

### **3. EIGENE UNTERSUCHUNGEN**

#### **3.1 Material und Methoden**

##### 3.1.1 Konventionelle Bakteriologie

##### 3.1.1.1 Material

##### Nährmedien:

- Polymyxin B-Eigelb-Mannit-Bromthymolblau-Agar (PEMBA) (Oxoid)
- Blutplatte (5 % Hammelblut in Merck I-Agar)
- Brain Heart Infusion broth (BHI) (Oxoid)
- BHI + 7 % NaCl
- Testmedien für Kohlenhydrat (KH)-Verstoffwechslung: Nutrient broth No. 2 (Oxoid) + 2,5 % Phenolrotlösung sowie je 1 % D-Mannit, D-Xylose, L-Arabinose (alles Merck)
- Stärke-Agar: Nutrient-Agar (Oxoid) + 0,2 % Stärke (Merck)
- KNO<sub>3</sub>-Bouillon: Nutrient broth CM 1 (Oxoid) + 0,1 % KNO<sub>3</sub>
- Gelatine: 15 % Nährgelatine, 1 % Pepton, 0,5 % Hefeextrakt, 0,2 % Glucose (alles Merck)
- TSB + 50 U/ml Polymyxin B Sulfat (Sigma)
- Doppelt gepuffertes (Pepton-)Wasser (Difco) (für Milchpulver ohne Pepton)

##### Reagenzien:

- H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 3 % v/v in A.dest
- Kristallviolettlösung, Lugolsche Lösung, Alkohol, Safraninlösung für Gramfärbung modifiziert nach HUCKER
- 5 % Malachitgrün-Lösung, 0,3 % Sudanschwarz-Lösung, 0,5 % Safranin-Lösung, Xylol für Schnellfärbeverfahren nach HOLBROOK und ANDERSON
- Oxidase-Teststreifen (Bactident<sup>®</sup>, Merck)
- Sulfanilsäurelösung: 0,5 g Sulfanilsäure (Merck) in 100 ml Aqua dest. + 30 ml Eisessig (Merck), filtrieren
- Naphtylaminlösung: 0,1 g Naphtylamin in 100 ml kochendem Aqua dest. lösen + 30 ml Eisessig, filtrieren

### 3.1.1.2 Stämme

#### Referenzstämme:

4 Referenzstämme mit Unterschieden in den bakteriologischen Eigenschaften und der Toxizität wurden eingesetzt:

P 59 = DSM (Deutsche Sammlung für Mikroorganismen, Braunschweig) = 2302 9/83

P 60 = 4433/73 (KRAMER, England), diarrhoeisch = SMR 161

P 61 = F 4810/72 (England), emetisch = SMR 178

P 62 = psychrotroph, 8° C (Schweden), diarrhoeisch = SMR 182

Herkunft der SMR-Stämme: Swedish Dairie's Association, Lund  
Dr. A. CHRISTIANSSON

#### Feldstämme:

Im Rahmen eines Forschungsvorhabens mit einem großen Milchtrocknungsbetrieb wurden seit 1994 insgesamt 1365 Milchpulverproben und 215 Umfeldproben auf *B. cereus* untersucht. Daher stammen folgende Feldstämme:

146 Stämme aus Milchpulver

183 Stämme aus dem Umfeld der Produktionsanlage

Alle in dieser Arbeit verwendeten Bazillen-Stämme sind nach möglichst wenig Passagen in BHI + 10 % Glycerin bei -80° C konserviert worden. Auf diese Gefrierkultur wurde für alle Fragestellungen jeweils zurückgegriffen.

### 3.1.1.3 Methoden

Die Isolierung aus Milchpulver und Umfeldproben erfolgte in Anlehnung an die amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach §35 LMBG L 01.00/53:

#### Probenaufbereitung:

##### a) Umfeldproben

- Entnahme mit in doppelt gepuffertem Peptonwasser getränkten Gazetupfern
- Inkubation in gleichem Medium bei 37° C mindestens 18 h
- 1 ml in 10 ml TSB + Polymyxin überführen
- 48 h bei 30° C inkubieren
- Drei-Ösen-Ausstrich auf PEMBA, 18 h bei 30° C inkubieren

##### b) Milchpulver

- 750 g Milchpulverprobe 1:10 in doppelt gepuffertem Wasser auflösen

- 1 ml in 10 ml TSB + Polymyxin überführen
- 48 h bei 30° C inkubieren
- Drei-Ösen-Ausstrich auf PEMBA, 18 h bei 30° C inkubieren

Das Ergebnis aus der normal konzentrierten TSB ermöglicht die Aussage: weniger oder mehr als 10 *B. cereus*/g.

#### Morphologische Beurteilung:

- Gramfärbung nach HUCKER, Beurteilung von Färbeverhalten, Zellgröße, Sporenform und Ausprägung des Sporangiums
- Beweglichkeit
- Schnellfärbeverfahren nach HOLBROOK und ANDERSON von frischen Kulturen von PEMBA, charakteristisches Erscheinungsbild vegetativer Zellen von *B. cereus* nach der Färbung: Lipidtröpfchen sind schwarz, die Sporen schwach- bis mittelgrün, das Zytoplasma rot gefärbt
- Sudanschwarz-Färbung (mod. siehe Oxoid Handbuch S. 87) zur Darstellung der Lipidtröpfchen in vegetativen Zellen von *B. cereus* von einem Tag alten PEMBA-Platten:  
1 Minute in 0,3 % Sudanschwarz-Lsg. in 70 % Alkohol färben, 5 Sekunden in 96 % Alkohol waschen, 20 Sekunden in 0,25 % Safranin ⇒ Lipid-Tröpfchen schwarz, Zytoplasma rot gefärbt.

#### Biochemisches Leistungsspektrum:

- Gelatinehydrolyse: Ein Tropfen bewachsener Bouillon wird auf ein Gelatine-Röhrchen überimpft, 24 h bei 30° C bebrütet und 6 h bei 6° C gekühlt. Anschließend wird die Gelatinehydrolyse beurteilt.
- Katalase: Ein Tropfen 3 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> wird auf ein Deckglas gegeben und mit einer Öse Kulturmaterial verrieben. Im positiven Fall kommt es zu einer deutlichen Gasbildung.
- Oxidase: Auf den Teststreifen wird Kulturmaterial aufgetragen, eine Blaufärbung des Streifens zeigt die Aktivität der Oxidase an.
- Stärkehydrolyse: Die Platte wird mit der zu untersuchenden Kultur beimpft und 24 h bei 30° C bebrütet. Dann werden einige Tropfen Lugolsche Lösung hinzugegeben und die Reaktion beurteilt. Wird der Agar braun gefärbt, wurde Stärke verstoffwechselt, färbt er sich blau, ist sie nicht abgebaut worden.
- Lecithinase: Die Lecithinaseaktivität wird auf PEMBA nachgewiesen. Sie zeigt sich durch die Eigelbpräzipitation.

- KH-Verstoffwechslung:

L-Arabinose, D-Xylose und D-Mannit: Das entsprechende Röhrchen wird mit einem Tropfen bewachsener Bouillon beimpft und 24 h bei 30° C bebrütet. Kommt es zum Farbumschlag des Indikators zu gelb, ist der Zucker verstoffwechselt worden.

Außerdem wird die Verstoffwechslung von D-Mannit auf PEMBA nachgewiesen. Die Platte wird mit einer Kultur beimpft und für 24 h bei 30° C bebrütet. Wird D-Mannit nicht abgebaut, kommt es zu einem Farbumschlag des Bromthymolblau nach Blau.

- Nitratreduktion: Der beimpften und bei 30° C bebrüteten KNO<sub>3</sub>-Bouillon werden 1 ml Sulfanilsäurelsg. zugesetzt und ein Tropfen Naphtylaminlsg. Schon eine kurzzeitige Rotfärbung zeigt an, daß Nitrat reduziert worden ist.
- Hämolyse: Das Hämolyseverhalten wird auf Blutagar beurteilt. Zu erwarten ist eine scharfrandige, ausgeprägte β-Hämolyse.

Vermehrungsverhalten in:

- 7 % NaCl-Bouillon nach 24 h bei 30° C
- BHI-Bouillon nach 3 Wochen bei 6° C
- BHI-Bouillon nach 24 h bei 40° C im Wasserbad.

### 3.1.2 Molekularbiologische Charakterisierung

#### 3.1.2.1 Material

DNA-Freisetzung:

- BHI-Agar
- A.bidest.
- Safelock-Cups 1,5 ml (Eppendorf)
- Wasserbad 100° C
- Eisbad

PCR:

**Reagenzien:**

- Primer (MWG Biotech GmbH), 100 pmol/100 µl Ansatz

<b>Primer</b>	<b>Sequenz</b>	<b>Autor</b>
7	5'-ACG CGC CCT	BROUSSEAU et al. 1993
9	5'-CCG GCG GCG	BROUSSEAU et al. 1993
10	5'-GAG CTG ACC A	HENDERSON, DUGGLEBY und TURNBULL 1994

- Desoxynucleosid-Triphosphate (dNTP's), Lithiumsalze, dATP, dCTP, dGTP, dTTP (Boehringer, 1051-440, -458, -466, -482), 0,2 mmol je dNTP/100 µl Ansatz
- Polymerase DyNAzyme EXT DNA Polymerase (Biometra 100732), 2,5 U/100 µl Ansatz
- MgCl<sub>2</sub> (Biometra), 1,5 mmol/100 µl Ansatz
- PCR-Puffer: 10 mmol Tris-HCl, 50 mM KCl, pH 8,3 (Biometra), 10 µl/100 µl Ansatz
- Mineralöl (Sigma), 70 µl/Ansatz
- Wasser (Sigma, W-4502) DNase + RNase frei

#### **Geräte:**

- Thermocycler (Biometra, UNO-Thermoblock)
- Zentrifuge (Eppendorf 5415 C)
- Spitzen, DNA-frei, Biopur (Eppendorf)
- Filtertips (Biozym)
- Cups DNA-frei einzeln verpackt, Biopur (Eppendorf)

#### Agarose-Gelelektrophorese:

##### **Reagenzien:**

- Agarose (Merck 1.01236)
- Ethidiumbromid (Merck 111615)
- Gelladepuffer s.u.
- Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Merck 1.08382)
- Borsäure (Merck 1.00165)
- EDTA (Titriplex III z.A.) (Merck 8418)
- DNA Längenstandards VI, XIII, XIV (Boehringer 1062590, 1721925, -933)

##### **Geräte:**

- Magnetrührer mit Heizplatte (IKA Labortechnik)
- Wasserbad (Köttermann)
- Geltablett mit Kamm, 12 Kavitäten (Biometra)
- Elektrophoresekammer (Biometra)
- Fluo-Link KV-Transilluminator (Fröbel)
- Zentrifuge (Eppendorf 5415 C)
- Polaroid-Fotografie + Film (B + W Instant Pack Film)

### Lösungen:

- 10 x TBE-Puffer (Stammlösung) pH 8,3
- 0,89 M Tris aminomethan = 107,8 g
- 0,89 M Borsäure = 55,0 g
- 0,025 M EDTA = 9,3 g
- 1 x TBE-Puffer (Gebrauchslösung)  
1 : 10 mit Bidest verdünnen
- Ethidiumbromid  
1 % Ethidiumbromid-Lösung w/v in Bidest
- Gelladepuffer  
0,1 % Bromphenolblau (Merck 8122)  
0,1 % Xylencyanol (Sigma x-4126)  
50 % Glycerin  
lösen in Bidest

### 3.1.2.2 Methoden

#### DNA-Freisetzung:

Die bei -80° C aufbewahrten *Bacillus cereus*-Stämme werden auf BHI-Platten für 18 h bei 30° C angezüchtet.

In ein Reaktionsgefäß mit Sicherheitsverschluß (1,5 ml Safelock, Eppendorf ), wird eine Kolonie in 500 µl steriles A. bidest überimpft (pro Stamm im Doppelansatz). Eine photometrische Dichtebestimmung des Templates ist anfänglich durchgeführt worden. Sie hatte keinen Einfluß auf die Ergebnisse.

Die Proben werden für 5 min im kochenden Wasserbad zur DNA-Freisetzung und Denaturierung der doppelsträngigen DNA erhitzt. Anschließend erfolgt die sofortige Kühlung im Eiswasser, um die Rehybridisierung der Einzelstränge zu verhindern.

Dieser Rohextrakt wird als Template in der PCR verwendet.

#### PCR:

Lagerung sämtlicher Reagenzien und PCR-Ansatz erfolgen in Biopur-Cups, Pipettieren der PCR unter UV-Licht.

- Vorlegen von Wasser. Es wird je nach DNA-Extraktzugabe auf 100 µl Ansatz vorgelegt. Ausreichend Wasserkontrollen sind mitzupipettieren.
- Zugabe von 10 µl Puffer. Dabei werden die Spitzen jedesmal gewechselt, um ein Aufsaugen in die Filtertips zu vermeiden.

- Zugabe von 3 µl MgCl<sub>2</sub>, 10 µl dNTP's (2,5 µl pro Nucleotid) und 2,5 µl Polymerase. Auf das Spitzenwechseln kann jeweils verzichtet werden.
- Zugabe von 1 µl Primer (mit Spitzenwechsel).
- Herunterzentrifugieren (kurz)
- Überschichten der wässrigen Phase mit 70 µl Öl und erneutes Herunterzentrifugieren.
- Zugabe von 50 µl Template. Die Pipettenspitze wird am Rand des Eppendorf-Cups durch die Öl-Phase in die wässrige Phase geführt.
- PCR im Thermocycler  
Temperatursteigerung von 30° C bzw. 50° C auf 72° C mit 0,2° C/sec (ramping).

### Pipettierschema

	<u>Ø Kontrolle</u>	<u>Probe</u>
Wasser	73,5 µl	23,5 µl
Puffer	10 µl	10 µl
MgCl <sub>2</sub>	3 µl	3 µl
dNTP's	10 µl	10 µl
Polymerase	2,5 µl	2,5 µl
Primer	1 µl	1 µl
Öl	70 µl	70 µl
Template	/	50 µl

### Cycler-Programm

94° C	5 min	
<hr/>		
94° C	1 min	20 Schleifen
30° C	1 min	Ramping
72° C	2 min	0,2° C/sec.
<hr/>		
94° C	1 min	35 Schleifen
50° C	1 min	Ramping
72° C	2 min	0,2° C/sec.

### Agarose-Gelelektrophorese:

- Für Amplifikate: 2 %iges Gel, entspricht 1 g Agarose/50 ml
- Zugabe von 50 ml 1 x TBE Puffer
- Lösen auf dem Magnetprüher bei ca. 150° C bis zur klaren Lösung
- Zugabe von 2 µl 1 %igem Ethidiumbromid

- Abkühlen im Wasserbad bei ca. 60° C (~ 10 min)
  - Gießen des Gels
  - Vorbereitung des Amplifikates in einem neuen Cup
    - Proben sowie Marker herunterzentrifugieren
    - zum Marker: 1 µl Gelladepuffer + 6 µl Bidest + 2 µl Marker
    - zu den Amplifikaten: 1 µl Gelladepuffer + 8 µl Amplifikat
- Proben vor dem Auftragen ins Gel herunterzentrifugieren
- Die Kammer bis ca. 0,5 cm über dem Gel mit 1 x TBE füllen, dabei den gleichen TBE-Lösungs-Ansatz wie für die Herstellung des Gels verwenden
  - Auftragen der Proben
  - Laufzeit des Amplifikates 80 min bei 85 V
  - Darstellung und Polaroid-Fotografie des Gels auf UV-Transilluminator

### **3.1.3 Toxintests/Pathogenität**

#### 3.1.3.1 Material

##### ELISA für *B.cereus*-diarrhoeisches Toxin:

- BHI-Bouillon mit 0,1 % Glucose (pH 7,4) (BHIG)
- Tecra<sup>®</sup> *Bacillus cereus* Diarrhoel Enterotoxin Visual Immunoassay (Bioenterprises Ptd. Ltd., Australien, Vertrieb in Deutschland: Riedel de Haën)
- Stock-Zentrifuge (Wilhelm Stock Maschinenbau KG, Marburg/L., Germany)
- ELISA-Reader: Rainbow Photometer (SLT - Laborinstruments Ges.m.b.H., Austria)

##### Zellkultur:

- VERO-B<sub>4</sub>, Niere, afrikanische Grüne Meerkatze (DSM ACC 33)
- Kulturmedium: RPMI 1640 (Biochrom) + 10 % foetales Kälberserum
- BHI-Bouillon mit 0,1 % Glucose (pH 7,4) (BHIG)
- Sigma LH 340 (Testkit zum Nachweis der Laktatdehydrogenase (LDH))

##### Geräte:

- Filtropur S 0,2, steril (Sarstedt, USA)
- Cellstar<sup>®</sup>, Makroplatte mit Abdeckplatte, TC, steril (Greiner Labortechnik)
- Gewebekulturplatte, 24 Kavitäten, TC, steril (Greiner Labortechnik)
- Gasbrutschrank 7,5 % CO<sub>2</sub>, 37° C (zur Inkubation)



- Umkehrmikroskop (Carl Zeiss, Germany)
- Stock-Zentrifuge (Wilhelm Stock Maschinenbau KG, Marburg/L., Germany)
- 150 Watt Ultrasonic Disintegrator Mk2 (MSE Scientific Instruments, England)
- Spectralphotometer (340 nm) (Shimadzu, Japan)

### 3.1.3.2 Methode

#### ELISA für *B.cereus*-diarrhoeisches Toxin:

Probenaufbereitung (mod. lt. Herstellerangaben)

- Stamm mind. 12 h bei 30° C in BHIG (pH 7,4) unter Schütteln inkubieren (10 ml in 50 ml Kölbchen)
- In 10 ml Zentrifugengläsern zentrifugieren, 15 min bei 2200 x g, nicht bremsen
- 5 ml Überstand abnehmen, pH-Messung (soll: 7-8)
- 50 µl Probenadditiv zugeben, gut mischen
- 200 µl für Test verwenden

#### ELISA

Vorbereitung und Durchführung des ELISA erfolgen laut Angaben des Herstellers. Die Nachweisgrenze liegt laut Hersteller bei 1 ng/ml.

Die Auswertung des ELISA erfolgte je nach Fragestellung auf zwei verschiedene Weisen:

- a) Nach Angabe des Herstellers visuell mit einer Farb-Vergleichskarte
- b) Über Berechnung des Toxingehaltes mittels einer mitgeführten Standardreihe. Als Standard dienten hierbei Verdünnungsstufen der mitgelieferten Positiv-Kontrolle mit bekanntem Toxingehalt (21 ng/ml) (Abb. 3). Die Proben waren auswertbar, wenn sie im linearen Abschnitt der Kurve zwischen den Extinktionswerten 0,127 und 1,619 lagen. Lagen die Proben unterhalb des Extinktionswertes von 0,127, wurden sie als negativ gewertet. Wenn die Proben über dem Extinktionswert von 1,619 lagen, mußten sie verdünnt werden, damit sie ausgewertet werden konnten. Der nach einer Verdünnung ermittelte Toxingehalt wurde anhand der dazugehörigen Verdünnungsstufe auf die Ausgangskonzentration des Toxines pro ml zurückgerechnet.

Zur Überprüfung der Wiederholbarkeit des ELISA sind Verdünnungsreihen von fünf Stämmen wiederholt worden. Die Ergebnisse sind bestätigt worden.

### Zellkultur:

Die allgemeinen Methoden zum Arbeiten mit Zellkulturen sind in zahlreichen Lehrbüchern veröffentlicht. Im folgenden werden stichwortartig nur die für die hier vorgestellten Versuche wichtigen Bedingungen aufgeführt:

### **Zytotoxizitätstests**

Die VERO-B<sub>4</sub>-Zellen wurden in Cellstar<sup>®</sup> Makroplatten (6-Feld) angezüchtet. Für die Zytotoxizitätsversuche wurden Gewebekulturplatten (24-Feld) verwendet, die Anzuchtphase bis zum Erreichen verwendbarer Monolayer beträgt eine Woche. Die Zellkultur wurde vor dem Versuch frisch mit Kulturmedium überschichtet (1 ml/Feld). Alle Versuche wurden pro Platte im Doppelansatz und auf jeweils zwei Platten durchgeführt (HAMMER und WALTE 1996).

*B. cereus* wurde hierzu 24 h bei 30° C in BHIG angezüchtet (modifiziert nach GLATZ und GOEPFERT 1976), die Bouillon dann 15 min bei 2200 x g zentrifugiert und der Überstand sterilfiltriert (0,22 µm Spritzenvorsatzfilter). Auf jedes Feld der Zellkultur wurden dann 250 µl des Filtrates aufgebracht und die Wirkung nach 48 h abgelesen.

Die Auswertung erfolgte mit einem Umkehrmikroskop bei 25- und 160-facher Vergrößerung. Als Zellschädigung wurde dabei die Abrundung der polygonalen Zellen sowie der Grad der Vakuolisierung angesehen (HAMMER und WALTE 1996), wobei die *B. cereus*-Toxine meist zum vollständigen Absterben der Zellen führten.

Zusätzlich zur morphologischen Beurteilung wurde die Freisetzung von LDH mit dem Sigma LH 340-Testkit photometrisch bestimmt. LDH kommt im Zellkulturüberstand nur bei Schädigung der Zellmembranen vor. Zur LDH-Messung wurde das Spektralphotometer auf eine Wellenlänge von 340 nm eingestellt und die Absorptionsanzeige mit 1 ml A. dest. als Referenz auf Null abgeglichen. 1 ml Reagenz (LDH-L) und 50 µl Probe wurden in die Proben-Küvette pipettiert und durch vorsichtiges Kippen gemischt. Es wurde die Absorptionsänderung innerhalb einer Minute gemessen. Als Positivkontrolle diente ein Toxin-bildender *B. cereus*-Referenzstamm. Als positiver Referenzwert (Freisetzung = 100 %) beim LDH-Test diente der Mittelwert der Meßwerte der Überstände zweier Kulturfelder mit abgeschwemmten und mit Ultraschall desintegrierten Zellen (HAMMER und WALTE 1996). Gegen diesen Referenzwert wurde die LDH-Freisetzung der Proben berechnet (GRANUM 1985). Eine LDH-Freisetzung > 20 % wurde bei *B. cereus* nach statistischer Evaluierung als positiv definiert. Dieser Evaluierung lagen zwölf Überstände von Kulturfeldern zu Grunde, die nur mit BHI überschichtet waren, und zwölf Überstände mit abgeschwemmten und im Ultraschall desintegrierten Zellen. Sie dienten entsprechend als Negativ- bzw. Positivkontrollen.

### 3.2 Ergebnisse

#### 3.2.1 Morphologie und biochemisches Leistungsspektrum

##### 3.2.1.1 Isolierung der Stämme

Es wurden 1365 Milchpulverproben und 215 Umfeldproben von einem Betrieb untersucht, dabei konnten aus Milchpulver 146 und aus dem Umfeld 183 Stämme isoliert werden. Die Kontaminationsrate im Milchpulver liegt damit bei 11 %, die zahlenmäßige Belastung im Pulver bei ca. 1-10 Sporen/g (Probengröße 750 g). Bei den Umfeldproben wurde nicht quantifiziert, Abstrichflächen für Tupferproben waren max. 500 cm<sup>2</sup>. Dennoch erscheint das Umfeld bei einer Kontaminationsrate von über 85 % durchgängig und gleichmäßig mit *B. cereus* belastet.

Das Milchpulver läßt sich an Hand der Erhitzungsbedingungen der Milch in drei Typen einteilen (Tab. 5).

<b>Tab. 5: Verteilung der isolierten <i>B. cereus</i>-Stämme nach der Herkunft aus verschiedenen Milchpulvertypen</b> - Untersuchung von 1365 Milchpulverproben -			
<b>Milcherhitzung</b>	<b>Anzahl der Stämme (146)</b>	<b>Stämme in %</b>	<b>MP-Produktion in %</b>
High heat > 100° C	22	15	5
Medium heat 90-100° C	101	69	80
Low heat 72-73° C für 15 sek.	23	16	15

Die Anzahl der isolierten Stämme stimmt größenordnungsmäßig mit dem Anteil des jeweiligen Milchpulvers an der Produktion überein. Dies erklärt sich dadurch, daß selbst bei High heat-Pulver kein wirklich sporozider Erhitzungsprozeß stattfindet. Erstaunlich ist jedoch, daß gerade bei High heat-Pulver signifikant (chi-Quadrat Test) mehr Stämme isoliert wurden als bei den anderen Pulvertypen. Dies liegt an der Isolierungsmethode. Da alle Stämme nach einer Voranreicherung in einem nicht-selektiven Medium isoliert wurden, ist davon auszugehen, daß bei Low heat- und Medium heat-Pulver die noch vorhandene Begleitflora zu einer Unterdrückung der Vermehrung von *B. cereus* führt. In high heat-Pulvern liegt sicherlich nur noch eine Flora von Sporenbildnern mit einem geringeren Konkurrenzdruck vor.

Bei der Kontamination des Milchpulvers mit *B. cereus* treten außerdem deutliche jahreszeitliche Unterschiede auf (Tab. 6), wobei die Probenzahl in den einzelnen Monaten annähernd konstant ist.

**Tab. 6: Jahreszeitliche Unterschiede in der Kontamination von Milchpulver mit *B. cereus***

146 Stämme, isoliert zwischen dem 11.05.94 und dem 19.01.98

Monat	Jan.	Feb.	März	April	Mai	Juni	Juli	Aug.	Sep.	Okt.	Nov.	Dez.
Stämme	5	2	3	7	8	12	16	25	28	20	13	7

### 3.2.1.2 Morphologie, Vermehrungsverhalten und biochemisches Leistungsspektrum

Zur Identifizierung und Charakterisierung der isolierten Stämme wurden Parameter zu Morphologie und Vermehrungsverhalten erhoben sowie ein biochemisches Leistungsspektrum erstellt.

In der Morphologie sind alle Stämme gleich, bei den getesteten Bedingungen zum Vermehrungsverhalten reagieren die Stämme überwiegend einheitlich (Tab. 7). Besonders die an einer Stichprobe durchgeführte Sudanschwarzfärbung ist zur Identifizierung von *B. cereus* geeignet.

**Tab. 7: *B. cereus*: Morphologie und Vermehrungsverhalten, Auswertung von 329 *B. cereus*-Stämmen**  
(146 aus Milchpulver, 183 aus dem Umfeld)

	positiv	negativ
Gram-positiv	329	0
Zelle > 1 µm	329	0
Spore oval	329	0
Sporangium aufgetrieben	0	329
Beweglichkeit	329	0
Sudanschwarz-Färbung (42)	42	0
7 % NaCl	286	43
40° C	295	34
6° C	45	284

Die Daten ausgewählter Reaktionen des biochemischen Leistungsspektrums sind Tabelle 8 zu entnehmen. Besonders hervorzuheben sind hier die einheitliche Bildung von Hämolyisin und Lecithinase.

**Tab. 8: *B. cereus*: Biochemisches Leistungsspektrum, Auswertung von 329 *B. cereus*-Stämmen**

Parameter	positiv	negativ
Hämolyse	329	0
D-Mannit	0	329
D-Xylose	12	317
L-Arabinose	6	323
Stärkehydrolyse	192	137
Gelatinehydrolyse	103	226
Lecithinase	328	1
Oxidase	0	329*
Katalase	329	0
Nitratreduktion	304	25

\* Stämme frisch aufgetaut

Die variablen Parameter wurden gesondert herangezogen, um mögliche Unterschiede zwischen Stammpopulationen in Endprodukt und Umfeld zu beurteilen. Unterschiede in den Eigenschaften lassen sich zwar feststellen, diese sind jedoch nicht statistisch signifikant (Tab. 9). Es lassen sich daher anhand dieser Parameter keine Schlußfolgerungen hinsichtlich des Ursprungs der Stämme aus dem Milchpulver ziehen.

**Tab. 9: *B. cereus*: Variable Parameter - Stämme getrennt nach Herkunft**

Parameter	Milchpulverproben n = 146		Umfeldproben n = 183	
	positiv %	negativ %	positiv %	negativ %
40° C	81	19	97	3
6° C	23	77	7	93
7 % NaCl	82	18	91	9
Stärkehydrol.	62	38	55	45
Gelatinehydrol.	42	58	22	82
Nitratreduktion	92	8	92	8

Das Vorhandensein von Oxidase ist in der Literatur nicht beschrieben, in Bergeys Manual of Systematic Bacteriology (1986) wird Oxidase sogar als nicht vorhanden aufgeführt. Bei elf *B. cereus* Stämmen wurde die Oxidasereaktion gesondert untersucht. Bei allen frisch aufgetauten Stämmen konnte eine negative Oxidasereaktion festgestellt werden. Neun Stämme reagierten nach dem ersten Überimpfen positiv, die beiden anderen nach dem

vierten Überimpfen (Tab. 10). Es ist davon auszugehen, daß bei *B. cereus* die Fähigkeit zur Oxidase-Bildung durch das Tiefgefrieren zeitweilig unterdrückt ist. Die Versuchsreihen wurden mit BHI-Agar durchgeführt, um mögliche Verfälschungen durch Oxidase aus Erythrozyten in Blutagar zu vermeiden.

**Tab. 10: *B. cereus*: Oxidasereaktion nach mehrmaligem Überimpfen auf BHI-Agar**

<u>Stamm</u>	7	26	58	163	191	197	225	272	811	888	920
Frisch aufgetaut	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1 x überimpft	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
2 x überimpft	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
3 x überimpft	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
4 x überimpft	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
5 x überimpft	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

### 3.2.2 Molekularbiologische Charakterisierung

Für die Feintypisierung von *B. cereus*-Isolaten wurde die sog. RAPD-PCR eingesetzt. Mit diesem Verfahren ist es möglich, bei bekannten Spezies eine Typisierung auf Stammebene durchzuführen. Die so gewonnenen Ergebnisse können für die Charakterisierung von Stammpopulationen, z.B. im Umfeld einer Meierei, genutzt werden. Zusätzlich lassen sich auch mögliche Kontaminationspfade aufdecken.

Die zur Identifizierung von *B. cereus*-Stämmen eingesetzte RAPD-PCR wurde im Rahmen dieser Arbeit neu entwickelt. Da dieses Verfahren bekanntermaßen sehr empfindlich ist, sind Stabilität in Bezug auf Kontaminationsanfälligkeit und Wiederholbarkeit zu prüfen.

Die verwendeten Zufallsprimer sind sehr kurz, d.h. die Wahrscheinlichkeit, daß auch nicht von *B. cereus* stammende DNA-Sequenzen amplifiziert werden, ist hoch. Sorgfältiges und sauberes Arbeiten und häufige Mitführung von Null-Kontrollen sind somit unabdingbar.

#### 3.2.2.1 Wiederholbarkeit

Bei einem Vergleich von Stämmen in der RAPD-PCR gilt als Standard, daß die Ergebnisse nur bei den Stämmen verwertbar sind, deren DNA **gleichzeitig** in der PCR amplifiziert und die Amplifikate auf einem Gel aufgetragen wurden. Trotzdem soll hier gezeigt werden, daß auch eine Auswertung (mit Einschränkungen) über mehrere Versuche möglich ist. Hierzu wurden mit einem Stamm und drei verschiedenen Primern Versuche vielfach wiederholt und das Auftreten der jeweils möglichen Banden erfaßt (Tabelle 11, 12, 13).

**Tab. 11: *B. cereus*-Stamm 59: Häufigkeit des Auftretens der Banden in der RAPD-PCR bei Primer 7 (n = 18 Wiederholungen)**

Banden bp	Häufigkeit des Auftretens		Bandenstärke*
	absolut	%	
170	17	94,4	3
290	18	100,0	1
360	18	100,0	3
400	17	94,4	3
530	18	100,0	2
640	18	100,0	3
800	17	94,4	3
1200	12	66,7	1
2100	17	94,4	3

\*[schwach=1; mittel=2; stark=3]

**Tab. 12: *B. cereus*-Stamm 59: Häufigkeit des Auftretens der Banden in der RAPD-PCR bei Primer 9 (n = 16 Wiederholungen)**

Banden bp	Häufigkeit des Auftretens		Bandenstärke*
	absolut	%	
180	11	68,8	1
440	15	93,8	1
510	16	100,0	3
700	8	50,0	1
800	16	100,0	3
1000	6	37,5	1
1150	16	100,0	3
1400	3	18,8	1
1700	15	93,8	2

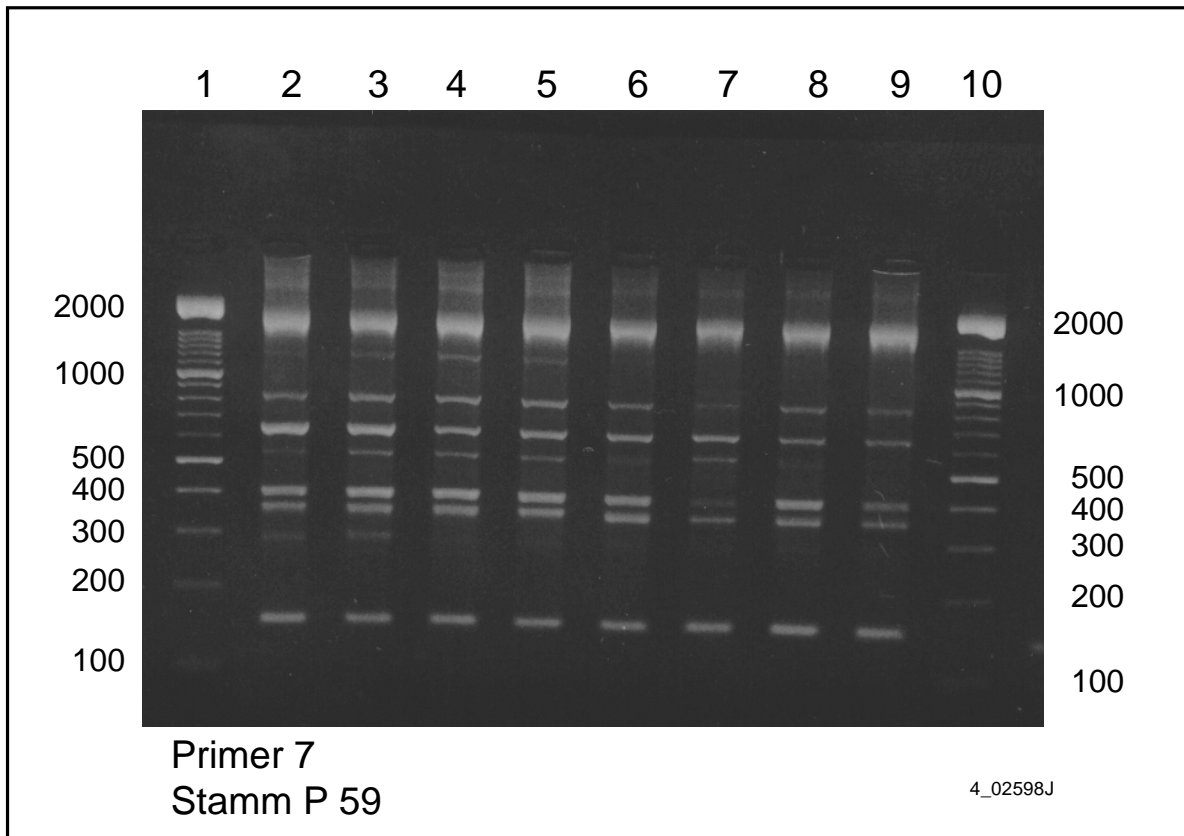
\*[schwach=1; mittel=2; stark=3]

<b>Tab. 13: <i>B. cereus</i>-Stamm 59: Häufigkeit des Auftretens der Banden in der RAPD-PCR bei Primer 10 (n = 17 Wiederholungen)</b>			
<b>Banden bp</b>	<b>Häufigkeit des Auftretens</b>		<b>Bandenstärke*</b>
	<b>absolut</b>	<b>%</b>	
320	16	94,1	2
440	3	17,7	1
510	15	88,2	2
650	17	100,0	3
730	2	11,8	1
800	3	17,7	1
830	1	5,9	1
850	2	11,8	1
900	4	23,5	2
920	2	11,8	1
950	2	11,8	1
1100	17	100,0	3
1400	3	17,7	1
1600	13	76,5	2
2600	5	29,4	2

\*[schwach=1; mittel=2; stark=3]

Es zeigt sich, daß insbesondere bei Primer 7 viele Banden sehr stabil auftreten, bei anderen (v.a. Primer 9 und 10) aber teilweise große Variabilität herrscht. Von der Standardvorgabe kann daher nicht abgewichen werden. Als zusätzliche Sicherheit werden die Stämme für die epidemiologischen Verfolgsuntersuchungen grundsätzlich im Doppelan-satz getestet. Abbildung 2 zeigt ein Photo eines Wiederholbarkeitsversuchs mit Stamm P59 und Primer 7.





**Abb. 2: Häufigkeit des Auftretens der Banden mit Stamm P59 und Primer 7, Spur 1 und 10 Längenstandard XIV, Spur 2 - 9 *B. cereus* Stamm P59**

Für die PCR ist Primer 7 angewendet worden. Die Banden 170, 360, 400, 530, 640, 800, 2100 bp treten bei jeder Wiederholung konstant auf. Die Bande 290 bp ist auf dem Originalfoto bei allen Wiederholungen vorhanden, dies wird auf der eingescannten Abbildung 2 nicht deutlich. Die Bande 1200 bp ist auf dem Originalfoto auf sechs Wiederholungen (2, 3, 4, 5, 6, 8) zu sehen, aber nur auf vieren in der Abbildung 2 (2, 3, 4, 5).

### 3.2.2.2 Epidemiologische Verfolgsuntersuchungen

Für die epidemiologische Verfolgsuntersuchung wurden die Ergebnisse der RAPD-PCR von 63 (davon 41 aus dem Milchpulver und 22 aus dem Umfeld) *B. cereus*-Stämmen einer Clusteranalyse zur Feststellung von Ähnlichkeiten unterzogen. Hierfür wurde die Basenpaarlänge sämtlicher durch die Primer 7, 9 und 10 in der PCR erzeugten Banden erfaßt und mit dem Statistikpaket SAS (Version 6.12) ausgewertet. Da es sich bei den erzeugten Daten um nicht-metrische Merkmale handelt, wurde für die Distanzmessung der Jaccard-Koeffizient berechnet und von 1 abgezogen (s. SAS/STAT Users Guide, Vol. 1, Vers. 6.4, 4th Edition, S. 536). Die Gruppierung der Stämme erfolgte dann durch die Zentroid-Methode der Clusteranalyse anhand der vorher berechneten Distanzmessung.

Bei den Stämmen, die die geringste Zentroid-Distanz aufwiesen, wurde die Ähnlichkeit wie folgt berechnet:

$$\text{Ähnlichkeit} = \frac{\sum \text{gemeinsame Banden}}{\sum \text{alle Banden}}$$

Zur Beurteilung, ab wann man überhaupt von Ähnlichkeit sprechen kann, wurden die für die DNA-Hybridisierung angewendeten Richtwerte herangezogen. Wenn mit dieser Methode Stämme für die taxonomische Einordnung verglichen werden, geht man von Zugehörigkeit zu einer gemeinsamen Art bei > 90 % Ähnlichkeit aus. Verschiedene Stämme einer Art sind sich meist zu > 99 % ähnlich. Da die hier eingesetzte RAPD-PCR mit Sicherheit weniger präzise als die DNA-Hybridisierung arbeitet, wurde die Auswertung auf Stämme bis zu 75 % Ähnlichkeit ausgedehnt.

Bei Anwendung dieser Methodik auf die mit allen drei Primern erzielten Ergebnisse ergeben sich folgende Ähnlichkeiten (Tab. 14):

<b>Tab. 14: Ähnlichkeiten von <i>B. cereus</i>-Stämmen nach Clusteranalyse (Ergebnisse mit Primer 7, 9 und 10 wurden berücksichtigt)</b>			
Stämme	Anzahl Banden insgesamt	Anzahl gemeinsamer Banden	Ähnlichkeit in %
30 und 37	19	18	94,74
937 und 948	27	23	85,19
288 und 289	22	18	81,82
291 und 292	20	16	80,00
193 und 194	19	15	78,95
290 und 293	23	18	78,26

Da die mit Primer 10 erzeugten Banden in der Wiederholbarkeit weniger zuverlässig auftraten, wurde die Analyse nur mit den Ergebnissen von Primer 7 und 9 wiederholt (Tab. 15).

<b>Tab. 15: Ähnlichkeiten von <i>B. cereus</i>-Stämmen nach Clusteranalyse (Ergebnisse mit Primer 7 und 9 wurden berücksichtigt)</b>			
Stämme	Anzahl Banden insgesamt	Anzahl gemeinsamer Banden	Ähnlichkeit in %
29 und 30	14	14	100
29 und 37	14	14	100
30 und 37	14	14	100
39 und 40	12	12	100
291 und 292	11	10	90,91
37 und 937	16	14	87,50
30 und 937	16	14	87,50
29 und 937	16	14	87,50
290 und 293	14	12	85,71
287 und 291	12	10	83,33
288 und 289	13	10	76,93
287 und 292	13	10	76,92

Betrachtet man nun, welche Stämme aus dem Endprodukt und welche aus dem Umfeld stammen, so zeigen sich keine deutlichen Zusammenhänge (Tab. 16).

<b>Tab. 16: Herkunft in der Clusteranalyse ähnlicher Stämme</b>					
Stamm	Herkunft	Datum	Stamm	Herkunft	Datum
29	Milchpulver	21.09.94	289	Milchpulver	10.06.98
30	Milchpulver	21.09.94	290	Milchpulver	10.06.98
37	Milchpulver	19.10.94	291	Milchpulver	10.06.98
39	Milchpulver	19.10.94	292	Milchpulver	10.06.98
40	Milchpulver	19.10.94	293	Milchpulver	10.06.98
287	Milchpulver	10.06.98	937	Umfeld	13.08.97
288	Milchpulver	10.06.98			

Stämme aus verschiedenen Chargen gleichen Produktionsdatums (287-293) zeigen keine auffällige Ähnlichkeit, andererseits läßt sich eine ältere Stammgruppe (29, 30, 37) über drei Wochen im Produkt nachweisen. Ein zu dieser Gruppe „passender“ Stamm aus dem Umfeld (937) wurde nahezu drei Jahre später isoliert.

Insgesamt ist bei den untersuchten Stämmen eine geringe Zahl mit einer Ähnlichkeit > 75 % gefunden worden. Diese Stämme wurden bis auf Stamm Nr. 937 alle aus dem Milchpulver isoliert. Das Ergebnis spricht gegen eine Kontamination des Milchpulvers aus dem Umfeld der Produktionsanlage.

### 3.2.3 Toxinbildungsvermögen, Pathogenität

Es gibt zwei kommerzielle Testkits zum Nachweis von *B. cereus*-Enterotoxin. Im Oxoid BCET-RPLA Kit wird nur die *per se* atoxische L<sub>2</sub>-Komponente des von BEECHER et al. (1995) beschriebenen Hämolyysin BL nachgewiesen (BEECHER und WONG 1994, GRANUM und NISSEN 1993). Der Tecra<sup>®</sup>-ELISA detektiert die 45 kDa-Komponente des nicht-hämolytischen Enterotoxins. Beide Testkits weisen eine Komponente eines diarrhoeischen Toxins von *B. cereus* sowohl aus Lebensmitteln als auch aus *B. cereus*-Kulturfiltrat nach. Die beiden Enterotoxin-Komplexe haben bei Ausbildung aller drei Komponenten jeweils ihre höchste Toxizität, jedoch wirken auch die einzelnen Toxin-Komponenten in Abhängigkeit von der jeweiligen Dosis toxisch.

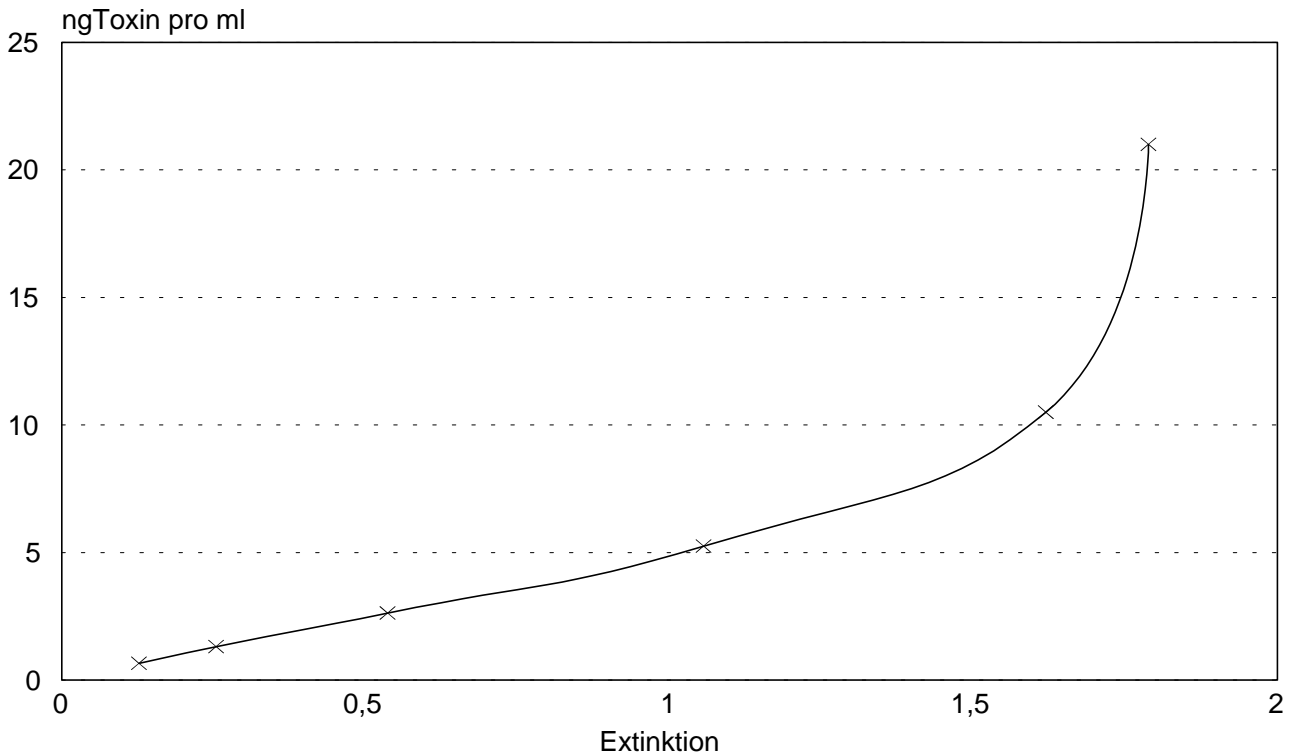
Weitere Toxine sind in Kapitel 2.3 aufgeführt. Für diese Substanzen sind bisher keine in der Routine anwendbaren Nachweisverfahren beschrieben. Es gibt jedoch die Möglichkeit, die Zytotoxizität mit Hilfe von Zellkulturen nachzuweisen.

#### 3.2.3.1 ELISA für diarrhoeisches Toxin

Für den Nachweis des diarrhoeischen Toxins von *B. cereus* (BDE, *B. cereus* diarrhoeical enterotoxin) steht ein kommerzieller Testkit zur Verfügung. Dieser Test weist die 45 kDa Komponente des nicht-hämolytischen Toxins von *B. cereus* (LUND und GRANUM 1996) nach, das aus insgesamt 3 Eiweißbausteinen besteht. Die Auswertung erfolgt visuell über den Vergleich mit einer Farbkarte in Stufen von 1 - 5, wobei alles über Stufe 2 als positiv gilt. Das Ergebnis ist somit rein qualitativ. Von den getesteten 329 Stämmen bilden nach dem Ergebnis des Testkits 322 zumindest die 45 kDa Komponente des Toxins.

Durch Modifikation des Testkits konnte auch eine quantitative Aussage erreicht werden. Hierzu wurden beim Hersteller die Konzentration der Positiv-Kontrolle des Kits ermittelt (21 ng/ml) und durch entsprechende Verdünnungen eine Standardreihe erstellt. Verdünnt wurde zur Basis 2 (Abb. 3). Zwischen den Extinktionswerten 0,127 und 1,619 verläuft die Kurve annähernd gerade, so daß in diesem Kurvenabschnitt die Extinktion der Proben in einem linearen Verhältnis zum Toxingehalt steht. Unterhalb einer Extinktion von 0,127 liegt der Toxingehalt der Probe deutlich unter der Nachweisgrenze des Tecra<sup>®</sup> ELISA von 1 ng Toxin pro ml und wird somit als negativ gewertet. Wenn eine Probe oberhalb der Extinktion von 1,619 liegt, muß sie verdünnt werden, damit der Toxingehalt ermittelt

werden kann. Der sich nach der Verdünnung ergebende Wert für den Toxingehalt muß zur Ermittlung des Toxingehaltes pro ml mit der reziproken Verdünnung multipliziert werden.



**Abb. 3: Standard-Verdünnungsreihe zur Basis 2 der Positiv-Kontrolle des Tecra<sup>®</sup>-ELISA zum Nachweis des diarrhoeischen Toxins von *B. cereus***

Folgende Zahlenpaare ergeben sich aus der Standard-Verdünnungsreihe der Positiv-Kontrolle:

Verdünnung	Toxingehalt ng/ml	Extinktion
$2^0$	21	1,788
$2^{-1}$	10,5	1,619
$2^{-2}$	5,25	1,056
$2^{-3}$	2,62	0,536
$2^{-4}$	1,31	0,254
$2^{-5}$	0,66	0,127

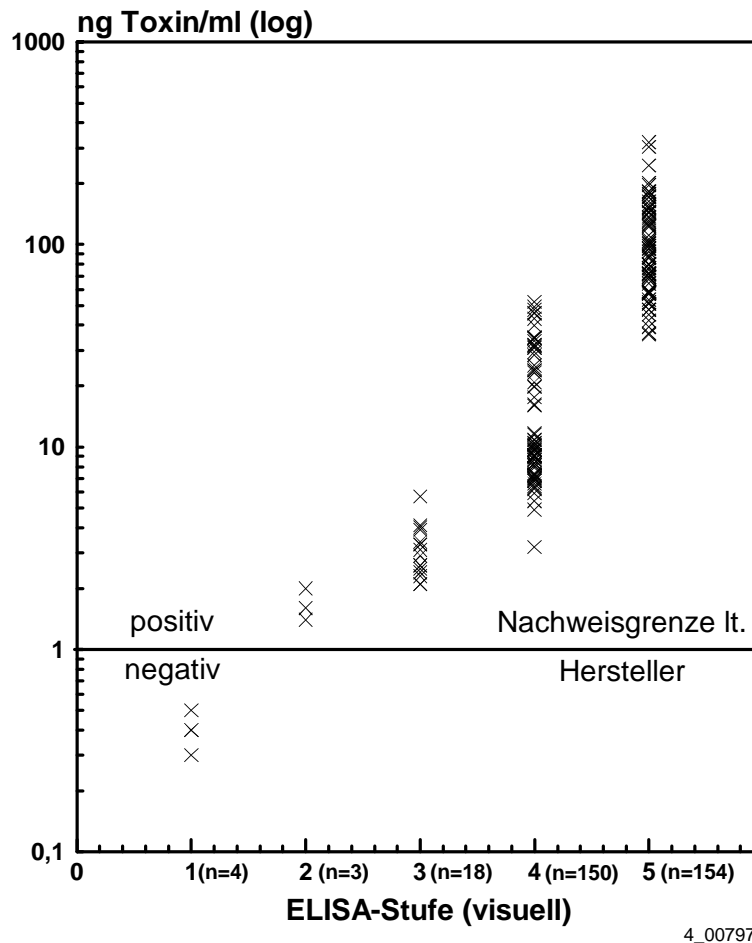
Die untersuchten Stämme bildeten bis zu 320,5 ng Toxin pro ml BHI (Tab. 17). Die einzelnen qualitativen Stufen (opt. Auswertung nach Farbkarte) überschneiden sich teil-

weise hinsichtlich der quantitativen Toxinbestimmung, nicht aber die Gruppen positiv/negativ.

<b>Tab. 17: Qualitativer und quantitativer Nachweis von diarrhoeischem <i>B. cereus</i>-Enterotoxin mit einem Testkit (Tecra<sup>®</sup>-ELISA)</b>		
<b>ELISA-Stufe (qualitativ)</b>	<b>Toxin ng/ml (quantitativ)</b>	<b>Anzahl der Stämme</b>
1	0,0 - 1,6	4
negativ 2	0,0 - 2,0	3
positiv 3	2,1 - 5,7	18
4	4,3 - 63,9	150
5	31,0 - 320,5	154

Ein Teil der Proben mußte verdünnt werden, damit die Toxinkonzentration im auswertbaren Bereich der Standard-Verdünnungsreihe des Tecra<sup>®</sup>-ELISA zwischen den Extinktionswerten 0,127 und 1,619 lag (Abb. 3). Anschließend wurde der ermittelte Wert entsprechend der Verdünnungsstufe der jeweiligen Probe multipliziert.

Die Nachweisgrenze des ELISA stimmt bei qualitativer und quantitativer Auswertung gut überein, sie liegt bei ca. 1 ng Toxin/ml (Abb. 4).



4\_00797

**Abb. 4: Nachweisgrenze des diarrhoeischen Toxins von *B. cereus* im Tecra®-ELISA**

### 3.2.3.2 Zytotoxizität

Der hier eingesetzte Zytotoxizitätstest kann möglicherweise zusätzliche Informationen über die Wirkung der tatsächlich gebildeten Toxine liefern, ohne daß jedoch eine Zuordnung zu einer bestimmten Substanz möglich wäre.

Auf der Zellkultur wurden die morphologischen Veränderungen der Zellen mikroskopisch ausgewertet, wobei die *B. cereus*-Toxine meist zu einem völligen Absterben vieler Zellen führen. Zusätzlich wurde die prozentuale Freisetzung von Laktatdehydrogenase (LDH) gemessen (Abb. 5). Die prozentuale Freisetzung von LDH wurde nach GRANUM (1985) berechnet (s. Kap. 2.3.1). Hierdurch kann der Grad der Schädigung der Zellmembran objektiv ermittelt werden. Der statistisch abgesicherte Grenzwert für eine positive Reaktion liegt bei 20 % LDH-Freisetzung. In Tabelle 18 sind zusätzlich auch nochmals die ELISA-Ergebnisse aufgeführt. Das im Vergleich zur Zellkultur starke Überwiegen ELISA-positiver Ergebnisse läßt sich dadurch erklären, daß der ELISA nur eine Komponente des BDE nachweisen kann. Die Toxizität dieses Toxins ist aber abhängig von der Ausbildung aller drei Komponenten, die jedoch oftmals unterschiedlich stark produziert werden.

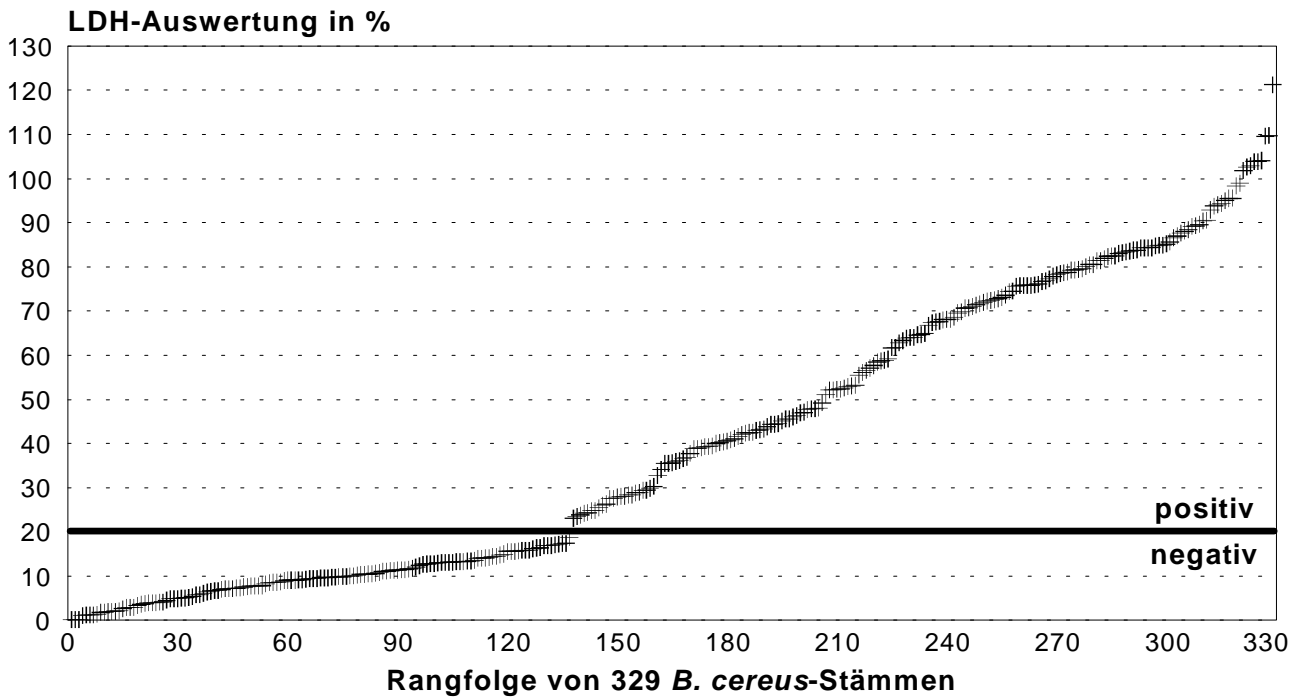


Abb. 5: Zytotoxizität von *B. cereus*: LDH-Freisetzung von 329 Stämmen

Tab. 18: <i>Bacillus cereus</i> : Nachweis der Zytotoxizität und des diarrhoeischen Toxins		
Parameter	positiv	negativ
Morphologische Beurteilung der Vero-Zellen	159	170
LDH-Messung (pos. bei LDH-Freisetzung > 20 %)	192	137
Diarrhoeisches Toxin (Tecra <sup>®</sup> ELISA)	322	7