

2. SCHRIFTTUM

2.1 Taxonomie und biologische Eigenschaften von *Bacillus cereus*

2.1.1 Taxonomie

Die Spezies *Bacillus cereus* (*B. cereus*) gehört zum Genus *Bacillus*. 1835 wurde "*Vibrio subtilis*" als eines der ersten Bakterien von Ehrenberg beschrieben. Cohn benannte den Organismus 1872 in *Bacillus subtilis* um und führte die Gattungsbezeichnung *Bacillus* ein. Zusammen mit den Genera *Sporolactobacillus*, *Clostridium*, *Desulfotomaculum*, *Sporosarcina* und *Thermoactinomyces* gehört das Genus *Bacillus* in die Familie der *Bacillaceae* (SLEPECKY und HEMPHILL 1992).

BERKELEY und ALI (1994) zählen außer dem Genus *Bacillus* noch *Alicyclobacillus*, *Amphibacillus*, *Clostridium*, *Desulfotomaculum*, *Oscillospira*, *Pasteuria*, *Sporohalobacter*, *Sporolactobacillus*, *Sporosarcina*, *Sulfobacillus*, *Syntrophospora* und *Thermoactinomyces* zu den endosporenbildenden Genera.

Das Genus *Bacillus* ist ungewöhnlich heterogen und umfasst alle sporenbildenden, aeroben Stäbchen. In der fünften Ausgabe von Bergey's Manual of Systematic Bacteriology sind 146 Spezies aufgelistet und insgesamt wurden mehr als 200 beschrieben. Die Molekularbiologie kann in diesem Zusammenhang helfen, eine neue, verständlichere Taxonomie zu ermöglichen (SNEATH et al. 1996).

Nach BERKELEY und ALI (1994) waren Ende 1992 im Genus *Bacillus* 67 Spezies beschrieben.

Nach GIBSON und GORDON (1974) werden die *Bacillus*-Arten in zwei Gruppen unterteilt. Die erste Gruppe bilden die Arten, die weitgehend sicher eingeordnet sind (22), die zweite Gruppe jene, die weniger genau bekannt sind (26). *B. cereus* wird in Gruppe I geführt. Des weiteren ordnen sie *B. cereus* drei Unterarten zu, nämlich *B. cereus* var. *fluorescens*, var. *albolactis* und var. *mycoides*.

Die *Bacillus*-Arten variieren auch aus molekularbiologischer Sicht sehr. Der prozentuale Anteil an G + C schwankt bei ihnen zwischen 33 und 66 %. Auf der Basis der 16S rRNA faßt man fünf sehr verschiedene Taxa zusammen (ASH et al. 1991) (Abb. 1).

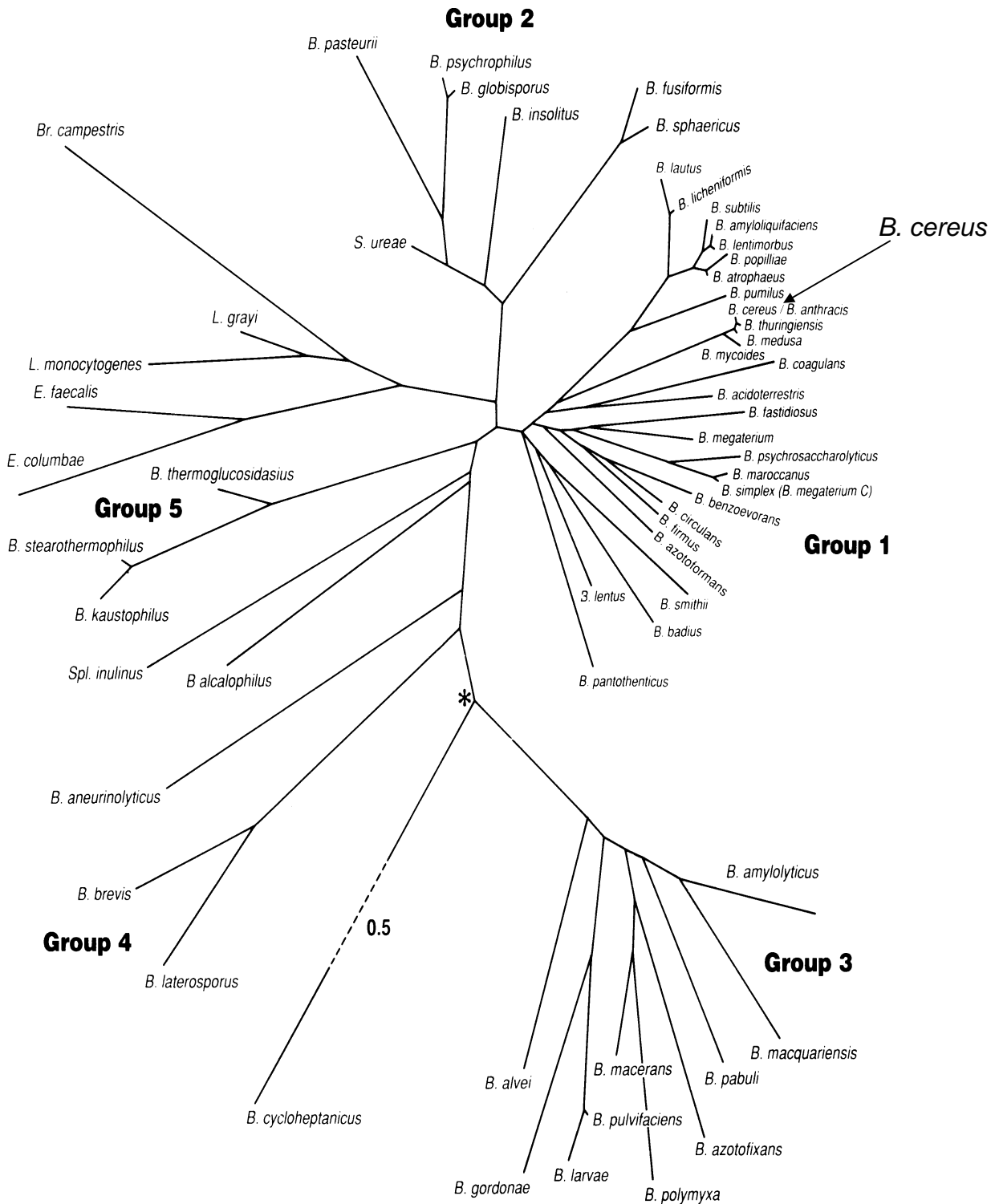


Abb. 1: Stammbaum des phylogenetisch heterogenen Genus *Bacillus*. Der evolutionäre Abstand zwischen zwei Spezies entspricht dem Abstand der Verzästelung (nach ASH et al 1991).

Der evolutionäre Stammbaum des Genus *Bacillus* beruht auf der Abschätzung des Substitutionsgrades der Nukleotide (K_{Nuc}). Die K_{Nuc} -Abschätzungen, die auf dem Vergleich von

1332 Nukleotiden basieren, rangieren zwischen Position 107 und 1410 des Nummerierungssystems von *E. coli* (ASH et al. 1991).

STACKEBRANDT et al. (1987) haben die phylogenetischen Verwandtschaftsgrade zwischen dem Genus *Bacillus* und den nächsten sporenbildenden und nicht-sporenbildenden Verwandten anhand der 16S rRNA aufgezeigt. Dies versuchten auch schon FOX, PECHMAN und WOESE (1977).

Die Basis der systematischen Bakteriologie befindet sich zur Zeit in einem ständigen, grundlegenden Wandel. Die klassischen Methoden werden durch Methoden der Molekulargenetik ersetzt. Die Molekularbiologie erlaubt eine bessere phylogenetische Annäherung an die Taxonomie und in Kombination mit anderen Techniken eine genauere Klassifikation als früher (ASH et al. 1991).

2.1.2 Morphologie und kulturelle Eigenschaften (SNEATH et al. 1996)

B. cereus ist ein 3-5 µm langes und 1-1,2 µm breites, gram-positives, endosporenbildendes Stäbchen. Das Sporangium ist nicht geschwollen und die ellipsoide Spore liegt zentral in der Zelle. *B. cereus* besitzt eine Zellwand vom Murein-Typ. Die Zellen treten häufig in Ketten auf, dadurch variiert die Kolonieform bei den einzelnen Stämmen. Die Kolonien haben eine stumpfe, wachsartige Oberfläche, der Rand ist unregelmäßig, aber ohne deutliche Ausläufer.

Durch peritriche Begeißelung ist *B. cereus* beweglich (JOHNSON 1984, SNEATH et al. 1996).

B. cereus ist ein thermotolerantes Bakterium mit mesophilen und psychrotrophen Stämmen (COLLINS 1981, DUFRENNE et al. 1995, MEER et al. 1991, TE GIFFEL et al. 1995a).

Das Aussehen einer mit *B. cereus* bewachsenen Nährbouillon beschreiben BROWN et al. (1958) als meist körnig getrübt mit körnigem bis flockigem Sediment und ohne Kahmhaut. WEIDLICH (1961) dagegen spricht von einer gleichmäßigen Trübung, dicklich-weichflockigem Bodensatz und einem Oberflächenhäutchen am Glasrand.

B. cereus vermehrt sich aerob und fakultativ anaerob. Unter verminderter Sauerstoffspannung kann der Keim in versporter Form lange überleben (BEUTLING und BÖTTCHER 1998). Sporen von verschiedenen *Bacillus*-Species überleben häufig bis zu einem Jahr (SELTOW 1994). Auf Hammelblutagar bildet sich um die Kolonien herum ein unterschiedlich breiter Hof mit vollständiger Hämolyse.

Vermehrung findet je nach Stamm noch bei einer NaCl-Konzentration von bis zu 7 % und zwischen 6° C und 37° C statt (GIBSON und GORDON 1974). Nach KRAMER und GILBERT (1989) wächst und vermehrt sich die vegetative Form von *B. cereus* bei Temperaturen von 5-50° C mit einem Optimum von 28-35° C. Die pH-Wert-Grenzen für die Vermehrung liegen unter Laborbedingungen bei 4,9 bzw. 9,3 (KIM und GOEPFERT 1971).

Nach SUTHERLAND und LIMOND (1993) vermehrt sich *B. cereus* sogar von pH 2,8 bis 10,0. Das Auskeimen der Sporen findet in gekochtem Reis und in TSB-Bouillon von 5-50° C statt mit einem Optimum bei 30° C (JOHNSON, NELSON, BUSTA 1983). KNAYSI (1964) nennt für das Auskeimen unter Laborbedingungen eine Temperaturspanne von -1 bis 59° C, bei 30° C liegt das Optimum.

Stärke in Konzentrationen von 10 bis 50 g/l in der Nährbouillon hat keinen Einfluß auf die Vermehrung von *B. cereus*. Auch bei Zusätzen von Glukose bzw. Fruktose in Konzentrationen von 50 bis 300 g/l und von Laktose von 50 bis 200 g/l vermehrte sich *B. cereus* deutlich (SUTHERLAND und LIMOND 1993).

BRADSHAW, PEELER und TWEDT (1975) berichteten, daß sie zwei *B. cereus*-Stämme aus einer ungenügend erwärmten Suppe isoliert hatten mit einem $D_{115,6^{\circ}\text{C}}$ -Wert von 0,13 bzw. 11,29 min. Auch JOHNSON, NELSON und BUSTA (1982) untersuchten die Hitze-resistenz von emetischen und diarrhoeischen *B. cereus*-Stämmen, die bei Lebensmittelvergiftungen isoliert wurden. Sie benutzten für die Sporensuspension Phosphatpuffer. Lineare und nicht lineare Überlebenskurven wurden beobachtet. Der ermittelte $D_{95^{\circ}\text{C}}$ -Wert lag zwischen 1,2 und 20,2 min. SHEHATA und COLLINS (1972) untersuchten die Hitze-resistenz von psychrophilen Bacillen, darunter auch *B. cereus*. Der $D_{95^{\circ}\text{C}}$ -Wert war 1,8 min.

NOTERMANS und BATT (1998) haben physiologische Eigenschaften von *B. cereus*-Stämmen aufgelistet (Tabelle 1).

Tab. 1: Physiologische Eigenschaften von <i>B. cereus</i>			
	Eigenschaften	Parameter	Wert
Psychrotrophe Stämme (Vermehrungstemp. < 7° C)	Hitzeresistenz der Sporen	$D_{90^{\circ}\text{C}}$ (= 0,25 mM Na-P-Puffer)	2,2 - < 100 min
	Lag-Phase der Sporen	in BHI bei 7° C	126 -522 min
	Generationszeit	in Milch bei 7° C bei 7° C	96 - 342 min 564 - 4500 min
Alle Stämme	Hitzeresistenz der Sporen	$D_{100^{\circ}\text{C}}$ (Magermilch) z-Wert (PB Susp.)	2,7 - 3,1 min 6,1 - 9,2° C
	Vermehrungstemperatur	Minimum	5 - 15° C
		Maximum	35 - 50° C
		Optimum	28 - 35° C
	Generationszeit	bei 35° C	18 – 27°min
	a_w -Wert	Minimum	0,912 - 0,950
	pH-Wert	Minimum	4,35 - 4,9
Maximum		9,30	
Germinationstemperatur	Labormedien	-1 - 59° C	
	Gekochter Reis	5 - 50° C	

leicht verändert nach NOTERMANS und BATT (1998)

2.1.3 Biochemische Eigenschaften (SNEATH et al. 1996)

Die zur Isolierung, Identifizierung und weiteren Charakterisierung verwendeten Eigenschaften sind Tabelle 2 zu entnehmen, die Toxine sind in Kapitel 2.3 aufgeführt.

Tab. 2: Morphologische und Biochemische Eigenschaften	
Parameter	
Gramfärbung	+
Sporangium aufgetrieben	-
Durchmesser der Zelle > 1,0 µm	+
Ovale Spore	+
Beweglichkeit	+
β-Hämolyse	+
Oxidase	-
Katalase	+
PEMBA: Lecithinase-Bildung	+
PEMBA: Blaufärbung (Säurebildung aus Mannit)	+
Wachstum bei 6° C	-
Wachstum bei 40° C	d*
Wachstum in 7 % NaCl	d
Verstoffwechslung von D-Mannit	-
Verstoffwechslung von D-Xylose	-
Verstoffwechslung von L-Arabinose	-
Nitratreduktion	+
Hydrolyse von Stärke	+
Hydrolyse von Gelatine	+
*d = differiert	
Zitiert nach SNEATH et al. 1996 und GIBSON und GORDON 1974.	

Weiterhin besitzt *B. cereus* folgende Merkmale:

B. cereus ist im Voges-Proskauer-Test positiv, verstoffwechselt Citrat, hydrolysiert Äsculin und Casein und bildet Säure aus Glucose, Glycerin, Maltose, Saccharose und Trehalose. Indol wird nicht gebildet. Eine Vermehrung findet in Nährbouillon zwischen pH 5,7 und 6,8 bei 30° C und auch in Anwesenheit von Lysozym statt. NaCl, KCl oder Allantoin werden nicht benötigt. Über 50° C findet keine Vermehrung mehr statt. Tyrosin wird degradiert, Phenylalanin wird von *B. cereus* nicht desaminiert.

2.2 Identifizierung und Charakterisierung

Für epidemiologische Untersuchungen, speziell zum Aufzeigen von Kontaminationspfaden, ist eine genaue Differenzierung der einzelnen Stämme notwendig. Hierzu steht eine Vielzahl an Methoden zur Verfügung:

2.2.1 Mikrobiologischer Nachweis (konventionell)

Der Nachweis von *B. cereus* in Milch und Milchprodukten ist relativ einfach durchzuführen. Er erfolgt entweder direkt auf Polymyxin-Pyruvat-Eigelb-Mannit-Bromthymolblau-Agar (PEMBA) (HOLBROOK und ANDERSON 1980) bzw. Mannit-Eigelb-Phenolrot-Polymyxin-Agar (MYP) (MOSSEL, KOOPMAN und JONGERIUS 1967) oder, bei geringen Keimzahlen (< 100/g), durch MPN-Verfahren in Kaseinpepton-Sojamehlpepton-Bouillon mit Polymyxin mit anschließendem Nachweis auf PEMBA oder MYP (LANCETTE und HARMON 1980). Eine Bestätigung typischer Kolonien (Mannit-negativ, Eigelb-positiv) ist in der Regel nicht erforderlich (BECKER und TERPLAN 1987). Als weitere Selektivmedien gibt es das Eigelb-Polymyxin (KG)-Medium von KIM und GOEPFERT (1971), das McClung-Medium (McCLUNG, HEIDENREICH und TOABE 1946), Owens' EY (egg yolk)-broth und EY-Agar (OWENS 1974) und Nährbouillon oder -agar mit einer Eigelbemulsion (BILLING und LUCKHURST 1957). Eine detaillierte Beschreibung dieser und weiterer Medien zur Isolierung von *B. cereus* aus Lebensmitteln haben VAN NETTEN und KRAMER (1992) zusammengestellt. In ISO-Mitgliedsstaaten (International Standards Organization) ist gewöhnlich MYP das Medium der Wahl. PEMBA ist eine weit verbreitete Alternative. Verdächtige Kolonien müssen durch weitere Verfahren wie das Schnellfärbeverfahren nach HOLBROOK und ANDERSON (1980) bestätigt werden.

2.2.2 Biotypisierung

Für die biochemische Identifizierung und Differenzierung der einzelnen Stämme ist in einigen Studien das API-50 System (eine standardisierte Miniaturversion von konventionellen biochemischen Tests) verwendet worden (BEUTLING und BÖTTCHER 1998, IBERT et al. 1996, LOGAN und BERKELEY 1984, GRIFFITHS 1990, TE GIFFEL et al. 1995a, TE GIFFEL et al. 1996,).

Auf der Grundlage der Verstoffwechslung von Salicin, Dextrin, Stärke und Glykogen konnten diarrhoische und emetische *B. cereus*-Stämme unterschieden werden (SHINAGAWA 1993). Dies konnte von MAJOR et al. (1979) jedoch nicht nachgewiesen werden.

2.2.3 Serologie

Die Serotypisierung basiert auf den Flagellar-, vegetativen somatischen Zell- oder den Sporenantigenen.

Die Spezifität des somatischen (O) Antigens der vegetativen Zellen von *B. cereus* wurde zuerst von SIEVERS und ZETTERBERG (1940) genauer untersucht. Sie beobachteten eine Kreuzreaktion zwischen verschiedenen *Bacillus*-Species. Die O-Antigene sitzen in der Kortikalmembran und sind zur Stimulierung der direkten Antikörperbildung nicht geeignet (KRAMER und GILBERT 1989).

Für *B. cereus* gründet die erfolgreichste serologische Methode auf den Flagellarantigenen (H). Bei epidemiologischen Untersuchungen von Lebensmittelvergiftungen wurde diese Methode entwickelt und untersucht (DEBUONO et al. 1988, GILBERT und PARRY 1977, TAYLOR und GILBERT 1975). Auch für den Nachweis des zytostatischen (emetischen) Toxins ist sie verwendet worden (MIKAMI et al. 1994). Die Antiseren sind nicht kommerziell erhältlich, jedoch führt das Food Hygiene Laboratory, Colindale, London serologische Untersuchungen, die auf den Serotypen H-1 bis H-18 basieren, durch. Das Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health in Japan besitzt einen vergleichbaren Service, der noch 12 weitere Antiseren beinhaltet. Diese Antiseren stammen von Isolaten aus Japan (KRAMER und GILBERT 1989).

Offenbar besitzen durch Hitze abgetötete, also ihrer Geißeln beraubte vegetative Zellen einen erheblich geringeren Grad der Antigenität als formalininaktivierte, begeißelte Zellen (TAYLOR und GILBERT 1975). Den Autoren gelang es, 18 Serotypen von *B. cereus* anhand der Seren von mit formalininaktivierten Zellen immunisierten Kaninchen zu differenzieren. Es gab keine signifikanten Kreuzreaktionen zwischen den Seren. Mit diesen Seren wurden 137 *B. cereus*-Stämme aus 34 Ausbrüchen von Lebensmittelvergiftungen in Großbritannien und Australien, die in Zusammenhang mit gekochtem Reis stehen, überprüft. Die Mehrzahl der Stämme gehörte zum Serotyp H-1. Weiterhin fanden TAYLOR und GILBERT (1975) heraus, daß Stämme, die Diarrhoe auslösen, zu den Serotypen 2, 6, 8, 9 und 10 gehören, und Stämme, die Erbrechen auslösen, gewöhnlich zu den Serotypen 1, 3 und 5.

Die Nutzung der Sporenantigene von Bazillen brachte einige Probleme mit sich. Hierfür gibt es drei Gründe: (a) die Kontamination der Sporenantigene mit Trümmern von vegetativen Zellen, (b) die Germination der Sporen *in vivo* während der Serumproduktion und (c) die Germination der Sporen *in vitro* während des Immunoassay (NORRIS 1962). Kreuz-Agglutinationen zwischen den Sporen von *B. cereus*, *B. thuringiensis* und *B. anthracis* in zwei Studien (LAMANNA und EISLER 1960, LAMANNA und JONES 1961) bestätigten die enge Verwandtschaft zwischen den drei Spezies.

Mehr als 50 % der aus Lebensmitteln isolierten *B. cereus*-Stämme gelten als nicht typisierbar (GILBERT und PARRY 1977).

2.2.4 Phagentypisierung

Für Bazillen wurde die Phagentypisierung bisher selten angewendet. Wenn sie benutzt wurde, dann nur in Kombination mit anderen Meßwerten und nicht für sich alleine, da viele Stämme nicht bestimmbar sind. Stämme der *B. cereus*-Gruppe, die aus Milchprodukten stammten, konnten durch Phagentypisierung differenziert werden, jedoch gibt es Kreuzreaktionen zwischen *B. cereus*, *B. mycooides* und *B. thuringiensis*. Eine genaue Speziesidentifizierung ist mit Hilfe der Phagentypisierung nicht möglich (VÄISÄNEN, MWAISUMO und SALKINOJA-SALONEN 1991). Die Anwendung der Phagentypisierung in Zusammenhang mit Ausbrüchen von Lebensmittelvergiftungen wurde ebenfalls beschrieben (AHMED et al. 1995, JACKSON et al. 1995).

2.2.5 Protein-Elektrophorese

Die Proteine werden durch Elektrophorese in einem Polyacrylamidgel gelöst und aufgetrennt. Die Banden werden durch Anfärbung mit z.B. Silbernitrat oder Autoradiografie sichtbar gemacht. Liegt ein Standardprotokoll vor, kann eine hohe Reproduzierbarkeit für einen Satz an Isolaten unter experimentellen Bedingungen erreicht werden (PITT 1992). Ergebnisse der Subtypisierung von *B. cereus*-Isolaten aus der Umwelt und aus klinischer Herkunft erlauben eine Unterscheidung zwischen den *Bacillus*-Species und innerhalb der Spezies *B. cereus* (MATAR, SLIEMAN und NABUTT 1996).

2.2.6 Gaschromatographische Analyse zellulärer Fettsäuren

Diese Methode basiert auf der Extraktion von Fettsäuren, gefolgt von einer chemischen Analyse durch Gaschromatographie. Es wurde gezeigt, daß es sich um eine reproduzierbare Methode handelt und daß es möglich ist, zwischen den einzelnen Spezies des heterogenen Genus *Bacillus* zu unterscheiden. Mit dieser Technik war es jedoch nicht möglich, zwischen eng verwandten Spezies wie *B. cereus*, *B. mycooides* und *B. thuringiensis* zu differenzieren (VÄISÄNEN, MWAISUMO und SALKINOJA-SALONEN 1990, WAUTHOZ, EI LIOUI und DECALLONNE 1995).

2.2.7 Pyrolytische Gas-liquid Chromatographie (Py-GC) oder pyrolytische Massenspektrometrie (Py-MS)

Hierbei wird die Pyrolyse kombiniert mit der analytischen Technik der Gasflüssigkeitschromatographie oder der Massenspektrometrie. Obwohl beide Techniken für die

Identifizierung von *Bacillus*-Species verwendet wurden, gibt es Probleme hinsichtlich der Wiederholbarkeit und der Standardisierung. Darüber hinaus ist der kritische Wert, ab welchem die Isolate unterscheidbar sind, nicht bekannt (PITT 1992). Die Anwendung der Py-MS bei Lebensmittelintoxikationen und bei Infektionen mit *Bacillus*-Spezies, die nicht den Gastrointestinaltrakt betreffen, zeigt, daß alle Isolate aus epidemiologischen Untersuchungen korrekt in Cluster einzuordnen waren. Alle Einzelisolate waren unterschiedlich (SISSON et al. 1992).

2.2.8 Plasmidprofil-Analyse

Für die Analyse von Plasmidprofilen muß die extrachromosomale DNA, die einen variablen Teil des Genoms des Bakteriums darstellt, extrahiert werden. Die Größe und Anzahl der Plasmide, die ein Bakterium mit sich trägt, hängt von Umweltfaktoren ab. Diese Unterschiede der Bakterien hinsichtlich der Plasmide können als Unterscheidungskriterien zwischen den einzelnen Stämmen verwendet werden.

Die Analyse der Plasmidprofile wurde bei einer epidemiologischen Untersuchung einer Lebensmittelintoxikation durch *B. cereus* in einem Pflegeheim, bei dem sowohl die Patienten als auch das Personal betroffen waren, angewendet (DEBUONO et al. 1988). Das Ergebnis zeigt, daß die Analyse von Plasmidprofilen ein geeignetes Mittel zur Differenzierung von *B. cereus*-Stämmen ist. Obwohl die Möglichkeit besteht, daß Plasmide verloren gehen oder hinzu kommen, ist Plasmid-DNA innerhalb einer Zelle grundsätzlich stabil.

Auch MEYERS et al. (1976) betrachten die Analyse von Plasmidprofilen in der Gelelektrophorese als wichtiges Hilfsmittel für epidemiologische Studien.

2.2.9 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Methoden, die die PCR zur Grundlage haben, bauen auf die Heterogenität des bakteriellen Chromosomensatzes, der durch Faktoren wie die Deletion oder die zufällige Verteilung von Insertionssequenzen zustande kommt.

Die PCR ist als hochsensitives Verfahren sehr anfällig für falsch-positive Reaktionen. Eine besondere Gefahr besteht in der Kontamination fraglicher Proben durch PCR-Amplifikat, das bereits in kleinsten Mengen eine hohe Anzahl der gesuchten DNA-Kopien enthält. Zur Vermeidung solcher Kontaminationen sind eine Reihe von Vorsichtsmaßnahmen bekannt (KWOK und HIGUCHI 1989).

Die randomly amplified polymorphic DNA (RAPD)-Technik liefert eine neue Möglichkeit zur Charakterisierung von Bakterien. Durch willkürlich gewählte kurze Primer werden in der PCR unterschiedlich lange DNA-Sequenzen amplifiziert, welche im Agarose-Gel ein stammspezifisches Bandenmuster ergeben. Je dichter verwandt zwei Stämme sind, desto

ähnlicher sind sich die Bandenmuster. Die Typisierung mittels RAPD-PCR ist für epidemiologische Subtypisierungen von *B. cereus* (MATAR, SLIEMAN und NABUTT 1996), *B. licheniformis* (STEPHAN, SCHRAFT und UNTERMANN 1994) und *B. thuringiensis* (BROUSSEAU et al. 1993) verwendet worden. Die erfolgreiche Anwendung der Methode zur Differenzierung von *B. cereus*-Stämmen aus Babynahrung wurde von STEPHAN (1996) beschrieben. Die RAPD-PCR führt zu einer guten Unterscheidung der Stämme, gerade wenn viele Primer verwendet werden (WILLIAMS et al. 1990).

Ein großer Vorteil dieser Technik ist die hohe Geschwindigkeit. Auch ist die Methode so sensitiv, daß für viele Spezies eine DNA-Extraktion nicht notwendig ist, die Zellen können direkt von der Platte verwendet werden. Die Reproduzierbarkeit ist aber noch nicht vollständig geklärt (DODD 1994).

Die Reproduzierbarkeit ist ebenfalls anhand fünf verschiedener *B. cereus*-Stämme mit Hilfe des Gel-ComparTM (Applied Maths, Belgium) untersucht worden. Jeder Stamm wurde fünfmal in die PCR genommen und das Ergebnis in einem Dendrogramm ausgewertet. Die fünf Bandenmuster von jedem einzelnen Stamm haben eine Gemeinsamkeit von mindestens 93 % (NILSSON et al. 1998).

2.2.10 Ribotypisierung

Die Ribotypisierung ist nützlich bei der Typisierung von *B. thuringiensis* und verwandten Bakterien auf der Ebene der Spezies und Subspezies. Wie im Southern Blot wird chromosomale DNA extrahiert und mit Restriktionsenzymen in Fragmente zerlegt. Die Hybridisierung findet mit Hilfe des prokaryotischen 16S rRNA Genes statt (PRIEST et al. 1994).

2.2.11 Puls-Feld Gelelektrophorese (PFGE)

Die PFGE ist eine Typisierungsmethode, die gut differenziert und eine hohe Reproduzierbarkeit besitzt. Es ist eine Art Makrorestriktionsanalyse. Probleme wie zu komplexe Bandenmuster, wie sie bei der Ribotypisierung und der PCR auftreten können, lassen sich vermeiden. Man erhält eine kleine Anzahl sehr großer Fragmente, die in der Regel zwischen 10 und 800 kb groß sind. Punktmutationen im Genom können eine Veränderung der Fragmentgrößen bewirken. Um die großen Moleküle zu trennen, wird die herkömmliche Gelelektrophorese leicht abgewandelt. Die Modifikation besteht in einer periodischen Änderung der elektrischen Fließrichtung über das Gel (PITT 1992).

Die PFGE wurde zur Untersuchung eines Pseudo-Ausbruches mit *B. cereus* in einer pädiatrischen Einrichtung angewendet. Dabei wurde nachgewiesen, daß mit Hilfe der PFGE gut zwischen an dem Ausbruch beteiligten und anderen Stämmen unterschieden werden kann (LIU, KE und CHEN 1997).

2.3 *Bacillus cereus*-Toxine

B. cereus ist seit langem als Verderbniserreger in einer Vielzahl von Lebensmitteln bekannt. Zusätzliche Bedeutung erhält der Keim als Auslöser von Lebensmittelintoxikationen, vor allem in Zusammenhang mit Reisgerichten, jedoch auch mit Milch und Milchprodukten. Typische Form der Erkrankung sind Erbrechen und/oder Diarrhoe, je nach wirksam werdendem Toxintyp. Die diarrhoeische Form wurde das erste Mal nach einem Ausbruch, verursacht durch Vanillesauce, in einem Krankenhaus in Oslo, Norwegen 1948 untersucht (HAUGE 1955). Die emetische Form der Lebensmittelintoxikation wurde ungefähr 20 Jahre später nach einem Vorfall in London beschrieben (MORTIMER und McCANN 1974). Tabelle 3 zeigt eine Übersicht der bisher bekannten *B. cereus*-Toxine und ihrer Eigenschaften. Auf weitere Virulenzfaktoren wird hier nicht eingegangen.

Tab. 3: Bisher bekannte <i>B. cereus</i> -Toxine			
Toxintyp		Eigenschaften	Autoren
Enterotoxine	Enterotoxin (ET)	eine Komponente M _r * 45000 nicht hämolytisch inaktivierbar durch Trypsin, Pepsin, niedrigen pH hitzelabil PI** 5,5	SHINAGAWA et al. (1991)
	Hämolysin BL	3-Komponenten Toxin (B, L ₁ , L ₂) B: M _r 38000, kodiert durch <i>hblA</i> Gen L ₁ : M _r 38500, kodiert durch <i>hblC</i> Gen L ₂ : M _r 43200, kodiert durch <i>hblD</i> Gen hämolytisch	BEECHER und WONG (1994)
	Enterotoxin-komplex	3-Komponenten Toxin Komp. 1: M _r 34000 Komp. 2: M _r 40000 Komp. 3: M _r 48000 nur Komp. 1 hämolytisch nur Komp. 2 zytotoxisch	GRANUM und NISSEN (1993)
	Enterotoxin T	eine Komponente M _r 41000, kodiert durch <i>bceT</i> Gen	AGATA et al. (1995a)
	nicht hämolytisches Toxin	3-Komponenten Toxin Komp. 1: M _r 39000 Komp. 2: M _r 45000 Komp. 3: M _r 105000 nicht hämolytisch	LUND und GRANUM (1996)

Fortsetzung Tab. 3:			
Emetische Toxine	emetisches Toxin	eine Komponente stabil gegenüber Hitze, Trypsin, Pepsin, pH 2 bis 11	MELLING und CAPEL (1978)
	HEp-2 Vakuolisierungsfaktor	eine Komponente stabil gegenüber Hitze, proteolytischen Enzymen, niedrigem pH Vakuolenbildung in HEp-2 Zellen Erbrechen bei Rhesusaffen	SHINAGAWA et al. (1992, 1995)
	Cereulid	eine Komponente M _r 1200 zyklisches Dodecadepsipeptid stabil gegenüber Hitze, proteolytischen Enzymen, niedrigem pH Vakuolenbildung in HEp-2 Zellen produziert durch spezifische Klasse von <i>B. cereus</i>	AGATA et al. (1994, 1995b)

(*M_r = Molekulargewicht; **PI = Isoelektrischer Punkt)
 modifiziert nach NOTERMANS und BATT (1998)

2.3.1 Enterotoxine

Ähnlich wie bei durch Enterotoxine von *Vibrio cholerae* (CRAIG 1965), enterotoxischen *Escherichia coli* (EVANS, EVANS und GORBACH 1973) und *Clostridium perfringens* (NILO 1971) verursachten Diarrhoeen, sind auch bei *B. cereus* Enterotoxine für diese Erkrankungsform verantwortlich (SPIRA und GOEPFERT 1972).

Die diarrhoeische Form der Lebensmittelintoxikation durch *B. cereus* wird von mindestens drei bis vier verschiedenen, teilweise aus mehreren Komponenten bestehenden Enterotoxinen verursacht (BEECHER, SCHOENI und WONG 1995, GRANUM 1994, LUND und GRANUM 1996). Diese Enterotoxine entstehen während der vegetativen Vermehrung von *B. cereus* im Dünndarm (GRANUM 1994), hauptsächlich in der späten logarithmischen Vermehrungsphase (GRANUM et al. 1993). Strenggenommen handelt es sich somit um eine Lebensmittelinfektion. Die im Lebensmittel präformierten Toxine sind vermutlich ohne Wirkung auf den Wirt, da sie im Magen praktisch völlig inaktiviert werden (GRANUM et al. 1993).

Auf die Bildung des diarrhoeischen Toxins haben Glukose, Laktose, Fruktose und Stärke Einfluß. In Nährboullion wird bis zu einer Konzentration von 50 g Glukose oder 150 g Laktose oder 300 g Fruktose oder 50 g Stärke pro Liter das diarrhoeische Toxin von *B. cereus* gebildet, bei höheren Konzentrationen findet keine Toxinbildung mehr statt (SUTHERLAND und LIMOND 1993). Das am häufigsten angewendete Modell, mit dem die Auslösung einer Diarrhoe nachgewiesen wird, ist das "rabbit ileal loop" (RIL)-Verfahren. Dabei wird der Darm eines Kaninchens chirurgisch aus der Bauchhöhle vorgelagert,

so daß Ileumschleifen abgebunden werden können. Die Probe wird in einen abgebundenen Abschnitt injiziert und die Reaktion in Form der Flüssigkeitsansammlung protokolliert. Dabei sind Kontrollen notwendig, weil die injizierte Probe im abgebundenen Ileum alleine schon zu einer Flüssigkeitsansammlung führen kann, ohne daß sie selber toxisch ist. Auch *B. cereus*-Enterotoxine wurden mit Hilfe des RIL-Verfahrens nachgewiesen (NOTERMANS und BATT 1998).

In den letzten Jahren werden zum Zweck des Toxinnachweises verstärkt Zellkulturen eingesetzt (SEIDEL et al. 1996). In Zellkulturverfahren sind verschiedene Zelllinien zum Nachweis von Enterotoxin, genauer der Zytotoxizität von *B. cereus*, verwendet worden, wie z.B. Caco-2 Zellen (humane intestinale Epithelzellen), CHO Zellen (chinese hamster ovary) und Vero-Zellen (african green monkey kidney) (BUCHANAN und SCHULTZ 1992, DIETRICH, MAUERSBERGER und MÄRTLBAUER 1997, HUGHES et al. 1988, LUND und GRANUM 1996, SEIDEL et al. 1996). Als Indikator für Zellschädigungen oder Zelltod dient die Freisetzung der Laktatdehydrogenase (LDH). LDH wird bei Membranschäden der Zellen freigesetzt und läßt sich dann im Überstand der Zellkultur nachweisen (BERRY und FRIEND 1969). Die relative Freisetzung von LDH aus Vero-Zellen wurde von GRANUM (1985) angewendet, wobei unbehandelte Vero-Zellen mittels Ultraschall zerstört und der LDH-Gehalt ihres Überstandes mit 100 % gleichgesetzt wurde. KEMP, CROSS und MEREDITH (1986) haben die Toxizität von Chemikalien auf Zellkulturen mit Hilfe der Abnahme der Konzentration des Adenosin-Triphosphats (ATP) gemessen. ATP nimmt in einem vergleichbaren Verhältnis ab wie der Zelltod zunimmt.

KONOWALCHUK, SPEIRS und STAVRIC (1977) verglichen die RIL-Methode unter anderem mit Versuchen an CHO- und Vero-Zellen. Heute werden hauptsächlich die Zellkulturversuche durchgeführt.

Nur wenige haben sich bisher direkt mit den Wirkungsmechanismen der Enterotoxine beschäftigt (GRANUM 1994, GRANUM und NISSEN 1993, KRAMER und GILBERT 1989). KRAMER und GILBERT (1989) gehen davon aus, daß die Bindung an die Rezeptoren der Epithelzellen im Darm relativ schwach ist und deshalb der Effekt durch Antikörper blockiert werden kann. Enterotoxin zerstört zwar die Membran der Epithelzellen, aber der genaue Mechanismus ist noch nicht bekannt. *B. cereus*-Enterotoxin ist aber 100fach mehr potent als das Enterotoxin von *Clostridium perfringens* (GRANUM et al. 1993, GRANUM 1994) und wirkt ohne den Zusatz von divalenten Kationen (GRANUM 1994).

Trotz erheblicher Anstrengungen stehen die Eigenschaften der Toxine, die eine Diarrhoe auslösen, noch nicht vollständig fest. Es ist zwar bekannt, daß es mehrere Toxine gibt, doch wird über ihre Merkmale seit Jahren kontrovers diskutiert (NOTERMANS und BATT 1998).

2.3.1.1 Enterotoxin (ET)

SHINAGAWA et al. (1991) bestätigten ein Enterotoxin von *B. cereus* mit einem Molekulargewicht von 45 kDa. Dieses Enterotoxin besitzt aber weder hämolytische Eigenschaften, noch Phospholipase C-Aktivität. Die biologischen Eigenschaften des Enterotoxins lassen sich leicht durch Trypsin und Pepsin, eine Erhitzung für fünf Minuten bei 56° C und einen pH-Wert kleiner 3,0 oder größer 11,0 inaktivieren sowie durch Kaninchen-Antiserum neutralisieren. Dieses Protein ist hitzelabil und hat seinen isoelektrischen Punkt bei 5,5. 0,02 bis 0,04 µg Enterotoxin pro Kaninchen verursachen "vascular permeability" (VP), 8 bis 16 µg Flüssigkeitsansammlungen bei abgebundenen Ileumschleifen von Mäusen und 10 µg i.v. sind tödlich für Mäuse. Des weiteren wirken 0,1 bis 0,2 µg Toxin auf Vero-Zellen zytotoxisch.

BEECHER und WONG (1994) meinten, daß das von SHINAGAWA et al. (1991) bestätigte Enterotoxin von *B. cereus* verunreinigt gewesen sein könnte, und daß diese Verunreinigung die Flüssigkeitsansammlung im RIL-Test verursacht habe.

2.3.1.2 Hämolysin BL

Ein extrazelluläres Protein, welches von *B. cereus* B-4ac gebildet wird, wurde von THOMPSON et al. (1984) mit Hilfe der Chromatographie separiert. Eine Fraktion, die durch Chromatographie auf Hydroxylapatit gewonnen wurde, bestand aus drei nachweisbaren Antigenen. Diese Fraktion verursachte eine Flüssigkeitsansammlung im abgebundenen Kaninchenileum und löste Dermatonekrose in Kaninchenhaut aus. Außerdem wirkt das Protein tödlich nach i.v. Injektion bei Mäusen und zytotoxisch auf Vero-Zellen. Zwei weitere Fraktionen, die auch mit Hilfe der Chromatographie gewonnen wurden, waren für sich alleine nicht toxisch. Jede nicht-toxische Fraktion bestand aus zwei der drei Proteine, die aus der toxischen Substanz isoliert wurden. Wenn die beiden nicht-toxischen Fraktionen kombiniert wurden, zeigten sie bei allen oben genannten Versuchen ein positives Ergebnis. Ein Antiserum gegen eine der beiden nicht-toxischen Fraktionen neutralisierte die dermatonekrotische Antwort auf die Kombination der zwei nicht-toxischen Komponenten. Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, daß wahrscheinlich mehr als eine Komponente anwesend sein muß, um die biologischen Aktivitäten auszulösen (THOMPSON et al. 1984).

BEECHER und WONG (1994) führten die Arbeit von THOMPSON et al. (1984) weiter und isolierten von *B. cereus* einen Toxin-Komplex, der aus drei Komponenten besteht, das Hämolysin BL (B, L₁, L₂). Die B-Komponente hat ein Molekulargewicht von 37,8 kDa, die L₁-Komponente von 38,5 kDa und die L₂-Komponente von 43,2 kDa, wobei die Gewichte je nach verwendetem Gel leicht variieren können. BEECHER und MACMILLAN (1991) sowie HEINRICHS et al. (1993) ermittelten für die B-Komponente ein Molekulargewicht

von 35 kDa, für die L₁-Komponente von 36 kDa und für die L₂-Komponente von 45 kDa. Das N-Terminal der B-Komponente ist vollständig bekannt und besteht aus dreizehn Aminosäuren (BEECHER und WONG 1994, HEINRICHS et al. 1993), für L₁ und L₂ besteht er aus 18 (17 bekannt) bzw. aus 11 (9 bekannt) Aminosäuren (BEECHER und WONG 1994). Die vollständige Nukleotidsequenz des *hblA* Gens, welches für die B-Komponente kodiert, wurde von HEINRICHS et al. (1993) beschrieben.

Die isoelektrischen Punkte der Komponenten B, L₁, und L₂ liegen bei ca. 5,34, 5,33 und 5,33 (BEECHER und WONG 1994).

Keine Komponente für sich alleine löst Hämolyse oder eine VP-Reaktion aus. Maximale Aktivität tritt nur ein, wenn alle drei Komponenten vorhanden sind. In niedrigen Dosen löste die Kombination der drei Komponenten VP aus und in hohen Dosen Hautnekrosen. Bei hohen Konzentrationen von einer oder zwei Komponente(n) reicht eine geringe Konzentration der anderen Komponente(n), um vollständige Hämolyse auszulösen. Die B-Komponente bindet an die Erythrozyten und sensibilisiert sie für die lytische Aktivität der L-Komponenten. Wenn durch die B-Komponente sensibilisierte Erythrozyten mit L₁ oder L₂ behandelt und anschließend gewaschen werden, findet die Zellyse nach Zugabe der dritten Komponente statt. Erythrozyten werden gegen die Lyse schon von mikromolaren Konzentrationen von Zn²⁺ geschützt, aber nicht durch Ca²⁺ oder Mg²⁺, selbst bei Konzentrationen von 25 mM. Zn²⁺ verhindert die Hämolyse durch Hämolysin BL ab 10 µM. Ab einer Konzentration von 500 µM verhindert Zn²⁺ die Hämolyse vollständig. EDTA hebt diesen Schutz der Erythrozyten durch Zn²⁺ komplett wieder auf (BEECHER und WONG 1994).

Hämolysin BL produziert ein charakteristisches und einzigartiges, diskontinuierliches Hämolysemuster im Geldiffusionstest. Wenn die Komponenten des Hämolysin BL zusammen in eine Kavität im Blutagar gegeben werden, beginnt die Hämolyse nicht sofort und direkt neben der Vertiefung. Vielmehr dauert es etwas, bis die Hämolyse in einigem Abstand (typisch sind einige Millimeter) zum Rand der Kavität sichtbar wird. Es wird ein Hämolysering um die Kavität gebildet. Dieser Hämolysetest zeigt ein sehr ungewöhnliches Dosis-Antwort-Phänomen. Es stellt ein provisorisches Modell für das diskontinuierliche Hämolysemuster auf Blutagar dar. Kommt es zu einem diskontinuierlichen Hämolysemuster, sind alle drei Komponenten des Hämolysin BL vorhanden. Der Anstieg des lytischen Radius von 1 bis auf 3,8 mm verläuft asymptotisch mit dem Anstieg der Konzentration von 10 bis 1000 ng pro Vertiefung. Wird die Konzentration von Hämolysin BL auf eine Skala zum log₁₀ aufgetragen, erhält man eine annähernd lineare Dosis-Antwort-Kurve. Daraus läßt sich schließen, daß Hämolysin BL mit der Geldiffusionsmethode quantitativ zu messen ist. Untersuchungen mit unterschiedlichen Konzentrationen der einzelnen Komponenten sind hierbei nicht gemacht worden (BEECHER und WONG 1994). Für eine schnelle

und vollständige Hämolyse müssen alle drei Proteine anwesend sein (BEECHER und MACMILLAN 1991).

Die Komponenten B plus L₁, jede mit einer Konzentration von 1000 ng/ml, lösen in Abwesenheit von L₂ 15 % Hämolyse aus. B plus L₂ allein verursachen 10 % Hämolyse. Weder eine einzelne Komponente noch die Kombination von L₁ und L₂ bis zu einer Konzentration von jeweils 2500 ng/ml lösen eine Hämolyse aus (BEECHER und WONG 1994).

Die Komponenten des Hämolysin BL wurden einzeln und in Kombination auf ihre VP-Aktivität getestet. Bei dem Ödem der Haut liegt eine mikrovaskuläre Durchlässigkeit der Gefäße vor, wodurch Serumproteine ins Interstitium gelangen und eine Flüssigkeitsansammlung nach sich ziehen. Durch die i.v. Injektion von Evans Blau, das an die Serumproteine bindet, verfärbt sich das Gebiet um die Injektionsstelle des VP-Faktors. Diese Methode dient zum quantitativen Nachweis des VP-Faktors (TU und MILLER 1992).

Bei hohen Konzentrationen des VP-Faktors von *B. cereus* kommt es zu einer zentralen Nekrose mit einer großen blau gefärbten und geschwollenen Zone (GLATZ, SPIRA und GOEPFERT 1974). 2,5 µg jeder Komponente für sich injiziert, oder die Kombinationen B und L₂ bzw. L₁ und L₂ (je 2,5 µg), lösen keine Reaktionen aus. Selbst bei einer Injektion von 7,68 µg jeder einzelnen Komponente kommt es zu keiner Reaktion. Die Kombination B plus L₁ verursacht ein Ödem von 14 mm Durchmesser, eine Blaufärbung von 3 bis 4 mm und keine Nekrose. Die Kombination aller drei Komponenten verursacht eine Blaufärbung von 13 mm Durchmesser, eine Nekrose von 11 mm und kein Ödem (BEECHER und WONG 1994). Die Bildung eines Ödems nach der Injektion der B- und L₁-Komponente wurde schon früher beobachtet (BEECHER und MACMILLAN 1991).

Die Daten von BEECHER und WONG (1994) zeigen, daß das Hämolysin BL der schon von anderen Autoren (GRANUM und NISSEN 1993, THOMPSON et al. 1984, TURNBULL et al. 1979) beschriebene, dermatonekrotische VP-Faktor ist.

Im Oxoid[®] *B. cereus* Enterotoxin (BCET)-RPLA (reverse passive latex agglutination)-Kit (Unipath Ltd., Basingstoke, Hampshire, England) wird nur die *per se* atoxische L₂-Komponente des von BEECHER et al. (1995) beschriebenen Hämolysin BL nachgewiesen (BEECHER und WONG 1994, GRANUM und NISSEN 1993). Dieses BCET-RPLA Kit weist angeblich das diarrhoeische Toxin von *B. cereus* aus Lebensmitteln und *B. cereus*-Kulturfiltrat nach (OXOID Handbuch 1993).

Das Nachweissystem enthält Partikel aus Polysterol, die mit aufgereinigtem Antiserum beladen sind, das von mit dem diarrhoeischen *B. cereus*-Toxin immunisierten Kaninchen gewonnen wurde. Diese beschichteten Partikel agglutinieren in Anwesenheit des diarrhoeischen Toxins von *B. cereus*. Als Kontrolle werden Partikel mit Immunglobulinen von nicht immunisierten Kaninchen eingesetzt. Der Test wird in Mikrotiterplatten mit V-förmigen Vertiefungen durchgeführt. In zwei Reihen der Vertiefungen werden Verdünnungen

des Nahrungsmittelextraktes oder der Kulturflüssigkeit angelegt und mit der Suspension gemischt. Bei Vorliegen des Enterotoxins kommt es zur Agglutination, die sich durch Bildung einer diffusen Netzstruktur zeigt. Wenn die Menge des Enterotoxins unterhalb der Nachweisgrenze liegt oder kein Enterotoxin vorhanden ist, bildet sich auf dem Boden ein kompaktes, punktförmiges Sediment (OXOID Handbuch 1993).

Dieses BCET-RPLA-Kit ist unter anderem von BUCHANAN und SCHULTZ (1992), CHRISTIANSSON (1993), DAY et al. (1994) und SUTHERLAND und LIMOND (1993) verwendet worden.

MÄNTYNEN und LINDSTRÖM (1998) entwickelten ein PCR-Primer-Modell zum Nachweis der *hblA* Sequenz von *B. cereus*, die die B-Komponente kodiert. Zur Bestätigung ihres Produktes führten sie die Hybridisierung im Southern Blot durch. GRANUM et al. (1996) beschreiben ein Primer-Set zum Nachweis der B-Komponente des Hämolysin BL. Außerdem fanden sie einige *B. cereus* Stämme, die an Ausbrüchen von Lebensmittelvergiftungen beteiligt waren und große Mengen an Enterotoxin produzieren, aber teilweise weder die B-, noch die L₂-Komponente des Hämolysin BL besitzen.

2.3.1.3 Enterotoxinkomplex

GRANUM und NISSEN (1993) beschreiben ebenfalls einen Enterotoxin-Komplex mit drei Komponenten, wobei die enterotoxische Aktivität nur von einem Protein abhängt. Die drei Proteine haben Molekulargewichte von 34, 40 und 48 kDa. Die ersten 14 bzw. 15 Aminosäuren nach dem Signalpeptid der drei Proteine sind bekannt (GRANUM und NISSEN 1993). Das 34 kDa-Protein hat eine fast identische Sequenz wie die von GILMORE et al. (1989) beschriebene Sphingomyelinase. Die Sequenz des 40 kDa-Proteins ist annähernd identisch mit der der B-Komponente des Hämolysin BL (BEECHER und WONG 1994). Auf Blutagar bildete nur die 34 kDa-Komponente Hämolyse. Im Vero-Zell-Test hatte das 40 kDa Protein die höchste zytotoxische Aktivität, wohingegen das 48 kDa Protein gar keine zeigte und das 34 kDa Protein so geringe, daß diese Aktivität wohl von Verunreinigungen stammt (GRANUM und NISSEN 1993).

2.3.1.4 Enterotoxin T

Ein weiteres Enterotoxin von *B. cereus* ist von AGATA et al. (1995a) beschrieben worden. Dieses Polypeptid wird vom *bceT* Gen von *B. cereus* kodiert, besteht aus 336 Aminosäuren und hat ein Molekulargewicht von 41,039 kDa. Das Enterotoxin T ist tödlich für Mäuse, sorgt für eine Flüssigkeitsansammlung im abgebundenen Ileum von Mäusen, wirkt positiv in der "vascular permeability"-Reaktion und zytotoxisch auf Vero-Zellen. Sowohl AGATA

et al. (1995), als auch MÄNTYNEN und LINDSTRÖM (1998) haben PCR-Methoden zum Nachweis des *bceT* Genes entwickelt.

2.3.1.5 Nicht-hämolytisches Toxin

Von einem *B. cereus* Stamm, der 1995 an einer Lebensmittelintoxikation beteiligt war, wurden drei enterotoxisch wirksame Komponenten chromatographisch isoliert. Es sind Proteine mit Molekulargewichten von 39, 45 bzw. 105 kDa. Sie stellen das nicht-hämolytische Toxin von *B. cereus* dar. Das 39 kDa Protein zeigt große Ähnlichkeit mit der L₁-Komponente des Hämolyisin BL. Es stimmt in fünf von sechs Aminosäuren in seiner Sequenz mit dem von BEECHER und WONG (1994) veröffentlichten N-Terminal der L₁-Komponente überein. Die Proteine sind von den B- und L₂-Komponenten des Hämolyisin BL verschieden und besitzen keine nachweisbare hämolytische Aktivität (LUND und GRANUM 1996).

Die drei toxischen Komponenten reagieren alle mit einem polyklonalen Antiserum, welches *B. cereus*-Enterotoxin detektiert (LUND und GRANUM 1996).

Die 45 kDa-Komponente könnte dasselbe Protein sein wie das von SHINAGAWA et al. (1991) gefundene, da beide im *Bacillus cereus* Diarrhoeal Enterotoxin (BDE) Visual Immunoassay (VIA) (Tecra[®]) (Bioenterprises Pty., Ltd., Roseville, NSW, Australien) positiv reagieren (NOTERMANS und BATT 1998).

Dieser Test ist ein Sandwich-ELISA für den Nachweis von BDE. Das diarrhoeische Toxin von *B. cereus* wird direkt aus Lebensmitteln oder *B. cereus*-Kulturfiltraten nachgewiesen, die Durchführung erfolgt in Mikrotiterplatten, die mit gereinigten Antikörpern gegen das Antigen 577 gecoatet sind. Das Antigen 577 wurde schon früher als das diarrhoeische Toxin identifiziert (BURRELL et al. 1991).

Das Testkit wurde zum direkten Nachweis des BDE aus Lebensmittelproben entwickelt. Es wird nur eine einfache Extraktion vorgeschaltet. Der ELISA dauert vier Stunden, die Nachweisgrenze des Toxins aus Lebensmittelproben liegt bei 2 ng/ml.

Eine Reihe von künstlich kontaminierten Lebensmitteln wie Babynahrung, Salate, gekochtes Fleisch und Reisgerichte wurden mit dem Testkit überprüft. Ein zufriedenstellender Toxinnachweis gelang bei einem Wert von 2,5 ng/ml, wenn eine einfache Extraktion stattgefunden hatte. Durch die verwendeten Lebensmittel wurden keine Beeinträchtigungen beobachtet. Die Überprüfung des Kits wurde auch mit Kulturüberständen von verschiedenen anderen *Bacillus*-species durchgeführt, wie z.B. *B. thuringiensis*, *B. subtilis*, *B. brevis*, *B. sphaericus*, *B. pumilus*, *B. licheniformis*, *B. amyloliquefaciens* und auch *B. cereus*, die an Lebensmittelintoxikationen beteiligt waren (BURRELL et al. 1991).

Im Tecra[®] BDE VIA Kit werden nach BEECHER und WONG (1994) nur zwei nicht-toxische Begleitproteine nachgewiesen. Das 45 und das 105 kDa Protein gehören zum nicht-hämolytischen Toxin-Komplex. Dabei stellt das 45 kDa Protein das Hauptantigen des Tecra[®]-ELISA dar. Auch das 105 kDa Protein reagiert positiv, aber im Vergleich zum 45 kDa Protein wird vom 105 kDa Protein für eine positive Reaktion zehnmals soviel Protein benötigt (LUND und GRANUM 1996).

Zum Nachweis des BDE wurde der Tecra[®] ELISA unter anderem auch von BAKER und GRIFFITHS (1995), CHRISTIANSSON (1993), ODUMERU et al. (1997) und TAN et al. (1997) eingesetzt.

Zur Bestimmung der Zytotoxizität wurden Vero-Zellen und Caco-2 Zellen verwendet. Bei beiden Zelllinien ergaben sich gleiche Ergebnisse, wobei die deutlich langsamer wachsenden Caco-2 Zellen nicht für Routineuntersuchungen verwendet wurden. Für maximale Zytotoxizität müssen alle drei Komponenten vorhanden sein, wobei Kombinationen von zwei Proteinen bei dann höheren Konzentrationen auch eine Zytotoxizität zeigen (LUND und GRANUM 1996).

2.3.2 Emetisches Toxin

Das emetische Toxin wird im Lebensmittel präformiert, es entsteht während der Vermehrung von *B. cereus* in demselben (KRAMER und GILBERT 1989). Es handelt sich um ein zyklisches Dodecadepsipeptid (Cereulid). Das Cereulid hat ein Molekulargewicht von 1,2 kDa, und die Aminosäuresequenz lautet: (d-O-Leu-D-Ala-L-O-Val-L-Val)₃ (AGATA et al. 1994). Die auf Grund der chemischen Struktur berechnete Molekularmasse (AGATA et al. 1994) und die Hitzestabilität des Cereulid ähneln nach AGATA et al. (1995b) den Eigenschaften des schon früher beschriebenen emetischen Toxins von *B. cereus* (GILBERT und KRAMER 1984, MELLING et al. 1976, MELLING und CAPEL 1978). Diese Autoren berichteten von einem niedermolekularen Toxin von *B. cereus*, das bei Rhesusaffen Erbrechen auslöst.

Die Untersuchung der Stabilität des Cereulid ergibt, daß es 20 min bei 121° C, pH-Werte von 2 bis 12 und Behandlungen mit Trypsin und Pepsin unbeschadet übersteht (SHINAGAWA et al. 1995). Das Toxin übersteht selbst eine Hitzebehandlung für 90 min bei 126° C. Die optimale Temperatur für die Bildung des emetischen Toxins in einer Reiskultur-Bouillon beträgt 30° C (24 h). Bei Temperaturen zwischen 35 und 45° C werden zwar mehr vegetative Zellen und mehr Sporen gezählt, aber die emetische Reaktion fällt geringer aus (MELLING und CAPEL 1978). Nach HUGHES et al. (1988) erfolgt die optimale Toxinbildung in der stationären Vermehrungsphase von *B. cereus* in Reiskulturen bei 25-30° C.

Ein sehr hoher Prozentsatz der Isolate (mehr als 70 %), die aus Ausbrüchen von Lebensmittelintoxikationen herrühren, die vom emetischen Typ von *B. cereus* verursacht wurden, gehören dem Serotyp 1 an (GILBERT 1979). In einer Untersuchung von MIKAMI et al. (1994) waren alle *B. cereus*-Stämme, die das emetische Toxin produziert haben, vom Serotyp 1. Sporen des Serotyps 1 zeigen bei 95° C eine deutlich höhere dezimale Reduktionszeit als Sporen anderer Serotypen (PARRY und GILBERT 1980).

Der Überstand vom emetischen Typ von *B. cereus* löst bei HEp-2-Zellen (humanes Epidermiskarzinom, Larynx) eine Vakuolenbildung aus (BUCHANAN und SCHULTZ 1992, HUGHES et al. 1988, SHINAGAWA et al. 1992, 1995). Die Vakuolisierung kann nur beobachtet werden, wenn *B. cereus* in einer Suspension oder auf Platten von gekochtem Reis angezüchtet wurde, wohingegen dieselben Stämme aus BHI oder TSB keine Wirkung zeigten (SHINAGAWA et al. 1992). Die kleinste Dosis, die die Vakuolenbildung auslöst, beträgt 5 ng Cereulid ml⁻¹ (AGATA et al. 1994). AGATA et al. (1995b) beobachteten bei durch Cereulid vakuolisierten HEp-2-Zellen geschwollene Mitochondrien. Das gleiche hatten SAKURAI et al. (1994) durch den Überstand von *B. cereus*-Stämmen vom emetischen Typ, die in einer Reiskultur vermehrt wurden, gefunden.

Die Deutlichkeit der Vakuolisierung der HEp-2 Zellen korreliert mit der eingesetzten Menge des emetischen Toxins, genauso wie das Erbrechen im Fütterungsversuch mit Rhesusaffen dosisabhängig ist (SHINAGAWA et al. 1995). AGATA et al (1995b) haben den emetischen Effekt des Cereulid an Moschusspitzmäusen (*Suncus murinus*) studiert. *Suncus murinus* stellt ein neues Tiermodell zur Untersuchung des Erbrechens dar (TORII, SAITO und MATSUKI 1991). Erbrechen konnte sowohl durch orale Gaben als auch durch intraperitoneale Injektionen des Cereulid ausgelöst werden. Der ED₅₀ Wert (emetische Dosis) lag dabei für orale Gaben bei kalkulierten 12,9 µg kg⁻¹ und 9,8 µg kg⁻¹ für die intraperitoneale Injektion. Keines der Tiere verstarb durch den Versuch. Eine dosisabhängige Latenz des ersten Erbrechens war nach Verabreichen des Cereulid zu beobachten (AGATA et al. 1995b).

Des weiteren ähnelt die Struktur des Cereulid der des Antibiotikums Valinomyzin. Auch Valinomyzin verursacht bei *Suncus murinus* Erbrechen, jedoch erst bei höheren Dosen. Darüber hinaus löst Valinomyzin bei vergleichbaren Dosierungen in HEp-2-Zellen Vakuolenbildung aus. Die Unterschiede in der biologisch aktiven Dosis zwischen Cereulid und Valinomyzin könnten an den geringen strukturellen Unterschieden und dem damit verbundenen Unterschied in der Bindung an die Oberflächenrezeptoren der Zellen liegen (AGATA et al. 1995b).

Ein 5-HT₃-Rezeptor-Antagonist, das Ondansetronhydrochlorid, unterband den emetischen Effekt des Cereulid bei *Suncus murinus* vollständig, genauso wie eine Vagotomie (AGATA et al. 1995b).

In einem weiteren Fütterungsversuch hat das Cereulid bei Rhesusaffen Erbrechen ausgelöst (SHINAGAWA et al. 1995). Vier in einem anderen Versuch verwendete Affen entwickelten bei einer 16maligen Fütterung mit dem emetischen Toxin innerhalb von acht Monaten keine Resistenz (MELLING und CAPEL 1978).

ANDERSSON et al. (1998) beschreiben ein neuartiges, empfindliches, günstiges und schnelles Nachweisverfahren für das emetische Toxin. Es beruht auf dem Verlust der Beweglichkeit von Ebersperma, das, dem Extrakt von emetischem *B. cereus* oder kontaminierten Lebensmitteln ausgesetzt, innerhalb von 24 h seine Motilität verlor. Die paralyisierten Spermatozoen wiesen geschwollene Mitochondrien auf, aber weder eine Entleerung des ATP-Speichers noch eine Beschädigung der Plasmamembran. Eine Untersuchung des Toxins mittels Massenspektrometrie ergab, daß es sich um ein Dodecadepsipeptid handelt, dessen Masse der des Cereulid ähnelt. 0,5 ng des Dodecadepsipeptid pro ml Ebersperma paralyisierten 50 % der Spermatozoen. Das entspricht der Toxinbildung von 10^4 bis 10^5 KBE *B. cereus*. Die Nachweisgrenze aus dem Lebensmittel entspricht der von 10^6 bis 10^8 KBE g^{-1} gebildeten Menge bei einer Probengröße von mindestens 3 g. Valinomycin und Gramizidin lösten einen vergleichbaren Effekt beim Ebersperma aus. Die Symptome lassen darauf schließen, daß das emetische Toxin wie ein Ionophor Tunnel in der Membran bildet, die Mitochondrien schädigt und die oxidative Phosphorylierung blockiert, wodurch das Sperma seine Beweglichkeit verliert. Der Verlust der Motilität des Ebersperma wurde subjektiv unter einem Phasen-Kontrast Mikroskop ausgewertet und bestätigt mittels einer objektiven Messung der Beweglichkeit mit dem Hamilton-Thorn Sperma -Analyzer (HTM-S, Version 7.2, Hamilton-Thorn Research, Danvers Mass.) (ANDERSSON et al. 1998).

2.4 Vorkommen und Bedeutung von *Bacillus cereus*

B. cereus ist ein ubiquitär vorkommender Saprophyt, er findet sich in Erde, Pflanzen und Staub (COONROD, LEADLEY und EICKHOFF 1971, KRAMER und GILBERT 1989). Des weiteren ist *B. cereus* auch in frischem Gras, Heu, Silage, Kraftfutter (CHRISTIANSSON, NILSSON und BERTILSSON 1996), Dung und Stroh (BECKER et al. 1994) nachzuweisen. Aus hygienischer Sicht von besonderem Interesse ist das Vorkommen bei Tier und Mensch und in Lebensmitteln.

2.4.1 Mensch/Rind

Mensch:

B. cereus wurde bis vor kurzem von den klinischen Mikrobiologen wenig Aufmerksamkeit geschenkt, da vermutet wurde, daß er nur geringe Pathogenität besitzt. Das Bakterium

kommt zu 14 bis 15 % im Stuhl von gesunden Menschen vor (GHOSH 1978), und es sind Fälle bekannt, in denen *B. cereus* aus der Muttermilch isoliert wurde (SINGH et al. 1984). Es ist ferner bekannt, daß *B. cereus* verschiedene Formen von Infektionen bzw. Intoxikationen verursacht (GRANUM 1994). Beim Menschen wurde *B. cereus* bei Bakteriämien, Septikämien, Pneumonien, Pleuritiden (COONROD, LEADLEY und EICKHOFF 1971), Panophthalmitis, Gangränen und bei postoperativen Wundinfektionen (TURNBULL et al. 1979a) als Ursache nachgewiesen.

Seit *B. cereus* in Lebensmitteln gefunden wurde, gilt er als potentieller Problemkeim, weil die Toxine beim Menschen sowohl Diarrhoeen als auch Erbrechen auslösen (NOTERMANS und BATT 1998). Das "diarrhoeische Syndrom" tritt nach acht bis sechzehn Stunden ein und ist gekennzeichnet durch Magenkrämpfe und Durchfall. Das "emetische Syndrom" zeigt sich schon nach ein bis fünf Stunden und ist durch Übelkeit und Erbrechen charakterisiert (KRAMER und GILBERT 1989).

Durch *B. cereus*-Toxine werden relativ milde verlaufende Magen-Darm-Erkrankungen verursacht, die gelegentlich als Ausbruch (Tab. 4), sehr viel häufiger jedoch als Einzelerkrankungen auftreten. Aufgrund der milden Verlaufsform ist zudem von einer sehr hohen Dunkelziffer auszugehen.

Tab. 4: Beispiele für durch <i>B. cereus</i>-Toxine in Milch und Milchprodukten verursachte Erkrankungen des Menschen						
Pro- dukt	An- zahl	Er- krankte	Typ	Bakt. Befund	Land/Jahr	Autor
Milch	221	Schul- kinder	diarrhoeisch	2×10^7 <i>B. cereus</i> /ml	Rumänien 1972	Christiansson 1992
Milch	1	Säug- ling	emetisch	$2,6 \times 10^6$ <i>B. cereus</i> /ml	Dänemark 1981	Christiansson 1992
past. Milch	280	Per- sonen	emetisch	4×10^5 <i>B. cereus</i> /ml	Niederlande 1989	van Netten et al. 1990
Sahne	2	Kinder	emetisch u. diarrhoeisch	5×10^6 <i>B. cereus</i> /ml	England 1975	Christiansson 1992
Sahne	62	Per- sonen	k.A.	k.A.	Bulgarien 1987	WHO 1992
Vanille- Sauce	61	Per- sonen	diarrhoeisch	$2,5 \times 10^7 - 1,1 \times 10^8$ <i>B. cereus</i> /ml	Norwegen 1955	Gilbert 1979
Vanille- Sauce	127	Sol- daten	diarrhoeisch	1×10^7 <i>B. cereus</i> /ml	Deutschland 1970	Gilbert 1979

k.A. = keine Angabe

Rind:

Beim Rind löst *B. cereus* stürmisch verlaufende Euterinfektionen aus (WEIDLICH 1961). BROWN und SCHERER (1957) beschreiben zwei Fälle von Mastitis durch *B. cereus* bei laktierenden Kühen. Sie machen Hämolyse- und Toxinbildung sowohl für die Entstehung des Gangräs in dem einen als auch für das blutige Sekret in dem anderen Fall verantwortlich.

Nach JONES und TURNBULL (1981) war *B. cereus* für 28 Fälle von Mastitis beim Rind in England verantwortlich. Fünf Fälle endeten tödlich, die Krankheitsverläufe bei den anderen Tieren waren unterschiedlich. Möglicherweise wurde der Bazillus durch zur Fütterung verwendetes Brauereigetreibende übertragen. Der Erreger ließ sich darin ebenso wie im Kot der Tiere nachweisen.

Die Darmpassage beim Rind überlebt *B. cereus* problemlos (TE GIFFEL et al. 1996).

Drei Abortfälle beim Rind durch *B. cereus* sind von WOHLGEMUTH, BICKNELL und KIRKBRIDE (1972) beschrieben worden. Zwei der Aborte fanden im achten Monat der Trächtigkeit statt, der dritte im sechsten. *B. cereus* wurde in Reinkultur aus den Feten isoliert. Weitere Aborterreger konnten dabei nicht festgestellt werden.

2.4.2 Lebensmittel allgemein

B. cereus ist, wie oben beschrieben, ein ubiquitärer Keim. Es liegen Beschreibungen über die Isolierung aus verschiedenen Lebensmitteln wie Milchprodukten, Fleisch, Gewürzen und Getreiden (NOTERMANS und BATT 1998), im einzelnen z.B. aus Vanillesoße (HAUGE 1955, von LUDWIG 1971), Erbsensuppe (BENNETT et al. 1993), Sojabohnen (TORRES-ANJEL 1981), gebratenem Reis (GILBERT 1979, MORTIMER und McCANN 1974), Fleisch (SHARMA und DOGRA 1983), gekochtem Reis, gegrilltem Hähnchen, Fleischbällchen, Pudding, gekochten Kartoffeln, Rosenkohl und pasteurisierter Sahne (GILBERT 1979) vor.

Von GOEPFERT, SPIRA und KIM (1972) wird als Ursache für die hochgradige Kontamination der Lebensmittel ungenügende Erhitzung und unsachgemäße Lagerung angesehen.

In Reis vermehrt sich *B. cereus* am schnellsten zwischen 25 und 35° C, ein emetischer Stamm hatte sein Maximum bei 45° C. Das Auskeimen der Sporen fand noch bei 5° C statt (JOHNSON, NELSON und BUSTA 1983).

2.4.3 Milch und Milchprodukte

B. cereus kommt in Milch (GRIFFITHS 1993), UHT-Milch (MOSTERT, LÜCK und HUSMANN 1979), Vollmilch, fettreduzierter Milch und Magermilch (SÖGAARD 1975),

Sahne (PHILLIPS, GRIFFITHS und MUIR 1981), Cheddar Käse und Eiscreme (AHMED, MOUSTAFA und MARTH 1983), Milchpulver und Babynahrung (BECKER et al. 1994) vor.

Nach Untersuchungen von SLAGHUIS et al. (1997) waren 5 % der Tankmilch auf den Höfen mit *B. cereus* kontaminiert (< 2-10 Sporen/10 ml), bei AHMED, MUSTAFA und MARTH (1983) waren es 9 % der Rohmilchproben. TE GIFFEL et al. (1996) fanden in 35 % der Rohmilchproben *B. cereus*, bei Untersuchungen von Milchpulver hingegen waren 60 % der Proben positiv. STADHOUDERS, HUP und HASSING (1982), denen Daten der Netherlands Controlling Authority for Milk and Milk Products (COZ) als Grundlage dienten, ermittelten in positiven Proben bis zu 20 *B. cereus*/g Milchpulver, in Ausnahmefällen aber sogar mehr als 100/g. Zahlen von WONG, CHANG und FAN (1988) zeigen, daß bei ihren Untersuchungen 29 % der Milchpulverproben (n = 94) *B. cereus* enthielten, wobei die Proben im Durchschnitt mit 74 KBE/g kontaminiert waren. 11,7 KBE/g und 3,9 Sporen/g Pulver wiesen WALTHER und LÜCK (1978) im Mittel in ihren Proben nach. 26,7 % der Proben waren *B. cereus* positiv.

2.4.3.1 Kontamination/Dekontamination

Es ist bekannt, daß *B. cereus* auf dem Wege der Kontamination in Milch und Milchprodukte gelangt (WONG, CHANG und FAN 1988). Als Quellen für die Kontamination der Rohmilch mit *B. cereus*-Sporen kommen -neben den Gerätschaften- Staub, Erde, Einstreu, Futter, Luft und die Verschleppung durch die Hände des Melkpersonals auf das Euter in Betracht (BECKER und TERPLAN 1987). Es gibt saisonale Unterschiede im Auftreten von *B. cereus* in Milch, wobei die höchsten Werte im Sommer und Herbst erreicht werden (CHAMPAGNE et al. 1994). Daß in den Sommer- und Herbstmonaten in der Milch höhere Zahlen an *B. cereus* gefunden werden als im Winter, wird von BECKER und TERPLAN (1987) auf die Tatsache zurückgeführt, daß sich *B. cereus* auf unzureichend gereinigten Geräteoberflächen vermehren kann. Ähnliche jahreszeitliche Abhängigkeiten konnten sie auch bei Milchpulver finden. SLAGHUIS et al. (1997) fanden ebenfalls Differenzen in der Kontamination mit *B. cereus*. Sie unterschieden aber zwischen Herden, die aufgestallt waren (bis zu 4 % *B. cereus* positiv), und Herden, die Weidegang hatten (bis zu 23 % *B. cereus* positiv). Bei Milch von Rindern, die das ganze Jahr über im Stall gehalten wurden, konnten sie keinen jahreszeitlichen Unterschied bei der Kontamination mit *B. cereus* feststellen. Auch TE GIFFEL et al. (1995) haben festgestellt, daß die Anzahl der Sporen in der Milch von der Weideperiode abhängig ist. Die Kontamination der Milch läßt sich durch gute Euterhygiene verringern (CHRISTIANSSON 1997).

TE GIFFEL et al. (1997) konnten *B. cereus* in 40 % der untersuchten pasteurisierten Milchen aus Haushalten in den Niederlanden nachweisen. Dagegen wurde *B. cereus* so-

gar in allen von NOTERMANS et al. (1997) untersuchten 1l-Packungen frischer Milch in den Niederlanden gefunden (n = 38).

LIN, SCHRAFT und GRIFFITHS (1997) sehen die Sporen in der Rohmilch als Ursache für die Kontamination von Milchprodukten an. BILLING und CUTHBERT (1958) fanden in über 10,5 % der untersuchten Milchkanen mehr als 5×10^3 *B. cereus*/Kanne. CHRISTIANSSON et al. (1998) kommen zu dem Schluß, daß die Kontamination mit *B. cereus* überall in der Produktionskette stattfinden kann. Als primäre Ursache betrachten aber auch sie Sporen in der angelieferten Rohmilch. STADHOUDERS, HUP und HASSING (1982) führen für die Kontamination von Milchpulver drei mögliche Begründungen an:

- Milch von geringer Qualität zu Prozeßbeginn
- Vermehrung der Bakterien während der verschiedenen Schritte der Herstellung
- Zufällige Kontamination während des Herstellungsprozesses.

B. cereus gehört als Sporenbildner zu den hitzeresistenten Bakterien, so daß besonders hitzebehandelte Produkte bei einer Kontamination betroffen sind. Nur die Endosporen selber sind hitzeresistent, nicht die vegetative Form. Für die Hitzeresistenz ist der geringe Wassergehalt des Protoplasten die wahrscheinlichste Erklärung. Im Regelfall überstehen die Sporen von *B. cereus* eine UHT-Behandlung nicht (DAVIES 1975). Während einer UHT-Behandlung bei 104,5° C werden 25 % der *B. cereus* Sporen, bei 121° C 99,98 % und bei 137,8° C 99,99 % zerstört. Werden die Sporen hinterher für sechs Stunden bei 35° C inkubiert, kommt es nach der Behandlung bei 104,5° C zur Vermehrung mit einer Generationszeit von 63 min, bei 121° C von 37 min und bei 137,8° C von 38 min (MARTIN, HARPER und GOULD 1966). Es ist erstaunlich, daß die Generationszeit nach einer UHT-Behandlung bei höheren Temperaturen abnimmt. FRANKLIN (1970) isolierte Sporen von *B. cereus*, die 135° C für vier Stunden überstanden. Die Umweltbedingungen während der Sporulation, der Erhitzung und der Erholung sind die signifikantesten Faktoren, die Einfluß auf die Hitzeresistenz der bakteriellen Endosporen haben (FRANKLIN 1970). Bei Milchprodukten mit hohen Fettanteilen, wie z.B. Sahne (48 % F.i.T.), nimmt die Hitzeresistenz der Sporen zu (GRIFFITHS und PHILLIPS 1990). Außerdem wird die Hitzeresistenz der Sporen in Milch durch die Anwesenheit von CO₂ gesteigert (GUIRGUIS, GRIFFITHS und MUIR 1984).

Auch Biofilme auf den Geräteoberflächen können nach WIRTANEN, HUSMARK und MATTILA-SANDHOLM (1996) zu einer Kontamination der Lebensmittel während der Herstellung führen, da nach CHRISTIANSSON et al. (1998) die hydrophoben Sporen auf der Oberfläche der Geräte haften bleiben. WIRTANEN, HUSMARK und MATTILA-SANDHOLM (1996) untersuchten die Vermehrung von *B. cereus* auf rostfreiem Stahl und Teflon und die Möglichkeiten zur Dekontamination. Doch weder "Cleaning in place" (CIP),

Spülen mit warmen Wasser, noch das Reinigen mit hochehitztem Wasser brachten auf einer der beiden Oberflächen einen vollständigen Erfolg.

Mittel mit Wirkstoffen, die Chlor freisetzen, wie z.B. Puremel[®] und Alfablink[®], wirken stark sporozid. Hinsichtlich der Resistenz von *B. cereus*-Sporen gegenüber chlorhaltigen Desinfektionsmitteln gibt es stammspezifische Unterschiede. Wenn Sporen auf Oberflächen haften, sind sie gegenüber chlorhaltigen Desinfektionsmitteln resistenter als wenn sie sich in einer Suspension befinden (TE GIFFEL et al. 1995b).

Die Inaktivierung durch Hitze von *B. cereus*-Sporen, die auf einem festen Untergrund haften, ist von der relativen Luftfeuchtigkeit abhängig. Den größten Effekt hat die Hitze bei einer Luftfeuchtigkeit von 40 %. Sowohl bei einer Zunahme als auch bei einer Abnahme der Luftfeuchtigkeit nimmt die Inaktivierungsrate ab (PFEIFER und KESSLER 1994).

In milchverarbeitenden Betrieben werden zur Steigerung der mikrobiellen Qualität von Milchprodukten Entkeimungszentrifugen (Baktofugen) verwendet. Die Keimzahl von mesophilen Bazillen wird um den Faktor zehn verringert, die der thermophilen auf die Hälfte. Von insgesamt 15 verschiedenen isolierten *Bacillus*-Arten konnten nach der Baktofugation nur noch Keime der Arten *B. licheniformis*, *B. pumilus* und ein einziger Stamm von *B. circulans* nachgewiesen werden (TATZEL 1994). Bei der Entkeimung der Milch mit Hilfe der Baktofuge erschweren das geringe spezifische Gewicht und die Größe von *B. cereus* die Abtrennung durch Zentrifugalkraft. Durch Drosseln der Separator-Zulaufleistung auf z.B. 60 bis 70 % Nennleistung lassen sich Entkeimungseffekte von größer 90 % erzielen (LEHMANN und ZETTIER 1989).

2.4.3.2 Vermehrung

Für das Verhalten in der wärmebehandelten Milch ist es nicht unwesentlich, woher die in der Rohmilch vorhandenen Sporen stammen. So konnte festgestellt werden, daß Sporen aus den Melkgerätschaften zum langsam auskeimenden, solche aus Erde, Futter, Mist und ähnlichem zum schnell auskeimenden Typ gehören. Beide unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Hitzeresistenz und auch der Fähigkeit der vegetativen Zellen zur raschen Sporulation, Eigenschaften, die bei den langsam auskeimenden Typen stärker ausgeprägt sind (BECKER und TERPLAN 1987).

In pasteurisierter Milch keimen innerhalb von zwei Stunden alle Sporen von *B. cereus* aus, in Milchen mit Fruchtaromen sind es ungefähr 54 % und in fermentierten Milchen ca. 28 % der Sporen. In Milchpulver und Eiscreme ist die Vermehrung von *B. cereus* aufgrund der geringen Wasseraktivität bzw. der niedrigen Lagerungstemperatur kaum möglich (WONG, CHEN und CHEN 1988). Der a_w -Wert von Milchpulver liegt bei $< 0,6$ (SPILLMANN und FEDDER 1997).

Die durchschnittliche Population von *B. cereus* in Milchprodukten beträgt 15 bis 280 KBE/ml bzw. pro Gramm, in Milchpulver liegt sie bei 74 KBE/g. Dabei sind 29 % der Milchpulverproben kontaminiert (WONG, CHANG und FAN 1988). TE GIFFEL et al. (1996) fanden 60 % positiver Proben. In den Auswertungen von STADHOUDERS, HUP und HASSING (1982) sind >100 *B. cereus*/g Milchpulver belegt, wobei in den meisten Proben aber nur bis zu 20 pro Gramm gefunden wurden. Bei der Bewertung dieser Zahlen darf nicht vergessen werden, daß sie teilweise von 1982 stammen.

In einen Tag alter Milch konnten bei einer Untersuchung in den Niederlanden ca. 10 KBE *B. cereus* pro 100 ml nachgewiesen werden (NOTERMANS et al. 1997). Nach zwölf bis vierzehn Tagen bei 7,5° C kann die Konzentration an *B. cereus* in Milch auf 10⁸ KBE/ml ansteigen (LANGEVELD et al. 1996).

Wenn vegetative Zellen in Milch bei Raumtemperatur inokuliert werden, vermehren sie sich sehr schnell nach einer kurzen lag-Phase von zwei Stunden und erreichen mehr als 10⁸ KBE/ml innerhalb von acht Stunden. Werden hingegen Sporen von *B. cereus* in die Milch inokuliert, ist es ähnlich, die lag-Phase dauert aber vier Stunden (WONG, CHEN und CHEN 1988).

Nach DUFRENNE et al. (1995) und FOEGEDING und BERRY (1997) können *B. cereus*-Stämme sich an niedrige Temperaturen adaptieren. Aus Milch und Milchprodukten sind sogar *B. cereus*-Stämme isoliert worden, die sich bei 4° C (VAN NETTEN et al. 1990) und 1° C (COGHILL und JUFFS 1979) vermehren.

Die Generationszeit bei 0 bis 2° C beträgt 30 Stunden, während sie bei 4 bis 6° C auf sechs bis neun Stunden reduziert wird (COUSIN 1982).

2.4.3.3 Verderb

Aufgrund seiner Sporen, die die Milcherhitzung überstehen, ist *B. cereus* ein häufiger Verderbniserreger in Lebensmitteln, insbesondere in Molkereiprodukten (JONES und TURNBULL 1981). Dort führt er z. B. zu einer Gerinnung der Milch.

Beim Verderb handelt es sich, entsprechend der Definition des Internationalen Milchwirtschaftsverbandes, um eine Koagulation der Milch, die nicht mit einem unmittelbaren Anstieg des Säuregrades verbunden ist. Sie wird zunächst meist durch kleine koagulierte Partikel, die auf der Oberfläche der Milch treiben, sichtbar. Flockiger Rahm oder Rahmpfropfen, deren Entstehung auf physikalische Ursachen zurückzuführen ist, können durch Erhitzen auf 45° C wieder verflüssigt werden, während solche bakterieller Genese auch bei Erhitzung auf 100° C stabil bleiben. Die Entstehung des Fehlers wird auf eine Lecithinaseaktivität von *B. cereus* zurückgeführt. Das Enzym soll an der Membran der Fettkügelchen angreifen und, zusammen mit einer Koagulation des membranassoziierten Kaseins, die Flockenbildung hervorrufen. Eine Vermeidung des Defektes ist wohl nur

durch eine geschlossene Kühlkette zu erreichen. In diesem Zusammenhang ist zu bedenken, daß *B. cereus* psychrotrophe Eigenschaften besitzt (BECKER und TERPLAN 1987).

Die Bildung hitzeresistenter Proteasen, die zum Verderb von UHT-Milch im Verlauf der Lagerung beitragen, wird ebenfalls diskutiert. In neuerer Zeit wird auch über einen Fehler bei Rührjoghurt berichtet, der auf die Vermehrung von *B. cereus*, bevor die spezifische Joghurtflora dominiert, zurückgeführt wird. Der Defekt äußert sich in einer verzögerten Säuerung und der Abscheidung von Serum vor dem Rühren sowie Klumpenbildung und fadem Aroma beim fertigen Produkt (BECKER und TERPLAN 1987).

Bei der Milchpulverherstellung, besonders bei "low heat"-Produkten, führen aerobe und anaerobe Sporenbildner (*B. cereus*, *Clostridium perfringens*) zu einem Verderb der Produkte (LEHMANN und ZETTIER 1989). Die Sporen überleben die Pasteurisierung von Milch und Sahne (COGHILL und JUFFS 1979). Bei einer Pasteurisierung bei 84 bis 88° C kommt es sogar zu einem schnelleren Verderb der Milch als bei einer Pasteurisierung bei 72° C, da die höheren Temperaturen zu einer Aktivierung der Sporen führen (CROMIE, SCHMIDT und DOMMETT 1989). Der Organismus entwickelt sich recht schnell und begrenzt dadurch die Haltbarkeit von Milch und Milchprodukten (WOUTERS 1993).

Gegen Ende der Haltbarkeit von Milchprodukten (Milch, Sahne etc.) ist die mikrobielle Population eine Monokultur von thermoduren Psychrotrophen. Milch, die bei 6° C aufbewahrt wurde, zeigte keine Anzeichen von Verderb. Bei einer Lagerung bei 8° C zeigten die ersten Milchproben nach zwölf Tagen Verderb, bei 10° C nach acht und bei 12° C nach sechs Tagen (NOTERMANS et al. 1997). Das verdorbene Produkt enthält hauptsächlich Bazillen, besonders *B. circulans* und *B. cereus* (DOMMETT 1992). Dort führen die Bakterien zur süßen Gerinnung des Milchproduktes (OVERCAST und ATMARAM 1974) und zu einem bitteren, fruchtigen, ranzigen oder hefig-gärigen Aroma (COLLINS 1981).

2.4.3.4 Toxinbildung

Es wird berichtet, daß *B. cereus* in pasteurisierter Milch, die bei 6 bis 8° C (CHRISTIANSSON 1993, CHRISTIANSSON et al. 1989) und bei 30° C (GRIFFITHS 1990) gelagert wird, Toxin produzieren kann. Nach SUTHERLAND (1993) wird Toxin in Milch bei allen Lagertemperaturen gebildet, bei denen sich *B. cereus* vermehrt. Diese Beobachtung hat nach GRIFFITHS und PHILLIPS (1990) einen geringen Wert, da für eine nachweisbare Toxinproduktion eine große Zahl ($> 1 \times 10^7$ KBE/ml) von *B. cereus* vorhanden sein muß.

Nach GRIFFITHS (1990) nimmt die Toxinbildung von *B. cereus* in Milch mit dem Ansteigen der Temperatur zu. Der *B. cereus* Stamm B-4ac produzierte in pasteurisierter, in sterilisierter und in fermentierter Milch Toxin, aber nicht in Milch mit Apfelaroma (WONG, CHEN und CHEN 1988).

BAKER und GRIFFITHS (1995) untersuchten die Stabilität des diarrhoeischen Toxins mittels des Tecra[®] BDE VIA. Bei 65 und 70° C ist die Thermostabilität des Toxins in Milch vier Mal so groß wie in zellfreiem Kulturüberstand.

Es besteht ein Zusammenhang zwischen der Menge an aufgenommenen *B. cereus*-Zellen pro ml und dem Auftreten von Symptomen bei Testpersonen. Es gibt jedoch kein klares Dosis-Antwort-Verhältnis, und es wird angenommen, daß *B. cereus* nicht immer zu Erkrankungen führt (LANGEVELD et al. 1996).

NIKODEMUSZ et al. (1969) führten einen Versuch durch, bei dem vier Personen je 200 g eines Puddings aßen, der 7×10^7 Bazillen pro Gramm enthielt. $1,4 \times 10^{10}$ Keime gelangten dabei in den Darm. Nur ein Teilnehmer entwickelte Diarrhoe über 72 h. Besonders auffällige Symptome konnten nicht beobachtet werden.

Für das "diarrhoeische Syndrom" müssen $1,2 \times 10^3$ bis 10^8 *B. cereus* g⁻¹, im Mittel 10^7 ; für das "emetische Syndrom" 10^4 bis 10^{10} g⁻¹, im Mittel ebenfalls 10^7 , vorhanden sein (KRAMER und GILBERT 1989).

BECKER und TERPLAN (1987) schreiben, daß $> 10^6$ *B. cereus* g⁻¹ Lebensmittel vorhanden sein müssen, um Krankheitssymptome hervorzurufen. Jedoch können besonders exponierte Verbraucherkreise (Kinder, Kranke, Senioren) schon bei Vorliegen wesentlich geringerer Keimgehalte erkranken.

ROWAN und ANDERSON (1998) ziehen die zulässige Grenze für *B. cereus* bei $< 10^5$ KBE/g bzw. ml.