konnten in den Minisalami-Produkten des deutschen Handels im Rahmen dieser Studie somit nicht festgestellt werden.

Mit Gesamtkeimzahlen zwischen $7,5-8,5 \log_{10}$ KbE/g ($3,2 \times 10^7 - 3,2 \times 10^8$ KbE/g) und Milchsäurebakterienzahlen im Bereich von 1×10^7 KbE/g – 1×10^9 KbE/g wurden in den fünf Produkttypen kaum Unter-

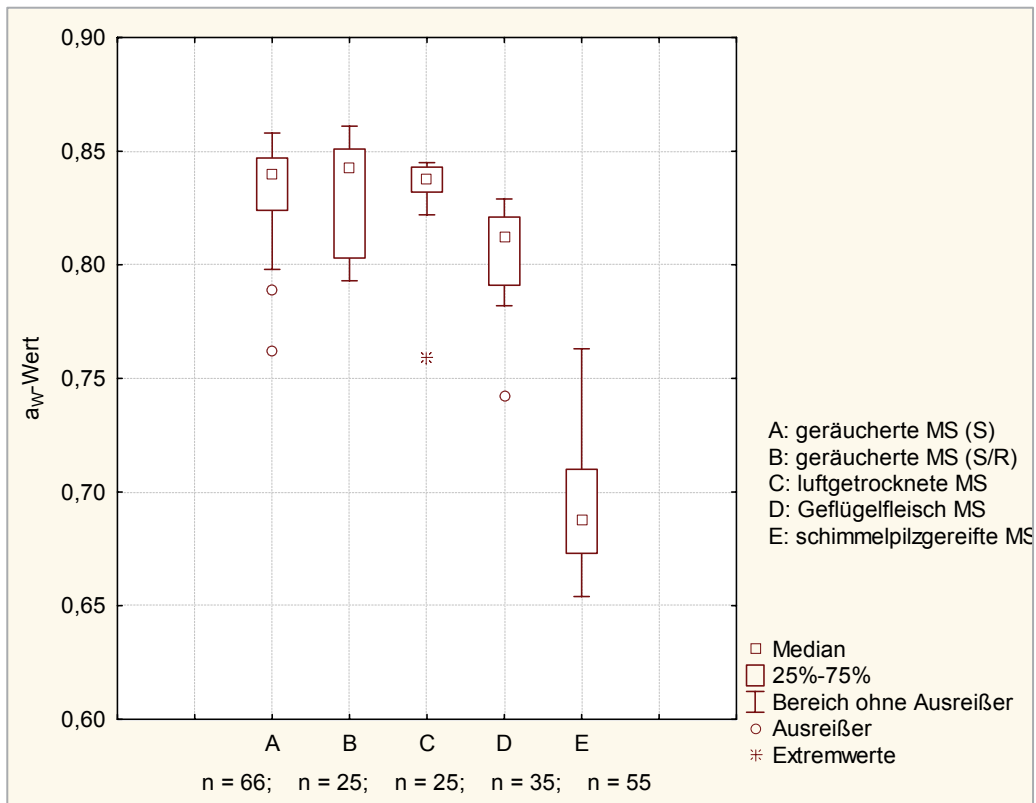


Abb. 2: Ergebnisse der a_w -Wertmessungen in Minisalami-Produkten aus dem Handel

Tab. 6: Ergebnisse zum Vorkommen pathogener Keime in Minisalami-Produkten aus dem Handel

Produktgruppe	Anzahl untersucht	Anzahl positive Proben			
		<i>Salmonella</i> spp.	STEC/EHEC	<i>Listeria monocytogenes</i>	Koagulase-pos. Staphylokokken
A Geräucherte Minisalami (Schweinefleisch)	66	0	0	0	8 (12 %)*
B Geräucherte Minisalami (Schweine- u. Rindfleisch)	25	0	0	0	0
C Geräucherte Minisalami (Geflügelfleisch)	35	0	0	0	0
D Luftgetrocknete Minisalami	25	0	0	0	0
E Schimmelpilzgereifte Minisalami	55	0	0	0	2 (3,6 %)*

* 1×10^2 KbE/g

schiede festgestellt. Für die schimmelpilzgereiften Minisalamis lagen die Gesamtkeimzahlen meist im Bereich von $8,5 \log_{10}$ KbE/g. Pseudomonaden und *Enterobacteriaceae* wurden in keiner der untersuchten Produkte nachgewiesen (quantitative Nachweisgrenze 1×10^1 KbE/g).

Das Mykotoxin Ochratoxin A wurde in den 14 untersuchten schimmelpilzgereiften Minisalamis nicht detektiert und zeigt damit die Verwendung nicht toxinogener Schimmelpilzkulturen für die Herstellung dieser Produkte an.

Diskussion

Fermentierte Fleischerzeugnisse werden vor allem aus einem komplexen Zusammenspiel von verschiedenen Faktoren mikrobiologisch stabilisiert. Neben dem Zusatz von Nitritpökelsalz und der Absenkung des pH-Wertes spielt die Abtrocknung des Produktes eine sehr bedeutende Rolle. Dabei reagieren Gram-negative und Gram-positive Keime hinsichtlich der Tenazität unter niedrigen a_w -Wertbedingungen verschieden (Tab. 7). Aus den Daten in der Literatur wird deutlich, dass Salmonellen und STEC/EHEC höhere Anforderungen an die Wasseraktivität haben als Gram-positive Keime (HOEIJ and NOTERMANS, 2009). So zeigen die Gram-negativen Ver-

treter bereits bei a_w -Werten von $<0,94$ kein Wachstum mehr (TIGANITAS *et al.*, 2009). Im Gegensatz dazu ist eine Vermehrung von *Listeria monocytogenes* bis a_w 0,89 (TIGANITAS *et al.*, 2009) und für *Staphylococcus aureus* bis a_w 0,84 bekannt (VALERO *et al.*, 2009).

Aus diesen Basisdaten sowie aus den in dieser Studie ermittelten Messwerten für den Wasseraktivitätswert der Minisalami-Produkte aus dem Handel (mediane a_w -Werte für geräucherte Minisalamis 0,82-0,84, für luftgetrocknete 0,84 und für schimmelpilzgereifte 0,69; vgl. Abb. 2) lässt sich ableiten, dass eine Vermehrung Gram-negativer Keime in diesen Rohwurstprodukten ausgeschlossen werden kann. Die Negativ-Befunde für die Minisalami-Produkte – in keiner der 206 untersuchten Proben aus dem Handel waren Salmonellen, STEC/EHEC oder *L. monocytogenes* nachweisbar – überraschen daher nicht und weisen gleichzeitig darauf hin, dass die industriellen Herstellungstechnologien zu mikrobiologisch stabilen Rohwurstprodukten führen.

Bezüglich der Tenazitätseigenschaften ist ein besonderes Augenmerk auf Gram-positive Keime, hier auf *S. aureus* zu richten, da Koagulase-positive Staphylokokken immerhin in 4,8 % der Produkte nachzuweisen waren. Die Keimzahlen waren

Tab. 7: Wachstumsbegrenzende Parameter für Lebensmittelinfektionserreger (nach HOEIJ and NOTERMANS, 2009; TIGANITAS *et al.*, 2009; VALERO *et al.*, 2009)

Pathogener Mikroorganismus	Temperatur	Wasseraktivität	pH-Wert
Gram-negative Bakterien:			
<i>Salmonella enterica</i>	5.2 – 46 °C	0.94	4.2 – 9.5
<i>Campylobacter jejuni</i>	30 – 47 °C	0.98	4.9 – 9.0
<i>E. coli</i> O57:H7	8 – 46 °C	0.95	4.2 – 9.5
<i>Shigella sonnei</i>	6 – 47 °C	0.95	4.8 – 9.0
<i>Yersinia enterocolitica</i>	-1.3 – 42 °C	0.94	4.2 – 10.0
Gram-positive Bakterien:			
<i>Listeria monocytogenes</i>	0 – 43 °C	0.89	4.5 – 9.0
<i>Staphylococcus aureus</i>	8 – 45 °C	0.84	4.5 – 9.3
<i>Clostridium botulinum</i> Proteolytic Types A,B,F	10 – 48 °C	0.94	4.6 – 9.0
<i>Clostridium botulinum</i> Non-Proteolytic Types B,E,F	3.3 – 45 °C	0.97	5.0 – 9.0
<i>Bacillus cereus</i>	5 – 50 °C	0.91	4.4 – 9.3

jedoch sehr niedrig, was ebenfalls ein Beleg für die offensichtlich grundsätzlich gute hygienische Qualität der für die Minisalamiproduktion verwendeten Rohstoffe und Herstellungsprozesse ist.

Ochratoxin A konnte in keiner der untersuchten Proben nachgewiesen werden. Dies zeigt, dass von den Herstellern definierte Edelschimmelpilzkulturen eingesetzt werden.

Aufgrund der vorliegenden Ergebnisse ist es eher unwahrscheinlich, dass Minisalami-Sticks als Übertragungsvehikel für *Salmonella* spp. in Frage kommen.

Danksagung

Für die ausgezeichnete technische Assistenz bedanken wir uns bei Frau Elke Gardill, Frau Liane Weber, Frau Georgine Krappmann und Herrn Jörgen Dresel.

Literatur

Gareis, M. and R. Scheuer. 2000. Ochratoxin A in meat and meat products. *Archiv für Lebensmittelhygiene* 51:102-104.

Hoeij, K. and S. Notermans. 2009. Practical risk assessment in food production. *Food Science & Technology* 23 (1): 28-30.

Kabisch, J., R. Scheuer, W. Roedel, and M. Gareis. 2008. Influence on the microbial effect of sodium nitrite in raw fermented sausage. *Mitteilungsblatt der Fleischforschung Kulmbach* 47:99-105.

Miko A., C. Dorn, A. Schroeter, and R. Helmuth 2000. *Salmonella*. BgVVHefte 2:143-165

Rahn, K., S. A. Degrandis, R. C. Clarke, S. A. McEwen, J. E. Galan, C. Ginocchino, R. Curtiss, and C. L. Gyles. 1992. 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* 6:271-279.

RKI. 2008. Salmonella-Panama-Erkrankungen: Zu einem überregionalen Ausbruch bei Kindern durch Minisalami-Sticks. *Epidemiologisches Bulletin* 5.

Rödel, W., R. Scheuer, and H. Wagner. 1989. A new method of determining water activity in meat-products. *Fleischwirtschaft* 69:1396-1399.

Tiganitas, A., N. Zeaki, A. S. Gounadaki, E. H. Drosinos, and P. N. Skandamis. 2009. Study of the effect of lethal and sublethal pH and a_w stresses on the inactivation or growth of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* Typhimurium. *International Journal of Food Microbiology* 134 (1-2):104-112.

Valero, A., F. Perez-Rodriguez, E. Carrasco, J. M. Fuentes-Alventosa, R. M. Garcia-Gimeno, and G. Zurera. 2009. Modelling the growth boundaries of *Staphylococcus aureus*: Effect of temperature, pH and water activity. *International Journal of Food Microbiology* 133:186-194.