

# Bedeutung der Hitzeresistenz von *Mycobacterium paratuberculosis* für pasteurisierte Milch

Philipp Hammer, Christian Kiesner und Paul Teufel (Kiel)

**M***ycobacterium paratuberculosis* ist seit Anfang des Jahrhunderts als Erreger der Paratuberkulose des Rindes bekannt. Aufgrund von Ähnlichkeiten im Krankheitsbild und unterstützt durch mikrobiologische und molekularbiologische Untersuchungen wird eine mögliche Beteiligung dieses Erregers auch an der Krankheit „Morbus Crohn“ des Menschen diskutiert. Als Vehikel für die Übertragung wird dabei immer wieder pasteurisierte Trinkmilch genannt, da es in der wissenschaftlichen Literatur vermehrte Hinweise auf ein Vorkommen in roher Milch und ein Überleben von *M. paratuberculosis* unter den Bedingungen der Dauer- und Kurzzeiterhitzung gibt.

## Das Bakterium

*Mycobacterium paratuberculosis* gehört zur Familie der Mykobakterien, zu der auch die klassischen Erreger der Tuberkulose oder der Lepra gehören, darf aber keinesfalls mit diesen verwechselt werden. Wissenschaftlich korrekt handelt es sich bei dem Erreger um eine Unterart von *Mycobacterium avium*. Er gehört zu einer Gruppe sich nur sehr

langsam vermehrender Mykobakterien. Während "normale" Bakterien innerhalb von 24 Stunden bis wenigen Tagen kultivierbar sind, werden für *M. paratuberculosis* mindestens acht Wochen benötigt.

*M. paratuberculosis* ist beim Rind und anderen Wiederkäuern der alleinige Verursacher der Paratuberkulose, auch Johnesche Krankheit genannt. Diese Erkrankung bricht bei Milchrindern meistens nach der zweiten oder dritten Kalbung



Abb. 1: Typische Auffaltung des Dünndarms bei Paratuberkulose (Foto: Paratuberculosis Research Center, University of Wisconsin, Madison, USA)

aus. Die Kälber infizieren sich bereits vor der Geburt durch das Muttertier oder durch Aufnahme kontaminierter Milch nach der Geburt. Die Paratuberkulose führt zu entzündlichen Auffaltungen der Schleimhaut im letzten Abschnitt des Dünndarms (Ileum) (Abb. 1). Im fortgeschrittenen Stadium ist die Erkrankung durch unstillbare Durchfälle gekennzeichnet, die nach einigen Wochen bis Monaten stets zum Tode führen. In den Herden erkranken meist nur Einzeltiere, die jedoch, bis die Krankheit erkennbar wird, über längere Zeiten erhebliche Keimmengen (bis zu  $10^8$  und mehr pro Gramm Kot) ausscheiden.

*M. paratuberculosis* kann auf zwei Wegen in die Milch gelangen:

- Der Erreger kann aus der Blutbahn, vermutlich eingeschlossen in Makrophagen (Fresszellen), ins Eutergewebe eindringen. Dabei ist mit sehr niedrigen Keimzahlen von weniger als 10 Bakterienzellen pro 50 ml Milch zu rechnen.
- Erregerhaltiger Kot kann während des Melkprozesses die Milch verunreinigen. Wegen der hohen Keimzahl im Kot kann – in Abhängigkeit vom Verunreinigungsgrad – eine wesentlich höhere Keimzahl erreicht werden.

Die Krankheit ist weltweit, jedoch regional unterschiedlich verbreitet. Über das Vorkommen in Deutschland liegen nur unvollständige Daten vor. Fachleute schätzen, dass wenigstens 10-15 % der Milchviehherden betroffen sein könnten. In Studien aus anderen Ländern der EU (z. B. Dänemark und den Niederlanden) sind Befallsraten von 35 bis über 60 % ermittelt worden. Die wirtschaftlichen Verluste durch Rückgang der Milchleistung, Abmagern (Abb. 2) und vorzeitigen Abgang der Tiere sind erheblich. Schätzungen aus den USA bzw. aus Holland nennen jährliche Einbußen von 1,5 Milliarden Dollar bzw. 25 Millionen Gulden.

## Morbus Crohn

Eine der Paratuberkulose der Wiederkäuer sehr ähnliche Erkrankung des Menschen ist Morbus Crohn. Parallelen zeigen sich sowohl im klinischen Bild als auch pathologisch-anatomisch. Morbus Crohn unterscheidet sich jedoch von der Johne-schen Krankheit der Tiere dadurch, dass die Erkrankung zwar auch chronisch, aber praktisch nie tödlich verläuft und dass alle Abschnitte des Magen-Darm-Traktes betroffen sein können.

**Abb. 2:**  
*Klinisch an Paratuberkulose erkrankte Holstein-Friesian Kuh*  
(Foto: Paratuberculosis Research Center, University of Wisconsin, Madison, USA)



In Deutschland leiden circa 175.000 Personen an Morbus Crohn. Die Erkrankung ist eine Multifaktorenkrankheit; als Auslöser kommen unter anderem erbliche, diätetische, immunologische und psychische Faktoren in Betracht.

Die Beteiligung von *M. paratuberculosis* an Morbus Crohn wird kontrovers diskutiert. Noch liegen keine Daten für einen eindeutigen Zusammenhang vor. Ein Fachgremium der EU hat hierzu festgestellt: „Die gegenwärtige Datenlage ist nicht ausreichend, um zu beständigen oder abzulehnen, dass *Mycobacterium paratuberculosis* ein ursächliches Agens, zumin-

dest einiger Fälle der Crohnschen Erkrankung des Menschen ist.“ Weiterhin schlussfolgert das Gremium: „Es gibt genügend Anlass, eine gesteigerte und zügige Forschungsaktivität zu begründen, damit diese Problematik gelöst werden kann.“

## Hitzeresistenz in Milch

Die Pasteurisierung von Milch erfolgt prinzipiell nach drei in der Milch-Verordnung festgelegten Verfahren: Bei der

Dauererhitzung wird Milch in einem Kessel auf 62–65 °C erwärmt und 30 Minuten bei dieser Temperatur gehalten. Auf diese Weise werden ausschließlich kleine Milchmengen bis zu einigen 100 Liter bearbeitet (z. B. für die Direktvermarktung). Im industriellen Maßstab wird hauptsächlich die so genannte Kurzzeiterhitzung eingesetzt, bei der die Milch in einem kontinuierlichen Durchfluss auf 72-75 °C erhitzt und zwischen 15 und 30 Sekunden heiß gehalten wird. Die Kapazität eines solchen Prozesses liegt bei Tausenden von Litern pro Stunde. Ein weniger bedeutendes, sonst aber ähnliches industri-

elles Verfahren ist die Hoherhitzung, bei der auf über 85 °C erhitzt wird (nicht zu verwechseln mit ultrahoherhitzter H-Milch). Alle Verfahren sind nach bisheriger Erfahrung dazu geeignet, die Anzahl eventuell in der Rohmilch vorhandener pathogener Mikroorganismen so zu reduzieren, dass durch den Verzehr dieser Milch keine Infektionen erfolgen können.

Um eine mögliche Hitzeresistenz von *M. paratuberculosis* bei diesen Bedingungen zu prüfen, müssen experimentelle und apparative Voraussetzungen geschaffen werden, die den Verhältnissen in der Praxis möglichst nahe kommen. Des-



**Abb. 3:** Laboranlage zur experimentellen Kurzzeiterhitzung von Milch (Übersicht und Ausschnitt; Fotos: I. Spreckels, BAFM Kiel)

Deshalb ist es nicht auszuschließen, dass Autoren, die über eine völlige Inaktivierung von *M. paratuberculosis* nach Erhitzung der Milch berichten, zu diesem Ergebnis nur kamen, weil sie ihre Versuche zu früh beendet haben. Mit dem neuen Verfahren waren bei 42,3 % der Versuche vermehrfähige *M. paratuberculosis* nachweisbar. Bei der Gegenüberstellung der positiven und negativen Ergebnisse in Form eines Punkteschwarmes zeigt sich keine besondere Schwerpunktbildung (Abb. 4). Das bedeutet, das Überleben der Erhitzung ist unabhängig von der Ausgangskeimzahl und den hier geprüften Temperatur-Zeit Bedingungen.

wegen wurde an der Bundesanstalt für Milchwirtschaft (BAFM) in Kiel eine Anlage für die experimentelle Kurzzeiterhitzung von kontaminierter Milch konstruiert und aufgebaut. Das Vorhaben wurde durch eine Sonderzuweisung des Bundesministeriums für Ernährung, Landwirtschaft und Forsten gefördert. Dieser „Kleinpasteur“ entspricht in Aufbau und Funktion im wesentlichen großtechnischen Anlagen (s. Abb. 3).

Für die Versuche wurde Rohmilch der eigenen Versuchsherde mit Kulturen von *M. paratuberculosis* versetzt und im gesetzlich für die Kurzzeiterhitzung vorgeschriebenen Temperaturbereich von 72-75 °C sowie auch bei niedrigeren und höheren Temperaturen erhitzt. Dabei wurden verschiedene Bakterienstämme mit unterschiedlicher Ausgangskeimzahl eingesetzt.

Bisher wurden 319 Experimente durchgeführt, wobei Temperatur-Zeit

Kombinationen in einem Temperaturbereich von 68 bis 80 °C mit 18 bis 25 Sekunden mittlerer Verweilzeit (Heißhaltezeit) geprüft wurden. Der Heißhalter wurde strömungstechnisch so ausgelegt, dass die schnellsten Milchteilchen die Zeit von 15 Sekunden nicht unterschreiten und die langsamsten die Zeit von 30 Sekunden nicht überschreiten.

Für den Nachweis der Vermehrfähigkeit wurde eine aufwendige Kultivierungstechnik mit Spezialnährböden entwickelt, deren wesentliche Charakteristik ein Schritt zur Wiederbelebung hitzgeschädigter *M. paratuberculosis*-Zellen und eine sehr lange Bebrütungszeit der Kulturen (bis zu einem Jahr!) ist. Die lange Inkubationszeit erwies sich als notwendig, da hitzgeschädigte Keime teilweise einen solchen Zeitraum benötigen, um sich im Nährmedium wieder zu vermehren. Diese Zeit ist wesentlich länger, als bisher in der Literatur publiziert wurde.

Normalerweise unterliegt das Absterbeverhalten von Bakterien bei Erhitzung einer linearen Funktion, das heißt die Zahl der Bakterien verringert sich in Abhängigkeit von Temperatur und Heißhaltezeit gleichmäßig bis zu einem Punkt, an dem Überlebende nicht mehr nachgewiesen werden können. Hierbei gilt die Grundregel: je länger die Heißhaltezeit, bzw. je höher die Temperatur, desto größer ist der Effekt der Abtötung. Anders bei *M. paratuberculosis*: Hier findet zwar während der Erhitzung eine ganz erhebliche Reduktion der Ausgangskeimzahl statt, es kann jedoch relativ lange eine geringe Zahl von Überlebenden nachgewiesen werden, was auf einen zunehmend asymptotischen Verlauf der Inaktivierungskurve hinweist.

Auch die von anderen Forschungsgruppen in der EU erarbeiteten Ergebnisse weisen auf diese ungewöhnliche Hitze-resistenz eines Teiles der eingesetzten Bakterienkulturen hin.

Eine Erklärung für die besondere Hitze-resistenz von *M. paratuberculosis* bieten möglicherweise die langsamen Stoffwechselvorgänge dieser Organismen. Bei Verwendung einer so genannten Vitalfärbung kann man beobachten, dass maximal 10 % einer Kultur überhaupt nur stoffwechselaktiv sind. Der Rest scheint sich in einem Ruhezustand zu befinden, in dem die Keime dann möglicherweise resistenter gegen Hitze einwirkung sind.

Damit werden Modellrechnungen zur Sicherheit des Erhitzungsverfahrens schwierig, da auch sehr geringe Ausgangskeimzahlen den Erhitzungsprozess überleben können.

## Offene Fragen

Derzeit ist eine Beteiligung von *M. paratuberculosis* an Morbus Crohn nicht als gesichert anzusehen. Es gilt als unwahrscheinlich, dass *M. paratuberculosis* alleiniger Verursacher der Krankheit ist. Sofern der Erreger zumindest als Risikofaktor für einen Teil der für Morbus Crohn empfänglichen Personen angesehen werden kann, müsste der Keim als Zoonoseerreger betrachtet werden. In diesem Zusammenhang völlig offen ist aber die Frage, ab welcher Keimzahl dann tatsächlich ein Infektionsrisiko für den Verbraucher bestünde (minimale infektiöse Dosis).

Die Ergebnisse aus der internationalen Fachliteratur sowie aus den eigenen Versuchen zeigen, dass eine kleine Anzahl von *M. paratuberculosis*-Zellen die Bedingungen der Kurzzeiterhitzung überleben kann. Im Hinblick auf die Gegebenheiten in der Praxis sollte jedoch auch berücksichtigt werden, dass die von der Milchsammung bis zur Abfüllung durchgeführten Prozessschritte (Filtration, Reinigung im Separator, Erhitzung) eine möglichen Belastung kontinuierlich verringern. Darüber hinaus werden eventuell kontaminierte Milch-Chargen während der Milchsammung erheblich verdünnt. Von entscheidendem Vorteil ist hierbei auch, dass eine Vermehrung des Keimes außerhalb des Wirtskörpers nicht mehr stattfindet. Die

Wahrscheinlichkeit, dass pasteurisierte Trinkmilch mit überlebenden *M. paratuberculosis* in den Handel gelangt, wird dadurch sehr klein, ist aber, wie die folgenden Überschlagsrechnungen zeigen, bei sehr konservativen Annahmen noch vorhanden.

Bei Annahme, dass eine Kuh bzw. alle Tiere aus einer Herde von 15 Kühen *M. paratuberculosis* mit der Milch ausscheiden, sind auf Molkereiebene rechnerisch 0,16 bzw. 2,4 Koloniebildende Einheiten (KBE; in der Bakteriologie Bezeichnung für kleinste Einheit, in der Bakterien auftreten; diese kann eine bis sehr viele einzelne Zellen enthalten) pro kg Rohmilch zu erwarten. Das gleiche Szenario bezogen auf eine Kontamination der Milch

übrig. Eine ähnliche Berechnung wurde von einer holländischen Arbeitsgruppe vorgenommen, die einen Wert von maximal 0,5 KBE *M. paratuberculosis* pro kg handelsfertiger Trinkmilch ergab.

Nach beiden Berechnungen können also, wenn auch in sehr geringer Zahl, positive Trinkmilchproben erwartet werden. Tatsächlich wurden in Untersuchungen aus Großbritannien auch vereinzelt *M. paratuberculosis* in pasteurisierter Trinkmilch aus dem Handel nachgewiesen. Die Untersucher isolierten das Bakterium aus vier von 1.000 Trinkmilchproben.

Solange keine Beziehung zwischen der Kontamination von Milch mit *M. paratuberculosis* und dem Morbus Crohn beim Menschen hergestellt werden kann, ist

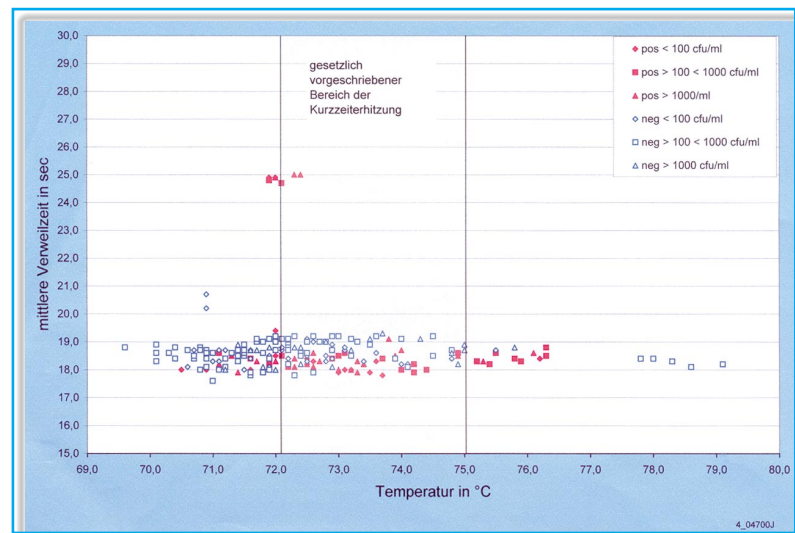


Abb. 4: Überleben von *M. paratuberculosis* bei der Erhitzung von Milch (einschließlich gesetzlich vorgeschriebenem Temperaturbereich der Kurzzeiterhitzung), positive und negative Versuche gegliedert nach Höhe der Ausgangskeimzahl (cfu/ml = Koloniebildende Einheiten pro Milliliter). Rot: Versuche, in denen Keime überlebten. Blau: Versuche ohne nachweisbar überlebende Keime

durch Kot ergibt für eine ausscheidende Kuh 8.000 und für alle 15 Kühe 120.000 KBE pro kg auf Molkereiebene. Zu beachten ist, dass diese Abschätzungen auf möglichst ungünstigen Annahmen – das heißt einer kleinen Herde mit geringer Milchleistung – basieren. In der Praxis dürften die Verdünnungseffekte größer sein. Zusätzlich muss die mehr als 100.000fache Reduktion der Keimzahl durch die Erhitzung berücksichtigt werden. Von der höchsten berechneten Keimzahl bleibt nach der Pasteurisierung also kaum 1 KBE *M. paratuberculosis* pro kg Milch

eine umfassende Risikoabschätzung unter Einbeziehung der hier vorgestellten Untersuchungsdaten nicht möglich. Aufgabe der produktorientierten Forschung ist es, Daten über mögliche Expositionsabschätzungen zu liefern, damit gegebenenfalls ein vorbeugendes Risikomanagement durchgeführt werden kann.

Dr. Philipp Hammer, Dr. Paul Teufel, Institut für Hygiene und Produktsicherheit; Dr. Christian Kiesner, Institut für Verfahrenstechnik; Bundesanstalt für Milchforschung, Herman-Weigmann-Str. 1, 24103 Kiel