

Aus dem
Institut für Hygiene und Produktsicherheit
der Bundesanstalt für Milchforschung in Kiel
eingereicht über das Institut für Lebensmittelhygiene
des Fachbereiches Veterinärmedizin der Freien Universität Berlin

**UNTERSUCHUNGEN ZU VORKOMMEN UND VERBREITUNG VON
BACILLUS CEREUS IN EINEM MILCHTROCKNUNGSBETRIEB
DURCH PHÄNOTYPISCHE UND MOLEKULARBIOLOGISCHE
CHARAKTERISIERUNG DER ISOLIERTEN STÄMME**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades
eines Doktors der Veterinärmedizin
an der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Christian Wiebe
Tierarzt aus Eutin

Berlin 1999

Journal-Nr. 2369

Gedruckt mit Genehmigung
des Fachbereiches Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Dekan:	Prof. Dr. K. Hartung
Erster Gutachter:	Prof. Dr. W. Heeschen
Zweiter Gutachter:	Prof. Dr. G. Hildebrandt
Tag der Promotion:	06.03.2000

Meiner Frau Garnet
und meinen Eltern

INHALTSVERZEICHNIS		Seite
	Inhaltsverzeichnis	I-III
	Verzeichnis der Abkürzungen	IV
1.	EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG	1
2.	SCHRIFTTUM	2
2.1	Taxonomie und biologische Eigenschaften von <i>Bacillus cereus</i>	2
2.1.1	Taxonomie	2
2.1.2	Morphologie und kulturelle Eigenschaften	4
2.1.3	Biochemische Eigenschaften	6
2.2	Identifizierung und Charakterisierung von <i>Bacillus cereus</i>	7
2.2.1	Mikrobiologischer Nachweis (konventionell)	7
2.2.2	Biotypisierung	7
2.2.3	Serologie	8
2.2.4	Phagentypisierung	9
2.2.5	Protein-Elektrophorese	9
2.2.6	Gaschromatographische Analyse zellulärer Fettsäuren	9
2.2.7	Pyrolytische Gas-liquid Chromatographie (Py-GC) oder pyrolytische Massenspektrometrie (Py-MS)	9
2.2.8	Plasmidprofil - Analyse	10
2.2.9	Polymerasekettenreaktion (PCR)	10
2.2.10	Ribotypisierung	11
2.2.11	Pulsfeld Gelelektrophorese	11
2.3	<i>Bacillus cereus</i>-Toxine	12
2.3.1	Enterotoxine	13
2.3.1.1	Enterotoxin (ET)	15
2.3.1.2	Hämolysin BL	15
2.3.1.3	Enterotoxinkomplex	18
2.3.1.4	Enterotoxin T	18
2.3.1.5	Nicht-hämolytisches Toxin	19
2.3.2	Emetisches Toxin	20
2.4	Vorkommen und Bedeutung von <i>Bacillus cereus</i>	22
2.4.1	Mensch/Rind	22
2.4.2	Lebensmittel allgemein	24

2.4.3	Milch und Milchprodukte	24
2.4.3.1	Kontamination/Dekontamination	25
2.4.3.2	Vermehrung	27
2.4.3.3	Verderb	28
2.4.3.4	Toxinbildung	29
3.	EIGENE UNTERSUCHUNGEN	31
3.1	Material und Methoden	31
3.1.1	Konventionelle Bakteriologie	31
3.1.1.1	Material	31
3.1.1.2	Stämme	32
3.1.1.3	Methoden	32
3.1.2	Molekularbiologische Charakterisierung	34
3.1.2.1	Material	34
3.1.2.2	Methoden	36
3.1.3	Toxintests/Pathogenität	38
3.1.3.1	Material	38
3.1.3.2	Methode	39
3.2	Ergebnisse	41
3.2.1	Morphologie und biochemisches Leistungsspektrum	41
3.2.1.1	Isolierung der Stämme	41
3.2.1.2	Morphologie und Vermehrungsverhalten, biochemisches Leistungsspektrum	42
3.2.2	Molekularbiologische Charakterisierung	44
3.2.2.1	Wiederholbarkeit	44
3.2.2.2	Epidemiologische Verfolgsuntersuchungen	47
3.2.3	Toxintests (Toxinbildungsvermögen)/Pathogenität	50
3.2.3.1	ELISA für <i>B. cereus</i> diarrhoeisches Toxin	50
3.2.3.2	Zytotoxizität	53
4.	DISKUSSION	55
4.1	Charakterisierung von <i>B. cereus</i>-Stämmen	55
4.1.1	Vorkommen von <i>B. cereus</i> im Milchpulver	55
4.1.2	Konventionelle Bakteriologie	56
4.1.3	Molekularbiologie	58
4.1.4	Toxintests	60
4.1.4.1	ELISA für <i>B. cereus</i> diarrhoeisches Toxin	61
4.1.4.2	Zytotoxizität	62

4.2	Umfelduntersuchung	63
4.3	Risikoanalyse	64
4.4.	Hygienesicherung	68
5.	ZUSAMMENFASSUNG	73
6.	SUMMARY	75
7.	LITERATUR	76

Verzeichnis der Abkürzungen

Abb.	= Abbildung
A. bidest.	= Aqua bidestillata
A. dest.	= Aqua destillata
Ala.	= Alanin
ATP	= Adenosin-Triphosphat
B.	= Bacillus
BCET	= Bacillus cereus Enterotoxin
BDE	= Bacillus (cereus) Diarrhoeal Enterotoxin
BHI	= brain-heart-infusion = Hirn-Herz-Glukose-Bouillon
bp	= Basenpaare
C	= Cytosin
CCP	= critical control point = kritischer Kontrollpunkt
D _{95 °C}	= Dezimale Reduktionszeit bei 95 °C
dATP	= Desoxy-Adenosin-Triphosphat
dCTP	= Desoxy-Cytidin-Triphosphat
dGTP	= Desoxy-Guanosin-Triphosphat
d. h.	= das heißt
DNA	= Desoxyribonukleinsäure
dNTP	= Desoxy-Nucleotid-Triphosphat
dTTP	= Desoxy-Thymidin-Triphosphat
E. coli	= Escherichia coli
ED	= emetische Dosis
EDTA	= Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	= enzyme linked immunosorbent assay
EU	= Europäische Union
EY	= egg yolk = Eigelb
F. i. T.	= Fett in Trockenmasse
G	= Guanin
HACCP	= hazard analysis and critical control point
IDF	= International Dairy Federation = Internationaler Milchwirtschaftsverband
ISO	= International Standards Organization = Internationale Standardisierungs-Organisation
i. v.	= intravenös
K _{nuc.}	= Substitutionsgrad der Nukleotide
k. A.	= keine Angabe
kb	= kilo base
KBE	= Koloniebildende Einheiten
k Da	= Kilo Dalton
KH	= Kohlenhydrat
LDH	= Laktatdehydrogenase
Leu	= Leucin

LMBG	= Lebensmittel- und Bedarfsgegenständegesetz
Lsg.	= Lösung
M _r	= Molekulargewicht
MP	= Milchpulver
MPN	= most-probable-number = Größte wahrscheinliche Anzahl
MYP	= Mannit-Eigelb-Phenolrot-Polymyxin-Agar
PCR	= Polymerase chain reaction = Polymerase-Kettenreaktion
PEMBA	= Polymyxin-Pyruvat-Eigelb-Mannit-Bromthymolblau-Agar
PI	= Isoelektrischer Punkt
P _y -GC	= Pyrolytische Gasflüssigkeitschromatographie
P _y -Ms	= Pyrolytische Massenspektrometrie
RAPD-PCR	= randomly amplified polymorphic DNA-PCR
RIL	= rabbit ileal loop
RNA	= Ribonukleinsäure
RPLA	= reverse passive latex agglutination
rRNA	= ribosomale Ribonukleinsäure
s. u.	= siehe unten
Susp.	= Suspension
Tab.	= Tabelle
TBE	= Trisaminomethan-Borsäure-EDTA-Puffer
to	= Tonne
TSB	= trypticase soy broth = Kaseinpepton-Sojamehl-Bouillon
UHT	= ultra high temperature
uv	= ultraviolett
Val.	= Valin
var.	= variants = Variante
VIA	= visual immunoassay
VP	= vascular permeability

Lebenslauf:

Name:	Christinan Wiebe
Geburtsdatum:	05.07.1968
Geburtsort:	Eutin
Staatsangehörigkeit:	deutsch
Familienstand:	verheiratet
Eltern:	Dr. Gerhard Wiebe, Tierarzt Ruth Wiebe, geb. Gleinig, MTA
1975 – 1979	Grund- und Hauptschule Lensahn/Ostholstein
1979 – 1988	Freiherr-von-Stein-Schule Oldenburg/i.H. Abitur im Juni 1988
1988 – 1990	Zivildienst beim DRK als Rettungssanitäter
1990 – 1996	Studium der Veterinärmedizin an der Freien Universität Berlin
September 1996	Volontariat am Insitut für Hygiene und Produktsicherheit der Bundesanstalt für Milchforschung in Kiel
vom 01.10.1996 bis 31.12.1998	Anstellung als wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Hygiene der Bundesanstalt für Milchforschung in Kiel
seit 01.02.1999	Anstellung als Assistenztierarzt bei Dres. Edzards/Hinrichs Gartenstr. 2 +8, 26427 Esens

DANKSAGUNG

Herrn Prof. Dr. Walther Heeschen danke ich sehr herzlich für die Überlassung des Themas und die ausgezeichneten Arbeitsmöglichkeiten am Institut für Hygiene und Produktsicherheit der Bundesanstalt für Milchforschung.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Philipp Hammer für die fachliche Betreuung der Arbeit, hilfreiche Anregungen und großzügige Unterstützung.

Für die gute Einarbeitung in die molekularbiologischen Arbeitsmethoden möchte ich mich herzlich bei Frau Dr. Karin Knappstein bedanken.

Weiterhin danke ich allen Mitarbeitern des Instituts für Hygiene und Produktsicherheit für die freundliche Aufnahme und tatkräftige Unterstützung.

SELBSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende
Arbeit selbständig erledigt habe.

Christian Wiebe