



**Status Quo der Vermarktung ökologischer
Ziegenmilchprodukte: Sicherung von
mikrobiologischer Qualität und Authentizität am
Modell der Region Hessen**

Herausgeberin:

Geschäftsstelle Bundesprogramm Ökologischer Landbau
in der Bundesanstalt für Landwirtschaft und Ernährung (BLE)
53168 Bonn

Tel.: +49 228 6845-280 (Zentrale)

Fax: +49 228 6845-787

E-Mail: geschaeftsstelle-oekolandbau@ble.de

Internet: www.bundesprogramm-oekolandbau.de

Finanziert vom Bundesministerium
für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz
im Rahmen des Bundesprogramms Ökologischer Landbau

Auftragnehmer:

Justus-Liebig-Universität Giessen
Institut für Tierärztliche Nahrungsmittelkunde

Dieses Dokument ist über <http://forschung.oekolandbau.de> verfügbar.



Forschungsprojekt 02OE116

“Status Quo der Vermarktung ökologischer Ziegenmilchprodukte: Sicherung von mikrobiologischer Qualität und Authentizität am Modell der Region Hessen”

Auftraggeber:

**Geschäftsstelle Bundesprogramm Ökologischer Landbau
in der Bundesanstalt für Landwirtschaft und Ernährung (BLE)**

Abschlussbericht

01.06.2002 – 31.10.2003

Bearbeiter:

Dr. A. Hassan

Ö. Akineden

V. Oellig

C. Rausch

Dr. E. Schneider

Prof. Dr. E. Usleber

Professur für Milchwissenschaften
Institut für Tierärztliche Nahrungsmittelkunde
Justus-Liebig-Universität Giessen
Ludwigstraße 21
35390 Giessen

INHALTSVERZEICHNIS

1	ZIELE UND AUFGABENSTELLUNG DES PROJEKTS	1
1.1	Planung und Ablauf des Projekts	1
1.2	Wissenschaftlicher und technischer Stand an den angeknüpft wurde	2
2	MATERIAL UND METHODEN	5
2.1	Mikrobiologische Untersuchung von Ziegenkäse	5
2.1.1	Probennahme.....	5
2.1.2	Probenvorbereitung.....	5
2.1.3	Spezifische Untersuchungsverfahren.....	6
2.1.3.1	Bestimmung Koagulase-positiver Staphylokokken sowie Thermonuklease-Nachweis.....	7
2.1.3.2	Bestimmung präsumtiver <i>Bacillus cereus</i>	8
2.1.3.3	Nachweis von <i>Listeria monocytogenes</i>	8
2.1.3.4	Bestimmung von <i>Escherichia coli</i> und coliformen Keimen.....	9
2.1.3.5	Nachweis Verotoxin-bildender <i>E. coli</i> (VTEC).....	10
2.1.3.6	Nachweis von Salmonellen.....	13
2.1.4	Überprüfung der Nachweisverfahren.....	13
2.2	Entwicklung von molekularbiologischen Verfahren zur Überprüfung der Authentizität von Ziegenmilchprodukten	16
2.2.1	DNA-Extraktion.....	16
2.2.1.1	Verwendung eines kommerziellen Extraktionskits.....	17
2.2.1.2	NET-Puffer-Methode	17
2.2.1.3	ATL-Lysis- Puffer-Methode	18
2.2.2	PCR-Methoden auf Basis universeller Primer	19
2.2.2.1	Amplifizierung des mitochondrialen tRNA (mt-tRNA)-Gens	19
2.2.2.2	Gelelektrophorese	20
2.2.2.3	Amplifizierung des mitochondrialen cytochrom b (mt-cytb)-Gens.....	21
2.2.2.4	Restriktionsenzymverdau des mt-cytb-Genamplifikats	22
2.2.2.4.1	Auswahl geeigneter Restriktionsenzyme	24
2.2.2.4.2	Verdau mit Restriktionsenzymen.....	24
2.2.2.4.3	Gelelektrophorese der Restriktionsfragmente.....	25
2.2.3	PCR-Methoden auf Basis speziesspezifischer Primer	25
2.2.3.1	Amplifizierung eines Rind-spezifischen Abschnitts des mt-tRNA-Gens.....	25
2.2.3.2	Amplifizierung eines Rind-spezifischen Abschnitts des mt-cytb-Gens	26
2.2.3.2.1	Restriktionsverdau des speziesspezifischen mt-cytb-Genamplifikats	29
2.2.4	Überprüfung der Sensitivität und Spezifität der PCR-Methoden	31
2.2.4.1	Überprüfung der Spezifität.....	31

2.2.4.2	Überprüfung der Nachweisempfindlichkeit und Testrobustheit.....	31
2.2.5	Untersuchung von Handelsproben.....	32
2.2.5.1	Untersuchung von ökologischen und konventionellen Ziegenkäse.....	32
2.2.6	Vergleichsuntersuchung mit einem enzymimmunologischen Testverfahren ...	33
2.2.6.1	Enzymimmuntest zum Nachweis von Kuhmilch in Ziegenkäse	33
2.2.6.1.1	Probenvorbereitung.....	33
2.2.6.1.2	Testdurchführung.....	33
3	ERGEBNISSE	34
3.1	Mikrobiologische Qualität von Ziegenmilchprodukten	34
3.1.1	Charakterisierung der untersuchten Probenmaterialien	34
3.1.2	Bewertungskriterien.....	36
3.1.3	Untersuchungsergebnisse.....	38
3.1.3.1	Friskäse.....	39
3.1.3.2	Weichkäse	40
3.1.3.2.1	Pathogene/toxinogene Keime	40
3.1.3.2.2	Hygienekeime	41
3.1.3.2.3	Bewertung der Befunde für Weichkäse	43
3.1.3.3	Schnitt- und Hartkäse.....	44
3.1.3.3.1	Pathogene Keime	44
3.1.3.3.2	Hygienekeime	45
3.1.3.3.3	Bewertung der Befunde	47
3.1.4	Gesamtbewertung der Ergebnisse, Schlussfolgerungen und Empfehlungen für ein ganzheitliches Untersuchungssystem	47
3.2	Authentizität von Ziegenmilchprodukten	53
3.2.1	DNA-Extraktion.....	53
3.2.2	PCR-Methoden auf Basis universeller Primer	53
3.2.2.1	Amplifizierung des mitochondrialen tRNA (mt-tRNA)-Gens.....	53
3.2.2.2	Amplifizierung des mt-cytb-Gens	53
3.2.2.4	Restriktionsverdau des mt-cytb-Genamplikats	54
3.2.2.4.1	Auswahl geeigneter Restriktionsenzyme	54
3.2.2.4.2	Verdau mit Restriktionsenzymen	56
3.2.3	PCR-Methoden auf Basis speziesspezifischer Primer	58
3.2.3.1	Amplifizierung eines Rind-spezifischen Abschnitts des mt-tRNA-Gens.....	58
3.2.3.2	Amplifizierung eines Rind-spezifischen Abschnitts des mt-cytb-Gens	58
3.2.3.2.1	Untersuchung der Primerspezifität anhand des Verdau mit Restriktions- enzymen	63
3.2.4	Vergleichsuntersuchung mit einem immunchemischen Verfahren	65
3.2.5	Untersuchung von Handelsproben – Ergebnisse, Bewertung und Schlussfolgerungen	65

4	ZUSAMMENFASSUNG	74
5	GEGENÜBERSTELLUNG DER URSPRÜNGLICH GEPLANTEN ZU DEN TATSÄCHLICH ERREICHTEN ZIELEN	78
6	LITERATURVERZEICHNIS.....	79

Anhang: Materialien

1 ZIELE UND AUFGABENSTELLUNG DES PROJEKTS

1.1 Planung und Ablauf des Projekts

Ziel des hier beschriebenen Projekts waren Status quo-Erhebungen zur grundlegenden Identifizierung möglicher Problembereiche bei der Verarbeitung und Vermarktung ökologischer Ziegenmilchprodukte. Ausgehend von diesen Ergebnissen sollten geeignete Lösungskonzepte zur Qualitätssicherung und damit Absatzsteigerung ökologischer Ziegenmilchprodukte erarbeitet werden.

Die Ergebnisse des Forschungsvorhabens sollten somit geeignet sein, die Vermarktung ökologischer Ziegenmilchprodukte zu fördern, indem beispielhaft an der Region Hessen ein ganzheitliches Hygiene- und Authentizitätssicherungssystem erarbeitet wird, mit dem

1. die hygienische Qualität dieser Produkte optimiert und sichergestellt werden kann,
2. die Produzenten ökologischer Produkte vor unfairem Wettbewerb durch billige aber verfälschte Produkte geschützt werden,
3. die Grundlagen eines den gesundheitlichen Verbraucherschutz, aber auch die spezifische Produktionssituation ökologisch wirtschaftender Betriebe berücksichtigenden Qualitätssicherungssystems erarbeitet werden.

Die Planung der methodischen Arbeitsziele des Projekts beinhaltet daher die Untersuchung von Ziegenmilchprodukten (Ziegenkäse) auf mikrobiologische Qualität und tierartspezifische Authentizität. Dabei sollten geeignete Methoden zur mikrobiologischen Untersuchung von Ziegenmilchprodukten verwendet und evtl. modifiziert sowie molekularbiologische Methoden (PCR) zur Authentizitätsprüfung (Tierartdifferenzierung) erarbeitet werden.

Aufgrund der im Forschungsprojekt gewonnenen Erkenntnisse zum Status quo der ökologischen Ziegenmilchproduktion sollten etwaige Schwachpunkte identifiziert und Strategien zur Optimierung der Produktion vorgeschlagen und in ein ganzheitliches Qualitätssicherungssystem integriert werden. Dieses System orientiert sich an den lebensmittelrechtlichen Vorgaben unter Berücksichtigung der spezifischen Produktionssituation ökologisch produzierender Betriebe. Die in diesem Projekt erarbeiteten Grundlagen des Qualitätssicherungssystems sollen als wesentliches Kriterium für den langfristigen

wirtschaftlichen Erfolg ökologischer Ziegenmilchproduktion dienen.

Der Ablauf des Projekts beinhaltete gemäß diesen Zielen folgende durchgeführte Schritte:

- Auswahl des in die Untersuchung einbezogenen Probenmaterial unter Berücksichtigung der Kriterien ökologische/konventionelle Erzeugung, Direktvermarktung und Handelsware nach Angebotsbreite mit Schwerpunkt der regionalen Produktion in Hessen
- Untersuchungen zur mikrobiologischen Qualität, zum einen auf Hygienemarker (analog zu den in Milchverordnung Anlage 6 genannten Kriterien für Kuhmilch) sowie auf relevante pathogene Mikroorganismen (Salmonellen, *Listeria monocytogenes*, verotoxinbildende *E. coli* mit ggf. Toxinnachweis sowie *B. cereus*). Validierung und Optimierung der eingesetzten Untersuchungsverfahren mit laufenden Kontrolluntersuchungen
- Erarbeitung einer PCR-Methodik zur Differenzierung von Ziegen- und Kuhmilch sowie Validierung der Methodik anhand künstlich verfälschter Produkte. Vergleichsuntersuchungen mit immunologischen Testverfahren. Status-Quo Erhebungen zur Spezies-Authentizität von Ziegenmilchprodukten mit den erarbeiteten PCR-Methoden
- Erarbeitung von Empfehlungen für ein ganzheitliches Untersuchungssystem zur Erfassung und Prüfung der Qualität ökologisch erzeugter Ziegenmilchprodukte. Empfehlung eines Monitoring- und Überwachungssystems zur Authentizitätsprüfung von Ziegenmilchprodukten.

1.2 Wissenschaftlicher und technischer Stand an den angeknüpft wurde

Publizierte vergleichende Untersuchungen zur mikrobiologischen Qualität von Ziegenmilchprodukten aus ökologischer und konventioneller Produktion existierten nach Literaturrecherchen zum Beginn des Projektes nicht. Für Deutschland ist der Wissensstand zur mikrobiologischen Qualität von Ziegenmilch und Ziegenmilchprodukten insgesamt als sehr

dürftig zu bezeichnen, entsprechende Untersuchungen zur Authentizität von Ziegenkäse aus dem Handel wurden in Deutschland überhaupt noch nicht publiziert.

Für Direktvermarktung von Kuhmilch und Käse aus Kuhmilch wurde von der Bundesanstalt für Milchforschung in Kiel ein erhöhtes Risiko von pathogenen Mikroorganismen in Rohmilch (Vorzugsmilch, Milch-ab-Hof) sowie in Rohmilchkäsen (Anteil der ökologisch wirtschaftenden Betriebe nicht spezifiziert) festgestellt (Hahn et al., 1999a, 1999b). Insbesondere wurden in Rohmilchkäsen relativ häufig *L. monocytogenes*, *B. cereus* und vereinzelt sogar verotoxinbildende *E. coli* nachgewiesen.

Aufgrund genereller Unterschiede der Spezies und der Haltungsformen sowie aufgrund einer anderen Erregerökologie sind diese Befunde jedoch nicht auf Ziegenmilch und Ziegenmilchkäse übertragbar. Für Ziegenmilch und Ziegenkäse aus einem großen direktvermarktenden, allerdings konventionell wirtschaftenden Betrieb ermittelten Schwöpe und Schüppel (1995) gute mikrobiologische Qualität im Hinblick auf pathogene Keime.

Schnellhardt et al. (1997) untersuchten Tankmilchproben von Ziegenmilchbetrieben (vermutlich sowohl konventionell als auch ökologisch, es wurde aber nicht differenziert) aus Bayern und konstatierten, dass mit Ausnahme vereinzelter positiver Befunde für *L. monocytogenes* keine pathogenen Mikroorganismen nachweisbar waren. Eine Übertragbarkeit dieser Befunde auf verarbeitete Ziegenmilchprodukte ist allerdings nicht möglich.

Für Hessen lagen bislang keine Daten zur mikrobiologischen Qualität von Ziegenmilchprodukten vor. Den Angaben von Kloppert et al. (2000) ist zu entnehmen, dass hier weitgehend auf betriebliche Eigenkontrollen gesetzt wird, so dass aussagekräftige publizierte Daten nicht existieren. Die Eutergesundheit bei Ziegen scheint insgesamt im Vergleich zu Rinderbetrieben nicht schlechter zu sein (Kloppert et al., 2000), eine Differenzierung nach Produktionsweisen wurde allerdings nicht durchgeführt. Vorläufige, bisher nicht publizierte Ergebnisse eigener Untersuchungen zur Eutergesundheit bei Ziegen bestätigen eine insgesamt recht gute Situation, allerdings wurden vereinzelt für Sammelmilchproben sehr hohe Gesamtkeimzahlen festgestellt. Zusammenfassend war es aufgrund des unzureichenden Wissensstandes bislang nicht möglich, fundierte Aussagen zur mikrobiologischen Qualität

und zur Authentizität von Ziegenmilch und Ziegenmilchprodukten in Deutschland zu machen.

Die Professur für Milchwissenschaften bearbeitet in ihrer universitären Forschung den zentralen Problemkomplex lebensmittelhygienisch relevanter Fragestellungen im Hinblick auf den gesundheitlichen Verbraucherschutz.

Innerhalb des Leitthemas "Hygiene und Qualitätsparameter von Ziegenmilch und Ziegenmilchprodukten" wurden im Rahmen von drei Dissertationsarbeiten Untersuchungen zu Inhaltsstoffen, zytologischer sowie allgemeiner bakteriologischer Qualität von Ziegenmilch durchgeführt. Die teilweise sehr hohen Gesamtkeimzahlen ($>>1$ Mio./ml) in Sammelmilchproben deuten auf Qualitätsprobleme bei einigen Betrieben hin.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Mikrobiologische Untersuchung von Ziegenkäse

2.1.1 Probennahme

Im Zeitraum 2002/2003 wurden für die mikrobiologischen Untersuchungen insgesamt 183 Ziegenkäseproben aus dem Einzelhandel (Supermärkte, ökologische Fachgeschäfte), auf Wochenmärkten und bei Direktvermarktern (Hofläden, Direktverkauf ab Hof) in Hessen gekauft. Soweit es sich nicht um abgepackte Ware handelte, wurden Informationen zum jeweiligen Produkt vom Verkaufspersonal erfragt. Der Transport der Proben erfolgte gekühlt (in Kühltaschen oder Styroporbehältern mit Kühlaggregaten). Die Proben wurden anschließend entweder sofort untersucht oder bei + 4 °C bis maximal 14 Tage (Schnitt- und Hartkäse) gelagert. Zusätzlich wurden eine Reihe von Ziegen- und Kuhmilchkäseproben (nicht in den Auswertungen berücksichtigt) für die orientierenden Untersuchungen zur Überprüfung der Untersuchungsverfahren beschafft.

2.1.2 Probenvorbereitung

Die Vorbereitung der Proben für die quantitative Bestimmung von Koagulase-positiven Staphylokokken, *Bacillus cereus*, *E. coli* bzw. coliformen Keimen erfolgte gemäß der amtlichen Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 35 LMBG, Methode L01.00-1. Dabei wurden jeweils 10 g der zu untersuchenden Probe unter aseptischen Bedingungen in den Beutel eines Beutel-Walkmischgerätes eingewogen, 90 ml ¼-starke Ringerlösung dazugegeben und ca. 2 - 3 min im Walkmischgerät gemischt, bis der Käse gründlich dispergiert war. Anschließend wurde eine dezimale Verdünnungsreihe in ¼-starker Ringerlösung (jeweils 1 ml + 9 ml Verdünnungslösung) bis zur Verdünnungsstufe 10⁻⁸ hergestellt.

Zum qualitativen Nachweis von *Listeria monocytogenes* wurden 25 g der Probe wie oben beschrieben behandelt, allerdings wurde als Verdünnungslösung für die Anschüttelung 225 ml ½ Fraser-Bouillon verwendet.

Zum qualitativen Nachweis von Salmonellen wurden 25 g der Probe ebenfalls wie oben beschrieben vorbereitet, allerdings wurde als Verdünnungslösung für die Anschüttelung 225 ml gepuffertes Peptonwasser verwendet.

Die Probenvorbereitung von Käse zum Nachweis verotoxinbildender *E. coli* (VTEC) wird bei der entsprechenden Beschreibung spezifischer Untersuchungsverfahren (2.1.3) dargestellt.

2.1.3 Spezifische Untersuchungsverfahren

Bei den mikrobiologischen Untersuchungen wurde grundsätzlich auf Methoden der Amtlichen Sammlung von Untersuchungsverfahren nach §35 LMBG zurückgegriffen, soweit aus labortechnischen Gründen erforderlich mit geringfügigen Modifikationen. Eine Aufstellung der eingesetzten Verfahren ist in der folgenden Übersicht dargestellt:

Parameter	Methode/ Kurzbezeichnung (Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach §35 LMBG)
Probenvorbereitung	L01.00-1
Coliforme Keime/ <i>E. coli</i>	L 01.00-54 bzw. L 01.00-3
<i>S. aureus</i>	L 01.00-24
<i>B. cereus</i>	L 01.00-72
<i>L. monocytogenes</i>	L 00.00-32
Salmonellen	L 00.00-20

2.1.3.1 Bestimmung Koagulase-positiver Staphylokokken sowie Thermonuklease-Nachweis

Die Bestimmung Koagulase-positiver Staphylokokken erfolgte nach Methode L 01.00-24. Aus der Anschüttelung (2.1.2) wurde 1 ml auf drei Agarplatten mit ETGPA-Nährboden nach Baird-Parker - ca. 0,33 ml pro Platte (Verdünnungsstufe 10^{-1}) - verteilt und ausgespatelt. Danach wurden von der Anschüttelung und von jeder weiteren Verdünnungsstufe je 0,1 ml auf zwei Baird-Parker-Agarplatten ausgestrichen (10^{-2} bis 10^{-5}) und alle Ansätze bei 37 °C unter aeroben Bedingungen insgesamt 48 h bebrütet. Anschließend wurden je fünf typische bzw. atypische Kolonien auf Standard II-Nähragar überimpft. Nach Bebrütung (24 h, 37 °C) wurde mit Koloniematerial der Katalase-Test und der KOH-Test durchgeführt. KOH-positive und Katalase-positive Kolonien wurden weiter in Hirn-Herz-Bouillon (BHI, brain heart infusion) überimpft, 24 h bei 37 °C bebrütet und anschließend auf Koagulase-Aktivität untersucht. Im Falle einer positiven Koagulase-Reaktion wurde zusätzlich ein Objektträger-agglutinations-Schnelltest (Staphaurex) durchgeführt. Aus dem Anteil der als positiv bestätigten Kolonien wurde die Zahl der Koagulase-positiven Staphylokokken je g Probe berechnet.

Als Suchtest für Staphylokokken-Enterotoxine wurden Käseproben auf das Vorhandensein von Thermonuklease geprüft. Dazu wurden 20 g der Probe mit 5 g Thermonuklease-freiem Magermilchpulver versetzt, in 50 ml Wasser suspendiert, homogenisiert und mit Salzsäure auf einen pH-Wert von 3,8 eingestellt. Anschließend wurde das Untersuchungsmaterial 20 min bei 9000 U/min zentrifugiert. Zu dem Überstand wurde die 0,05-fache Menge kalter Trichloressigsäure-Lösung zugegeben. Anschließend wurde der Überstand erneut 20 min bei 9000 U/min zentrifugiert. Das Sediment wurde in 1 ml Tris-Puffer gelöst, mit Natronlauge auf einen pH-Wert von 8,5 eingestellt und anschließend mit Tris-Puffer auf ein Endvolumen von 2 ml aufgefüllt. Der Extrakt wurde im Wasserbad bei 100 °C 15 min erhitzt.

In einen Toluidinblau O-DNAse-Test-Agar wurden bis zu 10 Löcher gestanzt (Durchmesser 2 mm) und das ausgestanzte Material entfernt. In jeweils ein Loch wurde so viel des zu untersuchenden Extraktes einpipettiert, dass das Loch gut gefüllt war (ca. 14 µl). Die so beschickte Testplatte wurde mit dem Petrischalendeckel nach oben 4 h bei 37 °C in einer

feuchten Kammer bebrütet. Bei negativem Testergebnis nach 4 h wurden die Löcher erneut mit Kulturmaterial aufgefüllt, weiterbebrütet und nach 24 h nochmals beurteilt.

Die untersuchte Probe wurde dann als Thermonuklease-positiv bewertet, wenn sich aufgrund der Spaltung der Desoxyribonucleinsäure um das mit dem erhitzten Extrakt beschickte Loch eine rosafarbene Zone gebildet hatte, die mindestens 1 mm breit ist.

2.1.3.2 Bestimmung präsumtiver *Bacillus cereus*

Die Bestimmung präsumtiver *Bacillus cereus* erfolgte gemäß Methode L 01.00-72. Je 0,2 ml der Proben-Anschüttelung wurde auf fünf Polymyxin-Pyruvat-Eigelb-Mannit-Bromthymolblau (PEMBA)-Agarplatten ausgestrichen, sowie jeweils 0,1 ml der Anschüttelung und der weiteren Verdünnungsstufen (10^{-2} bis 10^{-5}) auf je zwei PEMBA-Agarplatten. Die Bebrütung erfolgte unter aeroben Bedingungen 18 - 48 h bei 37 °C. Anschließend wurden zur Auswertung für präsumtive *Bacillus cereus* charakteristische Kolonien gezählt. Zusätzlich wurden mindestens fünf der verdächtigen Kolonien auf PEMBA-Agar reinkultiviert, mikroskopisch als Nativpräparate untersucht, sowie auf weitere charakteristische Merkmale (Hämolyse, biochemische Reaktionen) überprüft. Weiterhin wurden die charakteristischen Kolonien mittels BBL Crystal GP untersucht. Aus der Anzahl bestätigter Kolonien wurde die Anzahl an präsumtiven *Bacillus cereus* je g Probe berechnet.

2.1.3.3 Nachweis von *Listeria monocytogenes*

Die Bestimmung von *Listeria monocytogenes* erfolgte entsprechend Methode L 00.00-32. Je 25 g der Probe wurden in 225 ml der ersten selektiven Anreicherung ($\frac{1}{2}$ Fraser-Bouillon) homogenisiert (2.1.2), in einen Erlenmeyerkolben überführt und 24 h bei 30 °C bebrütet. Anschließend wurde 0,1 ml Kulturmaterial in 10 ml der zweiten selektiven Anreicherung (Fraser-Bouillon) überimpft und 48 h bei 37 °C bebrütet. Aus beiden Anreicherungsansätzen wurde nach der jeweiligen Bebrütungsdauer Material entnommen und auf ALOA-Agar sowie PALCAM-Agar ausgestrichen und 24 h (ALOA) bzw. bis 48 h (PALCAM) bei 37 °C

bebrütet. Anschließend wurden von jeder Platte fünf verdächtige Kolonien entnommen. Befanden sich auf einer Platte weniger als fünf verdächtige Kolonien, so wurden alle verdächtigen Kolonien für die Bestätigung verwendet. Die ausgewählten Kolonien wurden auf Caseinpepton-Sojamehlpepton-Agar mit Hefeextrakt (TSYEA) ausgestrichen und 18 - 24 h oder bis zu einem zufriedenstellenden Wachstum bei 37 °C bebrütet. Von diesem Kulturmaterial wurde das Gramverhalten festgestellt sowie die Beweglichkeitsprüfung und der Katalase-Test durchgeführt. Des Weiteren wurden die verdächtigen Kolonien auf Hämolyse sowie auf die Fähigkeit zum Abbau von Xylose, Rhamnose und Mannitol überprüft. Zusätzlich wurden der CAMP-Test sowie zur Verifizierung der Ergebnisse "api Listeria"-Test bzw. „Microbact 12 L“ durchgeführt.

2.1.3.4 Bestimmung von *Escherichia coli* und coliformen Keimen

Die Bestimmung von *Escherichia coli* und coliformen Keimen erfolgte im MPN-Verfahren gemäß Methode L 01.00-54. Je 1 ml der Probenverdünnungsstufen 10^{-1} bis 10^{-4} (2.1.2) wurde in jeweils drei Kulturröhrchen, die ein selektives Laurylsulfat-Tryptose-Nährmedium mit Zusatz von Tryptophan und 4-Methylumbelliferyl-b-D-Glucuronid (LST-MUG) enthalten, überführt. Parallel dazu wurden drei Kulturröhrchen, die doppelt konzentrierte LST-MUG enthielten, mit je 10 ml der Anschüttelung beimpft. Nach 24 h und 48 h Bebrütung bei 30 °C wurde die Fluoreszenz nach Anregung mit langwelligem UV-Licht und die Indolbildung mittels Kovacs-Reagenz (*E. coli*) bzw. die Gasbildung (coliforme Keime) überprüft. Aus der Anzahl der Kulturröhrchen mit positiver Reaktion wurde mittels MPN-Tabelle die Anzahl an *E. coli* bzw. coliformen Keimen je g bestimmt. Zur Bestätigung positiver sowie zweifelhafter Kulturen wurde Kulturmaterial in einfach konzentrierte LST-MUG überimpft. Nach Bebrütung (24 h bei 30 °C) wurden Gasbildung, Fluoreszenz und Indolbildung überprüft.

Die Verdünnungsstufen 10^{-4} bis 10^{-9} wurden in Anlehnung an die Methode L 01.00-3 untersucht. Je 0,1 ml jeder Verdünnungsstufe wurden im Doppelansatz auf VRB-MUG-Agar ausgestrichen und 24 h bei 37 °C bebrütet. Als coliforme Keime wurden Kolonien mit typisch dunkelroter Farbe ohne Fluoreszenz bewertet. Diese wurden nicht weiter differenziert. Kolonien von nicht typischer Morphologie wurden auf Standard II-Agar

überführt und ebenfalls 24 h bei 37 °C bebrütet. Anschließend wurden ebenfalls KOH-Test, Oxidase-Test und die Differenzierung mittels Enterotube II durchgeführt. Die entsprechenden Kolonien wurden mitgezählt, sofern es sich um einen Vertreter der Coliformengruppe handelte. Typische rote Kolonien mit einem fluoreszierenden Hof wurden als *E. coli* eingestuft. Aus der Anzahl bestätigter Kolonien wurde die Anzahl an *E. coli* bzw. coliformen Keimen je g Probe berechnet.

2.1.3.5 Nachweis Verotoxin-bildender *E. coli* (VTEC)

Der Nachweis von VTEC erfolgte zum einen mittels zweier kommerzieller immunchemischer Tests zum Nachweis von Verotoxinen (Enzymimmuntest, ELISA), sowie zum anderen mittels molekularbiologischem Nachweis der Gene für Verotoxin 1 und 2.

Zur Probenvorbereitung für die Durchführung der immunchemischen Tests wurden je 25 g Probenmaterial zunächst in 225 ml m-TSB mit Zusatz von je 45 µl sterilfiltriertem Novobiocin (100 mg/ml Aqua dest.) suspendiert und homogenisiert (Stomacher, 2 min, 260 U/min). Anschließend wurde die Suspension 18-24 h bei 37 °C im Schüttelbad (~180 U/min) inkubiert. Für den Toxinnachweis wurde die Voranreicherung 30 min sedimentiert. Dann wurden 100 µl des Überstandes im Doppelansatz in den ELISA eingesetzt. Die weitere Durchführung der ELISA erfolgte gemäß den Angaben der Hersteller (NOVITEC Verotoxin ELISA bzw. HiSS Premier EHEC). Im Falle eines Verotoxin-positiven Ergebnisses erfolgte eine Bestätigung mittels Polymerasekettenreaktion (PCR).

Der Nachweis der Verotoxingene 1 und 2 mittels PCR erfolgte unter Verwendung einer hier kurz beschriebenen Methode. Zur DNA-Extraktion wurde 1 ml der Voranreicherungskultur (s.o.) in Eppendorf-Hütchen abgefüllt und 5 min bei 13 000 U/min kühlzentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand dekantiert, das Bakteriensediment in 1 ml Ringerlösung resuspendiert und mittels Vortex vollständig gelöst. Die Suspension wurde erneut 2 min bei 13 000 U/min zentrifugiert, in 950 µl Ringerlösung gelöst und 10 min bei 100 °C im Wasserbad inkubiert. Abschließend wurde noch einmal 2 min bei 13 000 U/min zentrifugiert. Der gewonnene Extrakt wurde sofort verwendet oder bei + 4 °C gelagert.

Zur Durchführung der PCR wurde zunächst ein Reaktionsgemisch mit in Tabelle 2.1 beschriebener Zusammensetzung hergestellt. 2,5 µl des DNA-Extrakts sowie das Reaktionsgemisch wurden in je ein Reaktionsgefäß pipettiert und anschließend die PCR im Thermocycler (iCycler, Biorad) nach dem in Tabelle 2.2 dargestelltem Temperaturprogramm durchgeführt.

Tabelle 2.1: Zusammensetzung des Reaktionsgemisches zur Durchführung der PCR

Substanz	Menge
Aqua dest.	19,5 µl
Reaktionspuffer	3,0 µl (10 x Puffer)
MgCl ₂	1,8 µl (25 mmol/l)
dNTP	1,0 µl (10 mmol/l je Nukleotid)
Primer I (MK 1*)	1,0 µl (10 µmol/l)
Primer II (MK 2*)	1,0 µl (10 µmol/l)
<i>Taq</i> -DNA-Polymerase	0,2 µl (5 U/µl)
* MK 1	5'-TTT ACG ATA GAC TTC TCG AC- 3'
MK 2	5'-CAC ATA TAA ATT ATT ACG CTC- 3'

Tabelle 2.2: Amplifikationsbedingungen der PCR

Anzahl der Zyklen	Temp. (°C)	Dauer	Amplifizierungsschritt
1	94	5 min	Initiale Denaturierung
30	94	30 sec	Denaturierung
	44	30 sec	Primeranlagerung
	72	30 sec	Polymerisierung
1	72	5 min	Endsynthese
1	4	ca. 5 min	Abkühlen

Der Nachweis des PCR-Produkts mittels Agarosegelelektrophorese wurde wie folgt durchgeführt: Zur Herstellung eines 2 %igen Gels wurden 3,0 g Agarose in 150 ml 1x TAE-Puffer gelöst und 1 min gekocht. Nach Abkühlen auf 56 °C wurde die verflüssigte Agarose in eine Flachbettform mit justiertem Kamm gegossen. Nach Erstarren des Gels wurde der Kamm entfernt und das Gel in eine mit Laufpuffer (1x TAE-Puffer) gefüllte Gelkammer (Fa. BioRad) gelegt.

12 µl des PCR-Produktes wurden mit 3 µl 6x „Orange Loading Dye Solution“ vermischt und auf dem Agarosegel aufgetragen. Zur Bestimmung des Molekulargewichts der Amplifikate wurde jeweils ein Molekulargewichtsstandard-Marker von 100 Bp (1 µg/µl) bzw. 50 Bp (1 µg/µl) randständig aufpipettiert. Die Auftrennung der Proben erfolgte bei 120 mA (2,5 h).

Die Färbung der Gele erfolgte nach der Gelelektrophorese in wässriger Ethidiumbromidlösung (5 µg/ml) für 5 min. Zur Entfernung des überschüssigen Farbstoffs wurden die Gele 10 min bei Raumtemperatur in Aqua dest. geschwenkt und anschließend unter UV-Licht (302 nm) (GelDoc 2000, Gel-Videodokumentationssystem, BioRad) digital fotografiert.

2.1.3.6 Nachweis von Salmonellen

Die Bestimmung von Salmonellen erfolgt gemäß der Methode L00.00-20. Dazu wurde die Anschüttelung (2.1.2) 16 - 20 h bei 37 °C bebrütet. Anschließend wurden zur selektiven Anreicherung 0,1 ml Kulturmaterial in 10 ml Magnesium-Malachitgrün-Medium nach Rappaport-Vassiliadis (RV-Medium), sowie 10 ml in 100 ml Selenit-Cystin-Medium überführt und bei 42 °C bzw. 37 °C bebrütet. Nach 24 h und nach 48 h wurde jeweils Kulturmaterial auf selektiven Nährböden, Brillantgrün-Phenolrot-Laktose-Saccharose-Agar (BPLS) und auf AES-Laboratoire-Salmonellen-Agar-Platte (ASAP), ausgestrichen und ebenfalls bei 37 °C 24 h und 48 h bebrütet. Anschließend wurden - sofern vorhanden - charakteristische Kolonien auf Standard II-Agar ausgestrichen und 24 h bei 37 °C bebrütet. Die auf Standard II-Agar gewachsenen Kolonien wurden mittels KOH-Test, Oxidase-Test und Enterotube II weiteruntersucht. Bei positiven Ergebnissen wurden serologische Tests mit omnivalenten sowie polyvalenten Antiseren durchgeführt.

2.1.4 Überprüfung der Nachweisverfahren

Zur Validierung der Untersuchungsverfahren wurden laufend Kontrolluntersuchungen durchgeführt. Bei jedem Untersuchungsgang zum Nachweis von Koagulase-positiven Staphylokokken, *B. cereus*, *L. monocytogenes*, *E. coli*, Coliformen bzw. Salmonellen wurden jeweils Positiv- und Negativkontrollen mituntersucht. Dazu wurden die in den Tabellen 2.3 und 2.4 angegebenen Referenzstämme verwendet. Die weiteren Untersuchungsschritte erfolgten jeweils wie oben beschrieben. Zusätzlich wurden Käseproben mindestens fünfmal mit allen zu untersuchenden Keimen künstlich kontaminiert und entsprechend den oben beschriebenen Methoden untersucht.

Tabelle 2.3: Aufstellung der verwendeten Referenzstämme (ausser VTEC)

Mikroorganismus	Bezeichnung	Herkunft
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	Tierärztliche Nahrungsmittelkunde, JLU Gießen
<i>Staphylococcus aureus</i> Thermonuklease-positiv	13FA	Eigene Stammsammlung
<i>Staphylococcus aureus</i> Thermonuklease-positiv	49A	Eigene Stammsammlung
<i>Staphylococcus aureus</i> Thermonuklease-positiv	2915/03	Institut für Tierhygiene, JLU Gießen
<i>Bacillus cereus</i>	-	Tierärztliche Nahrungsmittelkunde, JLU Gießen
<i>Bacillus subtilis</i>	-	Tierärztliche Nahrungsmittelkunde, JLU Gießen
<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC 19116	Lehrstuhl für Hygiene und Technologie der Milch, LMU München
<i>Listeria ivanovii</i>	ATCC 19119	Lehrstuhl für Hygiene und Technologie der Milch, LMU München
<i>Listeria innocua</i>	ATCC 33090	Lehrstuhl für Hygiene und Technologie der Milch, LMU München
<i>Rhodococcus equi</i>	-	Institut für Tierhygiene, JLU Gießen
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922	Tierärztliche Nahrungsmittelkunde, JLU Gießen
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	Eigene Stammsammlung
<i>Salmonella</i> Typhimurium	ATCC 19585	Institut für Tierhygiene, JLU Gießen
<i>Salmonella choleraesuis</i> <i>ssp. choleraesuis</i>	DSM 9898	DSMZ GmbH, Braunschweig
<i>Salmonella</i> Infantis	M144/01	Tierärztliche Nahrungsmittelkunde, JLU Gießen

Tabelle 2.4: Aufstellung der für die Untersuchung auf VTEC verwendeten Referenzstämme

Bezeichnung	Herkunft	Serovar	Gebildete Toxine	isoliert aus
B 2405	Tierärztliche Nahrungsmittelkunde, JLU Gießen	O3:H-	VT 1	Rinderkot
B 2324	Tierärztliche Nahrungsmittelkunde, JLU Gießen	O157:H7	VT 2	Rinderkot
B 2098	Tierärztliche Nahrungsmittelkunde, JLU Gießen	O113:H21	VT 2	Rinderkot
Sal 4/XVII/1	Tierärztliche Nahrungsmittelkunde, JLU Gießen	O22:H8	VT 1 + VT 2	Rindfleisch
Sal 52/1/1-00	Tierärztliche Nahrungsmittelkunde, JLU Gießen	O157:H-	VT 1 + VT 2	Rindfleisch
W 38/30/1-01	Tierärztliche Nahrungsmittelkunde, JLU Gießen	k.A.	VT 1 + VT 2	Rindfleisch

2.2 Entwicklung von molekularbiologischen Verfahren zur Überprüfung der Authentizität von Ziegenmilchprodukten

Zum Nachweis der Verfälschung von Milchprodukten aus Ziegenmilch wurden Polymerasekettenreaktions-(polymerase chain reaction, PCR)-Methoden auf Basis universeller sowie speziesspezifischer Primer in Verbindung mit geeigneten Probenextraktionsmethoden entwickelt und validiert.

Dabei wurden die einzelnen Arbeitsschritte DNA-Extraktion, PCR und Elektrophorese jeweils räumlich getrennt durchgeführt. Sämtliche Laborgeräte wurden ausschließlich für die entsprechenden Arbeitsschritte verwendet. Alle Verbrauchsmaterialien wurden vor Gebrauch sterilisiert bzw. autoklaviert oder schon steril und DNase/RNase-frei bezogen.

In Vorversuchen wurden jeweils die für die einzelnen PCR-Methoden verwendeten Primer, die Zusammensetzung der Reaktionsgemische und die Amplifikationsbedingungen mit dem Ziel optimiert, eine effiziente Amplifikation mit deutlich darstellbaren, spezifischen Banden zu erreichen. Dazu wurden teilweise auch die Konzentrationen an $MgCl_2$ und Polymerase zur Steigerung der Spezifität der einzelnen Verfahren variiert. Bei allen PCR-Ansätzen wurde jeweils eine Negativkontrolle ohne DNA-Zusatz mitgeführt.

2.2.1 DNA-Extraktion

Zur Entwicklung geeigneter Präparationsmethoden für DNA aus Milch und Käse wurden Methoden auf Basis eines kommerziellen Extraktionskits (QIAamp[®] DNA Stool Mini Kit) sowie unter Verwendung geeigneter Lysepuffer (NET-Puffer, ATL-Puffer) getestet.

2.2.1.1 Verwendung eines kommerziellen Extraktionskits

Die Extraktion der DNA erfolgte unter Verwendung eines kommerziellen Kits (Extraktionskit QIAamp[®] DNA Stool Mini Kit) mit den im Kit enthaltenen Reagenzien entsprechend den Angaben des Herstellers. Je 100 µl, 200 µl, 400 µl bzw. 600 µl Milchprobe wurden in ein 2 ml-Reaktionsgefäß gegeben und 1 min bei 10.000 x g/min zentrifugiert. Nach Entfernung der Fettschicht wurde jeder Probe 1,6 ml ASL-Puffer hinzugefügt und wie oben beschrieben zentrifugiert. Anschließend wurden 1,4 ml Überstand mit einer InhibitEX-Tablette versetzt, 1 min gevortext und wie oben beschrieben zentrifugiert, danach der Überstand in ein weiteres 2 ml-Reaktionsgefäß überführt und wiederum 3 min wie oben zentrifugiert. 600 µl des Überstandes wurden mit je 600 µl AL-Puffer und 25 µl Proteinase K gründlich gemischt und 10 min bei 70 °C inkubiert. 600 µl dieser Probenmischung wurden anschließend in die Säule („QIAamp spin column“) pipettiert und wie oben 1 min zentrifugiert. Die Säule wurde in ein neues 2 ml-Reaktionsgefäß eingesetzt, das Filtrat verworfen, wiederum 600 µl AL-Puffer in die Säule gegeben und diese 1 min wie oben zentrifugiert. Nach erneutem Verwerfen des Filtrats wurde der Säule 500 µl AW1-Puffer zugefügt. Nach Zentrifugation und Zugabe von 500 µl AW2-Puffer und einer weiteren Zentrifugation wurde das entstandene Filtrat erneut verworfen. Durch Zugabe von 200 µl AE-Puffer wurde die DNA eluiert und bei -18 °C für weitere Versuche aufbewahrt.

2.2.1.2 NET-Puffer-Methode

Zur Aufbereitung der DNA mittels NET-Puffer-Methode wurden von jeder zu untersuchenden Milchprobe 100 µl, 200 µl, 400 µl bzw. 600 µl in jeweils ein 2 ml-Reaktionsgefäß gegeben. Bei Untersuchung von Käse wurden je 20 g mit 20 ml sterilem Aqua dest. im Stomacher 2 min homogenisiert. 100 µl, 500 µl bzw. 1 ml des Homogenisats wurden in ein 2 ml-Reaktionsgefäß gegeben. Die so behandelten Milch- und Käseproben wurden anschließend 1 min bei 10.000 x g/min zentrifugiert. Nach Entfernung der Fettschicht wurde zu jeder Probe 400 µl NET-Puffer nach Romero und Lopez-Goni (1999) zugegeben und wiederum 1 min bei 10.000 x g/min zentrifugiert. Bei fettreichen Proben wurde die Fettschicht gegebenenfalls nochmals entfernt. Zur Deproteinisierung wurden je 25 µl

Proteinase K (14,8 mg/ml) hinzugefügt und 2 h bei 56 °C im Wasserbad inkubiert, zur Inaktivierung der Proteinase K wurden die Proben danach mit 20 µl 2,6 mol/l NaOH und 40 µl 24%-igem Natriumdodecylsulfat (SDS) versetzt und 10 min in kochendes Wasser gestellt. Anschließend wurde 200 µl Roti[®]-Phenol-Chloroform hinzugefügt und der Ansatz 5 min bei 10.000 x g/min zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß abpipettiert und 20 µl NaClO₄ (5 mol/l) und 100 µl Isopropanol (2-Propanol) zugefügt. Nach 30 min Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Proben bei 10.000 x g/min 30 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Zur Entfernung der Salze aus der isolierten DNA wurden 500 µl 70%-iges Ethanol hinzugegeben, die Ansätze 5 min wie oben zentrifugiert, der Überstand verworfen, die DNA 10 min bei Raumtemperatur getrocknet und in 100 µl Aqua dest. gelöst. Die Aufbewahrung erfolgte bei -18 °C.

2.2.1.3 ATL-Lysis- Puffer-Methode

Die Extraktion mittels ATL-Lysis-Puffer erfolgte wie in 2.2.1.2 beschrieben, lediglich der NET-Puffer wurde durch ATL-Lysis-Puffer ersetzt.

2.2.2 PCR-Methoden auf Basis universeller Primer

2.2.2.1 Amplifizierung des mitochondrialen tRNA (mt-tRNA)-Gens

Zur Amplifizierung des mt-tRNA-Gens aus Milch- und Käseproben wurden die universellen Primer nach Maudet und Taberlet (2001) L-15774, der mit der Sequenz 5'-ACA TGA ATT GGA GGA CAA CCA GT-3' auf dem mitochondrialen Cytochrom b (mt-*cytb*)-Gen sowie H-16498, der mit der Sequenz 5'-CCT GAA GTA AGA ACC AGA-3' bereits auf dem mt-tRNA-Gen gelegen ist (Abbildung 2.1), verwendet.

<p>L-15774 <u>ACATGAATTGGAGGACAACCAGT</u>CGAACACCCATATATCACCATCGGACAACACTAGCATCTGT CCTATACTTTTCTCCTCATCCTAGTGCTAATACCAACGGCCGGCACAATCGAAAACAAATTAC TAAAATGAAGA↓Ende des mt-<i>cytb</i>-Gens ↓Beginn des mt-tRNA-Gens CAGGTCTTTGTAGTACATCTAATACTGGTCTTGTAACCAGAGAAGGAGAACAACCTAACC TCCCTAAGACTCAAGGAAGAACTGCAGTCTCACCATCAACCCCAAAGCTGAAG<u>TTCTATT</u></p> <p>BosL-15794 <u>TAAACTATTCCCTGAAC</u>ACTATTAATATAGTTCATAAATACAAAGAGCCTTATCAGTATTA AATTTATCAAAAATCCCAATAACTCAACACAGAATTTGCACCCTAACCAAATATTACAAACA CCACTAGCTAACATAACACGCCATACACAGACCACAGAATGAATTACCTACGCAAGGGGTA ATGTACATAACATTAATGTAATAAAGACATAATATGTATATAGTACATTAATTATATGCCC CATGCATATAAGCAAGTACATGACCTCTATAGCAGTACATAATACATATAATTATTGACTGT</p> <p>BosH-16102 ACATAGTACATTAT<u>GTCAAATTCATTCTTGATAGTATATC</u>TATTATATATTCCTTACCATTA GATCACGAGCTTAATTACCATGCCGCGTGAAACCAGCAACCCGCTAGGCAGGGATCCCTCTT CTCGCTCCGGGCCATAAACCGTGCGGGTTCGCTATCCAATGAATTTTACCAGGG<u>CATCTGGTT</u></p> <p>H-16498 <u>CTTTCTTCAGG</u>GCCATCTCATCTAAAACGGTCCATTCTTTCCTCTTAAATAAGACATCTCGA TG↓Ende des mt-tRNA-Gens</p>

Abbildung 2.1: Darstellung der Nukleotidsequenz eines Ausschnittes des mt-*cytb*-Gens und des kompletten mt-tRNA-Gens von *Bos taurus*, mit Markierung der Anlagerungsstellen der universellen Primer L-15774 und H-16498 und der speziesspezifischen Primer BosL-15794 und BosH-16102 (Beschreibung in 2.2.3.1). (Gendatenbank NCBI -Zugangsnummer J01394)

Obwohl diese Primer einen universellen Charakter haben, sollen sie nach Maudet und Taberlet (2001) eine Differenzierung von Kuh- und Ziegen-DNA ermöglichen, da dem Rind ein Abschnitt des tRNA-Gens fehlt und somit kleinere Amplifikate (724 Basenpaare, Bp) gebildet werden. Zur Durchführung der PCR wurde zunächst ein Reaktionsgemisch mit in Tabelle 2.5 beschriebener Zusammensetzung hergestellt. Nach gründlichem Mischen wurden jeweils 27,5 µl des Reaktionsgemisches in ein 0,2 ml-Reaktionsgefäß pipettiert und 2,5 µl der nach 2.2.1.2 präparierten DNA zugegeben. Die PCR erfolgte anschließend nach dem in Tabelle 2.6 dargestellten Temperaturprogramm im Thermocycler.

Tabelle 2.5: Zusammensetzung des Reaktionsgemisches zur Durchführung der PCR

Substanz	Menge
Aqua dest.	19,9 µl
Reaktionspuffer	3,0 µl (10x Puffer)
MgCl ₂	1,8 µl (25 mmol/l)
dNTP	0,6 µl (10 mmol/l je Nukleotid)
Primer I	1,0 µl (10 µmol/l)
Primer II	1,0 µl (10 µmol/l)
<i>Taq</i> -DNA-Polymerase	0,2 µl (5 U/µl)

Tabelle 2.6: Amplifikationsbedingungen der PCR

Zyklen (Anzahl)	Temperatur	Dauer	Amplifizierungsschritt
1 Zyklus	95 °C	4 min	Initiale Denaturierung
30 Zyklen	95 °C	60 sec	Denaturierung
	50 °C	60 sec	Primeranlagerung
	72 °C	60 sec	Polymerisierung
1 Zyklus	72 °C	7 min	Renaturierung

2.2.2.2 Gelelektrophorese

Der Nachweis der DNA-Amplifikate erfolgte mittels Gelelektrophorese und anschließender optischer Darstellung. Dazu wurden 10 µl des PCR-Produkts mit 2 µl „Orange Loading Dye Solution“ versetzt und auf das Agarosegel (2,0%-ige Agarose NEEO[®] bzw. 4,0%-ige

Saekem® LE Agarose) aufgetragen. Für die Bestimmung des Molekulargewichts des Amplifikats wurde jeweils ein Molekulargewichtsstandard-Marker von 100 bzw. 50 Bp randständig aufpipettiert. Die Auftrennung der Proben erfolgte bei 120 mA (2,5 h). Als Laufpuffer diente 1x TAE-Puffer. Zur optischen Darstellung der Amplifikate wurden die Gele anschließend in einer wässrigen Ethidiumbromid-Lösung (5 µg/ml) 5 min gefärbt. Um den überschüssigen Farbstoff zu entfernen, wurden die Gele durch Schwenken in Aqua dest. 10 min bei Zimmertemperatur entfärbt und anschließend unter UV-Licht bei einer Wellenlänge von 302 nm digital fotografiert.

2.2.2.3 Amplifizierung des mitochondrialen *cytochrom b* (mt-*cytb*)-Gens

Zur Amplifizierung des mt-*cytb*-Gens wurde das von Zehner et al. (1998) beschriebene universelle Primerpaar mit der Sequenz 5'-CAT CGA CCT TCC AGC CCC ATC AAA CAT-3' und mit der Sequenz 5'-TGT TCT ACT GGT TGG CCT CCA ATT CA-3' verwendet (Abbildung 2.2). Der Ansatz des Reaktionsgemisches erfolgte nach den in Tabelle 2.7 beschriebenen Angaben.

Tabelle 2.7: Zusammensetzung des Reaktionsgemisches zur Durchführung der PCR

Substanz	Menge
Aqua dest.	34,8 µl
Reaktionspuffer	5,0 µl (10x Puffer)
MgCl ₂	3,0 µl (25 mmol/l)
dNTP	1,0 µl (10 mmol/l je Nukleotid)
Primer 1	1,0 µl (10 µmol/l)
Primer 2	1,0 µl (10 µmol/l)
<i>Taq</i> -DNA-Polymerase	0,2 µl (5 U/µl)

Nach gründlichem Mischen wurden 46 µl des Reaktionsgemisches in ein 0,2 ml-Reaktionsgefäß pipettiert und 4 µl der nach 2.2.1.2 präparierten DNA zugegeben. Das anschließend durchgeführte Temperaturprogramm umfasste die in Tabelle 2.8 dargestellten Schritte, die gelelektrophoretische Auswertung erfolgte wie in 2.2.2.2 beschrieben.

Tabelle 2.8: Amplifikationsbedingungen der PCR

Zyklen (Anzahl)	Temperatur	Dauer	Amplifizierungsschritt
1 Zyklus	94 °C	4 min	Initiale Denaturierung
35 Zyklen	94 °C	30 sec	Denaturierung
	55 °C	30 sec	Primeranlagerung
	72 °C	30 sec	Polymerisierung
1 Zyklus	72 °C	7 min	Renaturierung

Die Amplifizierung des *mt-cytb*-Gens wurde in einer weiteren Methode mit den von Meyer et al. (1995) beschriebenen universellen Primern L14841 (Sequenz 5'-CCA TCC AAC ATC TCA GCA TGA TGA AA-3') und H15149 (Sequenz 5'-GCC CCT CAG AAT GAT ATT TGT CCT CA-3') durchgeführt. In Abbildung 2.2 sind die Anlagerungsstellen der universellen Primer L14841 an der Nukleotidposition 14816 bis 14841 und H15149 an der Position 15149 bis 15174 dargestellt. Die Zusammensetzung des Reaktionsgemisches, der weitere Ablauf und die Amplifikationsbedingungen entsprachen den in Tabelle 2.7 und 2.8 genannten. Die gelelektrophoretische Auswertung erfolgte wie in 2.2.2.2 beschrieben.

2.2.2.4 Restriktionsenzymverdau des *mt-cytb*-Genamplikats

Die Amplifikate der PCR nach Meyer et al. (1995) (*mt-cytb*-Genamplifikat) wurden anschließend durch Restriktionsenzymverdau in charakteristische Fragmente gespalten (RFLP = Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus).

↓ **Beginn des *cytb*-Gen 14514 Bp**

ATGACTAACATTCGAAAGTCCCACCCACTAATAAAAATTGTAAACAATGCATTCATCGACCT **Primer 1**

TCCAGCCCCATCAAACATTTTCATCATGATGAAATTTCGGTTCCTCCTGGGAATCTGCCTAA

TCCTACAAATCCTCACAGGCCTATTCTAGCAATACACTACACATCCGACACAACAACAGCA

TTCTCCTCTGTTACCCATATCTGCCGAGACGTGAACTACGGCTGAATCATCCGATACATACA

CGCAAACGGAGCTTCAATGTTTTTTTATCTGCTTATATATGCACGTAGGACGAGGCTTATATT

ACGGGTCTTACACTTTTCTAGAAACATGAAATATTGGAGTAATCCTTCTGCTCACAGTAATA

GCCACAGCATTATAGGATACGTCTACCATGAGGACAAATATCATTCTGAGGAGCAACAGT

CATCACCAACCTCTTATCAGCAATCCCATACATCGGCACAAATTTAGTCGAATGAATCTGAG

GCGGATTCTCAGTAGACAAAGCAACCCTTACCCGATTCTTCGCTTTCATTTTATCCTTCCA

TTTATCATCATAGCAATTGCCATAGTCCACCTACTATTCTCCACGAAACAGGCTCCAACAA

CCCAACAGGAATTTCTCAGACGTAGACAAAATCCCATTCACCCCTACTATAACCATTAAGG

ACATCTTAGGGGCCCTCTTACTAATTCTAGCTCTAATACTACTAGTACTATTTCGCACCCGAC

CTCCTCGGAGACCCAGATAACTACACCCAGCCAATCCACTCAACACACCCCCTCACATCAA

ACCCGAGTGATACTTCTTATTTGCATACGCAATCTTACGATCAATCCCCAACAACTAGGAG

GAGTACTAGCCCTAGCCTTCTCTATCCTAATTCTTGCTCTAATCCCCCTACTACACACCTCC

AAACAACGAAGCATAATATTCCGACCACTCAGCCAATGCCTATTCTGAGCCCTAGTAGCAGA

CCTACTGACACTCACATTGAATTGGAGGACAACCAGTCGAACACCCATATATCACCATCGGAC

AACTAGCATCTGTCCTATACTTTCTCCTCATCCTAGTGCTAATACCAACGGCCGGCACAATC

GAAAACAAATTACTAAAATGAAGA ↓ **Ende des *cytb*-Gen 15653 Bp**

Abbildung 2.2: Darstellung der Nukleotidsequenz des gesamten mt-*cytb*-Gens von *Bos taurus* mit Markierung der Anlagerungsstellen der Primer 1 und 2 nach Zehner et al. (1998) und der Primer L14841 und H15149 nach Meyer et al. (1995). (Gendatenbank NCBI - Zugangsnummer AB074966).

2.2.2.4.1 Auswahl geeigneter Restriktionsenzyme

Zur Ermittlung geeigneter Restriktionsenzyme wurde zunächst in Vorversuchen mittels des Computerprogramms Clone Manager 4.0 eine Simulation des Restriktionsverdaus des nach 2.2.2 extrahierten und nach Meyer et al. (1995) amplifizierten *mt-cytb*-Genabschnitts durchgeführt. Die Sequenzen wurden von einer Gendatenbank (NCBI) übernommen. Aus 525 möglichen Enzymen wurden die Restriktions-Endonukleasen *TasI*, *HaeIII*, *SspI*, *HinfI*, *Tru9I* sowie *Bsh1236I* ausgewählt, da diese die Kuhmilch- und Ziegenmilch-Amplifikate an unterschiedlichen Stellen schneiden und damit unterschiedlich große spezifische Fragmente entstehen sollten.

2.2.2.4.2 Verdau mit Restriktionsenzymen

Der Restriktionsverdau des nach Meyer et al. (1995) amplifizierten *cytb*-Genabschnittes erfolgte mit den o.a. Restriktions-Endonukleasen. Der Restriktionsansatz setzte sich wie in Tabelle 2.9 dargestellt zusammen.

Tabelle 2.9: Zusammensetzung des Reaktionsgemisches zum Restriktionsverdau der Amplifikate

Substanz	Menge
PCR-Produkt	18,0 µl
Enzym	2,0 µl
Inkubationspuffer (10x)	3,0 µl
Aqua dest.	7,0 µl

Die Inkubation des Reaktionsgemisches erfolgte in einem 2 ml-Reaktionsgefäß im Wasserbad (24 h bei 37 °C (*HaeIII*, *Bsh1236I*, *Tru9I*, *SspI* und *HinfI*) bzw. bei 65 °C (*TasI*)).

2.2.2.4.3 Gelelektrophorese der Restriktionsfragmente

Für die Darstellung der Fragmente nach dem Restriktionsenzymverdau wurde eine Elektrophorese in 4 %-igem Metaphor[®]-Agarosegel durchgeführt. Dazu wurden 12 µl des Restriktionsproduktes mit 3 µl „Orange Loading Dye Solution“ versetzt, auf das Agarosegel aufgetragen und bei 100 mA 3,5 h elektrophoretisch aufgetrennt. Als Laufpuffer diente TAE-Puffer (1x). Für die Bestimmung des Molekulargewichts des Restriktionsproduktes wurde ein Molekulargewichtsstandard-Marker (50 Bp) verwendet. Die weitere Durchführung erfolgte wie in 2.2.2.2 beschrieben. Anschließend wurden die errechneten mit den tatsächlich gefundenen Fragmentgrößen verglichen.

2.2.3 PCR-Methoden auf Basis speziesspezifischer Primer

2.2.3.1 Amplifizierung eines Rind-spezifischen Abschnitts des mt-tRNA-Gens

Zur Amplifizierung eines Rind-spezifischen Abschnitts des mt-tRNA-Gens aus Milch- und Käseproben wurden das Primerpaar BosL-15794 (Sequenz 5'-TTC TAT TTA AAC TAT TCC ATG AAC-3') und BosH-16102 (Sequenz 5'-GAT ATA CTA TCA AGA ATG AAT TTG AC-3') nach Maudet und Taberlet (2001) verwendet (siehe Abbildung 2.1). Der Ansatz des Reaktionsgemisches erfolgte nach den in Tabelle 2.5 beschriebenen Angaben, die Amplifikationsbedingungen der PCR sind in Tabelle 2.10 aufgeführt, der gelelektrophoretische Nachweis in 2.2.2.2 beschrieben.

Tabelle 2.10: Amplifikationsbedingungen der PCR

Zyklen (Anzahl)	Temperatur	Dauer	Amplifizierungsschritt
1 Zyklus	95 °C	4 min	Initiale Denaturierung
30 Zyklen	95 °C	60-sec	Denaturierung
	59 °C	60 sec	Primeranlagerung
	72 °C	60 sec	Polymerisierung
1 Zyklus	72 °C	7 min	Renaturierung

2.2.3.2 Amplifizierung eines Rind-spezifischen Abschnitts des mt-cytb-Gens

Zur Amplifizierung eines Rind-spezifischen Abschnitts des mt-cytb-Gens wurde in einer ersten Methode das von Herman (2001) beschriebene Primerpaar (Sequenz 5'-GGA CGT ATC CTA TAA AT-3' und 5'-GGA ATC TGC CTA ATC CTA-3') verwendet (Abbildung 2.3). Der Ansatz des Reaktionsgemisches sowie die Durchführung der PCR erfolgte nach den in Tabelle 2.5 beschriebenen Angaben. Das verwendete Temperaturprogramm erfolgte wie in Tabelle 2.11, die Gelelektrophorese wie in 2.2.2.2 beschrieben.

Tabelle 2.11: Amplifikationsbedingungen der PCR

Zyklen (Anzahl)	Temperatur	Dauer	Amplifizierungsschritt
1 Zyklus	95 °C	4 min	Initiale Denaturierung
35 Zyklen	95 °C	30 sec	Denaturierung
	54 °C	30 sec	Primeranlagerung
	72 °C	30 sec	Polymerisierung
1 Zyklus	72 °C	7 min	Renaturierung

	1	60
Bos taurus	ATGACTAACATTTCGAAAAGTCCCACCCACTAATAAAAAATTGTAAACAATGCATTTCATCGAC	
Bos indicus	ATGACTAACATTTCGAAAAGTCCCACCCACTAATAAAAAATTGTAAACAATGCATTTCATCGAC	
Capra hircus	ATGACCAACATCGAAAAGACCCACCCATTAATAAAAAATTGTAAACAACGCATTTCATCGAC	
		Herman I
	61	120
Bos taurus	CTTCCAGCCCCATCAAACATTTTCATCATGATGAAATTTTCGGTTCCCTCCTGGGAATCTGC	
Bos indicus	CTTCCAGCCCCATCAAACATTTTCATCATGATGCAATTTTCGGTTCCCTCCTGGGAATCTGC	
Capra hircus	CTCCCAACCCCATCAAACATTCATCATGATGAAACTTTGGATCCCTCCTAGGAATTTGC	
	121	180
Bos taurus	CTAATCCTACAAATCCTCACAGGCCTATTCTTAGCAATACACTACACATCCGACACAACA	
Bos indicus	CTAATCCTACAAATCCTCACAGGCCTATTCTTAGCAATACACTACACATCCGACACAACA	
Capra hircus	CTAATCTTACAAATCCTCACAGGCCTATTCTTAGCAATACACTATACATCCGACACAATA	

Abbildung 2.3: Vergleich der Nukleotidsequenzen des mt-cytb-Gens von *Bos taurus* (Gendatenbank NCBI - Zugangsnummer AB074966), *Bos indicus* (Gendatenbank NCBI - Zugangsnummer AF419237) und *Capra hircus* (Gendatenbank NCBI - AF217254 Zugangsnummer). Die Unterschiede in den Nukleotidsequenzen sowie die Ansatzstellen der speziesspezifischen Primer nach Herman (2000) bzw. Bottero et al. (2002) sind markiert.

	181		240
Bos taurus	ACAGCATTCTCCTCTGTTACCCATATCTGCCGAGACGTGAACTACGGCTGAATCATCCGA		
Bos indicus	ACAGCATTCTCCTCTGTTACCCATATCTGCCGAGACGTGAACTACGGCTGAATCATCCGA		
Capra hircus	ACAGCATTCTCCTCTGTTACCCATATCTGCCGAGACGTGAACTACGGCTGAATCATCCGA		
	241		300
Bos taurus	TACATACACGCAAACGGAGCTTCAATGTTTTTATCTGCTTATATATGCACGTAGGACGA		
Bos indicus	TACATACACGCAAACGGAGCTTCAATGTTTTTATCTGCTTATATATGCACGTAGGACGA		
Capra hircus	TACATACACGCAAACGGAGCTTCAATGTTTTTATCTGCTTATATATGCACGTAGGACGA		
	301		360
	L 4814		
Bos taurus	GGCTTATATTACGGGTCTTACACTTTTCTAGAAACATGAAATATTGGAGTAATCCTTCTG		
Bos indicus	GGCTTATATTATGGGTCTTACACTTTTCTAGAAACATGAAATATTGGAGTAATCCTTCTG		
Capra hircus	GGCTTATATTATGGGTCTTACACTTTTCTAGAAACATGAAATATTGGAGTAATCCTTCTG		
	361	Herman II	421
Bos taurus	CTCACAGTAATAGCCACAGCATTATAGGATACGTCCTACCATGAGGACAAATATCATTC		
Bos indicus	CTCACAGTAATAGCCACAGCATTATAGGATACGTCCTACCATGAGGACAAATATCATTC		
Capra hircus	CTCACAGTAATAGCCACAGCATTATAGGATACGTCCTACCATGAGGACAAATATCATTC		
	421		480
Bos taurus	TGAGGAGCAACAGTCATCACCAACCTCTTATCAGCAATCCCATAACATCGGCACAAATTTA		
Bos indicus	TGAGGAGCAACAGTCATCACCAACCTCTTATCAGCAATCCCATAACATCGGCACAAATTTA		
Capra hircus	TGAGGAGCAACAGTCATCACCAACCTCTTATCAGCAATCCCATAACATCGGCACAAATTTA		
	481		540
Bos taurus	GTCGAATGAATCTGAGGCGGATTCTCAGTAGACAAAAGCAACCCCTTACCCGATTCTTCGCT		
Bos indicus	GTCGAATGAATCTGAGGCGGATTCTCAGTAGACAAAAGCAACCCCTTACCCGATTCTTCGCT		
Capra hircus	GTCGAATGAATCTGAGGCGGATTCTCAGTAGACAAAAGCAACCCCTTACCCGATTCTTCGCT		
	541	H 5092	600
Bos taurus	TTCCATTTTATCCTTCCATTTATCATCATAGCAATTGCCATAGTCCACCTACTATTCCCTC		
Bos indicus	TTCCATTTTATCCTTCCATTTATCATCATAGCAATTGCCATAGTCCACCTACTATTCCCTC		
Capra hircus	TTCCATTTTATCCTTCCATTTATCATCATAGCAATTGCCATAGTCCACCTACTATTCCCTC		
	601		660
Bos taurus	CACGAAACAGGCTCCAACAACCCAACAGGAATTTCCCTCAGACGTAGACAAAATCCCATTTC		
Bos indicus	CACGAAACAGGCTCCAACAACCCAACAGGAATTTCCCTCAGACGTAGACAAAATCCCATTTC		
Capra hircus	CACGAAACAGGCTCCAACAACCCAACAGGAATTTCCCTCAGACGTAGACAAAATCCCATTTC		

Fortsetzung Abbildung 2.3: Vergleich der Nukleotidsequenzen des mt-*cytb*-Gens von *Bos taurus* (Gendatenbank NCBI - Zugangsnummer AB074966), *Bos indicus* (Gendatenbank NCBI - Zugangsnummer AF419237) und *Capra hircus* (Gendatenbank NCBI - AF217254 Zugangsnummer). Die Unterschiede in den Nukleotidsequenzen sowie die Ansatzstellen der speziesspezifischen Primer nach Herman (2000) bzw. Bottero et al. (2002) sind markiert.

	661		720
Bos taurus	CACCCCTACTATAACCATTAAGGACATCTTAGGGGCCCTCTACTAATTCTAGCTCTAATA		
Bos indicus	CACCCCTACTATAACCATTAAGGACATCTTAGGGGCCCTCTACTAATTCTAGCTCTAATA		
Capra hircus	CACCCCTACTACACCATTAAAGATATCTTAGGGGCCATGCTACTAATTCTTGTCTAATA		
	721		780
Bos taurus	CTACTAGTACTATTTCGCACCCGACCTCCTCGGAGACCCAGATAACTACACCCAGCCAAT		
Bos indicus	CTACTAGTACTATTTCGCACCCGACCTCCTCGGAGACCCAGATAACTACACCCAGCCAAT		
Capra hircus	TTACTAGTACTATTTCACCCGACCTACTCGGAGACCCAGACAACATAATCCAGCAAT		
	781		840
Bos taurus	CCACTCAACACACCCCTCACATCAAACCCGAGTGATACTTCTTATTTGCATACGCAATC		
Bos indicus	CCACTCAACACACCTCCTCACATCAAACCCGAGTGATACTTCTTATTTGCATACGCAATC		
Capra hircus	CCACTCAAACACCCCTCACATCAAACCTGAGTGATAATTCCTATTTGCATACGCAATC		
	841		900
Bos taurus	TTACGATCAATCCCCAACAAACTAGGAGGAGTACTAGCCCTAGCCTTCTCTATCCTAATT		
Bos indicus	TTACGATCAATCCCCAACAAACTAGGAGGAGTACTAGCCCTAGCCTTCTCTATCCTAATT		
Capra hircus	CTACGATCAATCCCCAACAAACTAGGAGGAGTCTAGCCCTAGCTCTCTCAATCCTAATC		
	901		960
Bos taurus	CTTGCTCTAATCCCCCTACTACACACCTCCAAACAACGAAGCATAATATTCGGACCACTC		
Bos indicus	CTTGCTCTAATCCCCCTACTACACACCTCCAAACAACGAAGCATAATATTCGGACCACTC		
Capra hircus	TTAGTACTTGTACCTTCTCTCACACATCTAAACAACGAAGCATAATATTCGGCCCAATC		
	961		1020
Bos taurus	AGCCAATGCCTATTCTGAGCCCTAGTAGCAGACCTACTGACACTCACATGAATTGGAGGA		
Bos indicus	AGCCAATGCCTATTCTGAGCCCTAGTAGCAGACCTACTGACACTCACATGAATTGGAGGA		
Capra hircus	AGCCAATGCATATTCTGAATCCTGTAGCAGATCTAATTAACACTCACATGAATTGGAGGA		
	1021		1080
Bos taurus	CAACCAGTCGAACACCCATATATCACCATCGGACAACACTAGCATCTCTCCTATACTTTCTC		
Bos indicus	CAACCAGTCGAACACCCATATATCACCATTGGACAACACTAGCATCTATCCTATACTTTCTT		
Capra hircus	CAGCCAGTCGAACATCCCTACATTAATTATTGGACAACACTAGCATCTATTAATATAATTCTC		
	1081		1140
Bos taurus	CTCATCCTAGTGCTAATACCAAGGCCGGCACAATCGAAAACAAATTACTAAAATGAAGA		
Bos indicus	CTCATCCTAGTACTAATACCAACAGCCGGCACAATTGAAAACAAATTACTAAAATGAAGA		
Capra hircus	ATCATCTAGTATAAATACCAGCAGCTAGCACCATTGAAAACAACTTCTAAAATGAAGA		

Fortsetzung Abbildung 2.3: Vergleich der Nukleotidsequenzen des mt-*cytb*-Gens von *Bos taurus* (Gendatenbank NCBI - Zugangsnummer AB074966), *Bos indicus* (Gendatenbank NCBI - Zugangsnummer AF419237) und *Capra hircus* (Gendatenbank NCBI - AF217254 Zugangsnummer). Die Unterschiede in den Nukleotidsequenzen sowie die Ansatzstellen der speziesspezifischen Primer nach Herman (2000) bzw. Bottero et al. (2002) sind markiert.

Zur Amplifizierung eines Rind-spezifischen Abschnitts des mt-*cytb*-Gens aus Milch und Käse wurden in einer weiteren Methode die von Bottero et al. (2002) beschriebenen Primer L14814 (Sequenz 5'-GGC TTA TAT TAC GGG TCT TAC ACT-3') und H15092 (Sequenz 5'-AAT TCA TTC AAC CAG ACTT GTA CCA-3') verwendet (Abbildung 2.3). Das Reaktionsgemisch setzte sich wie in Tabelle 2.5 beschrieben zusammen. Die PCR erfolgte nach folgendem Temperaturprogramm (Tabelle 2.12). Die Auswertung der Amplifikate erfolgte wie in 2.2.2.2 beschrieben.

Tabelle 2.12: Amplifikationsbedingungen der PCR

Zyklen (Anzahl)	Temperatur	Dauer	Amplifizierungsschritt
1 Zyklus	95 °C	4 min	Initiale Denaturierung
35 Zyklen	95 °C	30 sec	Denaturierung
	52 °C	30 sec	Primeranlagerung
	72 °C	30 sec	Polymerisierung
1 Zyklus	72 °C	7 min	Renaturierung

2.2.3.2.1 Restriktionsverdau des speziesspezifischen mt-*cytb*-Genamplikats

Die Amplifikate der PCR-Methode nach Bottero et al. (2002) wurden zur zusätzlichen Überprüfung der Spezifität der Primer durch Restriktionsverdau (RFLP) mit den durch Simulation mittels Clone Manager 4.0 als optimal ermittelten Enzymen *HphI*, *MboII*, *HaeIII* bzw. *TspEI* (*TasI*) weiter fragmentiert (Tabelle 2.13). Je 1 µl eines Enzyms (10 U/µl) wurden mit 18 µl des PCR-Produkts, 3 µl Inkubationspuffer und 8 µl Aqua dest. 2 h bei 37 °C (*HphI*, *MboII*, *HaeIII*) bzw. 65 °C (*TspEI* (*TasI*)) inkubiert und danach gelelektrophoretisch (2.2.2.4.3) ausgewertet.

Zur Überprüfung der Ergebnisse wurde zusätzlich noch mit dem Clone Manager-Programm ein Restriktionsenzymverdau für „falsch-positive“ Amplifikate aus Ziegen-DNA simuliert (Tabelle 2.13).

Tabelle 2.13: Errechnete Größen der Restriktionsfragmente nach PCR-Amplifikation von speziesspezifischen Abschnitten des mt-*cytb*-Gens und simuliertem Enzymverdau

Amplifizierte Sequenz von der Spezies	Fragmentgrößen des Amplikons (279 Bp) nach Restriktionsenzymverdau mit			
	<i>HaeIII</i>	<i>TasI</i>	<i>MboII</i>	<i>HphI</i>
Kuh (AF 419237*)	-	173 98 8	223 56	152 127
Ziege (AB 004069*)	201 72	-	134 89 59	214 59

* Zugangsnummer der Gendatenbank NCBI

2.2.4 Überprüfung der Sensitivität und Spezifität der PCR-Methoden

2.2.4.1 Überprüfung der Spezifität

Zur Überprüfung der Spezifität der Testsysteme wurden zunächst Proben von Kuhmilch (pasteurisierte Milch, n = 47), Ziegenmilch (Rohmilch, n = 37, von Höfen in Hessen) sowie definiert aus Kuhmilch hergestelltem Käse (n = 7) in die Testsysteme eingesetzt und anschließend gelelektrophoretisch ausgewertet.

Um eine rassebedingte Variabilität der entsprechenden zu amplifizierenden Gensequenzen ausschließen zu können, wurden zusätzlich die PCR-Methoden gezielt mit Kuh- bzw. Ziegenmilch verschiedener Rassen (Einzelgemelke; n (Ziege) = 28; n (Kuh) = 17) überprüft. Dazu wurden Rohmilchproben von Ziegen der Rassen Bunte Deutsche Edelziege, Thüringerwald-Ziege und Weiße Deutsche Edelziege, Walliser Schwarzhalsziege sowie von verschiedenen Kuhrassen (Deutsche Schwarzbunte, Deutsche Rotbunte, Braunvieh, Fleckvieh, Jersey, Limousin, Hinterwäldler) aus verschiedenen Beständen (Hessen) gewonnen und für die Versuche verwendet.

Außerdem wurde Rohmilch anderer Tierarten wie Büffel (Universität Leipzig, Veterinärmedizinische Fakultät, Institut für Lebensmittelhygiene), Schaf (landwirtschaftlicher Betrieb, Hessen), Kamel (landwirtschaftlicher Betrieb, Ägypten) und Pferd (landwirtschaftlicher Betrieb, Hessen; Justus-Liebig-Universität Gießen, Gynäkologische Klinik) in die Tests eingesetzt.

2.2.4.2 Überprüfung der Nachweisempfindlichkeit und Testrobustheit

Zur Überprüfung der Sensitivität und Robustheit der erarbeiteten PCR-Methoden wurden reine Ziegenmilch- bzw. Ziegenkäseproben (Überprüfung mittels ELISA) künstlich mit Kuhmilch bzw. Kuhkäse in unterschiedlichen Konzentrationen versetzt und mit den entsprechenden Methoden mindestens je 5-mal untersucht.

Für die Herstellung dieser künstlich kontaminierten Milchproben wurde Kuhmilch mit Ziegenmilch gründlich gemischt und je 500 µl in ein 2 ml-Reaktionsgefäß verbracht. Die Konzentration des Kuhmilchanteils wurde auf Werte zwischen 0,01 % und 50 % eingestellt. Weiterhin wurde Kuhkäse in Ziegenkäse (Weichkäse, halbfester Schnittkäse sowie Hartkäse) eingemischt, indem Kuh- bzw. Ziegenkäse mit 100 ml Aqua dest. in einem Stomacher 2 min homogenisiert und anschließend wie in 2.2.1.2 beschrieben weiterbehandelt wurden. Der Kuhkäse-Anteil wurde auf verschiedene Konzentrationen in einem Bereich zwischen 0,01 % und 50 % eingestellt.

2.2.5 Untersuchung von Handelsproben

2.2.5.1 Untersuchung von ökologischen und konventionellen Ziegenkäse

Die in den bisherigen Versuchen als am geeignetsten ermittelte PCR-Methode (siehe 2.2.3.2, Methode 2) wurde anschließend zur Untersuchung von ökologischen Ziegenmilchprodukten auf Verfälschung mit Kuhmilch verwendet. Zu Vergleichszwecken wurden konventionell erzeugte Produkte in die Untersuchung miteinbezogen.

Dazu wurden reine Ziegenkäseproben (nach Deklaration oder Angaben des Herstellers, Verkäufers) sowie Ziegenkäse mit deklariertem Kuhmilchzusatz in verschiedenen Geschäften (Supermärkte, ökologische Fachgeschäfte, Reformhäuser), Märkten (Wochenmärkte, Bauernmärkte) und ab Hof in Hessen gekauft und mittels molekularbiologischer Verfahren untersucht.

2.2.6 Vergleichsuntersuchung mit einem enzymimmunologischen Testverfahren

Zur Überprüfung der PCR-Methode wurden die Handelsproben stichprobenartig mittels eines kommerziellen Mikrotiterplatten-Enzymimmuntests (Ridascreen CIS) auf der Basis von Antikörpern gegen bovines IgG untersucht.

2.2.6.1 Enzymimmuntest zum Nachweis von Kuhmilch in Ziegenkäse

2.2.6.1.1 Probenvorbereitung

Die Proben wurden nach Herstellerangaben (R-Biopharm AG, Darmstadt, Deutschland) aufbereitet. Je 1 g Käse wurde mit 10 ml Aqua dest. gemischt, homogenisiert und 10 min zentrifugiert (4000 x g bei 15 °C). Anschließend wurden je 100 µl des Überstands pro Kavität in den Test eingesetzt.

2.2.6.1.2 Testdurchführung

Der Test wurde nach Herstellerangaben durchgeführt. Dazu wurden die Proben (2.2.5.1) sowie die im Testkit bereits vorliegenden Standardlösungen im Doppelansatz in die Kavitäten der Mikrotiterplatte pipettiert und 30 min inkubiert. Nach einem Waschschrift wurde je 100 µl Enzymkonjugat-Lösung in die Kavitäten pipettiert, 30 min inkubiert und die Platte wiederum gewaschen. Anschließend wurde je 50 µl Substrat und 50 µl Chromogen in die Kavitäten pipettiert, 30 min inkubiert und die Enzymreaktion mit 100 µl Stopp-Reagenz/Kavität gestoppt. Die Auswertung erfolgte photometrisch bei einer Wellenlänge von 450 nm.

3 ERGEBNISSE

3.1 Mikrobiologische Qualität von Ziegenmilchprodukten

3.1.1 Charakterisierung der untersuchten Probenmaterialien

Bei der Gewinnung der Proben wurden die Proben nach Käsesorten entsprechend ihrer Angebotshäufigkeit eingekauft. Daneben stellten Produkte aus regionaler Herstellung, insbesondere solche aus ökologischer Produktion und/oder Direktvermarktung einen Schwerpunkt der Untersuchungen dar. Hieraus ergab sich die in den Tabellen 3.1 und 3.2 dargestellte Probenverteilung. In die Untersuchung einbezogen waren 12 direktvermarktende Betriebe (Hofläden), von denen acht ökologisch wirtschaften. Darüber hinaus wurden von mehreren Naturkostläden Ziegenkäse aus regionaler hessischer bzw. bayerischer Produktion (alle ökologisch) gekauft, die entweder aus Molkereibetrieben oder aus spezifischen Herkunftsbetrieben stammten.

Tabelle 3.1: Übersicht über die Herkunft der untersuchten Probenmaterialien (entsprechend Produktangaben)

Typ	Gesamtzahl	Deutschland	Hessen	Andere Bundesländer	F	NL	AT	I	Andere EU-Länder/ keine Angaben
Frischkäse	44	20	13	7	10	3	3	3	5
Weichkäse	56	27	18	9	15	7	1	1	5
Schnitt- und Hartkäse	83	39	36	3	4	35	1	-	4
Summe	183	86	67	19	29	45	5	4	14

F = Frankreich, NL = Niederlande, AT = Österreich, I = Italien

Tabelle 3.2: Übersicht über die Herstellungsart der untersuchten Probenmaterialien (entsprechend Produktangaben bzw. nach Auskunft Verkaufspersonal)

Typ	ökologische Produktionsweise	konventionelle Produktionsweise
Frischkäse (n = 44)	24	20
Weichkäse (n = 56)	24	32
Schnitt- und Hartkäse (n = 83)	66	17
Summe (n = 183)	114	69

In einigen Fällen war eine weitergehende Differenzierung hinsichtlich der Probenmaterialien nicht oder nur schwer möglich. So vertreiben einige Betriebe auf ihren Hofläden oder auf Wochenmärkten neben eigenen Produkten auch beispielsweise Ziegenkäse aus anderen Regionen Deutschlands oder aus dem europäischen Ausland. Auch die konventionell wirtschaftenden Betriebe sind im Verkauf ab Hof bzw. über Wochenmärkte tätig, und die hier verkauften Produkte sind nicht immer aus eigener Herstellung.

Nähere Angaben zu einzelnen Käsen, insbesondere bezüglich einer Herstellung aus Rohmilch oder aus wärmebehandelter Milch, konnten oft nur nach Rückfrage mit dem Verkaufspersonal geklärt werden, in einigen Fällen war eine Klärung dieser Frage überhaupt nicht möglich. Auffällig war zudem, dass in Hofläden bzw. auf Wochenmärkten und in Reformhäusern Hessens Rohmilch-Frischkäse aus anderen Bundesländern vertrieben werden, was im Sinne der Käseverordnung als nicht zulässig angesehen werden muss. Nicht bei allen Probenmaterialien konnte eine eindeutige Information bezüglich der Herstellung (ökologisch/konventionell) erhalten werden. Derartige Proben wurden zur Gruppe der konventionell hergestellten Käse gerechnet.

3.1.2 Bewertungskriterien

Hinsichtlich der Anforderungen zur mikrobiologischen Beschaffenheit von Käse wurde auf die in den Tabellen 3.3 und 3.4 dargestellten Werte gemäß Milchverordnung bezug genommen. Darüber hinaus ist gemäß Milchverordnung die Abwesenheit von Salmonellen und Listerien (in 25 g) sicherzustellen.

Tabelle 3.3: Hinsichtlich *S. aureus* und *E. coli* als Nachweiskeime für mangelnde Hygiene in Käse einzuhaltende Höchstwerte (MilchV Anlage 6)

Produkt/Keimart	m	M	n	c	Bemerkung
Nachweiskeime für mangelnde Hygiene					
<i>Escherichia coli</i>					
Käse aus Rohmilch und thermisierter Milch	10.000	100.000	5	2	-
Weichkäse (aus wärmebehandelter Milch)	100	1.000	5	2	-
<i>Staphylococcus aureus</i>					
Käse aus Rohmilch und thermisierter Milch	1.000	10.000	5	2	bei Überschreitung von M zusätzlich Prüfung auf Toxingehalt
Weichkäse (aus wärmebehandelter Milch)	100	1.000	5	2	bei Überschreitung von M zusätzlich Prüfung auf Toxingehalt
Frischkäse	10	100	5	2	(keine differenzierende Festlegung hinsichtlich Wärmebehandlung)

Tabelle 3.4: Hinsichtlich coliformer Keime als Indikatorkeime in Käse einzuhaltende Höchstwerte (MilchV Anlage 6)

Produkt/Keimart	m	M	n	c	Bemerkung
Weichkäse (aus wärmebehandelter Milch)	10.000	100.000	5	2	keine Festlegung für Rohmilchkäse

Höchstwerte für coliforme Keime in Weichkäse aus Rohmilch sowie in anderen Käsesorten wurden nicht festgelegt. Insofern ist eine Beurteilung unter rechtlichen Aspekten schwierig. Im Hinblick auf die Verbrauchererwartung in Bezug auf hygienische Produkte und die im folgenden dargestellten Ergebnisse erscheint es jedoch vernünftig, auch für coliforme Keime ähnliche Bewertungsniveaus wie für *E. coli* anzulegen.

Für pathogene Keime (Salmonellen, *Listeria monocytogenes*, VTEC) sowie für Toxine ist in Milchprodukten jeweils Abwesenheit zu fordern.

Eine Bewertung von *Bacillus cereus* ist vom Gesetzgeber nicht definiert. Eine Kontamination von $>10^4$ - 10^5 KbE/g dürfte aus gesundheitlicher Sicht problematisch sein, über 10^6 KbE/g ist eine Toxinbildung nicht auszuschließen. Bei guter Hygienepraxis sollten für *Bacillus cereus* in Käse Werte über 10^3 KbE/g vermeidbar sein.

3.1.3 Untersuchungsergebnisse

Eine summarische Darstellung der Untersuchungsergebnisse ist in Tabelle 3.5 wiedergegeben.

Tabelle 3.5: Zusammenfassende Darstellung der Ergebnisse der mikrobiologischen Untersuchung von Ziegenkäse. Die erste Zahl in jedem Feld gibt die absolute Anzahl positiver Befunde an, der dahinter stehende Wert in Klammern den prozentualen Anteil. Für *B. cereus*, *E. coli* und coliforme Keime ist die Anzahl der positiven Proben (Pr.) nach Kontaminationshöhe (KbE) differenziert angegeben.

	Alle Proben (n = 183)	Frischkäse (n = 44)	Weichkäse (n = 56)	Schnittkäse (n = 83)
Salmonellen nachweisbar in 25 g	-	-	-	-
VTEC	-	-	-	-
<i>L. monocytogenes</i> nachweisbar in 25 g	4 (2,2%)	-	-	4 (4,8%)
<i>S. aureus</i>	2 (1,1%)	-	1 (1,8%) 5 x 10 ² /g	1 (1,2%) 9 x 10 ⁵ /g
<i>S. aureus</i> -Thermonuklease (Enterotoxine)	-	-	-	-
<i>B. cereus</i>	25 (14%)	6 (14%) 6 Pr. <10 ² /g	8 (14%) 7 Pr. <10 ² /g 1 Pr. <10 ³ /g	11 (13%) 6 Pr. <10 ² /g 5 Pr. <10 ³ /g
<i>E. coli</i>	35 (19%)	2 (4,5%) 1 Pr. <10 ² /g 1 Pr. <10 ³ /g	10 (18%) 3 Pr. <10 ² /g 3 Pr. <10 ³ /g 2 Pr. <10 ⁴ /g 1 Pr. <10 ⁵ /g 1 Pr. <10 ⁶ /g	23 (28%) 9 Pr. <10 ² /g 4 Pr. <10 ³ /g 5 Pr. <10 ⁴ /g 3 Pr. <10 ⁵ /g 1 Pr. <10 ⁶ /g 1 Pr. <10 ⁷ /g
Coliforme Keime	99 (54%)	8 (18%) 4 Pr. <10 ² /g 2 Pr. <10 ³ /g 1 Pr. <10 ⁴ /g 1 Pr. <10 ⁵ /g	40 (71%) 3 Pr. <10 ² /g 6 Pr. <10 ³ /g 6 Pr. <10 ⁴ /g 6 Pr. <10 ⁵ /g 4 Pr. <10 ⁶ /g 6 Pr. <10 ⁷ /g 9 Pr. <10 ⁸ /g	51 (61%) 9 Pr. <10 ² /g 16 Pr. <10 ³ /g 11 Pr. <10 ⁴ /g 9 Pr. <10 ⁵ /g 4 Pr. <10 ⁶ /g 2 Pr. <10 ⁷ /g

Wie bereits anhand dieser Übersicht deutlich wird, ist eine nach Käsesorte differenzierende Betrachtung der Ergebnisse sinnvoll. In den folgenden Abschnitten sind daher solche Einzelbewertungen beschrieben.

3.1.3.1 Frischkäse

In keiner der 44 untersuchten Frischkäse-Proben ergaben sich Hinweise auf pathogene Keime. Weder Salmonellen noch *L. monocytogenes* noch VTEC waren nachweisbar. *B. cereus* war in Keimzahlen von überwiegend 10-20 KbE/g (maximal 60 KbE/g) in 6 Proben nachweisbar, was allerdings im Hinblick auf Gesundheitsrisiken (Toxinbildung) nicht als problematisch angesehen werden kann. *S. aureus* war in keiner Probe nachweisbar, ebenso ergaben sich keine Hinweise auf Enterotoxinbildung (Thermonuklease-Test). *E. coli* konnte in zwei Proben nachgewiesen werden.

Lediglich zwei Proben (konventionelle Herstellung) enthielten erhöhte Gehalte an coliformen Keimen (10^3 - 10^4 /KbE), sechs weitere (ebenfalls konventionelle Herstellung) wiesen Gehalte an coliformen Keimen mit weniger als 10^3 KbE/g auf. Auffällig war hier ein konventionell wirtschaftender regionaler Betrieb, für den auch in Weich- und Schnittkäsen deutlich erhöhte Werte für coliforme Keime festgestellt worden waren.

Bei der Mehrzahl der untersuchten Proben (n = 27) handelte es sich um Frischkäse aus wärmebehandelter Milch, 15 Proben waren nach Deklaration (bzw. nach Verkäuferangaben) aus Rohmilch hergestellt. Diese Information konnte in einigen Fällen erst auf Nachfrage erhalten werden, da keine entsprechende Kennzeichnung vorlag. Für zwei Proben konnte überhaupt keine Information bezüglich einer durchgeführten Wärmebehandlung erhalten werden.

Im Hinblick auf die oben geschilderten mikrobiologischen Kriterien wurden zwar keine Unterschiede festgestellt. Bezüglich der deklariert aus Rohmilch hergestellten Frischkäse ist aber erwähnenswert, dass nur ein Produkt aus echter Direktvermarktung (Hofladen) stammte, 8 Proben aus dem Europäischen Ausland importiert waren (7 x Frankreich, 1 x Niederlande)

und immerhin 6 Proben zwar aus Deutschland, aber nicht aus Direktvermarktung (Wochenmärkte, Naturkostläden) stammten. Letztere Proben sind im Hinblick auf die Bestimmungen der Käseverordnung als problematisch anzusehen. In §3 KäseV ist geregelt, dass in Deutschland hergestellter Frischkäse aus Rohmilch nur in Direktvermarktung ab Hof (und unter Einhaltung aller einschlägigen Hygienevorschriften) in den Verkehr gebracht werden darf.

Obwohl sich keine Hinweise auf pathogene Keime oder Toxinbildung in Frischkäse ergaben, bleibt die Tatsache festzustellen, dass ein nicht unerheblicher Anteil der Produkte aus Rohmilch hergestellt wurde. Da Frischkäse keiner Reifung unterzogen wird, stellen Rohmilchprodukte hier ein potentiell Risiko dar. Da offensichtlich neben ab-Hof-Verkauf und Importprodukten aus dem Europäischen Ausland auch Rohmilch-Frischkäse aus nicht-eigener Herstellung verkauft wird, ist dies im Hinblick auf die einschlägigen Rechtsvorschriften problematisch.

3.1.3.2 Weichkäse

3.1.3.2.1 Pathogene/toxinogene Keime

Salmonellen, Verotoxinbildende *E. coli* sowie *L. monocytogenes* wurden in keiner Probe nachgewiesen. Die Durchführung des Thermonuklease-Tests ergab in keiner Probe Hinweise auf das Vorhandensein von *S. aureus*-Enterotoxinen.

Im Hinblick auf *B. cereus* wies lediglich eine Probe der untersuchten Weichkäse (konventionelle Herstellung, aus wärmebehandelter Milch, Ursprungsland: Spanien) eine deutlich erhöhte Kontamination ($2,3 \times 10^2$ KbE/g) auf. Sieben weitere Proben wiesen geringe Keimzahlen zwischen 10 und 60 *B. cereus*/g auf, in den übrigen 48 Proben war *B. cereus* nicht nachweisbar ($<10^1$ KbE/g). Eine eindeutige lebensmittelrechtliche Bewertung dieser Befunde ist aufgrund fehlender Grenzwerte schwierig, ein gesundheitliches Risiko durch diese noch relativ geringgradige Kontamination von Weichkäse ist aber wohl nicht zu erwarten, da üblicherweise erst deutlich höhere Keimzahlen (ab 10^5 - 10^6 KbE/g) als kritisch bewertet werden.

3.1.3.2.2 Hygienekeime

Unter den insgesamt 56 Weichkäsen, die in die Untersuchungen einbezogen worden waren, stammten 24 Proben aus deklariert ökologischer Produktion, die übrigen 32 Proben aus konventioneller Produktion bzw. ohne spezifische Angabe der Produktionsart. Hinsichtlich der Herstellungsart waren 16 Proben aus Rohmilch hergestellt, 40 Proben waren aus wärmebehandelter Milch (oder ohne Angaben zur Wärmebehandlung). Die Produkte aus Rohmilch stammten fast alle ($n = 12$) aus ökologischer Produktion, die Mehrzahl wurde über Direktvermarktung oder regionale Wochenmärkte vertrieben. Bei den Weichkäsen aus wärmebehandelter Milch stammten 9 aus ökologischer Produktion, 28 aus konventioneller Produktion, bei drei Produkten war eine eindeutige Zuordnung nicht möglich.

Im Hinblick auf die Kontamination mit coliformen Keimen wiesen vor allem Weichkäse aus Rohmilch sehr hohe Werte auf, aber auch einige Produkte aus wärmebehandelter Milch waren teilweise hoch kontaminiert (Tabelle 3.6). Bei Anwendung des Grenzwertes für coliforme Keime in Weichkäse aus wärmebehandelter Milch ($m = 10^4/g$, $M = 10^5/g$) wären 32,5% aller Proben als kritisch und immerhin 25% als nicht verkehrsfähig einzustufen gewesen. Die Maximalwerte von $2,5 \times 10^8$ Coliformen/g wurden für Proben eines hessischen Ziegenmilchbetriebes mit Direktvermarktung festgestellt. Vier der sechs Rohmilchweichkäse mit Werten für Coliforme über $10^6/g$ stammten aus ökologischer Produktion oder aus lokaler Direktvermarktung. Allerdings stammte auch die Mehrzahl der Proben mit Coliformenzahlen $<10/g$ aus ökologischer Produktion oder aus der Direktvermarktung. Bei den Weichkäsen aus wärmebehandelter Milch wurden ebenfalls die höchsten Werte für coliforme Keime in Produkten aus ökologischer Produktion und/oder aus Direktvermarktung festgestellt.

Tabelle 3.6: Verteilung der quantitativen Ergebnisse für *E. coli* (KbE/g) in Relation zur Keimzahl für coliforme Keime (KbE/g) sowie im Hinblick auf Angaben zur Wärmebehandlung* der verwendeten Käseemilch in Weichkäse (n = 56)

		<i>E. coli</i>					
		<10 ¹	10 ¹ -10 ²	10 ² -10 ³	10 ³ -10 ⁴	10 ⁴ -10 ⁵	10 ⁵ -10 ⁶
Coliforme Keime	<10 ¹	16 (14/1/1)	0	0	0	0	0
	10 ¹ -10 ²	2 (1/0/1)	1 (1/0/0)	0	0	0	0
	10 ² -10 ³	6 (5/1/0)	0	0	0	0	0
	10 ³ -10 ⁴	4 (1/2/1)	1 (1/0/0)	0	1 (1/0/0)	0	0
	10 ⁴ -10 ⁵	4 (2/2/0)	0	2 (1/1/0)	0	0	0
	10 ⁵ -10 ⁶	4 (3/1/0)	0	0	0	0	0
	10 ⁶ -10 ⁷	6 (4/2/0)	0	0	0	0	0
	10 ⁷ -10 ⁸	4 (1/3**/0)	1 (1/0/0)	1 (0/1/0)	1 (0/1/0)	1 (0/1/0)	1 (1/0/0)

* Die erste Zahl in jedem Feld kennzeichnet die Anzahl der positiven Proben mit der jeweiligen Keimzahl. Die Zahlen in Klammern beziehen sich auf die Anzahl der Proben hinsichtlich einer Wärmebehandlung der zur Herstellung verwendeten Milch (wärmebehandelt/aus Rohmilch/keine Angaben zur Wärmebehandlung).

** : Eine Probe war zudem mit *S. aureus* in kritischer Keimzahl (5×10^2 /g) kontaminiert.

Für Weichkäse aus Rohmilch ist eine Bewertung der Befunde für coliforme Keime schwierig, da keine Grenzwerte festgelegt sind und eine Belastung wohl produktionstechnisch häufig nicht ganz vermieden werden kann. Dennoch ist aus hygienischer Sicht und zur Vermeidung von Gesundheitsrisiken eine Keimzahl für Coliforme von unter 10^5 /g sicher erstrebenswert. Legt man diesen Wert einer Bewertung zugrunde, so wären mehr als die Hälfte der untersuchten Rohmilch-Weichkäse als hygienisch bedenklich einzustufen. Dies ist insofern von Bedeutung, da fast alle im Rahmen dieser Untersuchung eingekauften Weichkäse aus Rohmilch über Direktvermarktung (Hofläden, Bauermärkte etc.) vertrieben werden.

Besonders zwei Betriebe aus der Region Hessen fielen im Hinblick auf eine hohe Belastung mit coliformen Keimen auf, ein ökologisch wirtschaftender Betrieb (Rohmilchkäse) und ein konventioneller Betrieb (Käse aus wärmebehandelter Milch). Die Weichkäse dieser beiden Betriebe wiesen eine sehr hohe Kontamination mit coliformen Keimen von 10^7 - 10^8 /g auf. In Weichkäse des ökologisch wirtschaftenden Betriebes wurde zudem der einzig erhöhte Befund für *S. aureus* (530 KbE/g) ermittelt. Dieselben Betriebe stellen zudem Schnittkäse her, die ebenfalls deutliche hygienische Mängel aufwiesen.

3.1.3.2.3 Bewertung der Befunde für Weichkäse

Obwohl sich keine Hinweise auf das Vorhandensein pathogener Keime bzw. deren Toxine ergaben, sind die festgestellten, teilweise sehr hohen Werte für coliforme Keime ein Beleg dafür, dass in einzelnen Fällen Hygienemängel bei der Herstellung oder im Vertrieb dieser Produkte vorliegen. Unter den 25 Weichkäsen mit Zahlen für coliforme Keime unter 10^3 /g und Werten für *E. coli* unter 10^2 /g waren 8 Proben aus ökologischer Produktion und lediglich 5 aus Direktvermarktung. Auffällig durch hohe Zahlen für coliforme Keime waren hier vor allem ein größerer ökologisch wirtschaftender Betrieb sowie ein Kleinbetrieb, der zwar konventionell wirtschaftet, aber überwiegend Direktvermarktung betreibt.

3.1.3.3 Schnitt- und Hartkäse

Die dominierende Gruppe innerhalb der auf dem Markt befindlichen Ziegenmilchkäse aus regionaler Produktion ist den Schnittkäsen bzw. Hartkäsen zuzuordnen. Daher wurde für diese Gruppe die größte Probenzahl untersucht (n = 83). Die überwiegende Mehrzahl der Proben ist wohl den Schnittkäsen (fest, halbfest) zuzuordnen, echte Hartkäse waren eher die Ausnahme. Eine scharfe Abgrenzung beider Käsesorten war allerdings oft nicht möglich, so dass Schnitt- und Hartkäse zusammen erfasst wurden.

3.1.3.3.1 Pathogene Keime

Salmonellen und VTEC waren nicht nachweisbar, ebenso ergaben sich keine Hinweise auf *S. aureus*-Enterotoxine. In der Gruppe der Schnittkäse wurde in vier Fällen *L. monocytogenes* eindeutig nachgewiesen, in allen vier Fällen handelte es sich um halbfesten Schnittkäse. Zwei positive Proben stammten von einem hessischen Biobetrieb (Hofladen), gekauft im Abstand von 4 Wochen. Beide Proben wiesen eine moderat bzw. deutlich erhöhte Kontamination mit *E. coli* (10^2 und 10^4 /g) bzw. coliformen Keimen (10^2 und 10^4 /g) auf. Eine weitere Probe stammte von einem konventionell wirtschaftenden hessischen Ziegenkäsebetrieb (Wochenmarkt). In dieser Probe wurden gleichzeitig hohe Werte für *E. coli* (10^3 /g) bzw. coliforme Keime (10^6 /g) ermittelt. Bei der vierten positiven Probe handelte es sich um ein ökologisch hergestellten Importkäse (Niederlande). Auch diese Probe war hochgradig mit *E. coli* (10^7 /g) bzw. coliformen Keimen (10^7 /g) kontaminiert. Aufgrund dieser Befunde ist davon auszugehen, dass bei diesen vier Proben ein generelles Hygieneproblem bei der Käseherstellung vorlag. Tabelle 3.7 verdeutlicht den Zusammenhang zwischen *E. coli* und coliformen Keimen in Bezug auf den Nachweis von *L. monocytogenes*.

Zwar sind weitergehende Schlussfolgerungen sehr vorsichtig zu beurteilen, diese Befunde deuten jedoch darauf hin, dass für Schnittkäse aus Ziegenmilchbetrieben bei höheren Gehalten an *E. coli* bzw. coliformen Keimen - als generellen Indikatoren für mangelnde Hygiene - auch ein erhöhtes Risiko für eine Kontamination mit *L. monocytogenes* bestehen könnte.

Für *B. cereus* wurden Maximalwerte zwischen 100 und 270 KbE/g in 5 Proben festgestellt. Ein erhöhtes Gesundheitsrisiko (Toxinbildung) dürfte hierdurch nicht gegeben sein.

3.1.3.3.2 Hygienekeime

Rund die Hälfte der untersuchten Schnitt- und Hartkäse wies im Hinblick auf die untersuchten mikrobiologischen Parameter coliforme Keime, *E. coli* und *S. aureus* eine hohe Qualität auf. In 32 Proben (39%) wurde überhaupt kein positiver mikrobiologischer Befund erhoben, weitere 8 Proben (10%) waren geringgradig mit *E. coli* oder coliformen Keimen kontaminiert. In Bezug auf diese Ergebnisse erscheint es bei guter Hygiene möglich, im Hinblick auf die hygienische Qualitätssicherung deutlich bessere Werte als gesetzlich gefordert zu erreichen. Bereits bei der Milchgewinnung können Kontaminationen mit diesen Keimen bei sachgemäßer Vorgehensweise vermieden werden (Schnellhardt et al., 1997; Schnellhardt, 1999).

In den eigenen Untersuchungen wiesen jedoch 15 Proben (18%) eine Kontamination mit coliformen Keimen von über 10^4 /g auf, mit Maximalwerten bis 10^7 /g. In den am höchsten kontaminierten Proben dominierte zudem quantitativ zumeist *E. coli*.

Ein tendenzieller Zusammenhang zwischen der Kontaminationshöhe mit Hygienekeimen und einer Herstellung des Käses aus Rohmilch oder wärmebehandelter Milch wurde festgestellt. Beide Gruppen waren in der vorliegenden Untersuchung etwa gleichstark vertreten (Rohmilchkäse: n = 36; Käse aus wärmebehandelter Milch: n = 38; keine Angaben: n = 9). Allerdings ist hier anzumerken, dass in 9 Fällen (Wochenmärkte) keine als zuverlässig zu wertenden Angaben zur Wärmebehandlung vorlagen. Unter den nicht oder nur gering mit *E. coli* ($<10^1$ /g) und coliformen Keimen ($<10^2$ /g) kontaminierten Käsen befanden sich 13 Käse aus Rohmilch und 18 Käse aus wärmebehandelter Milch. In den höher mit *E. coli* ($>10^3$ /g) und/oder coliformen Keimen ($>10^4$ /g) kontaminierten Käsen (n = 17) befanden sich 10 Käse aus Rohmilch und 7 Käse aus wärmebehandelter Milch.

Eine Einzelbetrachtung beider Parameter zeigte für *E. coli* einen Zusammenhang mit der Herstellung aus Rohmilch. Acht der zehn am höchsten mit *E. coli* belasteten ($>10^3/g$) Schnittkäse waren aus Rohmilch hergestellt. Dagegen waren unter den 26 am höchsten ($>10^3/g$) mit coliformen Keimen belasteten Proben 14 Käse aus Rohmilch und 12 Proben aus wärmebehandelter Milch, also keine wesentlichen Unterschiede.

Tabelle 3.7: Verteilung der quantitativen Ergebnisse für *E. coli* (KbE/g) in Relation zur quantitativen Keimzahl für coliforme Keime (KbE/g) sowie im Hinblick auf den Nachweis von *L. monocytogenes* in Schnitt- und Hartkäsen (n = 83)

		<i>E. coli</i>						
		$<10^1$	10^1-10^2	10^2-10^3	10^3-10^4	10^4-10^5	10^5-10^6	10^6-10^7
Coliforme Keime	$<10^1$	32	0	0	0	0	0	0
	10^1-10^2	6	2	1	0	0	0	0
	10^2-10^3	10	4	2	0	0	0	0
	10^3-10^4	5	2	1	3	0	0	0
	10^4-10^5	5	0	0	1	3	0	0
	10^5-10^6	2	0	0	1	0	1*	0
	10^6-10^7	0	1	0	0	0	0	1

Zahlen mit Fettdruck: jeweils **ein** positiver Befund für *Listeria monocytogenes* in dieser Gruppe

*: Diese Probe wies gleichzeitig erhöhte Kontamination mit *S. aureus* auf ($9 \times 10^5/g$), Hinweise auf Toxinbildung ergaben sich jedoch nicht.

Festzustellen ist schließlich, dass fünf der sechs am höchsten mit *E. coli* bzw. coliformen Keimen belasteten Schnittkäse aus regionalen Hofläden bzw. aus Direktvermarktung bezogen wurden.

Die festgestellten Keimzahlen für *S. aureus* lagen mit einer Ausnahme bei $<10^1$ /g. Lediglich in einer Probe (Schnittkäse aus wärmebehandelter Milch; ab Hof-Verkauf, konventionelle Herstellung) wurden 9×10^5 *S. aureus* pro Gramm festgestellt, Hinweise auf Enterotoxinbildung ergaben sich aber nicht. Diese Probe wies gleichzeitig stark erhöhte Gehalte an *E. coli* und coliformen Keimen auf (10^6 /g), so dass von deutlichen Hygienemängeln bei der Herstellung auszugehen ist.

3.1.3.3.3 Bewertung der Befunde

Schnittkäse stellen mengenmäßig die bedeutendste Gruppe innerhalb der Ziegenkäse dar, vor allem dominieren sie die Produktion direktvermarktender regionaler hessischer Betriebe. Während eine Reihe dieser regionalen Betriebe mikrobiologisch einwandfreie Produkte verkauften, fielen hinsichtlich einer Kontamination mit Hygienkeimen vier Betriebe auf, in deren Produkten hohe Werte für *E. coli* und coliforme Keime ermittelt wurden. In Käse aus zweien dieser Betriebe wurden zudem *L. monocytogenes* isoliert. Diese beiden Betriebe (einer ökologisch, einer konventionell wirtschaftend) waren auch bei anderen Käsegruppen auffällig (siehe Weichkäse).

3.1.4 Gesamtbewertung der Ergebnisse, Schlussfolgerungen und Empfehlungen für ein ganzheitliches Untersuchungssystem

Die in den vorhergehenden Abschnitten erläuterten Ergebnisse zeigen, dass hinsichtlich des mikrobiologischen Status von Ziegenkäse eine differenzierende Betrachtungsweise erforderlich ist.

Das Gefährdungspotential durch eine Kontamination mit Salmonellen scheint sehr gering zu sein. Ähnliche Ergebnisse berichten Schope und Schüppel (1997) für einen einzelnen Ziegenmilchbetrieb sowie Coenen (1999) in einer teilweise vergleichbaren Untersuchung an Kuhmilchkäse aus Direktvermarktung. Die in den eigenen Untersuchungen festgestellte

Abwesenheit von Salmonellen sowohl in Ziegenkäse aus regionaler Direktvermarktung als auch in Importprodukten läßt auf eine sehr geringe Gesamt-Inzidenz schließen.

B. cereus wurde insgesamt in 25 (14%) der Käseproben in Keimzahlen über 10^1 /g nachgewiesen. Die Verteilung der positiven Befunde auf die verschiedenen Käsesorten (Frischkäse 14%, Weichkäse 14%, Schnittkäse 13%) war praktisch identisch. Der Maximalwert lagen bei 270 KbE/g. In 19 Proben lag die Kontamination zwischen 10 und 100 KbE/g, Werte über 100 *B. cereus* pro Gramm (Bereich: 100-270) wurden in 5 Schnittkäsen und in einem Weichkäse festgestellt. Das Risiko durch *B. cereus* ist aufgrund der vorliegenden Befunde als eher gering einzustufen, da kritische Werte (Toxinbildung) bei mindestens 10^6 KbE/g liegen und eine Vermehrung von *B. cereus* auf diese Werte nur bei nicht ordnungsgemäßer Lagerung möglich sein dürfte.

S. aureus wurde im Vergleich zu ähnlichen Untersuchungen an Kuhmilch nur selten (1 Weichkäse, 1 Schnittkäse) nachgewiesen. Dies deckt sich aber mit den Befunden von Schwöpe und Schüppel (1997), die in Ziegenkäseproben (n = 43) eines Betriebes ebenfalls keine positiven Befunde für *S. aureus* ermittelten. Kritisch war in den eigenen Untersuchungen lediglich ein positiver Schnittkäse ($8,6 \times 10^5$ *S. aureus*/g), der zudem gleichzeitig stark mit *E. coli* und coliformen Keimen belastet war. Trotz dieser Befunde wurden alle Proben auf Thermonuclease als Marker für Enterotoxin-Produktion überprüft. In keinem Fall ergaben sich Hinweise auf *S. aureus*-Enterotoxine.

L. monocytogenes wurde nur in Schnittkäsen nachgewiesen, hier allerdings in vier Proben. Bei einer Probe handelte es sich um ein Importprodukt aus den Niederlanden. Die drei anderen positiven Proben stammten von zwei hessischen Betrieben. Erwähnenswert ist hierbei, dass beide Betriebe auch im Hinblick auf Hygienekeime (*E. coli*, Coliforme) als sehr problematisch einzustufen waren. Einer der Betriebe ist ein ökologisch wirtschaftender und Direktvermarktung betreibender Hof. Diese Befunde zeigen, dass hier ein Gesundheitsrisiko besteht, das allerdings sehr Hersteller-spezifisch ist. Eine durchaus vergleichbare Situation wurde für Schnitt- und Hartkäse aus Kuhmilch (Direktvermarktung) (Coenen, 1999) bzw. in Schaf- und Ziegenmilch (Schnellhardt et al., 1997) beobachtet.

Eine Kontamination von Käse mit *L. monocytogenes* ist nach wie vor weit verbreitet. Die in dieser Studie gefundene Häufigkeit von 4,8% in Schnittkäsen liegt im Vergleich zu denen anderer Untersucher im mittleren Bereich (Rudolf und Scherer, 2001). Die Tatsache, dass in Weichkäsen *L. monocytogenes* nicht nachweisbar war, hängt vermutlich auch damit zusammen, dass innerhalb dieser Käseart vor allem Edelschmelzkäse überwiegen, weniger die stärker gefährdeten Rotschmierekäse.

Hinweise auf eine Kontamination mit verotoxinbildenden *E. coli* ergaben sich in keiner Probe, obwohl das hierzu verwendete Untersuchungsverfahren einer intensiven Validierung unterzogen wurde. In Käse aus Kuhmilch liegt die Inzidenz bei 0-2%, intensive Untersuchungen von Coenen (1999) ergaben für Kuhmilch und daraus hergestellte Produkte aus direktvermarktenden Betrieben in 1,4% der Fälle positive VTEC-Befunde. Da in den eigenen Untersuchungen festgestellt wurde, dass ein hoher Anteil der auf dem Markt befindlichen Ziegen-Weichkäse aus Rohmilch hergestellt wird, kann trotz der vorliegenden Befunde das Risiko einer vereinzelt Kontamination nicht generell ausgeschlossen werden. In diesem Zusammenhang sind auch die teilweise aus Rohmilch hergestellten Frischkäse nicht risikofrei.

Im Hinblick auf Hygienekeime (*E. coli*, coliforme Keime) ergab sich für Frischkäse aus Ziegenmilch ein insgesamt erfreuliches Bild. Lediglich zwei Proben wiesen erhöhte Gehalte auf. Eine Probe (ab Hof) wies Coliforme im Bereich 10^4 /g auf, eine weitere (Frankreich) 10^3 /g, wobei das Keimspektrum in letzterer von *E. coli* dominiert wurde. Damit waren die Hygieneparameter weitaus besser erfüllt als für Kuhmilch-Frischkäse aus Direktvermarktung (25% Coliforme $>10^4$ /g und *E. coli* $>10^3$ /g), wie von Coenen (1999) berichtet.

Völlig anders sah es bei Weichkäse aus. Nur 16 Proben waren im Hinblick auf eine Kontamination mit coliformen Keimen negativ, 25 Proben (45%) überschritten einen Wert von 10^4 /g, und 19 Proben (34%) überschritten einen Wert von 10^5 /g. In einigen Proben lag die Belastung mit coliformen Keimen sogar bis zu 10^8 /g. Die Befunde für *E. coli* lagen etwas niedriger, aber auch hier wurden recht häufig hohe Kontaminationen nachgewiesen. Damit weist ein hoher Prozentsatz der Weichkäse schwere Hygienemängel auf. Diese Befunde decken sich weitgehend mit denjenigen von Coenen (1999) für Kuhmilch-Weichkäse, sind

also kein spezifisches Problem von Ziegenkäse. Darüberhinaus ist diese hohe Belastung unabhängig von ökologischer oder konventioneller Herstellung und wurde gleichermaßen für regionale Produkte als auch für Importprodukte festgestellt.

Hohe Belastungen mit coliformen Keimen wurden insbesondere in Rohmilchprodukten festgestellt. Zwar ist für Rohmilchweichkäse kein spezifischer Höchstwert für coliforme Keime festgelegt, eine Kontamination von über 10^4 /g kann jedoch aus der Sicht des Verbrauchers nicht als akzeptabel angesehen werden. Zudem demonstrieren die negativen Befunde in einigen Proben, dass eine Herstellung von Rohmilchweichkäse nicht zwangsläufig mit hohen Keimzahlen verbunden sein muss.

Im Hinblick auf regional hergestellte Produkte war auffällig, dass wiederum die zwei Betriebe die stärksten Hygienemängel aufwiesen, in deren Produkten auch *Listeria monocytogenes* nachgewiesen worden war.

In Schnittkäsen waren die Befunde im Hinblick auf *E. coli* und Coliforme etwas günstiger, aber auch hier wurden in 13 Proben (16%) erhöhte Werte festgestellt. Auch hier sind die Ergebnisse qualitativ und quantitativ vergleichbar mit Untersuchungen für Kuhmilchkäse aus Direktvermarktung.

Im Vergleich regionaler hessischer Ziegenkäse mit Importwaren - hier sind vor allem Frankreich und die Niederlande zu nennen - sind die einheimische Produkte hinsichtlich ihrer mikrobiologischen Qualität in den meisten Fällen vergleichbar. Für die Produkte einiger weniger einheimischer Betriebe wurden jedoch eklatante Hygienemängel festgestellt. Bezogen auf Weichkäse ist die Zahl der Betriebe mit Hygienemängeln deutlich höher.

In der Region Hessen wird staatlicherseits im Hinblick auf die gesundheitliche Unbedenklichkeit von Ziegen und Produkten aus Direktvermarktung stark auf betriebliche Eigenkontrollen gesetzt (Kloppert, 2000). Dieses System scheint aufgrund der festgestellten Ergebnisse auch oft zu funktionieren. Dennoch erscheinen Verbesserungen im Kontrollsystem angezeigt, um insbesondere Problembetriebe mit schlechter Herstellungspraxis schneller erfassen zu können. Eine Erhöhung der Kontrollfrequenz der direktvermarktenden

Ziegenmilchbetriebe wäre offensichtlich wünschenswert. Problematisch dürfte die Finanzierung und Durchsetzung intensiverer Kontrolluntersuchungen im Rahmen der betrieblichen Eigenkontrolle sein, da es sich bei der Mehrzahl der Betriebe um Klein- und Kleinstbetriebe mit einer verarbeiteten Milchmenge von deutlich unter 500 Litern handelt.

Eine ständige Überprüfung der Eutergesundheit der Ziegen im Bestand oder eine regelmäßige Überprüfung der aeroben mesophilen Gesamtkeimzahl der Bestandsmilch (Kloppert et al., 1997) würde vermutlich bereits eine Verbesserung der Hygienesituation erbringen, ist aber nicht ausreichend für eine Beurteilung der mikrobiologischen Qualität des aus der Milch hergestellten Käses, da die Keimbelastung überwiegend durch Lagerung und Verarbeitung bedingt sein dürfte.

Im Hinblick auf Kosteneffizienz könnte bereits eine intensivere Kontrolle einfacher Hygieneparameter, insbesondere auf coliforme Keime, von Nutzen sein. Es hat sich in den eigenen Untersuchungen gezeigt, dass dieser Parameter geeignet sein könnte, um Problembetriebe leichter zu indentifizieren, beispielsweise hinsichtlich einer Kontamination mit *Listeria monocytogenes*.

Sinnvoll wäre die laufende Kontrolle jeder einzelnen Produktionscharge zumindest auf coliforme Keime. Bei festgestellten Keimzahlen in Weichkäse und Schnittkäse von über $10^3/g$ bzw. über $10^2/g$ in Frischkäse sollten unbedingt Maßnahmen zur Überprüfung der Herstellungspraxis ergriffen werden bzw. eine Beratung durch Fachkräfte hinzugezogen werden.

Unabhängig von konkreten Problemen ist eine regelmäßige Kontrolle auf pathogene Keime angezeigt. Zur Frequenz betrieblicher Eigenkontrollen auf pathogene Keime oder Hygienekeime bei direktvermarktenden Betrieben gibt es derzeit keine klar definierten Vorgaben. Für Kuhmilch greift zumindest die Milchgüte-Verordnung als Minimalstandard auch bei Direktvermarktern (Hahn et al., 1999a, 1999b), obwohl auch dies nicht als ausreichend angesehen wurde. Die meisten Ziegenmilchbetriebe liefern jedoch nicht an Molkereien, die Milch wird somit routinemäßig nicht von einer Untersuchungsstelle erfasst. Auch sind nicht alle Betriebe in Milchleistungskontrollen eingebunden, falls ja, werden oft

nicht alle Tiere eines Betriebes erfasst. Diese Situation kann nach unseren Erfahrungen dazu führen, dass vor allem kleinere Betriebe Stichprobenuntersuchungen nur sehr sporadisch durchführen. Hier ist eine Erhöhung der Untersuchungsfrequenz mit klarer Vorgabe der zu untersuchenden Parameter wünschenswert. Insbesondere scheint eine möglichst durchgehende Kontrolle jeder Charge auf coliforme Keime zur Früherkennung von Hygienemängeln sinnvoll. Darüberhinaus erscheint im Hinblick auf die zunehmende Bedeutung von Direktvermarktungssystemen der Aufbau von spezifischen Qualitätsüberwachungsstellen sinnvoll und notwendig. Da eine derartige Organisation *de facto* aber nicht von den Erzeugern finanziert werden kann, ist die Etablierung derartiger Einrichtungen zur Verbesserung der Produktsicherheit vermutlich nur über staatliche Unterstützungsmaßnahmen realisierbar.

Zusammenfassend zeigen die Untersuchungsergebnisse, dass Ziegenkäse aus Direktvermarktung (ökologisch oder konventionell) in der Region Hessen hinsichtlich Gesundheitsrisiken durch pathogene Keime kein deutlich über dem für vergleichbare Produkte liegendes Problem darstellt. Für Ziegenkäse aus einigen Betrieben wurden jedoch deutliche Hygienemängel festgestellt. Hier sind Maßnahmen zur Verbesserung der Situation, insbesondere durch intensivere Kontrolluntersuchungen angezeigt.

3.2 Authentizität von Ziegenmilchprodukten

3.2.1 DNA-Extraktion

Zur Extraktion von DNA aus Milch und Käse erwies sich die Extraktionsmethode unter Verwendung des NET-Puffers als am besten geeignet. Als optimale Probenvolumina wurden 600 µl (Milch) bzw. 500 µl (homogenisierter Käse) ermittelt. Diese Methode wurde daher im folgenden weiter verwendet.

3.2.2 PCR-Methoden auf Basis universeller Primer

3.2.2.1 Amplifizierung des mitochondrialen tRNA (mt-tRNA)-Gens

Nach Amplifizierung des mt-tRNA-Gens mit den universellen Primern nach Maudet und Taberlet (2001) konnte zwar in allen 100 % reinen Probenmaterialien (Kuhmilch, Kuhkäse und Ziegenmilch) die entsprechenden spezifischen Banden (Ziege 987 Bp, Kuh 724 Bp) gelelektrophoretisch nachgewiesen werden, allerdings wurden bei Untersuchung künstlich kontaminierter Ziegenmilchproben (n = 26) bzw. Ziegenkäseproben (n = 27) die Rind-spezifischen Amplifikate mit einer Größe von 724 Bp in lediglich 38 % bzw. 51 % der Versuche nachgewiesen. Diese Methodik wurde daher nicht weiter verfolgt.

3.2.2.2 Amplifizierung des mt-*cytb*-Gens

Nach Verwendung der universellen Primer 1 und 2 nach Zehner et al. (1998) konnte das mt-*cytb*-Gen aus allen untersuchten reinen Kuh- und Ziegenmilchproben sowie aus allen künstlich kontaminierten Proben (n = 15) mittels PCR amplifiziert werden. Das Amplikon wies jeweils eine Größe von 921 Basenpaaren auf und entsprach damit der von Zehner et al. (1998) beschriebenen Größe. Bei einigen künstlich kontaminierten Proben zeigten sich jedoch zusätzliche unspezifische Banden, so dass diese Methode im weiteren nicht eingesetzt wurde.

Mittels der universellen Primer L14841 und H15149 nach Meyer et al. (1995) konnte das mt-*cytb*-Gen aus allen untersuchten reinen Milchproben von Kühen bzw. Ziegen sowie aus

Kuhkäse amplifiziert werden. Das Amplikon wies jeweils die von Meyer et al. (1995) beschriebene einheitliche Größe von 359 Bp auf (Abbildung 3.1). Im folgenden wurde daher diese PCR-Methode als Standardverfahren zur Überprüfung einer erfolgreichen DNA-Extraktion verwendet.

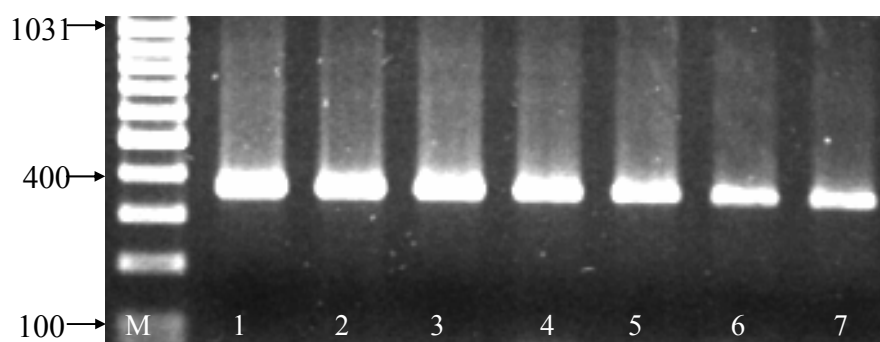


Abbildung 3.1: Typische Amplikons (359 Bp) des *mt-cytb*-Gens aus Kuhmilch (1 - 3) und Ziegenmilch (4 -7) nach Verwendung der Primer L14841 und H15149 in der PCR. (M = Marker, 100 Bp)

3.2.2.4 Restriktionsverdau des *mt-cytb*-Genamplifikats

3.2.2.4.1 Auswahl geeigneter Restriktionsenzyme

Die in den Vorversuchen als optimal ermittelten Enzyme und daraus resultierende Größen der Restriktionsfragmente des nach Meyer et al. (1995) amplifizierten *mt-cytb*-Gens sind in Tabelle 3.8 aufgeführt.

Tabelle 3.8: Mittels Clone Manager 4.0 errechnete Größen der Restriktionsfragmente des amplifizierten mt-*cytb*-Gens (359 Bp) aus Milch von *Bos taurus* (Kuh) und *Capra ssp.* (Ziege) sowie von weiteren Tierarten nach simuliertem Restriktionsverdau mit *BsuRI* (*HaeIII*), *HinfI*, *SspI*, *Tru9I*, *TasI*, sowie *Bsh1236I*.

Amplifizierte Sequenz von der Spezies	Errechnete Fragmentgrößen der Amplikons (359 bp) nach Restriktionsenzymverdau mit					
	<i>HaeIII</i>	<i>HinfI</i>	<i>SspI</i>	<i>Tru9I</i>	<i>TspEI (TasI)</i>	<i>Bsh1236I</i>
Kuh (AF 419237*)	285	198	247		336	
	74	117 44	87	–	23	–
Ziege (AB 004069*)	230	198	196		210	294
	74	161	163	–	106	65
	55				43	
Büffel (D82893*)	286		195		120	
	73	–	164	–	108	–
					79	
Schaf (AB006800*)	159	198	188	307	198	
	126	161	162	51	108	–
	74		8		52	
Stute (X79547*)	159	234		211		229
	105	81	196	82	199	130
	73	44	163	66	160	
	22					
Kamel (U06426*)		199	351	211	225	229
	–	160	8	97	82	130
				51	52	

* Zugangsnummer der Gendatenbank NCBI, – = kein Restriktionsmuster

3.2.2.4.2 Verdau mit Restriktionsenzymen

Nach PCR-Amplifizierung des bovinen bzw. caprinen mt-*cytb*-Gens nach Meyer et al. (1995) (2.2.2.3) aus reiner Ziegenmilch und Kuhmilch, Milch weiterer Tierarten bzw. Kuhkäse und anschließendem Restriktionsverdau mit den Enzymen *Hae*III, *Hinf*I, *Ssp*I, *Tru*9I, *Tas*I bzw. *Bsh*1236I konnten die errechneten Fragmentgrößen jeweils in der Gelelektrophorese bestätigt werden. Sie entsprachen jeweils den in Tabelle 3.8 aufgeführten Werten. Nach Restriktionsverdau der PCR-Amplifikate von Milchproben verschiedener Ziegen- bzw. Kuhrassen konnten ebenfalls die erwarteten spezifischen Muster gelelektrophoretisch bestätigt werden (Abbildung 3.2 und 3.3).

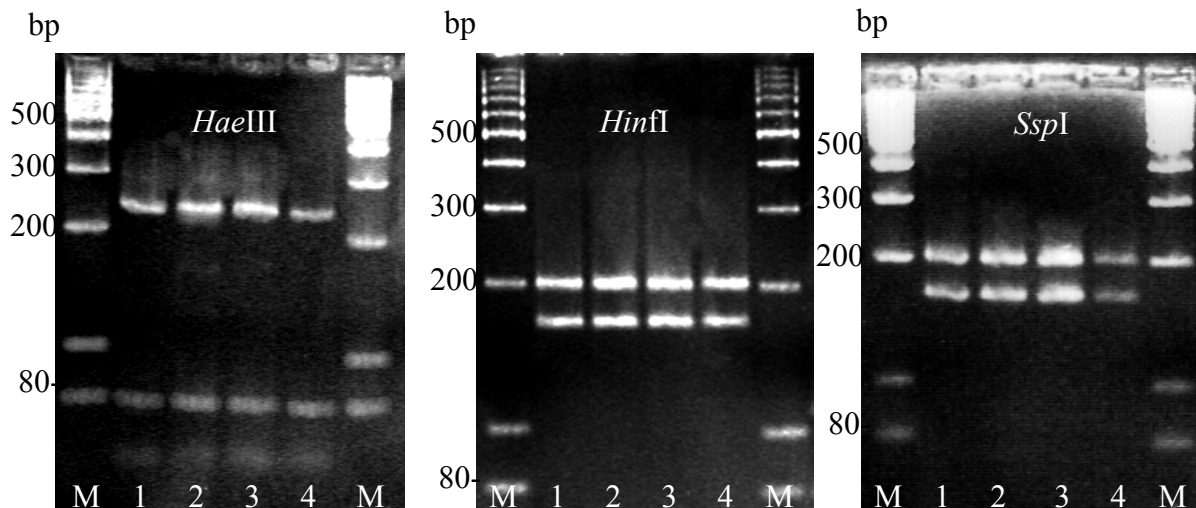


Abbildung 3.2: Typische Restriktionsmuster der PCR-Produkte des mt-*cytb*-Gens (359 bp) aus Milchproben verschiedener Ziegenrassen nach Verdau mit den Enzymen *Hae*III, *Hinf*I, bzw. *Ssp*I. Milchproben von Bunter Deutscher Edelziege (1), Thüringerwaldziege (2), Weißer Deutscher Edelziege (3) sowie Walliser Schwarzhalsziege (4). (M = Marker, 100 Bp)

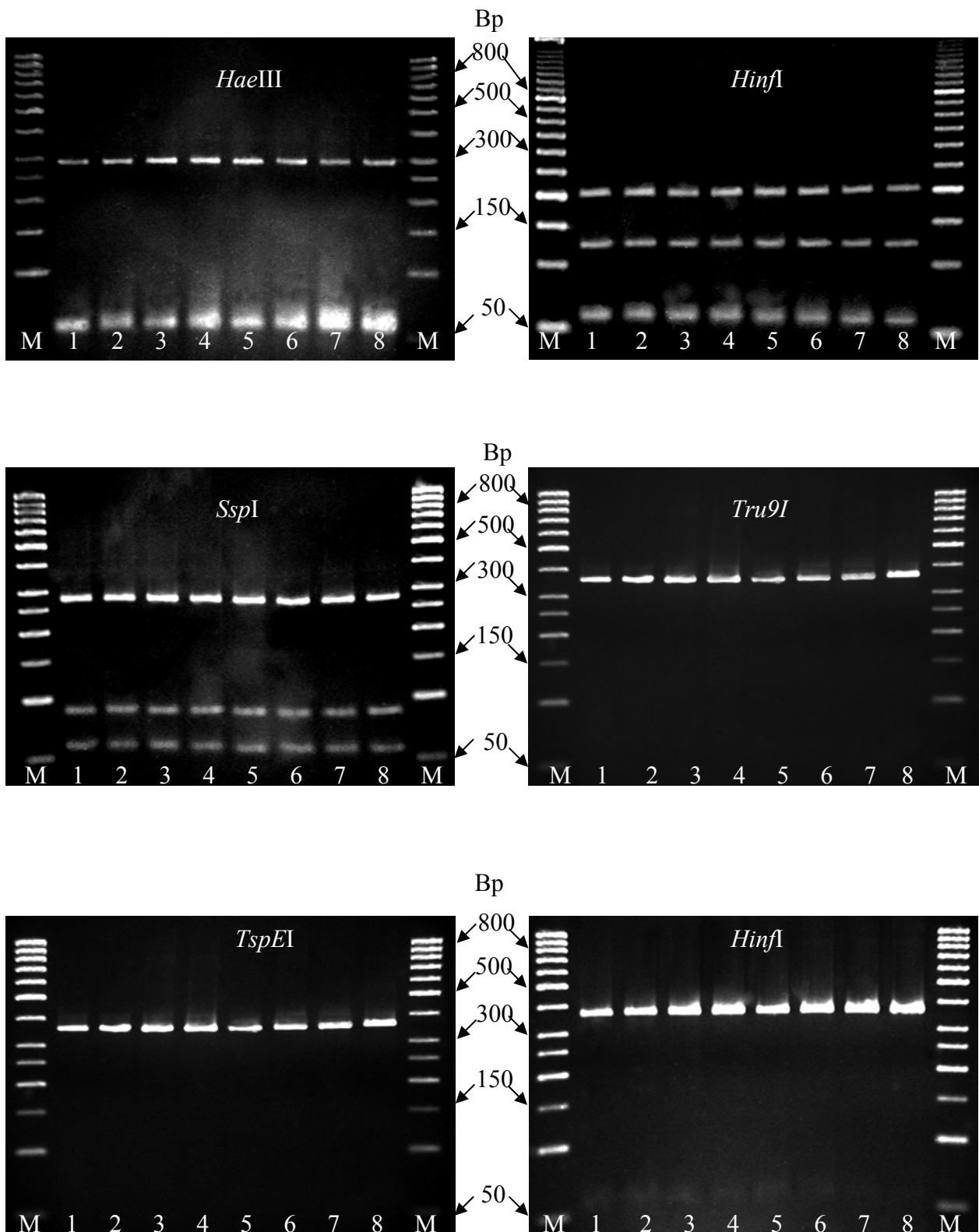


Abbildung 3.3: Typische Restriktionsmuster der PCR-Produkte des *mt-cytb*-Gens (359 bp) aus Milchproben verschiedener Kuhrassen nach Verdau mit den Enzymen *HaeIII*, *HinfI*, *SspI*, *Tru9I*, *TspEI* (*TasI*) bzw. *Bsh1236I*. Milchproben von Schwarzbunter (1), Rotbunter (2), Braunvieh (3) Fleckvieh (4), Hinterwandler (5), Rotvieh (6), Limousin (7) und Jersey (8). (M = Marker, 50 Bp)

Nach der PCR-Amplifizierung des mt-*cytb*-Gens aus künstlich kontaminierten Ziegenmilch- und Ziegenkäseproben und anschließendem Restriktionsverdau konnten allerdings in 19 von 20 Versuchen lediglich die für die Tierart Ziege charakteristischen Fragmente gelelektrophoretisch nachgewiesen werden. Daher wurden Untersuchungen zum Nachweis von Kuhmilch im folgenden über speziesspezifische Primer durchgeführt.

3.2.3 PCR-Methoden auf Basis speziesspezifischer Primer

3.2.3.1 Amplifizierung eines Rind-spezifischen Abschnitts des mt-tRNA-Gens

Nach Amplifizierung des mt-tRNA-Gens mit dem speziesspezifischen Primerpaar nach Maudet und Taberlet (2001) wurden in 31 von 34 Kuhmilchproben sowie in 7 von 7 Kuhkäseproben die für Rind spezifischen Amplifikate mit einer Größe von 357 Bp gelelektrophoretisch nachgewiesen. Allerdings reagierten auch zwei von 10 Ziegenmilchproben positiv. In 31 künstlich kontaminierten Ziegenmilch- und in 20 künstlich kontaminierten Ziegenkäseproben ergaben 12 bzw. 16 Proben falsch-negative Ergebnisse. Dieses Verfahren wurde daher nicht weiter eingesetzt.

3.2.3.2 Amplifizierung eines Rind-spezifischen Abschnitts des mt-*cytb*-Gens

Aus allen reinen Kuhmilch- und Kuhkäseproben konnten nach Amplifizierung nach Herman (2001) Rind-spezifische DNA-Amplifikate mit einer Größe von 286 Bp mittels Gelelektrophorese nachgewiesen werden. Allerdings konnten nur in 21 von 43 untersuchten Proben künstlich kontaminierter Ziegenmilch bzw. in 14 von 27 untersuchten Proben künstlich kontaminierten Ziegenkäses die Rind-spezifischen Amplifikate nachgewiesen werden. Fünf von 25 reinen Ziegenmilchproben reagierten falsch-positiv, d.h. nach Gelelektrophorese waren typische Banden von 286 Bp sichtbar. Somit erwies sich auch dieses Verfahren für die praktische Anwendung als ungeeignet.

Nach Verwendung der Rind-spezifischen Primer L 4814 und H 5092 nach Bottero et al. (2002) in der PCR konnten aus allen untersuchten reinen Kuhmilch- und -käseproben die erwarteten Rind-spezifischen Amplifikate mit der Größe von 279 Basenpaaren mittels Gelelektrophorese nachgewiesen werden (Abbildung 3.4, Reihe 1 und 2). Die Untersuchung von Milch verschiedener Kuhrassen ergab ebenfalls jeweils positive Resultate (Abbildung 3.5). Die jeweils als Negativkontrolle mitgeführten Milchproben aus reiner Ziegenmilch (Abbildung 2.7, Reihe 3 und 4) sowie Milchproben anderer Tierarten (2.2.4.1) ergaben in allen Versuchen negative Ergebnisse.

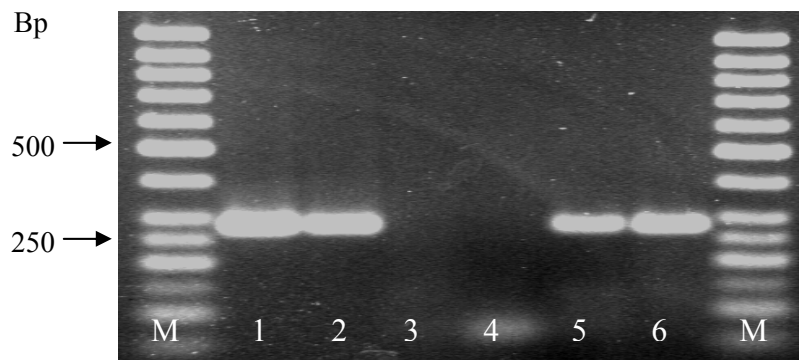


Abbildung 3.4: Typische Amplikons des *mt-cytb*-Gens (279 Bp) aus Kuhkäse (1, 2), Ziegenmilch (3,4) und künstlich kontaminiertem Ziegenkäse (1 % bzw. 20 % Kuhmilch-Anteil) (5, 6) nach PCR mit Verwendung der Rind-spezifischen Primer nach Bottero et al. (2002). (M = Marker, 50 bp)

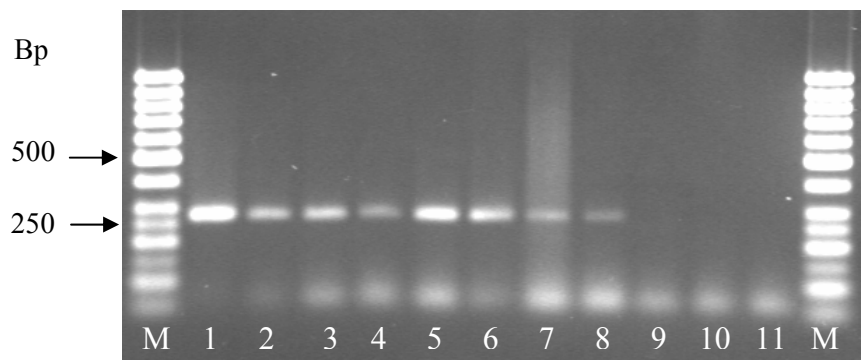


Abbildung 3.5: Rind-spezifische Amplikons nach Untersuchung von Milch verschiedener Kuhrassen mittels PCR nach Bottero et al. (2002). Rotvieh (1), Braunvieh (2), Fleckvieh (3), Deutsche Rotbunte (4), Deutsche Schwarzbunte (5), Limousin (6), Hinterwäldler (7) und Jersey (8) (9, 10, 11 = Negativkontrolle). (M = Marker, 50 bp)

Die Untersuchung künstlich kontaminierter Ziegenmilch und Ziegenkäse ergab die in den Tabellen 3.9 und 3.10 aufgeführten Ergebnisse (siehe auch Abbildung 3.6 und 3.7).

Die Methode erwies sich somit sowohl als hochspezifisch als auch hochsensitiv. Die praktisch erreichbare Nachweisgrenze liegt bei 1 % Kuhmilchanteil in Ziegenmilch bzw. Ziegenkäse. Diese Methode wurde daher im weiteren zur Untersuchung von Handelsproben eingesetzt.

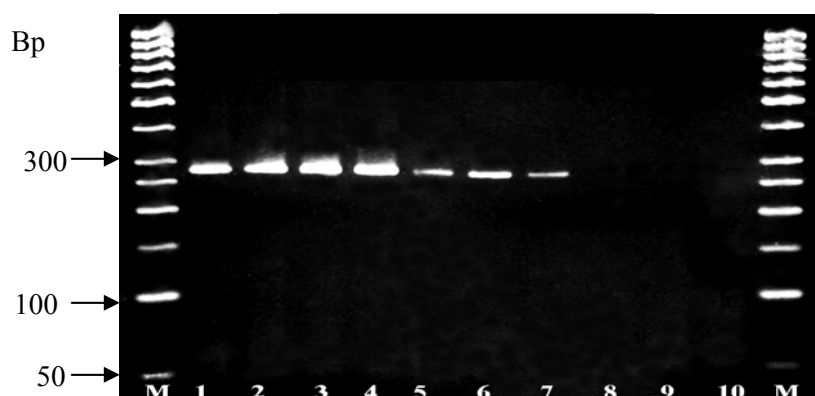


Abbildung 3.6: Beispiel für die Ermittlung der Nachweisgrenze der PCR-Methode nach Bottero et al. (2002). Rind-spezifische Amplikons (279 Bp) nach Untersuchung von mit Kuhmilch kontaminierter Ziegenmilch; Kuhmilchzusatz: 10 % (1), 8 % (2); 6 % (3); 4 % (4); 1 % (5); 0,5 % (6); 0,1 % (7); 0,05 % (8); 0,01 % (9) bzw. 0,005 % (10). (M = Marker, 50 bp)

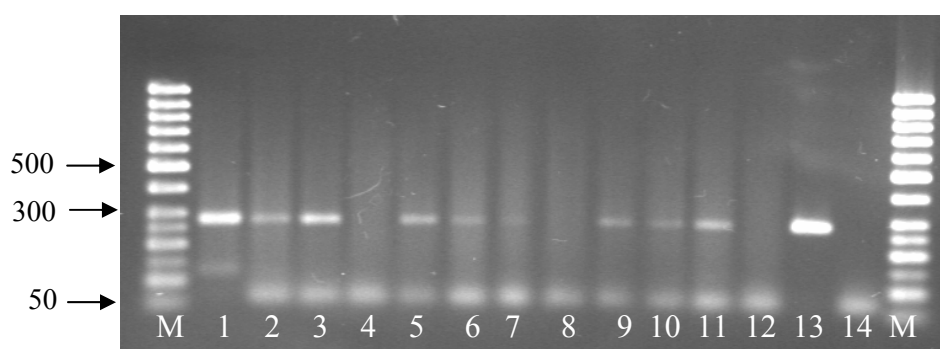


Abbildung 3.7: Beispiel für die Ermittlung der Nachweisgrenze der PCR-Methode nach Bottero et al. (2002). Rind-spezifische Amplikons nach Untersuchung von künstlich kontaminierten Ziegenkäsen mit unterschiedlichem Kuhmilchanteil : 10 % (1, 5, 9); 1 % (2, 6, 10); 0,5 % (3, 7, 11) und 0,01 % Kuhmilchanteil (4, 8, 12); Positivkontrolle: reine Kuhmilch (13); Negativkontrolle (14). (M = Marker, 50 bp)

Tabelle 3.9: Nachweis von Rind-spezifischen Amplifikaten nach Untersuchung von künstlich kontaminierten Ziegenmilchproben

Kuhmilchanteil in Ziegenmilch	n	Nachweis Rind-spezifischer Amplifikate	
		positiv (n)	negativ (n)
50 %	2	2	0
40 %	2	2	0
30 %	2	2	0
20 %	2	2	0
15 %	2	2	0
10 %	8	8	0
8 %	6	6	0
6 %	6	6	0
4 %	6	6	0
2 %	8	7	1
1 %	8	8	0
0,5 %	8	6	2
0,1 %	8	5	3
0,05 %	8	2	6
0,01 %	6	0	6
0,005 %	2	0	2

Tabelle 3.10: Nachweis von Rind-spezifischen Amplifikaten nach Untersuchung von künstlich kontaminierten Ziegenkäseproben

Kuhmilchanteil in Käse	n	Nachweis Rind-spezifischer Amplifikate	
		positiv (n)	negativ (n)
30 %	3	3	0
20 %	2	2	0
15 %	3	3	0
10 %	16	16	0
8 %	3	3	0
6 %	3	3	0
5 %	12	11	1
4 %	3	3	0
2 %	13	13	0
1 %	19	18	1
0,5 %	12	8	4
0,1 %	8	2	6
0,05 %	6	0	6

3.2.3.2.1 Untersuchung der Primerspezifität anhand des Verdauers mit Restriktionsenzymen

Der zur zusätzlichen Absicherung durchgeführte Restriktionsverdau der Amplifikate (279 Bp) nach Bottero et al. (2002) aus reinen Kuhmilch- und Kuhkäseproben sowie künstlich kontaminierten Ziegenproben mit den Enzymen *HaeIII*, *TasI*, *HphI* bzw. *MboI* ergab jeweils Rind-spezifische Muster. Ziegen-typische Schnittmuster waren nicht nachweisbar. In Abbildung 3.8 sind die typischen Schnittmuster der Amplifikate nach Verdau mit *HphI* bzw. *TasI* dargestellt.

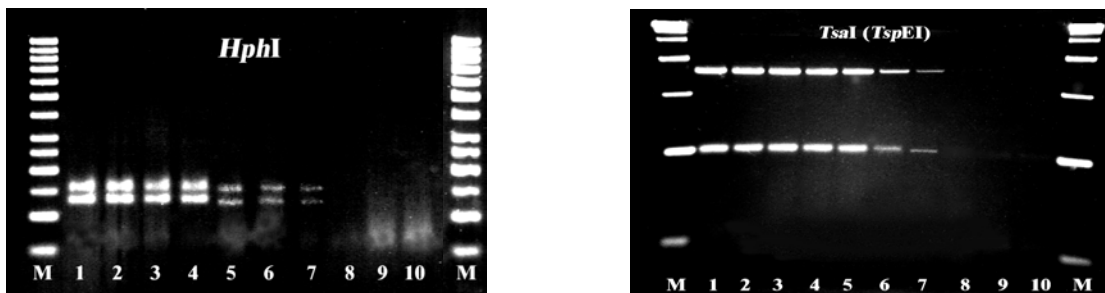


Abbildung 3.8: Restriktionsmuster der PCR-Produkte des *cytb*-Gens (279 Bp) aus mit Kuhmilch kontaminierter Ziegenmilch (1 = 10%, 2 = 8 %; 3 = 6 %; 4 = 4 %; 5 = 2%; 6 = 1 %; 7 = 0,5 %; 8 = 0,1 %, 9 = 0,01 % und 10 = 0,005 %) (M = Marker)

Diese Methode wurde daher bei der Untersuchung von Handelsproben routinemäßig zur Überprüfung positiver Resultate eingesetzt.

Zusammenfassend lässt sich somit folgendes feststellen:

Zur DNA-Extraktion aus Kuh- bzw. Ziegenmilch sowie Kuh- bzw. Ziegenkäse wurde eine zuverlässige und robuste Methode unter Verwendung von NET-Puffer entwickelt, mit der gute Ergebnisse erzielt wurden. Als optimale Probenvolumina wurden 600 µl (Milch) bzw. 500 µl (homogenisierter Käse) ermittelt.

Die PCR-Methode mit Verwendung des universellen Primerpaars nach Meyer et al. (1995) wurde zur Überprüfung der DNA-Extraktion eingesetzt.

Mittels speziesspezifischer Primer nach Bottero et al. (2002) konnte eine anwendungsreife hochsensitive PCR-Methode erarbeitet werden, die den direkten und selektiven Nachweis boviner DNA aus Ziegenmilch und Ziegenmilchprodukten auf schnelle und einfache Weise erlaubt. Die praktisch erreichbare Nachweisgrenze des Verfahrens liegt bei 1 % Kuhmilch in Ziegenmilch.

3.2.4 Vergleichsuntersuchung mit einem immunchemischen Verfahren

Mittels ELISA wurden Ziegenkäseproben aus Rohmilch (n = 4) sowie pasteurisierter Milch (n = 9) auf Kuhmilchzusatz über den Nachweis von bovinem IgG untersucht. Die Ergebnisse der PCR-Untersuchung von Rohmilchkäsen stimmten jeweils mit denen des ELISAs überein (zwei positive, zwei negative Kuhmilch-Befunde), bei Käsen aus pasteurisierter Milch in sieben Fällen (zwei positive, fünf negative Kuhmilch-Befunde). Zwei weitere Ergebnisse stellten sich wie folgt dar: In einem Fall enthielt der untersuchte Käse laut Deklaration 20 % Kuhsahne. Während mit der PCR-Methode ein positiver Kuhmilch-Nachweis erreicht wurde, ergab der ELISA hier erwartungsgemäß, aufgrund des Nachweisprinzips, ein negatives Ergebnis. Im zweiten Fall ergab die Untersuchung mittels ELISA ein nur schwach positives Ergebnis, während mittels PCR-Methode ein stark positives Ergebnis erzielt wurde. Im Hinblick auf die unterschiedlichen Detektionsprinzipien kann somit – zumindest für Rohmilchkäse – von einer guten Vergleichbarkeit der Ergebnisse ausgegangen werden.

3.2.5 Untersuchung von Handelsproben – Ergebnisse, Bewertung und Schlussfolgerungen

Wie bereits bei der Auswahl des Probenmaterials zur Untersuchung der mikrobiologischen Qualität wurde auch in dem hier beschriebenen zweiten Teil des Projekts besonderer Wert auf die Beprobung der Waren entsprechend ihres Marktanteils gelegt, gleichzeitig auch die regionale Produktion besonders beachtet. Für die Untersuchung auf Verfälschung war auch von besonderem Interesse festzustellen, ob Unterschiede zwischen kleinen regionalen Betrieben, die in vergleichsweise großer Zahl ökologisch arbeiten, und großen, z.T. europaweit vertreibenden Produzenten bestehen. Dabei ist die Art der hergestellten Produkte in diesem Kontext von geringerer Bedeutung.

Tabelle 3.11 gibt einen Überblick über die Herkunft der untersuchten Ziegenkäseproben entsprechend den Produktangaben, Tabelle 3.12 über die Herstellungsart der Proben.

Tabelle 3.11: Übersicht über die Herkunft der untersuchten Probenmaterialien (entsprechend Produktangaben)

Herkunftsland	Anzahl der Proben (n)	Ökologische Produktion (n)	Konventionelle Produktion (n)
Deutschland	53	38	15
davon Hessen	20	15	5
andere Bundesländer	33	23	10
Frankreich	53	0	53
Niederlande	45	37	8
Griechenland	6	4	2
Schweiz	3	3	0
Italien	2	1	1
Norwegen	2	0	2
Österreich	1	1	0
Gesamt	165	84	81

Tabelle 3.12: Übersicht über die Herstellungsart der untersuchten Probenmaterialien (entsprechend Produktangaben)

Typ	Ökologische Produktionsweise (n)	Konventionelle Produktionsweise (n)
Frischkäse n = 42	19	23
Weichkäse n = 67	24	43
Schnitt- und Hartkäse n = 56	41	15
Summe	84	81

22 der untersuchten Proben entstammen der Direktvermarktung, d.h. aus dem Verkauf ab Hof oder aus Hofläden sowie Direktverkauf über Bauernmärkte, die restlichen Proben dem Einzelhandel (Tabelle 3.13).

Nach Herstellerangaben (z.T. mündliche Auskunft) bzw. Warenbezeichnung wurde der größte Teil der Produkte aus reiner Ziegenmilch hergestellt, nur ein geringer Anteil (n = 5) bestand laut Deklaration aus Kuh- und Ziegenmilchgemischen (Tabelle 3.14). Diese Proben stammten alle aus konventioneller Produktion.

Tabelle 3.13: Übersicht über die Vermarktungsart der Produkte

Herstellungsart	Direktvermarktung	Einzelhandel
Ökologisch (n)	15	69
Konventionell (n)	7	74
Gesamt (n)	22	143

Tabelle 3.14: Übersicht über die Herstellerangaben bzw. Warenbezeichnung zur Verwendung von Ziegenmilch bzw. Kuhmilch in den Produkten

Verwendung von	Ökologische Produktionsweise	Konventionelle Produktionsweise
Ziegenmilch (n)	84	76
Ziegen- und Kuhmilch (n)	0	5

Alle Handelsproben wurden mit der in 2.2.3.2 (Abschnitt 2) beschriebenen spezies-spezifischen PCR-Methode auf Verfälschungen mit Kuhmilch untersucht. Als Kuhmilch-positiv ermittelte Produkte wurden mindestens zweimal nachuntersucht, wenn möglich wurden im Anschluss weitere Chargen des Produkts oder andere Produkte des gleichen Herstellers erworben und ebenfalls untersucht. Weiterhin wurden positive Proben in einer Verdünnung von 1:10 (in Phosphatpufferlösung) erneut extrahiert und untersucht, um eine weitere Absicherung der Methode zu erreichen.

Im folgenden werden die Ergebnisse der Untersuchung unter Berücksichtigung relevanter Aspekte bewertet:

Die Untersuchung der als Kuhmilch enthaltend deklarierten Proben ($n = 5$), die alle aus der konventionellen Produktion stammten, ergab in jedem Fall eine Bestätigung der Angaben. In den Proben konnten jeweils positive Resultate in der Rind-spezifischen PCR erzielt werden. Diese Ergebnisse wurden auch durch Überprüfung mittels ELISA bestätigt.

160 Handelsproben waren als reine Ziegenmilchprodukte deklariert. Nach den Ergebnissen der Rind-spezifischen PCR enthielten insgesamt 21 Proben (13 %) Kuhmilchzusätze. Tabelle 3.15 gibt eine Übersicht über die Einzelergebnisse der spezies-spezifischen Untersuchung dieser Proben.

Tabelle 3.15: Übersicht über die mittels speziesspezifischer PCR als Kuhmilch-positiv ermittelten Produkte

Lfd. Nr.	Käsesorte ¹	Hersteller-Code	Herstellungsland	Ökol. /konven. Produktion
2	F	Zi	D (Sachsen)	Ö
3	W	He	NL	Ö
6	S	Fr	NL	K
12	W	Pr	F	K
23	W	Fl	D (Hessen)	Ö
24	W	Fl	D (Hessen)	Ö
25	F	Ma	D (Saarland)	Ö
43	W	Fl	D (Hessen)	Ö
46	F	Hu	D (Bayern)	Ö
65	F	Sc	F	K
67	W	Ce	F	K
72	S	An	D (Bayern)	Ö
78	W	Gu	F	K
80	W	Sc	F	K
87	F	Pi	F	K
94	W	Fl	D (Hessen)	Ö
112	S	Ek	NL	Ö
128	W	Ce	F	K
154	S	Un	F	K
163	W	So	F	K
165	W	Sc	F	K

¹ = Frischkäse (F), Weichkäse (W), Schnitt- und Hartkäse (S)

Aus Tabelle 3.16 wird ersichtlich, dass Produkte aus konventioneller Produktion mit etwas höherer Häufigkeit positive Ergebnisse erbrachten. Bei detaillierter Betrachtung der Ergebnisse allerdings zeigen sich teilweise wesentlich deutlichere Unterschiede in Abhängigkeit von Produktionsart, Herkunft der Proben oder Betriebsart.

Tabelle 3.16: Übersicht über die Herkunft und Produktionsart der untersuchten Kuhmilch-positiven Ziegenmilchprodukte

Produktionsart und Herkunft	Proben mit Kuhmilchzusatz	Gesamtzahl der Proben
ökologische Produktion	10 (12 %)	84
konventionelle Produktion	11 (15 %)	76
Gesamt	21 (13 %)	160

Produkte aus Deutschland wiesen insgesamt einen Anteil positiver Proben von ca. 16 % auf (Tabelle 3.17). Von den untersuchten ökologischen Produkten enthielten acht Proben (21 %) Kuhmilchzusätze. Diese Zahl erscheint zwar auf den ersten Blick als relativ hoch, sie erklärt sich aber vor allem durch die hohe Belastungsfrequenz eines einzelnen Herstellers aus Hessen, der seine Produkte über einen Hofladen vermarktet. Hier waren von fünf untersuchten Käseproben vier positiv. Es sei darauf verwiesen, dass dieser Hersteller auch im Hinblick auf die mikrobielle Belastung seiner Produkte auffällig war.

Bei Nicht-Berücksichtigung dieses “Problem”-Herstellers ergäbe sich ein Anteil von Käsen mit Kuhmilchzusatz in ökologisch erzeugten deutschen Produkten von 12 %.

Tabelle 3.17: Übersicht über die Produktionsart der untersuchten Kuhmilch-positiven Ziegenmilchprodukte aus Deutschland

Produktionsart und Herkunft	Proben mit Kuhmilchzusatz	Gesamtzahl der Proben
Produkte aus Deutschland		
- davon ökol. Produkte	8* (21 %)	38
- davon konvent. Produkte	0 (0 %)	12
Gesamt	8 (16 %)	50

* vier positive Proben entfielen auf einen Hersteller

Mit Ausnahme des vorher erwähnten Betriebes enthielten alle weiteren untersuchten Produkte aus regionaler hessischer Direktvermarktung anderer ökologisch wirtschaftender Produzenten (10 Proben) keine Kuhmilchzusätze. Folglich kann prinzipiell von einer guten Qualität bei ökologischer Direktvermarktung hinsichtlich der Produktauthentizität gesprochen werden.

Die restlichen vier Kuhmilch-positiven ökologischen Produkte entstammten dem Einzelhandel und verteilten sich auf drei kleine Käsereien aus Sachsen, Saarland und Bayern sowie eine große Molkerei aus Bayern. Drei dieser Betriebe verarbeiten sowohl Ziegen- als auch Kuhmilch. Hier könnte eine technologische Verunreinigung der Ziegenmilch mit Kuhmilch im Verarbeitungsprozess eine mögliche Erklärung sein. Die vierte Probe entstammt einem Betrieb, der laut eigenen Angaben lediglich Schaf- und Ziegenmilch verarbeitet. Zwei weitere Produkte dieses Herstellers allerdings ergaben negative Resultate. Insgesamt erwiesen sich weitere 13 untersuchte Proben der vier Hersteller als negativ.

Bei 12 Produkten aus konventioneller Herstellung wurden keine Kuhmilch-Zusätze gefunden. Fünf Proben stammten aus zwei hessischen Betrieben mit Direktvermarktung, sieben Produkte aus Käsereien mit zumindest bundesweiter Vermarktung.

Auffällig bei der Aufstellung der Ergebnisse der untersuchten Produkte aus den Niederlanden (Tabelle 3.18) war der relativ geringe Anteil positiver Proben. Er lag bei 6,7 % der gesamten Proben sowie bei lediglich 5,4 % der ökologisch erzeugten Produkte. 82 % der hier untersuchten Proben entstammten ökologischer Produktion und tragen größtenteils das “Eko Skal”-Prüfsiegel der “Skal International Inspection and Certification Organisation”, teilweise lag auch Demeter-Qualität vor.

Tabelle 3.18: Übersicht über die Produktionsart der untersuchten Kuhmilch-positiven Ziegenmilchprodukte aus den Niederlanden

Produktionsart und Herkunft	Proben mit Kuhmilchzusatz	Gesamtzahl der Proben
Produkte aus den Niederlanden		
- davon ökol. Produkte	2 (5,4 %)	37
- davon konvent. Produkte	1 (13 %)	8
Gesamt	3 (6,7 %)	45

Der Anteil von Kuhmilch-positiven Proben aus Frankreich (Tabelle 3.19) war dagegen relativ hoch (20 %), fast die Hälfte aller positiven Proben waren französischer Herkunft. Auch hier gab es wiederum “Problem”-Produkte; so war vor allem eine Genossenschaft (mit mehr als 600 Mitgliedern) mit drei positiven (von acht untersuchten) Produkten auffällig, ein weitere Genossenschaft (ohne nähere Angaben) mit 2 positiven von 2 untersuchten. Alle Produkte aus Frankreich stammten aus konventionell arbeitenden Betrieben.

Die untersuchten Proben aus weiteren Herstellungsländern enthielten keine Kuhmilch-zusätze.

Tabelle 3.19: Übersicht über die Produktionsart der untersuchten Kuhmilch-positiven Ziegenmilchprodukte aus Frankreich

Produktionsart und Herkunft	Proben mit Kuhmilchzusatz	Gesamtzahl der Proben
Produkte aus Frankreich - nur konventionelle Produkte	10 (20 %)	51

Im Hinblick auf den Status-Quo der ökologischen Ziegenmilchproduktion am Modell Hessen lassen sich zusammenfassend folgende Schlussfolgerungen ziehen:

1. Ziegenkäseproben regional vermarktender ökologischer Betriebe in der Region Hessen ergaben mit Ausnahme eines Betriebes keine Hinweise auf eine Verfälschung mit Kuhmilch.
2. Generell war die Mehrzahl der untersuchten Ziegenkäseproben aus Deutschland authentisch, Kuhmilch-positive Proben wurden für fünf Hersteller ermittelt.
3. Bei Importprodukten wurde ein höherer Anteil Kuhmilch-positiver Proben für Produkte aus Frankreich (aus konventioneller Erzeugung) ermittelt.

Im Hinblick auf die prinzipiell gute Qualität der Produkte direkt vermarktender ökologischer Betriebe ist somit durchaus ein potentieller Wettbewerbsvorteil gegenüber z.B. konventionell erzeugten Importprodukten gegeben. Zur Erfassung potentieller „Problembetriebe“ allerdings ist der Parameter „Überprüfung der Produktauthentizität“ in das in 3.1.4 genannte Konzept zur Etablierung eines ganzheitlichen Qualitätssicherungssystem zu integrieren.

4 ZUSAMMENFASSUNG

Zur Sicherung der mikrobiologischen Qualität und Authentizität von ökologischen Ziegenmilchprodukten wurden in einer Status-Quo-Erhebung am Modell der Region Hessen grundlegende Problembereiche bei der Verarbeitung und Vermarktung identifiziert. Dazu wurden Ziegenmilchprodukte aus regionaler Herstellung, insbesondere aus ökologischer Produktion, zu Vergleichszwecken aber auch weitere Produkte je nach Angebotsbreite, eingekauft und auf folgende Parameter untersucht:

- Mikrobiologische Untersuchung auf Hygienekeime wie coliforme Keime, *Escherichia (E.) coli* und *Staphylococcus (S.) aureus* (incl. Enterotoxinnachweis)
- Mikrobiologische Untersuchung auf pathogene Mikroorganismen wie Salmonellen, *Listeria (L.) monocytogenes*, verotoxinbildende *E. coli* mit ggf. Toxinnachweis und *Bacillus (B.) cereus* mit ggf. Toxinnachweis
- Molekularbiologische Überprüfung der Authentizität.

Für die mikrobiologischen Untersuchungen wurden standardisierte Methoden eingesetzt, die validiert und ggf. optimiert wurden.

Für die molekularbiologischen Untersuchungen wurden PCR-Methoden auf Basis von universellen sowie speziesspezifischen Primern entwickelt und validiert. Zur DNA-Extraktion wurde eine zuverlässige und robuste Methode entwickelt, mit der gute Ergebnisse erzielt wurden. Eine PCR-Methode mit Verwendung von universellen Primern nach Meyer et al. (1995) wurde zur Überprüfung der DNA-Extraktion eingesetzt. Mittels speziesspezifischer Primer nach Bottero et al. (2002) konnte eine anwendungsreife hochsensitive PCR-Methode erarbeitet werden, die den direkten und selektiven Nachweis boviner DNA aus Ziegenmilch und Ziegenmilchprodukten auf schnelle und einfache Weise erlaubt. Die Nachweisgrenze des Verfahrens liegt bei 1 % Kuhmilch in Ziegenmilch.

Die Untersuchung von 183 Proben auf die mikrobiologischen Parameter ergab folgende Ergebnisse:

Im Hinblick auf die Belastung mit *E. coli* und Coliformen wies Frischkäse ein prinzipiell gutes Bild auf. Bei Weichkäse allerdings überschritten 25 Proben (45%) einen Wert von 10^4 KbE/g, 19 Proben (34%) einen Wert von 10^5 KbE/g. Maximalwerte lagen bei 10^8 KbE/g, dabei vor allem bei Rohmilchkäse. Die Befunde für *E. coli* lagen etwas niedriger, aber auch hier wurden recht häufig hohe Kontaminationen nachgewiesen. Damit weist ein hoher Prozentsatz der Weichkäse schwere Hygienemängel auf. Die Belastung war unabhängig von ökologischer oder konventioneller Herstellung und wurde gleichermaßen für regionale Produkte als auch für Importprodukte festgestellt. In Schnittkäse wurden in 13 Proben (16 %) erhöhte Werte im Hinblick auf *E. coli* und Coliforme festgestellt.

Im Hinblick auf regional hergestellte Produkte war auffällig, dass zwei Betriebe (davon ein konventionell wirtschaftender und ein ökologisch wirtschaftender mit Direktvermarktung) die stärksten Hygienemängel aufwiesen, in deren Produkten auch *L. monocytogenes* nachgewiesen worden war.

S. aureus wurde im Vergleich zu ähnlichen Untersuchungen an Kuhmilch nur selten (1 Weichkäse, 1 Schnittkäse) nachgewiesen. Dies deckt sich aber mit den Befunden aus der Fachliteratur. Lediglich ein Schnittkäse wies hohe Werte auf ($8,6 \times 10^5$ *S. aureus*/g) und war zudem gleichzeitig stark mit *E. coli* und coliformen Keimen belastet. *S. aureus*-Enterotoxine wurden nicht nachgewiesen.

Bacillus cereus wurde insgesamt in 25 Proben (14 %) in Keimzahlen über 10^1 Koloniebildenden Einheiten (KbE)/g nachgewiesen. Das Risiko durch *B. cereus* ist aufgrund der vorliegenden Befunde als eher gering einzustufen, da kritische Werte (Toxinbildung) bei mindestens 10^6 KbE/g liegen.

Salmonellen sowie verotoxinbildende *E. coli* wurden in keiner Probe nachgewiesen.

L. monocytogenes wurde in vier Schnittkäsen nachgewiesen. Bei einer Probe handelte es sich um ein Importprodukt aus den Niederlanden. Die drei anderen positiven Proben stammten von den zwei oben erwähnten hessischen Betrieben. Diese Befunde zeigen, dass hier ein Gesundheitsrisiko besteht, das allerdings sehr Hersteller-spezifisch ist.

Zusammenfassend zeigen die Untersuchungsergebnisse, dass Ziegenkäse aus Direktvermarktung (ökologisch oder konventionell) in der Region Hessen hinsichtlich Gesundheitsrisiken durch pathogene Keime kein deutlich über dem für vergleichbare Produkte liegendes Problem darstellt. Für Ziegenkäse aus einigen wenigen Betrieben wurden jedoch deutliche Hygienemängel festgestellt.

Aufgrund der hier vorliegenden Befunde können somit Empfehlungen zur Sicherstellung und Optimierung der hygienischen Qualität der ökologischen Ziegenmilchprodukte gegeben werden. Kurz zusammengefasst beinhalten diese eine Erhöhung der Kontrollfrequenz der Betriebe, Einbeziehung von geeigneten Untersuchungsparametern wie coliforme Keime, sowie regelmäßige Kontrolle auf pathogene Keime. Der Ausbau spezifischer und unabhängiger Qualitätsüberwachungsstellen für direktvermarktende Betriebe wäre wünschenswert.

Die molekularbiologische Untersuchung von 160 als reine Ziegenmilchprodukte deklarierten Handelsproben ergab einen Anteil von 21 Proben (13 %) mit Kuhmilchzusätzen. Produkte aus Deutschland wiesen insgesamt einen Anteil positiver Proben von ca. 16 % auf. Mit Ausnahme eines auffälligen Betriebes (vier positive Ergebnisse bei fünf untersuchten Proben) enthielten alle untersuchten Produkte aus regionaler hessischer Direktvermarktung ökologisch wirtschaftender Produzenten (10 Proben) keine Kuhmilchzusätze. Folglich kann prinzipiell von einer guten Qualität bei ökologischer Direktvermarktung hinsichtlich der Produktauthentizität gesprochen werden. Bei Produkten aus den Niederlanden lag der Anteil positiver Proben bei lediglich 6,7 % der gesamten Proben sowie 5,4 % der ökologisch erzeugten Produkte. Der Anteil von Kuhmilch-positiven Proben bei Importprodukten (alle aus konventioneller Herstellung) aus Frankreich lag bei 20 %.

Im Hinblick auf die prinzipiell gute Qualität der regional vermarktenden ökologischen Betriebe ist somit durchaus ein potentieller Wettbewerbsvorteil gegenüber z.B. konventionell erzeugten Importprodukten gegeben. Eine Integrierung des Parameters „Überprüfung der Produktauthentizität“ in das ganzheitliche Qualitätssicherungssystem ist aber in jedem Fall erforderlich, um gegebenenfalls Problembetriebe erfassen zu können.

5 GEGENÜBERSTELLUNG DER URSPRÜNGLICH GEPLANTEN ZU DEN TATSÄCHLICH ERREICHTEN ZIELEN

Geplantes Ziel	Ziel erreicht
Gesamtziele	
Status-Quo Erhebung zur grundlegenden Identifizierung möglicher Problembereiche bei der Verarbeitung und Vermarktung ökologischer Ziegenmilchprodukte	ja
Erarbeitung geeigneter Lösungskonzepte zur Qualitätssicherung und damit Absatzsteigerung ökologischer Ziegenmilchprodukte	ja
Einzelziele	
Mikrobiologische Untersuchung auf Hygienemarker wie Coliforme Keime, <i>E. coli</i> , koagulasepositive Staphylokokken (mit Enterotoxinnachweis)	ja
Mikrobiologische Untersuchung auf pathogene Keime (Salmonellen, <i>Listeria monocytogenes</i> , Enteropathogene <i>E. coli</i> und Toxine, <i>Bacillus cereus</i> und Toxine)	ja
Validierung und Optimierung der eingesetzten Untersuchungsverfahren	ja
Erarbeitung einer PCR-Methodik zur Differenzierung von Ziegen- und Kuhmilch	ja
Validierung der Methodik anhand künstlich verfälschter Produkte	ja
Vergleichsuntersuchung mit immunologischen Testverfahren	ja
Untersuchung von Ziegenmilchprodukten auf Authentizität	ja
Erarbeitung von Empfehlungen für ein ganzheitliches Untersuchungssystem	ja
Identifizierung mikrobiologischer Problembereiche	ja
Erkennung von und Schutz vor nachgemachten oder verfälschten Produkten	ja
Erfassung der Problembereiche bei der Vermarktung ökologischer Ziegenmilchprodukte	ja
Empfehlung eines Monitoring- und Überwachungssystems zur Authentizitätsprüfung von Ziegenmilchprodukten	ja

6 LITERATURVERZEICHNIS

Bottero, M. T., T. Civera, A. Anastasio, R. M. Turi und S. Rosati (2002): Identification of cow's milk in "buffalo" cheese by duplex polymerase chain reaction. *J. Food Prot.* 65, 362-366.

Branciari, R., I. J. Nijman, M.E. Plas, E. di Anatonio und J. A. Lenstra (2000): Species origin of milk in Italian mozzarella and Greek feta cheese. *J. Food Prot.* 63, 408-411.

Coenen, C. (1999): Untersuchungen zum Vorkommen und zur Risikoeinschätzung pathogener Keime in Rohmilch und Rohmilchprodukten aus der Direktvermarktung. Diss. med. vet. Berlin.

Hahn, G., H.G. Walte, C. Coenen und P. Teufel (1999a): Direktvermarktung von Rohmilch: Befunde und Risikoerörterung. *Kieler Milchwiss. Forschungsber.* 51, 105-115.

Hahn, G., H.G. Walte, C. Coenen und P. Teufel (1999b): Direktvermarktung von Produkten aus Rohmilch: Befunde und Risikoerörterung. *Kieler Milchwiss. Forschungsber.* 51, 333-342.

Herman B. L. (2001): Determination of the animal origin of raw food by species-specific PCR. *J. Dairy Res.* 68, 429-436.

Kahila Bar-Gal, G., und C. Greenblatt (2001): The relationships between *Capra* species from the southern Levant to other *Capra* species based on cytochrome b sequence. Zur Publikation eingereicht. (Gendatenbank-Zugangsnummer: AF217254).

Kloppert, B., A. Ehrenberg, W. Wolter und M. Zschöck (2000): Konzept zur Überwachung und Eigenkontrolle in Schaf- und Ziegenmilcherzeugerbetrieben im Sinne der Milchverordnung. *Proceedings 41. Arbeitstagung Lebensmittelhygiene*, 25.-28.9.2000 in Garmisch-Partenkirchen. Giessen, DVG, 213-219.

Kloppert, B., A. Ehrenberg, W. Wolter und M. Zschöck (2000): Konzept zur Überwachung und Eigenkontrolle in Schaf- und Ziegenmilcherzeugerbetrieben im Sinne der Milchverordnung. Proceedings 41. Arbeitstagung Lebensmittelhygiene, 25.-28.9.2000 in Garmisch Partenkirchen. Giessen, DVG, 213-219.

Kloppert, B., W. Wolter, M. Zschöck und V. Stojanowic (1997): Rohmilchqualität in hessischen Milcherzeugerbetrieben mit Milch-ab-Hof Abgabe oder Direktvermarktung unter besonderer Berücksichtigung der bakteriologischen Beschaffenheit. Proceedings 38. Arbeitstagung Lebensmittelhygiene, 29.9-2.10.1997 in Garmisch-Partenkirchen. Giessen, DVG, 206-213.

Maudet, C. und P. Taberlet (2001): Detection of cows' milk in goats' cheeses inferred from mitochondrial DNA polymorphism. J. Dairy Res. 68,229-235.

Meyer, R., C. Hofeilein, J. Luthy und U. Candrian (1995): Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism analysis: a simple method for species identification in food. J AOAC. 78, 1542-1551.

Romero, C. und I. Lopez-Goni (1999): Improved method for purification of bacterial DNA from bovine milk for detection of *Brucella* spp. by PCR. Appl. Environ. Microbiol. 65, 3735-3737.

Rudolf, M. und S. Scherer (2001): High incidence of *Listeria monocytogenes* in European red smear cheese. Int. J. Food Microbiol. 63, 91-98.

Schnellhardt, C. (1999): Untersuchungen zur bakteriologischen und zytologischen Qualität von Schaf- und Ziegenmilch in oberbayerischen Betrieben. Diss. med. vet. München.

Schnellhardt, C., H. Becker und E. Märtlbauer (1997): Bakteriologische Beschaffenheit roher Schaf- und Ziegenmilch aus Kleinbetrieben in Oberbayern. Proceedings 38. Arbeitstagung Lebensmittelhygiene, 29.9. - 02.10.1997 in Garmisch Partenkirchen. Giessen, DVG, 650-653.

Schwoppe, M. und H. Schüppel (1995): Untersuchungen zur hygienischen Beschaffenheit von Ziegenmilch und daraus hergestellten Produkten. Proceedings 36. Arbeitstagung Lebensmittelhygiene, 26.-29. September 1995 in Garmisch Partenkirchen. Giessen, DVG, 249-259.

Schwoppe, M. und H. Schüppel (1995): Untersuchungen zur hygienischen Beschaffenheit von Ziegenmilch und daraus hergestellten Produkten. Proceedings 36. Arbeitstagung Lebensmittelhygiene, 26.-29. September 1995 in Garmisch Partenkirchen. Giessen, DVG, 249-259.

Zehner, R., S. Zimmermann und D. Mebs (1998): RFLP and sequence analysis of the cytochrome b gene of selected animals and man: methodology and forensic application. Int J Legal Med. 111, 323-327.

Anhang: Materialien

AES Laboratoire Salmonellen Agar Platte (ASAP) (AES Laboratoire AEB520090)
Agarose NEEO® (Roth 2267.4)
ALOA Agar (AES Laboratoire AEB520080)
api Listeria (bioMerieux 10300)
Apilab Plus (bioMerieux 34001)
api 20 E (bioMerieux 20100)
ATL Tissue Lysis Buffer (QIAGEN 112235047)
Bacillus cereus Selektiv-Supplement (Oxoid SR 099E)
Bacillus-cereus-Agar-Basis (Oxoid CM 617)
Bactident Oxidase (Merck 1.13300.0001)
Baird Parker + RPF for coagulase (AES Laboratoire)
Baird-Parker-Agar (Merck 1.05406.0500)
BBL Bacto Purple Broth Base (Beckton Dickinson, BD)
BBL Coagulase Plasma mit EDTA (BD 240827)
BBL Crystal GP (BD, 245 140)
BBL Enterotube II (BD 273176)
Bile Salts No. 3 (Oxoid L 56)
BPLS-Agar (Brillantgrün-Phenolrot-Lactose-Saccharose-Agar) (Merck 1.07237.0500)
BsuRI (*HaeIII*) (MBI Fermentas ER0151)
Buraton Rapid (SM 113912)
Calciumchlorid (VWR 1.02378.0500)
Caseinpepton-Sojamehlpepton-Agar mit Hefeextrakt (Oxoid CM 131)
Caso-Bouillon (Caseinpepton-Sojamehlpepton-Bouillon) (Merck 1.05459.0500)
Columbia-Agar-Basis (Oxoid CM 331)
Creatin (Merck 1.05206.0050)
D(+)-Xylose (Merck 1.08689.0025)
Di-Kalium-Phosphat (Sigma P 8281)
DNA UV-Cleaner, UVC/T (Kisker Biotech, Steinfurt, Deutschland)
DNase-Testagar (VWR 1.10449.0500)

DNEasy Kit (Qiagen)
dNTP-Set (MBI Fermentas RO181)
Dstroy[®]-Sticks (Biozym, 710399)
EasyFreezer[®]-Ice-Box (Biozym, 730625)
Eigelb-Emulsion (Oxoid SR 047 C)
Eigelb-Tellurit-Emulsion (Merck 1.03785.0050)
Eisessig 100 % (Merck, 1.00056.2500)
Eppendorf Zentrifuge 3200 (Eppendorf, Hamburg, Deutschland)
Ethidiumbromid-Lösung, 5 µg/ml (Sigma, Taufkirchen, Deutschland, E1505)
Ethidiumbromid-Lsg. 10 mg/ml (Sigma, Taufkirchen, Deutschland, E1510)
Fluorocult E. coli direkt-Agar (ECD) (Merck 4038)
Fluorocult Laurylsulfat-Bouillon (Merck 1.12588.0500)
Fluorocult VRB-Agar (Merck 1.04030.0500)
FRASER-Listeria-Selektiv-Anreicherungsbouillon (Basis) (Merck 1.10398.0500)
FRASER-Listeria-Supplement (Merck 1.10399.0001)
GelDoc 2000 (BIORAD)
Gelelektrophorese Power Pac 1000 (BIORAD)
GeneRuler 50bp (MBI Fermentas SM0371)
Orange Ruler 50pb (MBI Fermentas SM0618)
Glucose-Medium (Merck 1.10860.0500)
GN-Anreicherungsbouillon (Merck 1107560500)
GRIESS-ILOSVAYS Reagenz auf Nitrit (Merck 1.09023.0500)
Hefeextrakt granuliert (Merck 1.03753.0500)
HinfI (MBI Fermentas ER0801)
Hirn-Herz-Bouillon (Brain-Heart-Infusion, BHI) (Merck 1.10493.0500)
HphI (MBI Fermentas ER1101)
Isopropanol > 99,5 % (2-Propanol, Roth 9866.1)
Kaliumhydroxid-Plätzchen (Merck 1.05033.0500)
KOVÁCS Indolreagenz (Merck 1.09293.0100)
L(+)-Rhamnose (Merck 1.04736.0025)
L.Monodisk (AES Laboratoire AEB193005)
Lagerrack mit Scharnierdeckel (Biozym 730209)

Loading Puffer 6x Loading Dye Solution (MBI Fermentas R0611)
Loading Puffer 6x Orange Loading Dye Solution (MBI Fermentas R0631)
MacConkey-Nährboden (OxoidCM 115B)
Magermilchpulver (VWR 1.15363.0500)
Malachitgrün (Oxalat) (Merck 1.01398.0025)
Mannitol-Egg-Yolk-Polymyxin-Agar (MYP) (Oxoid CM0929)
Marker Gene[®] Ruler 50 Bp Ladder (MBI Fermentas, SM0371)
Marker Gene[®] Ruler 100 Bp Ladder (MBI Fermentas, SM0241)
MboI (MBI Fermentas ER0811)
MetaPhor[®] Agarose (Biozym 850180)
Methylrot (C.I. 13020) Indikator (Merck 1.06076.0025)
MgCl₂ 25 mmol/l (Promega)
MicroPipetten 1-10 µl, 50-200 µl und 100-1000 µl (Eppendorf)
Mikrolöffelspatel Stahl (Merck, 2311352)
MR-VP-Bouillon (Merck 1.05712.0500)
Na-Biselenit (Oxoid EEC 231-966-3)
1-Naphtol zur Analyse (Merck 1.06223.0050)
Natriumchlorid (NaCl) (Merck 1.06400.5000)
Natriumdodecylsulfat (SDS) (Roth, 4360.1)
Natriumdodecylsulfat (SDS)-Lösung, 24 %
Natriumhydroxid (NaOH) (Merck 1.06498.1000)
Natriumhydroxid (NaOH)-Lösung, 2,6 mol/l
Natriumperchlorat (NaClO₄) (Sigma, 13455)
Natriumperchlorat (NaClO₄)-Lösung, 5 mol/l
NET-Puffer (50 mmol/l NaCl, 125 mmol/l EDTA, 50 mmol/l Tris-HCl, pH 7,6)
Nitrat-Bouillon (Merck 1.10204.0500)
Novitec Verotoxin Veterinär (Verotoxine 1 + 2)
Novobiocin (Sigma N 1628)
Oligonukleotidprimer (QIAGEN GmbH, Hilden, und
PALCAM-Listeria-Selektivagar (Basis) (Merck 1.11755.0500)
PALCAM-Listeria-Selektivsupplement (Merck 1.12122.0001)
PCR- Reaktionsgefäße 0,2 ml (Biozym, 710925)

Peptonwasser, gepuffert (Oxoid CM 509)
Pipettenaufsätze Filter Tipps DNase/RNase-frei (Greiner bio-one, 1000 µl (G) 740288)
Pipettenaufsätze Filter Tipps DNase/RNase-frei (Greiner bio-one, 10µl (G) 771288)
Pipettenaufsätze Filter Tipps DNase/RNase-frei (Greiner bio-one, 200µl (G) 739288)
Premier EHEC (HISS 7100960)
Proteinase K (Roche Mannheim 03115828001)
QIAamp[®] DNA Stool Mini Kit (QIAGEN, 69506)
QIAquick[®] PCR Purification Kit (QIAGEN, 28997)
Reaktionsgefäße 1,5 und 2,0 ml (Biozym, 710190)
Ridascreen SET A,B,C,D,E (R-Biopharm 4101)
RIDASCREEN Verotoxin (R-Biopharm 5701)
RIDASCREEN CIS (R-Biopharm 4302)
Ringerlösung (Oxoid BR 52)
Roti[®]-Phenol/Chloroform-Lösung (Roth, A156.2)
RVS-Bouillon (Merck 1.07700.0500)
Saekem[®] LE Agarose (Biozym, 840.004)
Safranin O (Merck 1.15948.0025)
Salmonella-Agar (Oxoid CM 0533B)
Salmonella Test Sera omnivalent/polyvalent I,II,III (Dade Behring)
Salzsäure rauchend zur Analyse, ISO (VWR 100.317.1000)
Schafblut defibriniert (Oxoid SR 0051 C)
Selenit Cystin Broth Base (Oxoid CM 699)
SspI (MBI Fermentas ER0772)
Standard-II-Nähragar (Merck 1.07883.0500)
Staphaurex Plus (Murex C06ZL33GB)
Steriles Aqua destillatum
Stomacher 400 Circulator (Seward)
Sub-Cell[®] GT (BIORAD)
Sudanschwarz B (Merck 1.15928.0025)
TAE-Puffer 50-fach (242 g Tris-Basis; 57,1 ml Eisessig; 100 ml 0,5 mol/l EDTA (pH 8,0))
Taq-DNA Polymerase (Promega M1865)
TasI (MBI Fermentas, ER1351)

Thermocycler *iCycler* (BIORAD)
Thermonuklease-DNase-Testagar (Merck 1.10449.0500)
Thermophilic DNA Polymerase 10x Buffer (Promega, M190A 14864506)
Titrplex II[®] (EDTA) (Merck, 1.08417.0250)
Toluidinblau O (Merck 1.15930.0025)
Trichloressigsäure krist. reinst (VWR 1.00810.1000)
Tris-(Hydroxymethyl)-aminomethan (Roth, 5429.3)
Tru9I (MBI Fermentas ER0982)
TSB-Bouillon (Oxoid CM 129)
Vortex Genie 2 , Scientific Industries (Merck)
Waage, Mettler PM 480 Delta Range[®] (Mettler Instrumente GmbH)
Wasserbad GFL (MAGV GmbH)
Wasserstoffperoxid 3% (Merck 1.07210.0250)
Xylol zur Analyse (Merck 1.08681.1000)
Xylose-Lysin-Desoxycholat-Agar (XLD) (Merck 5287)
Zentrifuge 202 MK (Sigma)
ZeroCooler[®]-Ice-Box (Biozym, 730620)
Zinkstaub (Merck 1.59481.0100)