Bedeutung von EHEC O104:H4 in Bockshornkleesamen, die zu anderen Lebensmitteln als Sprossen und Keimlingen weiterverarbeitet werden

Aktualisierte Stellungnahme Nr. 031/2011 des BfR vom 26. Juli 2011*

Ursache für das EHEC-Ausbruchsgeschehen in Deutschland und Frankreich im Mai und Juni 2011 waren mit großer Wahrscheinlichkeit kontaminierte Bockshornkleesamen und daraus gezüchtete Sprossen (vgl. BfR-Stellungnahme 23/2011 „Die Bedeutung von Bockshornkleesamen sowie Sprossen und Keimlingen im EHEC O104:H4-Ausbruchsgeschehen im Mai und Juni 2011“). Nach derzeitigem Wissen waren an dem Ausbruchsgeschehen Sprossen aus Bockshornkleesamen beteiligt. Allerdings werden die Samen nicht nur zur Sprossherstellung verwendet. Das Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR) hat deswegen die Bedeutung von EHEC O104:H4 in Bockshornkleesamen bewertet, die in verschiedenen Lebensmitteln einschließlich Nahrungsergänzungsmitteln verwendet werden. Ob diese Produkte bei der Verarbeitung von kontaminierten Bockshornkleesamen eine Infektion auslösen können, richtet sich im Wesentlichen nach den Aufbereitungs- und Verarbeitungsverfahren. Diese können abhängig von Hersteller und Produkt sehr unterschiedlich sein und sind dem BfR deshalb im Einzelnen nicht bekannt.

Nach derzeitigem Kenntnisstand ist davon auszugehen, dass der Ausbruchserreger nur in sehr geringer Konzentration in Bockshornkleesamen vorhanden ist. Die Überlebensfähigkeit von EHEC in den Samen des Bockshornklees hängt vom Ausgangskeimgehalt und von den angewandten Aufbereitungsverfahren ab. Da es möglich ist, dass der Erreger auch im Innern von Samenkörnern vorkommt, sind nur thermische Behandlungsverfahren (z.B. in feuchtem Milieu Erhitzen auf 72 °C für zwei Minuten im Kern), ggf. in Kombination mit Hochdruckverfahren oder Bestrahlung, geeignet, den Keim sicher abzutöten. Eine chemische Behandlung, wie die Reinigung mit Chlorwasser etc., reicht nicht aus, möglicherweise im Samenkern vorhandene EHEC-Bakterien sicher zu eliminieren. Ebenso überlebt der Keim das Reifen, Trocknen, Salzen und Säuern von Lebensmitteln.

Bockshornkleesamen finden sich in einer Vielzahl verschiedener Lebensmittel wie Käse, Kräutertees, Senf, Currygewürzen und Nahrungsergänzungsmitteln. Aus geschmacklichen und technologischen Gründen werden Bockshornkleesamen vor der Zugabe zu Lebensmitteln üblicherweise erhitzt.

Vor dem Hintergrund der Schwere der Erkrankung durch EHEC O104:H4 sollten Lebensmittelunternehmer prüfen, ob Material aus einer möglicherweise kontaminierten Bockshornkleesamencharge bereits zur Verwendung kam, und ob ihre Prozessverfahren hinsichtlich der sicheren Abtötung des Keims in und auf den Samen geeignet sind. Im Zweifelsfall sollten sie die hergestellten Produkte vom Markt nehmen.

Das BfR rät Verbraucherinnen und Verbrauchern zudem, Bockshornkleesamen vor der Weiterverarbeitung im Privathaushalt z.B. durch Rösten in der Pfanne kräftig zu erhitzen.

Kräutertees mit Bockshornkleesamen sollten wie alle Kräutertees mit kochendem Wasser aufgegossen werden und mindestens 5 Minuten ziehen. Wasser aus Heißwasserspender ist generell nicht für die Zubereitung von Kräutertees geeignet, da es nicht heiß genug ist, um Bakterien sicher abzutöten.

Das BfR hat seine Stellungnahme vom 11. Juli 2011 aktualisiert, um die Besonderheiten bei alleiniger Anwendung von Trockenhitze zur Abtötung von EHEC auf Bockshornkleesamen deutlicher herauszustellen.

1 Gegenstand der Bewertung

Im Mai und Juni 2011 kam es in Deutschland zu einem gehäuften Auftreten von Erkrankungsfällen mit dem hämolytisch-urämischem Syndrom (HUS) und blutigen Diarrhöen im Zusammenhang mit einer Infektion durch Enterohämorrhagische *Escherichia coli* (EHEC) des Serotyps O104:H4. Mittels DNA-Sequenzanalyse wurde festgestellt, dass der Ausbruchstamm wesentlich mehr Gemeinsamkeiten mit den Enteroaggregativen *Escherichia coli* (EAggEC) als mit den herkömmlichen EHEC hat. Der Erreger wird deshalb in der vorliegenden Bewertung als enteroaggregativer EHEC O104:H4 bezeichnet. Das Erkrankungsgeschehen betraf alle Länder in Deutschland, aber vor allem Norddeutschland. Mit dem Ausbruchserreger kontaminierte Sprossen aus einem niedersächsischen Gartenbaubetrieb werden als ursächliches Lebensmittelvehikel angesehen. Die Ergebnisse epidemiologischer Untersuchungen lassen den Schluss zu, dass der Ausbruchserreger über angelieferte Bockshornkleesamen in die Sprossenproduktion eingetragen wurde, auch wenn der labor diagnostische Nachweis weiterhin fehlt. Diese Schlussfolgerung steht in Übereinstimmung mit Ergebnissen anderer epidemiologischer Untersuchungen, die darauf hinweisen, dass Samen meistens, wenn nicht sogar immer, die Quelle von Sprossen-assoziierten Ausbrüchen sind (Puohiniemi et al., 1991; CDC, 1997a; Mahon et al., 1997).

Im Juni 2011 kam es auch in Frankreich zu einem Ausbruch mit dem enteroaggregativen EHEC O104:H4, bei dem selbstgezogene Sprossen als Ursache festgestellt wurden. Zur Herstellung der Sprossenmischung wurden u.a. Bockshornkleesamen verwendet. Die Rückverfolgung der in Frankreich verwendeten Bockshornklee-Samencharge ergab, dass eine bestimmte im Jahr 2009 hergestellte Bockshornklee-Samencharge über denselben in Deutschland ansässigen Zwischenhändler auch an einen niedersächsischen Gartenbaubetrieb geliefert und dort im Frühjahr 2011 zur Sprossenproduktion eingesetzt wurde. Daneben wurde in dem niedersächsischen Gartenbaubetrieb im April und Mai 2011 noch eine weitere im Jahr 2010 produzierte Bockshornklee-Samencharge für die Sprossenproduktion eingesetzt, die über denselben Zwischenhändler angeliefert wurde. Laut einer Risikobewertung der Europäischen Behörde für Lebensmittelsicherheit (EFSA) und dem Europäischen Zentrum für die Prävention und die Kontrolle von Krankheiten (ECDC) vom 29. Juni 2011 wurden diese beiden Bockshornklee-Samenchargen aus Ägypten importiert.

Auf Grundlage der Risikobewertung der EFSA/ECDC vom 29. Juni 2011 hat das BfR am 30. Juni 2011 in einer Stellungnahme auf die mögliche Gesundheitsgefahr bestimmter Bockshornklee-Samenchargen aufmerksam gemacht. Basierend auf dieser Stellungnahme hat das für die Überwachung des deutschen Importeurs zuständige Land die Rücknahme aller Chargen Bockshornkleesamen aus Ägypten angeordnet, bei denen das Mindesthaltbarkeitsdatum noch nicht oder nicht länger als 6 Monate abgelaufen ist. Die Vorwärtsverfolgung bei Zwischenhändlern in Deutschland hat ergeben, dass die im Jahr 2009 produzierte Bockshornklee-Samencharge von Deutschland aus auch an Betriebe in mindestens 14 anderen Staaten geliefert wurde.

Am 5. Juli 2011 hat das BfR eine Risikobewertung zur Bedeutung von EHEC O104:H4 in Sprossen und Keimlingen sowie Sprossensamen im Ausbruchsgeschehen im Mai und Juni 2011 veröffentlicht. Bei der Bewertung stützte sich das BfR u.a. auf die Ermittlungsergebnisse der deutschen Task Force EHEC sowie der europäischen Task Force zu EHEC, die von der EFSA aufgrund der staatenübergreifenden Relevanz der Ausbruchsgeschehen eingerichtet worden war.

Am 5. Juli 2011 hat die EFSA einen technischen Bericht zu den Ermittlungsergebnissen der europäischen Task Force über die Warenströme verdächtiger Samenchargen vorgelegt. Demnach wurden zwischen Dezember 2009 und Februar 2011 insgesamt 37 Tonnen Bockshornkleesamen aus Ägypten nach Deutschland importiert. Da der Ursprung der Kontamination der Samen zum jetzigen Zeitpunkt nicht bekannt ist und die Möglichkeit einer Kontamination anderer Samenarten und -chargen besteht, hat die EU-Kommission am 06. Juli 2011 Maßnahmen zum Schutz der Verbraucherinnen und Verbraucher ergriffen. Die Kommission ordnete den Rückruf und die unschädliche Beseitigung der im Zeitraum 2009-2011 aus Ägypten importierten und im Rahmen der Rückverfolgung auf EU-Ebene ermittelten Chargen Bockshornkleesamen an und verhängte bis zum 31. Oktober 2011 ein Importverbot für bestimmte Samen aus Ägypten (Durchführungsbeschluss der Kommission vom 6. Juli 2011, 2011/402/EU).

Bockshornkleesamen finden sich in einer Vielzahl verschiedener Produkte, beispielsweise in Currygewürz und Nahrungsergänzungsmitteln. Bisher gibt es keine Evidenz, dass außer Sprossen auch andere aus Bockshornkleesamen hergestellte Lebensmittel enteroaggregative EHEC O104:H4-Infektionen verursacht haben. Dennoch muss die Möglichkeit in Betracht gezogen werden, dass vereinzelte Erreger unter bestimmten Bedingungen in oder auf den Samen überleben und sich im Darm des Menschen wieder vermehren können. Es ist deshalb zu prüfen, ob auch von anderen Lebensmitteln einschließlich Nahrungsergänzungsmitteln eine Gefahr für die menschliche Gesundheit ausgehen kann, wenn Erzeugnisse aus Bockshornkleesamen (ganze Samen, Samenmehle und -pulver, Samenextrakte) aus Ägypten darin enthalten sind.

Vor diesem Hintergrund hat das BfR eine Bewertung hinsichtlich der Verarbeitung von Erzeugnissen aus Bockshornkleesamen bei der Herstellung von anderen Lebensmitteln vorgenommen, welche die Risikobewertung vom 5. Juli 2011 zur Bedeutung von Sprossen und Keimlingen¹ ergänzen soll. Dem BfR ist bisher allerdings nicht bekannt, in welchem Umfang Bockshornkleesamen der zurückgerufenen Chargen zu anderen Lebensmitteln weiterverarbeitet wurden als zur Sprossenproduktion.

2. Ergebnis

Es liegen wenig oder fast keine Kenntnisse über das Verhalten und die Widerstandsfähigkeit (Tenazität) enteroaggregativer EHEC O104:H4 allein oder als Teil eines Biofilms in der Umwelt, auf oder in Lebensmitteln vor. Die Risikobewertung inklusive der abgeleiteten Empfehlungen stützt sich deshalb weitgehend auf Erkenntnisse zum Verhalten anderer EHEC-Stämme (z.B. EHEC O157:H7) unter der Annahme, dass enteroaggregative EHEC O104:H4 eine vergleichbare Tenazität aufweisen. Zur Bewertung der Tenazität des Ausbruchserregers O104:H4 ist die Durchführung weiterer wissenschaftlicher Studien notwendig.

In der wissenschaftlichen Literatur werden überwiegend Behandlungsverfahren für Sprossensamen beschrieben, die eine Keimreduktion um 5 log-Stufen sicher stellen sollen, obwohl in dieser Matrix nur geringe Konzentrationen an pathogenen Keimen erwartet werden. Dies ist für Samen zur Sprossenherstellung notwendig, weil durch die mesothermen und feuchten Bedingungen während der Sprossenanzucht ein intensives Keimwachstum stattfinden kann.

Nach derzeitigem Kenntnisstand ist davon auszugehen, dass der Ausbruchserreger nur in sehr geringer Konzentration in Bockshornkleesamen vorhanden ist. Aus Sicht des BfR ist es

¹ Veröffentlicht unter http://www.bfr.bund.de/cm/343/bedeutung_von_sprossen_und_keimlingen_sowie_samen_zur_sprossenherstellung_im_ehec_o104_h4_ausbruchsgeschehen_im_mai_und_juni_2011.pdf

deshalb nicht erforderlich, vergleichbare Anforderung an die Dekontamination von Bockshornkleesamen zu stellen, welche zu anderen Produkten außer Sprossen weiterverarbeitet werden, sofern keine Vermehrung von enteroaggregativem EHEC O104:H4 nach Zugabe der Samen stattfinden kann. Unter dieser Voraussetzung bieten aus Sicht des BfR solche Behandlungsverfahren eine ausreichende Sicherheit, die den Modellkeim EHEC O157:H7 in und auf Samen um mindestens 2 log-Stufen reduzieren können.

Dazu können Erhitzungsverfahren angewandt werden, wie sie auch für andere Lebensmittel üblich sind. Aus geschmacklichen und technologischen Gründen werden Bockshornkleesamen vor der Zugabe zu Lebensmitteln üblicherweise erhitzt. Eine Erhitzung auf mindestens 72 °C für 2 Minuten im Kern oder eine in der Wirkungsweise vergleichbare Temperatur-Zeit-Kombination ist für die Abtötung des Erregers in den meisten Lebensmitteln geeignet. Das trifft auch für die Abtötung des Erregers in Samen zu, sofern ein feuchtes Milieu vorliegt (z.B. durch Einsatz von Heißwasserdampf). Bei alleiniger Anwendung von Trockenhitze sind bei Temperaturen um die 70 °C Erhitzungszeiten von mehreren Stunden erforderlich. Außerdem wird vom BfR das Bestrahlen der Samen, wie für Gewürze nach Lebensmittelbestrahlungsverordnung zugelassen, als hinreichend für diesen Verwendungszweck eingeschätzt.

Chemische Behandlungsverfahren, inklusive Einsatz von Chlurlösungen oder Zusatz von Schwefeldioxid (SO₂), sind grundsätzlich nicht dazu geeignet, Erreger, die sich möglicherweise im Inneren der Bockshornkleesamen befinden, zu eliminieren.

Vor dem Hintergrund der Schwere der Erkrankungen werden vom BfR nach dem gegenwärtigen Stand des Wissens zum Schutz der Verbraucherinnen und Verbraucher folgende Empfehlungen zur Risikominimierung ausgesprochen, auch wenn es bisher keine Anhaltspunkte dafür gibt, dass in Deutschland andere Produkte als Sprossen Infektionen mit enteroaggregativem EHEC O104:H4 ausgelöst haben:

➤ Empfehlungen für Lebensmittelunternehmer:

Empfänger zurückgerufener Bockshornklee-Samenchargen sollten notwendige Maßnahmen der Risikominimierung hinsichtlich ihrer eigenen Lagerbestände sowie ihrer hergestellten Produkte treffen. Deshalb sollten sie prüfen, ob ihre Herstellungsverfahren geeignet sind, den Erreger in und auf den Bockshornkleesamen vollständig abzutöten, so dass von den Produkten für Menschen kein Infektionsrisiko ausgeht und kein Eintrag in die Umwelt erfolgt. Im Zweifelsfall sollten sie die hergestellten Produkte vom Markt nehmen. Sie sollten außerdem abklären, ob eine Kreuzkontamination weiterer Rohstoffe bei der Lagerung oder bei der Verarbeitung der Samen stattgefunden haben kann.

➤ Empfehlungen für die zuständigen Behörden:

Die zuständigen Überwachungsbehörden sollten die Empfänger von Bockshornklee-Samenchargen, die nach den Erkenntnissen aus der in Deutschland und auf EU-Ebene durchgeführten Rück- und Vorwärtsverfolgung mit enteroaggregativen EHEC O104:H4 kontaminiert sein könnten, auf die mögliche Gesundheitsgefahr ausgehend von den Samen sowie daraus hergestellter Produkte hinweisen. Nachfolgend sollten sie gemeinsam mit dem Betrieb prüfen, ob die Einleitung von Maßnahmen zur Risikominimierung notwendig ist.

➤ Empfehlungen für Verbraucherinnen und Verbraucher:

Verbraucherinnen und Verbraucher sollten Kräutertees, auch solche mit Bockshornkleesamen, mit sprudelnd kochendem Wasser aufgießen und mindestens 5 Minuten ziehen lassen. Wasser aus Heißwasserspendern ist nicht für die Zubereitung von Kräutertees geeignet.

Verbraucherinnen und Verbrauchern wird empfohlen, Bockshornkleesamen vor der Weiterverarbeitung im Privathaushalt z.B. durch Rösten in der Pfanne kräftig zu erhitzen.

Grundsätzlich rät das BfR, die Überlebensfähigkeit und das Wachstumsverhalten von enteroaggregativem EHEC O104:H4 im Rahmen von wissenschaftlichen Tenazitätsstudien weiter zu erforschen.

3 Begründung

3.1 Risikobewertung

3.1.1 Mögliche Gefahrenquelle Enterohämorrhagische und Enteroaggregative *Escherichia coli*

Escherichia coli (*E. coli*) kommen natürlicherweise im Darm von Menschen und Tieren vor. Bestimmte Typen von *E. coli*, wie EHEC oder EAggEC, können gastrointestinale Erkrankungen beim Menschen hervorrufen. Da EHEC auch im Darm von Wiederkäuern vorkommen und mit dem Kot ausgeschieden werden, können sie direkt oder indirekt (z.B. über Lebensmittel) vom Tier auf den Menschen übertragen werden und Krankheiten auslösen. Nach derzeitigem Erkenntnisstand ist davon auszugehen, dass das Reservoir für EAggEC der Mensch ist. Eine Übertragung von EAggEC kann über Schmierinfektionen von Mensch zu Mensch erfolgen. Der Erreger kann auch bei der Zubereitung oder Produktion in Lebensmittel gelangen und so verbreitet werden.

Sogenannte atypische EAggEC können aus Kälbern, Ferkeln und Pferden isoliert werden. Diesen Stämmen fehlen allerdings bestimmte Eigenschaften, so dass derzeit davon ausgegangen wird, dass diese Tiere kein Reservoir für die humanpathogenen, typischen EAggEC darstellen (Über et al., 2006). Im Jahr 2004 fand in Großbritannien eine Studie statt, bei der 1227 *E. coli*-Isolate aus Rindern, Schafen und Schweinen nach einem bestimmten EAggEC-typischen Merkmal untersucht wurden. Keines der Isolate trug dieses Merkmal. Die Autoren geben allerdings an, dass mit der angewandten Methode nicht alle EAggEC erfasst werden und daher nicht ausgeschlossen werden kann, dass Bakterien dieser Art unter den untersuchten Bakterien vorkamen (Cassar et al., 2004).

Charakteristisch für EHEC sind die Eigenschaften, Shiga-Toxine (*stx1* oder *stx2*) zu bilden und sich über ein bestimmtes Protein (Intimin) im Darm seiner Wirte festzuheften. Die Begriffe STEC (für Shiga-Toxin-bildende *E. coli*) bzw. VTEC (für Verotoxin-bildende *E. coli*) werden daher synonym für *stx1*- oder *stx2*-bildende EHEC verwendet. EAggEC bildet hingegen normalerweise keine Shiga-Toxine und setzt sich mit Hilfe von Anheftungsfaktoren (Adhäsine) an der menschlichen Darmwand fest, wo sie in der Lage sind, Biofilme zu bilden. Diese Eigenschaft, Biofilme zu produzieren, ist sowohl für EHEC als auch für EAggEC ebenfalls für abiotische Oberflächen beschrieben.

EHEC gehören auch aufgrund des möglichen schweren Krankheitsverlaufs zu den bedeutendsten Ursachen für bakterielle Infektionen, die über Lebensmittel übertragen werden. EAggEC sind seit Mitte der 1990er Jahre bereits mehrfach als Verursacher von lebensmittelbedingten Ausbrüchen mit akutem und persistierendem Durchfall beschrieben worden (Okeke and Nataro, 2001). Bekannt ist diese *E. coli*-Variante vor allem aus Regionen mit mangelhaften Hygienebedingungen. Aber auch in entwickelten Regionen mit höherem Hygienestandard haben solche Ausbrüche stattgefunden. So fand der bisher größte bekannte Ausbruch in Japan statt, wo sich über 2500 Kinder an unterschiedlichen Schulen höchstwahrscheinlich an der Schulmahlzeit infiziert haben. Die verdächtigen Schulmahlzeiten in diesem Ausbruch beinhalteten Brot, Nudeln, Nudelsalat, Milchpudding, gebratenes Gemüse und Milch (Itoh et al., 1997).

In Brasilien konnte in einer weiteren Studie, bei der die Inhalte von 100 Babymilchflaschen (selbst zubereitet von Müttern aus schwachen sozioökonomischen Verhältnissen) auf pathogene *E. coli* untersucht wurden, in 3 Proben EAggEC in einer Konzentration von 10^3 - 10^4 Kolonie-bildenden Einheiten (KbE)/ml nachgewiesen werden (Morais et al., 1997). Studien zur Untersuchung von Ursachen der Reisediarrhö, mit Mexiko als Ursprungsland für die Ansteckung, haben ergeben, dass EAggEC aus Nachspeisen in einer durchschnittlichen Konzentration von $0,5 \times 10^4$ KbE/g isoliert werden konnten (Vigil et al., 2009). Auch Wasser aus offenen Brunnen stand in Zusammenhang mit Ausbrüchen.

Die pathogene Rolle und der Übertragungsweg von *E. coli*-Stämmen, die sowohl EHEC- als auch EAggEC-spezifische Virulenzfaktoren besitzen (*stx*-Produktion und enteroaggregative Adhäsion), ist zum gegenwärtigen Zeitpunkt nahezu unerforscht. Morabito et al. vermuteten bereits im Jahre 1998, dass derartig rekombinierte Stämme genauso pathogen für Menschen sein können, wie klassische EHEC-Stämme.

Charakteristika von EAggEC EHEC O104:H4 (Ausbruchsstamm)

Beim Ausbruchsgeschehen im Mai und Juni 2011 wurde als Ausbruchsstamm der Serotyp O104:H4 eindeutig als Krankheitsursache identifiziert.

Mittels DNA-Sequenzanalyse wurde festgestellt, dass der Ausbruchsstamm wesentlich mehr Gemeinsamkeiten mit den EAggEC als mit den herkömmlichen EHEC hat. So ähnelt der Ausbruchsstamm auf Sequenzebene zu 93 % einem humanen EAggEC-Stamm aus Zentralafrika, der bereits charakterisiert wurde. Das EHEC-spezifische an dem Ausbruchsstamm ist das bakteriophagenkodierte *stx2*-Gen. Offenbar handelt es sich bei dem Ausbruchsstamm um eine Rekombination aus zwei *E. coli* Pathotypen (EAggEC und EHEC), dem das für EHEC typische *eae* – (attaching and effacing) Gen fehlt.

Der Ausbruchsstamm weist eine Resistenz gegenüber den Beta-Laktam-Antibiotika der Gruppen Acylaminopenicilline und Cephalosporine, sowie gegenüber Tetracyclin, Nalidixinsäure, Streptomycin und Trimethoprim/Sulfamethoxazol auf. Außerdem wurde bisher in allen Isolaten eine Extended-Spektrum Beta-Laktamase (ESBL) vom Typ CTX-M-15 und eine Beta-Laktamase des Typs TEM-1 nachgewiesen.

Vorkommen von EAggEC EHEC O104:H4

Vorkommen beim Menschen

Bis zum Beginn des Ausbruchs in Deutschland im Mai 2011 sind in der Literatur nur wenige sporadische Fälle von *stx2*-positiven *E. coli* des Serotyps O104:H4 beschrieben worden. So berichtet das ECDC über die Infektion einer Person aus Finnland aus dem Jahr 2010, die die Infektion bei einer Reise nach Ägypten erworben haben soll. Zu einem weiteren Fall aus dem Jahr 2004 in Frankreich sind Details zur Erkrankung (inkl. Infektionsort) laut Bericht des ECDC nicht bekannt. Laut Angaben des Centers for Disease Control and Prevention (CDC) gab es im Jahr 2009 zwei HUS-Fälle in Georgien. In der Literatur wird eine Isolierung dieses Serotyps zudem bei einer Patientin mit HUS in Korea im Jahr 2005, sowie bei 2 Fällen (beide mit HUS) in Deutschland im Jahr 2001 beschrieben. Nur für die Isolate aus Deutschland (2001), Finnland (2010) und Georgien (2009) ist beschrieben, dass es sich um enteroaggregative EHEC handelte.

Enteroaggregative *E. coli* vom Typ O104:H4 ohne Shiga-Toxin-Gene sind aus mindestens einer großen englischen Fall-Kontroll-Studie mit Patienten mit infektiösen Darmerkrankungen bekannt (Wilson et al. 2001).

Vorkommen im Lebensmittel

Das Vorkommen des Serotyps O104:H4 in Lebensmitteln wurde in Deutschland und der EU bis zum Ausbruchsgeschehen noch nicht beschrieben. Enteroaggregativer EHEC O104:H4 wurde in Deutschland erstmals im Rahmen der aktuellen Ausbruchsuntersuchung in bzw. auf Lebensmitteln detektiert. Der Nachweis gelang in einer Probe Gurke und einer Probe Sprossen, die an unterschiedlichen Orten aus dem Küchenabfall von Personen entnommen worden waren, die mit dem Ausbruchserreger infiziert waren. Darüber hinaus wurde EAggEC EHEC O104:H4 in drei Lebensmittelproben festgestellt (Lachs roh und gegart, Paprika), die offensichtlich von einer Mitarbeiterin eines Partyservices während der Inkubationszeit kontaminiert worden waren.

STEC/VTEC anderer Serotypen lassen sich hingegen schon seit vielen Jahren in Lebensmitteln nachweisen. In Deutschland werden STEC/VTEC im Rahmen der betrieblichen Eigenkontrollen, der amtlichen Überwachung sowie im Rahmen des Zoonosen-Monitorings beobachtet. Im Rahmen der amtlichen Überwachung werden STEC/VTEC insbesondere bei frischem Fleisch sowie bei Rohfleischzubereitungen, aber auch bei Wildfleisch nachgewiesen

Innerhalb der EU wurde auch über vereinzelte Nachweise von STEC/VTEC in pflanzlichen Lebensmitteln (Gemüse, Obst) berichtet, wobei es sich bisher immer um Nicht-O104:H4-Stämme handelte.

Vorkommen bei Tieren und in der Umwelt

Der Ausbruchsstamm EAggEC EHEC O104:H4 wurde vor Beginn des Ausbruchsgeschehens in der EU bisher weder in Tierbeständen noch in Proben aus der Umwelt beobachtet. Keines der am Nationalen Referenzlabor des BfR für *E. coli* (NRL *E. coli*) differenzierten Isolate gehörte diesem Serovar an. Auch im Rahmen der Mitteilungen zur Zoonosenberichterstattung wurde das Serovar bisher nicht berichtet.

Insgesamt muss nach derzeitigem Kenntnisstand davon ausgegangen werden, dass der Ausbruchsstamm mit seiner detailliert beschriebenen genetischen Ausstattung sein Reservoir im Menschen hat, da dieser *E. coli*-Typ bis heute noch nie bei Tieren gefunden wurde. Bisher gibt es keinerlei Anhaltspunkte, dass der Ausbruchsstamm die Speziesbarriere Mensch-Tier überwunden hat. Allerdings kann nicht ausgeschlossen werden, dass der Ausbruchsstamm sekundär auch Tiere kolonisieren könnte, beispielsweise durch Aufnahme von kontaminiertem Wasser oder Futtermitteln. Es scheint derzeit so zu sein, dass sich der Erreger im Menschen vermehrt und nach Freisetzung über Fäkalien in die Umwelt gelangt, z.B. in das Abwasser. Es ist davon auszugehen, dass der Erreger für eine effektive Vermehrung wieder den Menschen kolonisieren muss.

Tenazität von Enterohämorrhagischen und Enteroaggregativen *Escherichia coli*

Über die Widerstandsfähigkeit des Ausbruchsstamms in der Umwelt ist bisher nur sehr wenig bekannt. Derzeit kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass der enteroaggregative EHEC O104:H4-Stamm längere Zeit in der Umwelt, z.B. in Wasser, überleben kann. Auch über seine Überlebensfähigkeit in Lebensmitteln ist so gut wie nichts bekannt. Scheutz et al. untersuchten 2011 den Ausbruchsstamm auf seine Fähigkeit hin, Biofilme zu bilden, und fanden heraus, dass er, wie für EaggEC-Stämme typisch, ein moderater bis guter Biofilmbildner ist. Des Weiteren gibt es Hinweise, dass der Erreger eine hohe Säureresistenz besitzt.

Intensiver beforscht wurden EHEC-Bakterien, u.a. auch das Serovar O157. Daher stützt sich die vorliegende Bewertung inklusive der abgeleiteten Empfehlungen weitgehend auf Erkenntnisse zum Verhalten von EHEC O157:H7 unter der Annahme, dass enteroaggregativer EHEC O104:H4 eine vergleichbare Tenazität aufweist. EHEC sind widerstandsfähig gegenüber Austrocknen, Einfrieren und Säuern, sodass sie in der Umwelt (Boden, Wasser, Fäkalien) über Wochen und Monate überleben können.

EHEC-Bakterien des Serovars O157:H7 haben die Fähigkeit, sowohl abiotische (Saldaña et al., 2009) als auch biotische Oberflächen, wie z.B. Kopfsalat, mit Biofilmen zu besiedeln (Takeuchi et al., 2000). In Biofilmen sind diese Bakterien widerstandsfähiger gegenüber Reinigungsmitteln als in freien Lebensformen (Stopforth et al., 2003). Die Tenazitätserhöhung der EHEC-Bakterien hängt stark von der Lebensmittelmatrix und den begleitenden biotischen und abiotischen Faktoren ab. Zum Beispiel wird die Tenazität verstärkt, wenn der Biofilm neben den EHEC-Bakterien aus weiteren bakteriellen Gruppen besteht und der Biofilm neben den EHEC-Bakterien aus weiteren bakteriellen Gruppen besteht und der Biofilm die ersten 48 Stunden ungestört bleibt (Stopforth et al., 2003). Auch auf der Oberfläche von Eisbergsalat und Romanasalat können EHEC in wenigen Stunden Biofilme (Patel et al., 2011) bilden. Daher können auch Salatmischungen, zu denen bereits Bockshornklee hinzugegeben wurde, auch nach der Entfernung des Bockshornklee mit dem Erreger kontaminiert sein.

Da die Persistenz des Erregers in Lebensmitteln von der Matrix und der angewandten Lebensmitteltechnologie abhängig ist, sind für die Einschätzung der Wirkung der einzelnen Verfahren neben Kenntnissen zum Verfahren selbst auch genaue Detailinformationen zur Matrix erforderlich. Insbesondere für ölhaltige Produkte ist bekannt, dass die Tenazität von Pathogenen deutlich höher ist. Ebenso ist in Biofilmen ein längeres Überleben belegt. Durch Verfahren wie Reifen, Trocknen und Säuern wird der Erreger nicht ausreichend inaktiviert (Mathusa et al., 2010). Auch gegenüber Salz können EHEC-Keime unempfindlich sein. Viele EHEC-Stämme können sich bei Salzkonzentrationen von 4 bis 5 % bei Raumtemperatur (25 °C) vermehren und manche Stämme überleben selbst 15%-ige Salzkonzentrationen für mindestens 24 Stunden ebenfalls bei Raumtemperatur (Olesen und Jespersen, 2010; Chevillat et al., 1996).

Tenazität gegenüber Hitze, Hochdruck und Bestrahlung

Aus geschmacklichen und technologischen Gründen werden Bockshornkleesamen vor der Zugabe zu Lebensmitteln üblicherweise erhitzt. Für EHEC O157:H7 sind D-Werte (Zeit zur Abtötung von 90 % der Mikroorganismen einer Population) für Lebensmittel wie Fleisch und Milch bekannt. Diese liegen ähnlich wie bei anderen *E. coli*-Typen im Temperaturbereich von 57 bis 64 °C bei Zeiten zwischen 270 und 9,6 Sekunden. Der Fettgehalt und das Trocknen von Lebensmitteln können allerdings den D-Wert erhöhen. Für eine Keimreduktion von EHEC um mindestens 2 log-Stufen in und auf Bockshornkleesamen müssen deshalb höhere Temperaturen eingesetzt werden, z.B. in feuchtem Milieu mindestens 72 °C für 2 Minuten im Kern oder eine in der Wirkungsweise vergleichbare Temperatur-Zeit-Kombination. Bei der alleinigen Anwendung von Trockenhitze müssen im Temperaturbereich von 70 °C abhängig vom a_w -Wert Erhitzungszeiten von etwa 5 bis 10 Stunden eingehalten werden, wie Studien von Beuchat und Scouten im Jahr 2002 zur Hitzeresistenz von *E. coli* O157:H7 auf Alfalfa-Samen zeigten.

Bei Samen zur Sprossenherstellung werden meist im Sinne eines Hürdenprinzips Kombinationen aus mehreren milden Reduktionsverfahren für Bakterien angewandt, um die Keimfähigkeit der Samen nicht zu beeinträchtigen. Studien zur Inaktivierung von EHEC O157:H7 durch thermische Behandlungen von Sprossensamen haben gezeigt, dass erst bei einer Anwendung von Trockenhitze bei 70 °C für 24 Stunden oder bei 70 °C für 6 Stunden gefolgt von einer Hochdruckbehandlung (600 MPa) für 2 min bei 35 °C eine Keimreduktion um 5 log-Stufen erreicht werden konnte (Neetoo und Chen, 2011). Nach bisherigem Erkenntnisstand soll auch eine Wärmebehandlung von 50 °C für eine Stunde gefolgt von gleichmäßig verteilter Gamma-Bestrahlung (2 bis 2,5 kGy) für eine Reduktion von EHEC O157:H7 um 4 bis 5 log-Stufen bei unterschiedlichen Sprossensamen geeignet sein.

Nach derzeitigem Kenntnisstand ist davon auszugehen, dass das Bestrahlen der Samen, wie für Gewürze nach Lebensmittelbestrahlungsverordnung zugelassen, die Konzentration an EHEC um mindestens 2 log-Stufen reduzieren kann.

Tenazität gegenüber chemischen Behandlungsverfahren

Bei Behandlungen von Sprossensamen mit chemischen Verfahren ist davon auszugehen, dass sie nicht geeignet sind, gegebenenfalls in den Samen vorhandene Erreger zu eliminieren.

Zur Konservierung von Lebensmitteln eingesetztes Schwefeldioxid kann eine Keimreduzierung bewirken. Schwefeldioxid (SO₂) ist als Konservierungs- und Antioxidationsmittel für verschiedene Lebensmittel zugelassen (E220). Zum Einsatz kommt SO₂ unter anderem für Trockenfrüchte, aber auch z.B. bei getrockneten Kartoffelerzeugnissen oder getrockneten oder tiefgefrorenen weißen Gemüsesorten, wobei produktspezifische Höchstmengen zugelassen sind. In der Weinherstellung ist der Einsatz von Schwefeldioxid weit verbreitet. Eine Keimreduzierung von EHEC O157:H7 um bis zu 5 log-Stufen konnte beispielsweise in verschiedenen sauren Apfelsaftprodukten durch einen Einsatz von 50ppm SO₂ erzielt werden (Basaran-Akgul et al., 2009).

Auch Ethanol als eine der bekanntesten antimikrobiellen Substanzen beeinflusst das Überleben von EHEC O157:H7. Die Größenordnung der Keimreduktion lässt sich jedoch derzeit nicht abschätzen.

Versuche zur Dekontamination von mit EHEC O157:H7 kontaminierten Lebensmitteln mit 0,5, 1,0 und 1,5%-igen organischen Säuren haben sich als ineffektiv gezeigt und unterstrei-

chen die Säuretoleranz dieses Erregers (Brackett et al., 1994). Im Labor lässt sich zeigen, dass Kulturen mit 3×10^4 KbE/ml EHEC O157:H7 nach 24 stündiger Inkubation sowohl bei 4 °C als auch bei 24 °C bei pH 3,4 und pH 11 stabil sind. Bei pH 2 findet nur eine leichte Reduktion (0,5 – 1 log) der Keimzahl statt (Miller und Kaspar, 1994). Versuche mit künstlichem Magensaft weisen darauf hin, dass nicht nur EHEC O157:H7 bei pH 1,5 überlebt, sondern auch andere Pathotypen wie Enteropathogene *E. coli* extrem säuretolerant sind (Arnold und Kaspar, 1995). Aufgrund dieser Datenlage und der Fähigkeit des Ausbruchsstammes zur Bildung von Biofilmen sollte generell von einer erhöhten Unempfindlichkeit gegenüber chemischen Behandlungen ausgegangen werden.

Untersuchungsergebnisse konnten zeigen, dass auch Behandlungen von Sprossensamen mit Chlorlösungen, die beispielweise 2 %-iges Chlor aus Calciumhypochlorit enthalten, keine vollständige Elimination von EHEC-Keimen ermöglichen (Fett et al., 2005). Möglicherweise liegt diese Beobachtung unter anderem daran, dass diese Keime in Biofilmen eine erhöhte Chlortoleranz zeigen. So ist bei Bakterien in Biofilmen mit einer um das 100-fach erhöhten Chlortoleranz zu rechnen (Prof. Exner, Uni Bonn, persönliche Mitteilung vom 21. Juni 2011).

Da es sich bei EHEC O104:H4 um einen neuen, sehr pathogenen Erreger handelt, sollte er hinsichtlich seiner Eigenschaften, einschließlich seiner Überlebensfähigkeit und seines Wachstumsverhaltens in verschiedenen Matrices, näher charakterisiert werden.

3.1.2 Zum Gefährdungspotenzial im EHEC O104:H4-Ausbruchsgeschehen

Die Infektionsdosis des bekannten Ausbruchserregers EHEC O157 ist sehr gering und liegt bei unter 100 Keimen. Über die Infektionsdosis des enteroaggregativen EHEC O104:H4 liegen keine Angaben vor, es ist jedoch davon auszugehen, dass sie ebenfalls sehr niedrig ist.

Derzeit ist davon auszugehen, dass sich der Erreger in der Umwelt oder in den Produkten nicht vermehren muss, um den Menschen zu infizieren. Eine effiziente Vermehrung des Erregers scheint insbesondere im Magen-Darm-Trakt des Menschen zu erfolgen. Hierdurch können dann auch schwerwiegende Krankheitsverläufe ausgelöst werden.

Im Mai und Juni 2011 kam es zu einem gehäuften Auftreten des sogenannten hämolytisch-urämischen Syndroms (HUS) und blutigen Diarrhöen im Zusammenhang mit Infektionen durch enteroaggregative EHEC O104:H4. Die Mehrzahl der durch den Ausbruchserreger verursachten Erkrankungen trat als unblutiger, meistens wässriger Durchfall in Erscheinung. Bei einem Teil der Erkrankten entwickelte sich eine hämorrhagische Kolitis mit krampfartigen Bauchschmerzen, blutigem Stuhl und teilweise Fieber. EHEC-Infektionen können jedoch auch inapparent und damit unbemerkt verlaufen. Eine gefürchtete Komplikation ist das HUS. Das Vollbild des HUS ist charakterisiert durch akutes Nierenversagen bis zur Anurie, hämolytische Anämie (Blutarmut) und Thrombozytopenie (Mangel an Blutplättchen). Typischerweise gehen dem HUS Diarrhöen, oft blutig, voraus. Diese schwere Komplikation tritt in etwa 5 bis 10 % der symptomatischen EHEC-Infektionen auf. Hierbei kommt es häufig zur kurzzeitigen Dialysepflicht, seltener zum irreversiblen Nierenfunktionsverlust mit chronischer Dialyse. In der Akutphase liegt die Letalität des HUS bei ungefähr 2 %.

Im Rahmen des Ausbruchs durch den Serotyp O104:H4 wurden bei klinisch erkrankten Personen auch häufig neurologische Symptome beobachtet, was möglicherweise daran liegt, dass es sich eher um einen enteroaggregativen Stamm handelt mit der Eigenschaft des EHEC, Shigatoxin zu bilden.

Die Inkubationszeit beträgt bei EHEC-Infektionen üblicherweise ca. 2 bis 10 Tage (durchschnittlich 3 bis 4 Tage), wobei diese Daten im Wesentlichen auf Untersuchungen zu EHEC der Serogruppe O157 beruhen. Im durch enteroaggregativen EHEC O104:H4 ausgelösten Ausbruchsgeschehen wird von einer medianen Inkubationszeit von 8 Tagen (Interquartil-

sabstand 7-9 Tage) ausgegangen. Die Symptome EHEC-assoziiierter HUS-Erkrankungen begannen in diesem Ausbruch im Median 5 Tage (Interquartilsabstand 4-6 Tage) nach Beginn des Durchfalls (Datenstand 18.06.2011).

Für weitergehende Informationen wird auf die Risikobewertung des BfR vom 5. Juli zur Bedeutung von EHEC O104:H4 in Sprossen und Keimlingen sowie Sprossensamen im Ausbruchsgeschehen im Mai und Juni 2011 verwiesen.

3.1.3 Expositionsabschätzung

Dem Bockshornklee werden verschiedene Wirkungen zugesprochen. Bockshornklee­sa­men enthalten neben Eiweiß etwa 6 bis 10 % Fett, Saponine, Bitterstoffe, Schleimstoffe und Vitamine. Die Samen haben einen leicht bitteren Geschmack, der durch Kochen oder Rösten verschwindet.

Quantitative Daten zu Keimkonzentrationen von pathogenen Lebensmittelkeimen auf Sprossensamen sind limitiert. Quantitative Analysen von Samen, deren Sprossen nach Verzehr zu Krankheit führten, ergaben Keimzahlen im Bereich von weniger als 1 bis 6 KbE/100 g Samen. Bei mikrobiologischen Untersuchungen im Rahmen der intensiven Untersuchungsaktivitäten der Länder zum EHEC-Ausbruchsgeschehen wurden nur in einer von über 900 untersuchten Proben von Sprossen sowie Samen zu deren Herstellung EHEC-Bakterien gefunden. Ein Nachweis gelang lediglich in einer Sprossenmischung aus einer geöffneten Packung, die bei einer erkrankten Person aus dem Küchenabfall entnommen wurde.

Experimentelle Untersuchungen haben gezeigt, dass einige EHEC-Stämme über die Wurzeln auch in das Innere von Pflanzen eindringen können. Bei Alfalfa wurde die Aufnahme von pathogenen und apathogenen Bakterien in das Innere der Samen schon festgestellt. Es wird angenommen, dass durch Risse in den Seitenwurzeln Bakterien einen Eintritt in die Pflanze erhalten (Dong et al., 2003). Für Bockshornklee­sa­men ist dies bisher noch nicht bekannt.

Die Überlebensfähigkeit von EHEC-Bakterien in Erzeugnissen aus Bockshornklee­sa­men ist abhängig von den angewandten Aufbereitungsverfahren. Wird Bockshornklee in Form eines Extrakts verwendet, ist davon auszugehen, dass die vorhandene Bakterienkonzentration durch Extraktionsmittel (z.B. Ethanol) und Hitze­ein­wirkung reduziert wird. Ob dieser Effekt zu einer vollständigen Eliminierung möglicherweise vorhandener enteroaggregativer EHEC O104:H4 führt, kann derzeit jedoch nicht abgeschätzt werden. Hingegen ist bei Bockshornklee­sa­menpulver von einer Überlebensfähigkeit auszugehen, weil bei der Reinigung, Vermahlung und dem Einmischen eines Bockshornklee­sa­menpulvers keine erhöhten Temperaturen zu erwarten sind.

Verarbeitung von Bockshornklee­sa­men bei der Herstellung von Lebensmitteln

Käse

Bockshornklee­sa­men sind in einigen jungen und mittelalten Schnittkäse als Zutat enthalten, um diesen eine nussige Note zu verleihen. Bockshornklee­sa­men werden vor der Zugabe zu Käse aus geschmacklichen und technologischen Gründen üblicherweise erhitzt. Ob dies in jeder Käserei so gehandhabt wird und welche Temperaturen dabei erreicht werden, ist dem BfR nicht bekannt. Käse mit Bockshornklee­sa­men werden auch von kleinen Käsereien hergestellt und über das Internet vertrieben. Junger Schnittkäse reift bis zu 5 Wochen, mittelalter Schnittkäse dagegen bis zu 3 Monate. Es ist davon auszugehen, dass die Prozesse der

Käseherstellung keinen Einfluss auf das Überleben möglicherweise im Innern der Bockshornkleesamen vorkommenden enteroaggregativen EHEC O104:H4 haben. Aber auch das Überdauern äußerlich an Samen anhaftender Erreger ist nicht unwahrscheinlich, da sich auch in halbfesten Schnittkäse aus Rohmilch EHEC anderer Serotypen nachweisen lassen (Zweifel et al., 2010).

Gewürzmischungen und Würzmittel

Bockshornkleesamen werden in gemahlenem Zustand für die Herstellung von Gewürzmischungen, vor allem Currypulver, verwendet. Insbesondere in indischen Currygewürzmischungen sind Bockshornkleesamen ein üblicher Bestandteil.

Bei der Herstellung von Gewürzen können zur Keimreduzierung thermische Verfahren wie Heißwasserdampfbehandlung oder Bestrahlung eingesetzt werden. Als thermische Inaktivierungsverfahren eignen sich sowohl Extruder- als auch Vakuumverfahren. Extruderverfahren erreichen bei Gewürzen eine Keimreduktion von ca. 10^2 KbE/g. Mit Vakuumverfahren kann die Kontamination von Gewürzen auf Keimzahlen von deutlich unter 5000 KbE/g reduziert werden. In beiden Verfahren wird Heißdampf eingesetzt, dessen Temperatur jedoch produktspezifisch angewandt wird. Dennoch kann angenommen werden, dass bei industriellen Herstellungsverfahren für Gewürze geringe Konzentrationen von enteroaggregativem EHEC O104:H4 eliminiert werden würden.

Bei der Bestrahlung von Gewürzen und getrockneten aromatischen Kräutern darf gemäß §1, Abs.2, Nr.1 der Verordnung über die Behandlung von Lebensmitteln mit Elektronen-, Gamma- und Röntgenstrahlen, Neutronen oder ultravioletten Strahlen (Lebensmittelbestrahlungsverordnung - LMBestV) die durchschnittliche absorbierte Gesamtdosis 10 Kilogray nicht übersteigen. Diese Strahlendosis wäre geeignet, um möglicherweise in geringer Menge vorkommende enteroaggregative EHEC O104:H4 abzutöten.

Bockshornkleesamen werden zudem auch „pur“ oder als Samenmehl zum Würzen bzw. zur eigenen Herstellung von Gewürzmischungen angeboten.

Außerdem werden Bockshornkleesamen zur Herstellung bestimmter Senfspezialitäten eingesetzt. Die Herstellung von Senf beinhaltet im wesentlichen Mahl- und Mischprozesse sowie eine gewisse Gärzeit, um das typische Senfaroma zu erzeugen. Während der Mahlvorgänge dürfen Temperaturen von 50 °C nicht überschritten werden, damit die flüchtigen Aromastoffe erhalten bleiben. Traditionell hergestellte Senfsorten enthalten in der Regel keine Konservierungsstoffe. Sollte bei der Senfherstellung Bockshornklee-Samenmehl verarbeitet werden, ist nicht zu erwarten, dass durch die Prozesse der Senfherstellung möglicherweise vorhandene enteroaggregative EHEC O104:H4 vollständig abgetötet werden. Deshalb sollten Erzeugnisse aus Bockshornkleesamen, die zu Senf weiterverarbeitet werden, vor der Zugabe mit einem geeigneten Keim reduzierenden Verfahren behandelt werden.

Bockshornkleesamenextrakt wird aus geschmacklichen Gründen auch flüssigen Würzsoßen (z.B. Soja- und Fischsoßen) zugesetzt. Es ist davon auszugehen, dass die vorhandene Bakterienkonzentration durch den Extraktionsschritt reduziert wird. Ob dieser Effekt jedoch zu einer vollständigen Eliminierung möglicherweise vorhandener enteroaggregativer EHEC O104:H4 führt, kann derzeit nicht abgeschätzt werden. Sollte bei der Zubereitung der Würzsoßen eine weitere Erhitzung auf mindestens 72 °C erfolgen, ist ein Überleben des Erregers unwahrscheinlich.

Tee

Erzeugnisse aus Bockshornkleesamen sind auch in bestimmten Stilltees enthalten (Aufgussbeutel). Es ist nach derzeitigem Kenntnisstand davon auszugehen, dass das Aufbrühen mit kochendem Wasser und mindestens 5-minütige Ziehenlassen des Tees äußerlich anhaftende EHEC-Keime ausreichend abtöten könnte, so dass keine Infektionsgefahr mehr bestünde, da die Samen selbst nicht verzehrt werden.

Nahrungsergänzungsmittel

Es gibt eine Vielzahl von Nahrungsergänzungsmitteln, z.B. in Form von Kapseln, welche Erzeugnisse aus Bockshornkleesamen häufig in Verbindung mit anderen Komponenten enthalten. Verarbeitet wird Samenextrakt oder -pulver, wobei die Überlebensfähigkeit von EHEC in Samenpulver höher sein dürfte als in Samenextrakten. Aufgrund der Vielzahl der in diesem Bereich tätigen Hersteller und verwendeten Herstellungsverfahren kann keine allgemeine Aussage zur Überlebensfähigkeit von EHEC in Nahrungsergänzungsmitteln getätigt werden. Nach Kenntnis des BfR wird bei manchen Produkten „aktivierter Bockshornklee“ verwendet, zur Aktivierung werden die Samen einer speziellen thermischen Behandlung unterzogen. Häufig wird aber bei der Herstellung dieser Präparate bewusst auf eine thermische Prozessierung der Samen verzichtet. Insbesondere bei diesen Präparaten muss davon ausgegangen werden, dass vorhandene EHEC-Bakterien überleben können.

In der Vergangenheit sind bereits Fälle bekannt geworden, bei denen eine Kontamination von Nahrungsergänzungsmitteln zu Erkrankungen führte, z.B. durch Salmonellen in hanf-basierten Produkten. Verschiedene Hersteller weisen explizit auf eine thermische Behandlung ihrer Produkte bzw. der einzelnen Zutaten hin.

3.1.4 Risikocharakterisierung

Nachfolgend wird das Verbraucherrisiko charakterisiert, das von unterschiedlich behandelten Erzeugnissen aus mit dem gefährlichen Keim kontaminierten Bockshornkleesamen ausgeht, die zu anderen Lebensmitteln als Sprossen und Keimlingen weiterverarbeitet wurden. Nicht betrachtet wird das Risiko, dass EHEC-Bakterien auf einer Vielzahl von abiotischen Flächen Biofilme bilden können und daher auch alle während der Handhabung von kontaminierten Samen und Erzeugnissen daraus verwendeten Gerätschaften zu einer kontinuierlichen Kontamination beitragen können.

Situation 1:

Mit enteroaggregativem EHEC O104:H4 kontaminierte Bockshornkleesamen wurden zu Lebensmitteln (außer Sprossen und Keimlingen) weiterverarbeitet und vorher gar nicht oder nur unzureichend behandelt, so dass der Erreger nicht vollständig abgetötet wurde.

Es ist möglich, dass Material aus dem Lagerbestand mindestens einer kontaminierten Bockshornklee-Samencharge in einem Herstellerbetrieb für Lebensmittel einschließlich Nahrungsergänzungsmitteln zur Verwendung kam. Sollten kontaminierte Bockshornkleesamen verarbeitet worden sein, ohne dass sie vorher ausreichend behandelt wurden, muss in Abhängigkeit von weiteren technologischen Effekten mit einem Überleben des Erregers in Käse, Senf, Tee-Aufgussbeuteln und Nahrungsergänzungsmitteln gerechnet werden. Das Risiko einer Infektion mit enteroaggregativem EHEC O104:H4 bestünde insbesondere beim unmittelbaren Verzehr dieser Käse und Senfsorten sowie von Nahrungsergänzungsmitteln.

teilen mit Bockshornkleesamen und -samenpulver. Weitere Krankheitsausbrüche durch enteroaggregativen EHEC O104:H4 wären möglich.

Eine Infektion nach Verzehr von Nahrungsergänzungsmitteln und flüssigen Würzsoßen aus Samenextrakt wäre hingegen wenig wahrscheinlich. Bei sachgerechter Zubereitung von Tee bestünde nach derzeitiger Einschätzung kein Infektionsrisiko.

Situation 2:

Mit enteroaggregativem EHEC O104:H4 kontaminierte Bockshornkleesamen wurden zu anderen Lebensmitteln als Sprossen und Keimlingen weiterverarbeitet und vorher so behandelt, dass der Erreger vollständig abgetötet wurde.

Sollten kontaminierte Bockshornkleesamen vor der weiteren Verarbeitung ausreichend behandelt worden sein und wäre eine Rekontamination mit enteroaggregativen EHEC O104:H4 unmöglich, kann davon ausgegangen werden, dass auch von Käsesorten, Senf und Nahrungsergänzungsmitteln mit Erzeugnissen aus Bockshornkleesamen keine Gefahr für die menschliche Gesundheit ausgeht.

Bewertung der Schwere der gesundheitlichen Beeinträchtigung

Die gesundheitlichen Beeinträchtigungen sind als schwer zu beurteilen. Es handelt sich um ein sehr schweres Krankheitsbild, das von blutigem Durchfall über Nierenversagen mit Dialysepflicht und schweren neurologischen Symptomen bis zum Tode führen kann. Wie lange die gesundheitlichen Schäden bestehen bleiben, ob sie zu chronischen Verläufen (z.B. in Form bleibender Nierenschäden) führen oder reversibel sind und welche Spätschäden auftreten können, kann zum augenblicklichen Zeitpunkt noch nicht abgeschätzt werden. Auch weitere Todesfälle können nicht ausgeschlossen werden.

Bewertung der Qualität der Daten

Verarbeitungsverfahren

Der derzeitige Kenntnisstand zur Verwendung von Bockshornkleesamen außerhalb der Sprossenproduktion sowie der Herstellungsverfahren für Produkte, die Bockshornkleesamen enthalten, ist gering. Die Herstellungsverfahren können abhängig von Hersteller und Produkt sehr unterschiedlich sein und sind dem BfR deshalb im Einzelnen nicht bekannt.

Tenazität des Erregers

Die Qualität der Daten bezogen auf den Ausbruchserreger ist als sehr lückenhaft einzuschätzen. Zur Abschätzung der möglichen Gefahren wurden daher als Leitkeime EHEC-Erreger und EAggEC herangezogen. Doch auch bei diesen Keimarten sind die Daten als unvollständig hinsichtlich der zu bewertenden Produkte und betrachteten Herstellungsverfahren anzusehen. Diese Unsicherheit wurde bei der Bewertung entsprechend berücksichtigt.

4. Fazit und Handlungsempfehlungen

Die Rückverfolgung von Samenlieferungen in Deutschland und anderen EU-Staaten durch die deutschen Behörden und die Task Force der EFSA haben ergeben, dass bestimmte Chargen von Bockshornkleesamen mit den EHEC-Ausbrüchen in Deutschland und Frankreich in Verbindung stehen, was durch die Risikobewertung der EFSA und ECDC vom 29.

Juni 2011 bestätigt wurde. Nach Angaben der EFSA wurden diese Chargen aus Ägypten importiert.

Bockshornkleesamen werden nicht nur für die Sprossenherstellung verwendet, sondern finden sich in einer Vielzahl verschiedener Produkte, beispielsweise in Currygewürz und Nahrungsergänzungsmitteln. Dem BfR ist derzeit nicht bekannt, ob Material aus dem Lagerbestand mindestens einer kontaminierten Bockshornklee-Samencharge in einem Herstellerbetrieb für Lebensmittel einschließlich Nahrungsergänzungsmitteln zur Verwendung kam.

Bisher gibt es keine Evidenz, dass außer Sprossen auch andere, aus Bockshornkleesamen hergestellte Produkte enteroaggregative EHEC O104:H4-Infektionen verursacht haben. Dennoch muss die Möglichkeit in Betracht gezogen werden, dass vereinzelt Erreger unter bestimmten Bedingungen in oder auf den Samen überleben und sich im Darm des Menschen wieder vermehren können. Für den Zeitraum, in dem der Erreger auf oder in Samen überlebensfähig ist, besteht daher bei unzureichend behandelten Samen die Möglichkeit einer Übertragung des Erregers auf den Menschen über die Samen selbst oder über daraus hergestellte Produkte.

Es liegen wenig oder fast keine Kenntnisse über das Verhalten und die Überlebensfähigkeit enteroaggregativer EHEC O104:H4 allein oder als Teil eines Biofilms in der Umwelt, auf oder in Lebensmitteln und im Hinblick auf eine mögliche Kolonisation von Tieren vor. Die Risikobewertung inklusive der abgeleiteten Empfehlungen stützt sich deshalb weitgehend auf Erkenntnisse zum Verhalten anderer EHEC-Stämme (z.B. EHEC O157:H7) unter der Annahme, dass enteroaggregative EHEC O104:H4 eine vergleichbare Tenazität aufweisen. Zur Bewertung der Tenazität des Ausbruchserregers O104:H4 ist die Durchführung weiterer wissenschaftlicher Studien notwendig.

In der wissenschaftlichen Literatur werden überwiegend Kombinationen verschiedener Behandlungsverfahren für Sprossensamen beschrieben, die eine Keimreduktion um 5 log-Stufen bei Erhalt der Keimfähigkeit sicher stellen sollen, obwohl in dieser Matrix nur geringe Konzentrationen an pathogenen Keimen erwartet werden. Dies ist für Samen zur Sprossenherstellung notwendig, weil durch die mesothermen und feuchten Bedingungen während der Sprossenanzucht ein erhebliches Keimwachstum stattfindet.

Aus Sicht des BfR ist es nicht erforderlich, vergleichbare Anforderung an die Dekontamination von Bockshornkleesamen zu stellen, welche zu anderen Produkten außer Sprossen weiterverarbeitet werden, sofern keine Vermehrung von enteroaggregativem EHEC O104:H4 nach Zugabe der Samen erfolgen kann. Unter dieser Voraussetzung sieht das BfR Behandlungsverfahren für diesen Zweck als geeignet an, die den Modellkeim EHEC O157:H7 in und auf Samen um mindestens 2 log-Stufen reduzieren können.

Dazu können Erhitzungsverfahren angewandt werden, wie sie auch für andere Lebensmittel üblich sind. Aus geschmacklichen und technologischen Gründen werden Bockshornkleesamen vor der Zugabe zu Lebensmitteln üblicherweise erhitzt. Eine Erhitzung auf mindestens 72 °C für 2 Minuten im Kern oder eine in der Wirkungsweise vergleichbare Temperatur-Zeit-Kombination ist für die Abtötung des Erregers in den meisten Lebensmitteln geeignet. Das trifft auch für die Abtötung des Erregers in Samen zu, sofern ein feuchtes Milieu vorliegt (z.B. durch Einsatz von Heißwasserdampf). Bei alleiniger Anwendung von Trockenhitze sind bei Temperaturen um die 70 °C Erhitzungszeiten von mehreren Stunden erforderlich. Außerdem wird vom BfR das Bestrahlen der Samen, wie für Gewürze nach Lebensmittelbestrahlungsverordnung zugelassen, als hinreichend für diesen Verwendungszweck eingeschätzt.

Chemische Behandlungsverfahren, inklusive Einsatz von Chlorlösungen oder Zusatz von Schwefeldioxid (SO₂), sind grundsätzlich nicht dazu geeignet, Erreger, die sich möglicherweise im Inneren der Bockshornkleesamen befinden, zu eliminieren.

Vor dem Hintergrund der Schwere der Erkrankungen werden vom BfR nach dem gegenwärtigen Stand des Wissens zum Schutz der Verbraucherinnen und Verbraucher folgende Empfehlungen zur Risikominimierung ausgesprochen, auch wenn es bisher keine Anhaltspunkte dafür gibt, dass in Deutschland andere Produkte als Sprossen Infektionen mit enteroaggregativen EHEC O104:H4 ausgelöst haben:

- Empfänger zurückgerufener Bockshornklee-Samenchargen sollten notwendige Maßnahmen der Risikominimierung hinsichtlich ihrer eigenen Lagerbestände sowie ihrer hergestellten Produkte treffen. Deshalb sollten sie prüfen, ob ihre Herstellungsverfahren geeignet sind, den Erreger in und auf den Bockshornkleesamen vollständig abzutöten, so dass von den Produkten für Menschen kein Infektionsrisiko ausgeht und kein Eintrag in die Umwelt erfolgt. Im Zweifelsfall sollten sie die hergestellten Produkte vom Markt nehmen. Die Empfänger dieser Chargen sollten außerdem abklären, ob eine Kreuzkontamination weiterer Rohstoffe bei der Lagerung oder bei der Verarbeitung der Samen stattgefunden haben kann.
- Die zuständigen Überwachungsbehörden sollten Empfänger von Bockshornklee-Samenchargen, die nach den Erkenntnissen aus der in Deutschland und auf EU-Ebene durchgeführten Rück- und Vorwärtsverfolgung mit enteroaggregativen EHEC O104:H4 kontaminiert sein könnten, auf die mögliche Gesundheitsgefahr ausgehend von den Samen sowie daraus hergestellter Produkte hinweisen. Nachfolgend sollten sie gemeinsam mit dem Betrieb prüfen, ob die Einleitung von Maßnahmen zur Risikominimierung notwendig ist.
- Lebensmittelunternehmen, die Bockshornkleesamen weiterverarbeiten, sollten die im Rahmen des HACCP (Hazard Critical and Control Points)-Konzepts durchzuführende Gefahrenanalyse anlässlich des EHEC O104:H4-Ausbruchs überprüfen und ggf. anpassen. Da pathogene Keime möglicherweise über die Wurzeln auch in das Innere von Pflanzen eindringen können, sollten auch Samen in jedem Fall vor der Weiterverarbeitung so behandelt werden, dass ggf. im Samenkern vorhandene Krankheitserreger sicher abgetötet werden.
- Verbraucherinnen und Verbraucher sollten Kräutertees, auch solche mit Bockshornkleesamen, mit sprudelnd kochendem Wasser aufgießen und mindestens 5 Minuten ziehen lassen. Da Kräutertees mit Krankheitserregern belastet sein können, ist Wasser aus Heißwasserspendern grundsätzlich nicht für die Zubereitung von Kräutertees geeignet. Darauf hatte das BfR bereits im Jahr 2005 in einer Stellungnahme hingewiesen.
- Das BfR empfiehlt Verbraucherinnen und Verbrauchern, Bockshornkleesamen vor der Weiterverarbeitung im Privathaushalt z.B. durch Rösten in der Pfanne kräftig zu erhitzen, um ggf. auf oder in den Samenkörnern vorhandene Krankheitserreger abzutöten. Noch vorhandenes Samenmehl und daraus selbst hergestellte Gewürzmischungen aus unbehandelten Bockshornkleesamen sollten vorsichtshalber nicht verzehrt, sondern im Restmüll entsorgt werden.

- Grundsätzlich rät das BfR, die Überlebensfähigkeit und das Wachstumsverhalten von enteroaggregativem EHEC O104:H4 im Rahmen von wissenschaftlichen Tenazitätsstudien weiter zu erforschen.

5. Referenzen

Arnold, K. W., und Kaspar, C. W. (1995) Starvation- and stationary-phase-induced acid tolerance in *Escherichia coli* O157:H7. *Appl Environ Microbiol* 61. 2037–2039.

Basaran-Akgul et al. (2009). Inactivation of different strains of *Escherichia coli* O157:H7 in various apple ciders treated with dimethyl dicarbonate (DMDC) and sulfur dioxide (SO₂) as an alternative method. *Foodmicrobiology* 26, 8-15

Beuchat, L.R. und Scouten, A.J. (2002). Combined effects of water activity, temperature and chemical treatments on the survival of *Salmonella* and *Escherichia coli* O157:H7 on alfalfa seeds. *J. Appl. Microbiol.* 92, 382-395

BfR, Stellungnahme Nr. 045/2005 vom 13. September 2005. Temperierte Heißwasserspender für Kräuterteeaufgüsse nicht geeignet
http://www.bfr.bund.de/cm/343/temperierte_heisswasserspender_fuer_kraeuterteeaufguesse_nicht_geeignet.pdf

Brackett, R. E., Hao, Y-Y., Doyle, M. P. (1994). Ineffectiveness of hot acid sprays to decontaminate *Escherichia coli* O157:H7 on beef. *J Food Prot* 57, 198-203.
http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S147330990100144X?_fmt=full&_origin=&md5=7bcf780d0ad55e08c858017474822c86&ref=full

Cassar, C. A., Ottaway, M., Paiba, G. A., Futter, R., Newbould, S. & Woodward, M. J. (2004). Absence of enteroaggregative *Escherichia coli* in farmed animals in Great Britain. *Vet Rec* 154. 237–239.

CCFH (2010). Code of Hygienic Practice for Fresh Fruits and Vegetables. CAC/RCP 53-2003. In: FOA/WHO: Fresh Fruits and Vegetables. First Edition. ISBN 978-92-5-105839-8, 2007. Revision 2010 (new Annex III for Fresh Leafy Vegetables).
<ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/010/a1389e/a1389e00.pdf>

Cheville AM, Arnold KW, Buchrieser C, Cheng CM, Kaspar CW. rpoS regulation of acid, heat, and salt tolerance in *Escherichia coli* O157: H7. *Appl. Environ. Microbiol.* 1996;62:1822–1824.

Dong Y, Iniguez AL, Ahmer BM, Triplett EW. 2003. Kinetics and strain specificity of rhizosphere and endophytic colonization by enteric bacteria on seedlings of *Medicago sativa* and *Medicago truncatula*. *Appl. Environ. Microbiol.* 69:1783–90

EFSA (2011). Technischer Bericht der EFSA: „Tracing seeds, in particular fenugreek (*Trigonella foenum-graecum*) seeds, in relation to the Shiga toxin-producing *E. coli* (STEC) O104:H4 2011 Outbreaks in Germany and France“ vom 05. Juli 2011).

EU-Kommission (2011). Durchführungsbeschluss der Kommission vom 06. Juli 2011 über Sofortmaßnahmen hinsichtlich Bockshornkleesamen sowie bestimmter Samen und Bohnen aus Ägypten. (2011/402/EU)

Prof. M. Exner, Universität Bonn, persönliche Mitteilung vom 21. Juni 2011

Fett, W., M.L. Tortorello, and T.J. Fu. 2005. Seed sprouts: the state of microbiological safety. *Microbiology of Fresh Produce*. p. 167-219.

Itoh, Y., Nagano, I., Kunishima, M. & Ezaki, T. (1997). Laboratory investigation of enteroaggregative *Escherichia coli* O untypeable:H10 associated with a massive outbreak of gastrointestinal illness. *J Clin Microbiol* 35. 2546–2550.

Mahon, B.E., A. Ponka, W. Hall, K. Komatsu, L. Beuchat, S. Shiflett, A. Siitonen, G. Cage, M. Lambert, P. Hayes, N. Bean, P. Griffin, and L. Slutsker (1997). An international outbreak of *Salmonella* infections caused by alfalfa sprouts grown from contaminated seed. *J. Infect. Dis.* 175:876-882.

Mathusa, E.C., Chen, Y.H., Enache, E., Hontz, L. (2010). Non-O157 Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* in Foods. *J. Food Prot.* 73(9), 1721-1736.

Miller, L., und Kaspar, C. W. (1994). *Escherichia coli* O157:H7 acid tolerance and survival in apple cider. *J Food Prot* 57. 460–464.

Morabito, S., Karch, H., Mariani-Kurkdjian, P., Schmidt, H., Minelli, F., Bingen, E. & Caprioli, A. (1998). Enteroaggregative, Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O111:H2 associated with an outbreak of hemolytic-uremic syndrome. *J Clin Microbiol* 36. 840–842.

Morais, T. B., Gomes, T. A., Sigulem, D. M. (1997). Enteroaggregative *Escherichia coli* in infant feeding bottles. *Lancet* 349. 1448–1449.

Neetoo, H., und Chen, H. (2011). Individual and combined application of dry heat with high hydrostatic pressure to inactivate *Salmonella* and *Escherichia coli* O157:H7 on alfalfa seeds. *Food Microbiology* 28. 119-127.

Okeke, I. N. and Nataro, J. P. (2001). Enteroaggregative *Escherichia coli*, *Lancet Infect Dis* 1. 304–313.

Olesen, I., and L. Jespersen. 2010. Relative gene transcription and pathogenicity of enterohemorrhagic *Escherichia coli* after long-term adaptation to acid and salt stress. *Int. J. Food Microbiol.* 141:248–253.

Patel, J., Sharma, M. and Ravishakar, S. (2011), Effect of curli expression and hydrophobicity of *Escherichia coli* O157:H7 on attachment to fresh produce surfaces. *J Appl Microbiol* 110. 737-745.

Puohiniemi, R., T. Heiskanen, and A. Siitonen. 1997. Molecular epidemiology of two international sprout-borne *Salmonella* outbreaks. *J. Clin. Microbiol.* 35:2487-2491.

Rajkowski K.T., G. Boyd, D.W. Thayer (2003). Irradiation D-values for *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* sp. on inoculated broccoli seeds and effects of irradiation on broccoli sprout keeping quality and seed viability. *J. Food Prot.*, Vol. 66 No. 5, 760-766

Saldaña, Z., Xicohtencatl-Cortes, J., Avelino, F., Phillips, A. D., Kaper, J. B., Puente, J. L. and Girón, J. A. (2009), Synergistic role of curli and cellulose in cell adherence and biofilm formation of attaching and effacing *Escherichia coli* and identification of Fis as a negative regulator of curli. *Environmental Microbiology* 11: 992–1006.

Scheutz, F., Møller Nielsen, E., Frimodt-Møller, J., Boisen, N., Morabito, S., Tozzoli, R. (2011). Characteristics of the enteroaggregative Shiga toxin/verotoxin-producing *Escherichia coli* O104:H4 strain causing the outbreak of haemolytic uraemic syndrome in Germany, May to June. *Euro Surveill* 16:pii=19889.

Stewart, D. S., Reineke, K. F., Tortorello, M.. (2002). Comparison of Assurance Gold Salmonella EIA, BAX for screening/Salmonella, and GENE-TRAK Salmonella DLP rapid assays for detection of Salmonella in alfalfa sprouts and sprout irrigation water. *J. AOAC Int* 85. 395-403.

Stöcker, C. (2002). Vorkommen von shigatoxinbildenden *Escherichia coli* (STEC) bei verschiedenen Nutz- und Kleintieren, Ludwig-Maximilians-Universität München, Dissertation
Stopforth, J. D., Samelis, J., Sofos, J. N., Kendall, P. A., Smith, G. C. (2003) Influence of extended acid stressing in fresh beef decontamination runoff fluids on sanitizer resistance of acid-adapted *Escherichia coli* O157:H7 in biofilms. *J Food Prot* 66. 2258–2266.

Takeuchi, K., Matute, C. M., Hassan, A. N., Frank, J. F. (2000) Comparison of the attachment of *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurium*, and *Pseudomonas fluorescens* to lettuce leaves. *J Food Prot* 63. 1433–1437.

Thayer D.W., K.T. Rajkowski, G. Boyd, P.H. Cooke, D.S. Soroka (2003). Inactivation of *Escherichia coli* and *Salmonella* by Gamma Irradiation of Alfalfa seed intended for production of food sprouts. *J. Food Prot.*, Vol 66 No.2 175-181

Uber, A. P., Trabulsi, L. R., Irino, K., Beutin, L., Ghilardi, A. C. R., Gomes, T. A. T., Liberatore, A. M. A., de Castro, A. F. P. and Elias, W. P. (2006). Enteroaggregative *Escherichia coli* from humans and animals differ in major phenotypical traits and virulence genes. *FEMS Microbiology Letters* 256: 251–257.

Verordnung über die Behandlung von Lebensmitteln mit Elektronen-, Gamma- und Röntgenstrahlen, Neutronen oder ultravioletten Strahlen (Lebensmittelbestrahlungs-verordnung - LMBestV)

Vigil, K. J., Jiang, Z. D., Chen, J. J. (2009). Coliform and *Escherichia coli* contamination of desserts served in public restaurants from Guadalajara, Mexico, and Houston, Texas. *Am J Trop Med Hyg* 80. 606-608.

Waite J.G., Daeschel M.A. (2007). Contribution of wine components to inactivation of food-borne pathogens. *Journal of Food Science*, Vol. 72 No. 7

Weber, H. (2003). Technologien für sichere Produkte – Überblick über die Möglichkeiten zur Entkeimung von Gewürzen, 1. Teil. *Fleischwirtschaft* 7/03, 33-36

Wilson, A., Evans, J., Chart, H., Cheasty, T., Wheeler, J. G., Tompkins, D., Smith, H. R. (2001). Characterisation of strains of enteroaggregative *Escherichia coli* isolated during the infectious intestinal disease study in England. *Eur J Epidemiol* 17. 1125-1130.

Zweifel, C., Giezendanner N., Corti S., Krause G., Beutin L., Danuser J., Stephan R. (2010). Characteristics of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* isolated from swiss raw milk cheese within a 3-year monitoring programme. *J. Food Prot.*, Vol. 73 No. 1, 88-91.

Internetquellen

<http://www.kraeuterland.net/Heilpflanzen/bockshornklee.shtml>

www.bockshornsamen.de

<http://www.dein-senf.de/senfherstellung.html>

http://www.wdr.de/tv/servicezeit/extras/dossier_essen_ist_leben/unsere_lebensmittel/kraeuter/senf.jsp