

## Verkürzung und Optimierung des Nachweises von Salmonellen in Milcherzeugnissen

<b>Koordinierung:</b>	Forschungskreis der Ernährungsindustrie e.V. (FEI), Bonn
<b>Forschungsstelle:</b>	Universität München Lehrstuhl für Hygiene und Technologie der Milch Prof. Dr. E. Märtlbauer/Dr. H. Becker
<b>Industriegruppe:</b>	Milchindustrie-Verband e.V., Bonn
	Projektkoordinator: Dr. W. von Wiese Humana Milchunion eG, Herford
<b>Laufzeit:</b>	2000 - 2002
<b>Zuwendungssumme:</b>	€ 109.830,-- (Förderung durch BMWi via AiF/FEI)

### Ausgangssituation:

Der konventionelle kulturelle Nachweis von Salmonellen in Lebensmitteln wird heute allgemein nach dem Schema - Voranreicherung, Anreicherung, Nachweis, Bestätigung - durchgeführt. Ein negatives Ergebnis liegt frühestens am fünften Tag der Untersuchung vor. Alternative Verfahren wurden bisher kaum standardisiert, sieht man ab von verschiedenen bei der AOAC zugelassenen Methoden sowie den DIN-Normen 10 115 (Impedanzmessung), 10 135 (PCR) oder 10121 (ELFA).

Ziel des Forschungsvorhabens war daher die Entwicklung eines ca. 24-h-Screening-Verfahrens zum Nachweis von Salmonellen in Milcherzeugnissen, beinhaltend die Voranreicherung, die optimiert und verkürzt werden sollte, ggf. die selektive Anreicherung durch Immunomagnetische Separation (IMS) und den Nachweis mit kommerziellen Verfahren auf PCR-Basis (Foodproof und BAX *Salmonella*-Test: FP, BAX) bzw. Selektivnährböden (MSRV- und Diasalm-Medium).

### Wirtschaftliche Bedeutung:

Den Ergebnissen des ersten (Produktivität ausgewählter Voranreicherungsmedien) und zweiten Versuchsabschnitts (Empfindlichkeit der PCR-Verfahren) folgend, wurden für die Voranreicherung gepuffertes Peptonwasser

(GPW) und eine Bebrütungszeit von 12 h gewählt. Im dritten Versuchsabschnitt wurden verschiedene Milchtrockenprodukte (MTP), einschließlich Milchpulvern mit erhöhten Fettanteilen und Milcheiweißerzeugnissen (MEE), nach der Kontamination mit subletal geschädigten Salmonellen und einer 12stündigen Voranreicherung in gepuffertem Peptonwasser (GPW) vergleichend mit dem Referenzverfahren der Amtlichen Sammlung nach § 35 LMBG, mit den beiden o. g. PCR-Testkits, dem MSRV, sowie bei MEE auch mit dem Diasalm untersucht. Mit Ausnahme fetthaltigen Milchpulvers war eine gute Übereinstimmung zwischen den Ergebnissen des Referenzverfahrens und denen der beiden PCR-Testkits zu registrieren. Die Differenzen bei den fetthaltigen Produkten waren im Fall des FP nicht signifikant, während bei der Untersuchung von Milchpulver mit 24 % Fett mit dem BAX die Signifikanzschwelle überschritten wurde. Mit dem MSRV wurden bei einigen MTP weniger positive Proben gefunden als mit dem Referenzverfahren oder den PCR-Testkits. Bei den MEE bestand zwischen den Ergebnissen des Referenzverfahrens und denen des MSRV und des Diasalm eine gute Übereinstimmung.

Da bei Käse auch der Nachweis von Listerien interessant wäre, wurde geprüft, ob die für die gleichzeitige Voranreicherung beider Erreger entwickelte Universal Preenrichment Broth (UPB) für den Nachweis von Salmonellen in Käse geeignet ist.

Im vierten Versuchsabschnitt wurde daher ermittelt, wie sich die Keime in UPB, ohne und mit Käsezusatz, verhalten, um evtl. inhibierende Wirkungen des Mediums zu erfassen. Unabhängig von den drei einbezogenen Serovaren bestanden keine Unterschiede in der Produktivität von GPW und UPB. Im Hinblick auf die Nachweisgrenzen der PCR-Verfahren (500/ml für FP bzw.  $10^4$ /ml für BAX) waren die ermittelten Werte für einen sicheren Nachweis ausreichend. Für den im fünften Versuchsabschnitt vorgenommenen Vergleich von FP, BAX, MSRV und Diasalm mit dem Referenzverfahren beim Nachweis von Salmonellen in künstlich kontaminierten Käsen dienten als Untersuchungsmaterial 9 Standardsorten der in der Käse-Verordnung genannten Käsegruppen, die mit verschiedenen Salmonella-Serovaren kontaminiert wurden. Die Untersuchung erfolgte nach einer Lagerungszeit der beimpften Käse von 54 h/4 EC. Nach der Voranreicherung bei 37 EC/12 h in GPW bzw. UPB wurde aus jedem der beiden Nährböden gleichzeitig der Nachweis mit den o. g. Verfahren vorgenommen. UPB erwies sich dem GPW als nur geringfügig unterlegen, so dass die Verwendung dieses Nährbodens bei Käsen möglich ist. Der FP kann grundsätzlich nach einer 12stündigen Voranreicherung zum Nachweis von Salmonellen in Käse eingesetzt werden. Der BAX war bei der Untersuchung von Emmentaler den beiden anderen Verfahren unterlegen. Die gesamte Untersuchungsdauer wird mit beiden Testkits auf ca. 20 h reduziert. Sehr gute Ergebnisse wurden auch mit dem MSRV- und dem Diasalm erzielt, die Untersuchungsdauer beläuft sich hier auf 30 - 36 h. Insgesamt gesehen erwies sich die Untersuchung von Camembert aus Rohmilch, unabhängig von der Methode, also auch bei Verwendung des Referenzverfahrens, als problematisch.

Auf den Einsatz der IMS konnte bei allen Untersuchungen verzichtet werden.

#### **Wirtschaftliche Bedeutung:**

Die wirtschaftliche Bedeutung der modifizierten Verfahren ergibt sich aus den Anwendungsmöglichkeiten für kmU bei der Untersuchung der o. g. Produkte im Betriebslabor oder auch bei externen Untersuchungen. Vorteile entstehen durch erhebliche Einsparungen an Arbeitszeit, Verbrauchsmaterial und Geräten sowie durch vielfältige wirtschaftliche Aspekte, wie

schnellere Intervention durch frühe Erfassung einer Kontamination und Minderung des Risikos weiterer Fehlproduktionen, Zeiteinsparung bei der Umsetzung von HACCP-Konzepten u.a.m.

Der Gesamtumsatz der Molkereien, Käsereien und der Milchindustrie betrug in Deutschland 1998 19 Mrd. €. Dabei entfallen allein auf die hinsichtlich einer Kontamination mit Salmonellen besonders kritisch anzusehenden und bevorzugt in die Untersuchungen einbezogenen Milchtrockenprodukte 1,5 Mrd. €/Jahr.

#### **Publikationen (Auswahl):**

1. FEI-Schlussbericht 2002.
2. Herbert, C.: Verkürzung und Optimierung des Nachweises von Salmonellen in Milchtrockenprodukten. Dissertation, Universität München (2002).
3. Jetschin, S., Becker, H., Bürk, C., Ritzerfeld, U. und Märtlbauer, E.: Nachweis von Salmonellen in Käse mit kommerziellen PCR-Testkits. Proc. 43. Arbeitstagung Arbeitgeb. Lebensmittelhyg. DVG, Gießen, Verlag DVG Service, 432-436 (2002).
4. Jetschin, S.: Alternative Methoden zum Nachweis von Salmonellen in Käse. Dissertation, Universität München (2003).

#### **Weiteres Informationsmaterial:**

Universität München  
Lehrstuhl für Hygiene und Technologie der Milch  
Veterinärstr. 13, 80539 München  
Tel.: 089/2180-3672, Fax: 089/2180-2106  
E-Mail:  
milchhygiene@mh.vetmed.uni-muenchen.de

Forschungskreis der Ernährungsindustrie e.V. (FEI)  
Godesberger Allee 142-148, 53175 Bonn  
Tel.: 0228/372031, Fax: 0228/376150  
E-Mail: fei@fei-bonn.de