

Enteropathogene *Bacillus cereus* in Lebensmitteln: Identifizierung und Risikoabschätzung

Koordinierung:	Forschungskreis der Ernährungsindustrie e.V. (FEI), Bonn
Forschungsstelle I:	Technische Universität München Zentralinstitut für Ernährungs- und Lebensmittelforschung (ZIEL), Abt. Mikrobiologie, Freising-Weihenstephan Prof. Dr. Siegfried Scherer/Dr. Genia Lücking
Forschungsstelle II:	Universität München Lehrstuhl für Hygiene und Technologie der Milch Prof. Dr. E. Märtlbauer/Dr. Nadja Jeßberger
Forschungsstelle III:	Veterinärmedizinische Universität Wien Department für Pathobiologie Institut für Funktionelle Mikrobiologie Prof. Dr. Monika Ehling-Schulz/Dr. Corinna Rademacher
Industriegruppe:	Milchindustrie-Verband e.V. (MIV), Berlin
	Projektkoordinator: F.-J. Koße, Privatmolkerei Naarmann GmbH, Neuenkirchen
Laufzeit:	2012 – 2014
Zuwendungssumme:	€ 773.100,-- (Förderung durch BMWi via AiF)

Ausgangssituation:

Bacillus cereus kommt als Auslöser von Lebensmittelvergiftungen eine große wirtschaftliche Bedeutung zu. Innerhalb der EU stieg die Anzahl der durch *B. cereus* verursachten Lebensmittelvergiftungen im Jahr 2011 im Vergleich zum Vorjahr um 122 % an. Auch das Bundesinstitut für Risikobewertung registrierte *B. cereus* als einen der häufigsten Erreger von Lebensmittelvergiftungen für das Jahr 2012. *B. cereus* ist ein ubiquitärer Bodenkeim und kann trotz bester Hygienestandards in vielen Lebensmitteln nicht vollständig vermieden werden. Somit sind kleinere und größere Unternehmen von *B. cereus*-Kontaminationen gleichermaßen betroffen.

Seine lebensmitteltechnologische und -hygienische Problematik ist neben der Hitzeresistenz der Endosporen vor allem in der Toxinbildung begründet. Als Hauptpathogenitätsfaktoren wurden bisher verschiedene hitzelabile Enterotoxine

sowie ein hitzestabiles emetisches Toxin beschrieben. Die emetische Toxinproduktion, die zu Lebensmittelintoxikationen führt, wurde in einem IGF-Projekt (AiF 16845 N) untersucht. Im vorliegenden Projekt stehen die zu Lebensmittelinfektionen führenden Enterotoxine im Fokus. Für Hämolyysin BL (Hbl), das nicht-hämolytische Enterotoxin (Nhe) und Zytotoxin K (CytK) ist eine ursächliche Beteiligung an diarrhö-assoziierten Lebensmittelvergiftungen gesichert. Neuerdings wird aber auch die Bedeutung weiterer Virulenzfaktoren, wie des Hämolyisins II (HlyII) und der Metalloproteasen InhA1 und NprA, in diesem Zusammenhang diskutiert.

Im Falle einer *B. cereus*-Kontamination ist es derzeit nicht möglich, das von diesem Lebensmittel ausgehende Risiko abzuschätzen. Zum einen kann sich das toxische Potential verschiedener Stämme um mehr als das Hundertfache unterscheiden (es gibt Stämme, die als Futtermittel-„Probiotika“ eingesetzt werden; allerdings auch solche, die bereits für Todesfälle verant-

wortlich waren). Des Weiteren sind die Faktoren bzw. Regulationsmechanismen, die starke von schwachen Toxinbildnern unterscheiden, bislang nicht bekannt. Zudem ist die Bedeutung zusätzlicher Virulenzfaktoren unklar.

Da in vielen Produkten die völlige Vermeidung von *B. cereus* nicht möglich ist, ist eine Risikoabschätzung in Hinblick auf das enteropathogene Potential für die Betriebe von entscheidender Bedeutung. Ziel des Forschungsvorhabens war die Identifizierung eindeutiger Merkmale und darauf aufbauend die Entwicklung routineteuglicher Methoden zur Unterscheidung zwischen enteropathogenen und nicht enteropathogenen *B. cereus*, um die Hersteller im Kontaminationsfall in die Lage zu versetzen, über ein wissenschaftlich fundiertes Bewertungsschema eine Entscheidung über eine Produktfreigabe oder Produktsperre treffen zu können.

Forschungsergebnisse:

Im Fokus des Vorhabens stand die Identifizierung von Markern zur Differenzierung von enteropathogenen und nicht pathogenen *Bacillus cereus* und darauf aufbauend die Erstellung eines Risikobewertungsschemas für kontaminierte Lebensmittel.

1. Selektion der *B. cereus*-Stämme

Es wurden 19 enteropathogene sowie apathogene *B. cereus*-Stämme ausgewählt, von denen 10 stark und 9 mittel bzw. gering toxisch sind; 10 Stämme wurden aus Lebensmittel isoliert, 2 aus Lebensmitteln nach Vergiftungsfällen, 6 aus humanen Faeces nach Vergiftungsfällen, 1 aus postoperativer Infektion; alle Isolate sind nicht emetische *B. cereus sensu stricto*, 7 aus Toxinprofil A (*nhe*, *hbl*, *cytK*), 3 aus Profil C (*nhe*, *hbl*), 4 aus Profil D (*nhe*, *cytK*), 5 aus Profil F (*nhe*).

2. Genomsequenzierung und Genomvergleich

Der Vergleich der Gesamtgenomsequenzen der 19 Stämme mit Sequenzen der Datenbank ergab deutliche Stamm-spezifische Unterschiede. Die Sequenzen der Enterotoxingene waren hingegen stark konserviert. Deshalb sind potentielle Markersequenzen zur Differenzierung von enteropathogenen und apathogenen Stämmen vor allem in regulatorischen DNS-Bereichen zu vermuten; diese konnten bislang allerdings nicht identifiziert werden.

3. Präsenz, Transkription und Expression von bekannten Virulenzgenen

Zur Präsenz: 100 % der untersuchten Stämme besitzen die Gene *nheABC*, *inhA*, *nprA* und *sph*, 50 % *hblCDA* und 21 % *hlyII*. 10 % aller Stämme besitzen ein zweites *nhe*-Operon und 40 % der Stämme, die *Hbl* besitzen, ein zweites *hbl*-Operon. Es gibt keine Korrelation zwischen dem Vorhandensein von Toxin- und Virulenzgenen und der Toxizität eines *B. cereus*-Stammes.

Zur Transkription: Es wurde eine stamm-spezifische hohe bzw. niedrige Transkription der Toxingene beobachtet. Allerdings war keine Differenzierung zwischen stark und schwach toxischen Stämmen anhand der *plcR*-Transkription möglich. Ebenso gab es keine Korrelation zwischen der Transkription von *plcR* und *nhe* oder *hbl*.

Zur Toxinproduktion: Die sekretierte Toxinmenge war ebenfalls stamm-spezifisch. Bei 32 % der Stämme wurde keine Übereinstimmung zwischen der Toxingentranskription und der Toxinmenge gefunden, was auf posttranskriptionelle oder posttranslationale Regulation in der Toxinproduktion hinweist.

Simulierte Darmbedingungen: Es wurden geeignete Bedingungen zur Simulation des Darms etabliert (RPMI Medium, CaCo-2-Darmepithelzellen, O₂-arm, 37 °C). Darmepithelzellen stimulieren die Toxingentranskription sowie die Toxinproduktion aller Stämme.

4. Kinetik der Toxinproduktion unter simulierten intestinalen Bedingungen

Durch biolumineszente Promotorfusionskonstrukte konnte die Transkriptionsaktivität der Enterotoxin-Operons *nhe* und *hbl* über einen längeren Zeitraum verfolgt werden. Es zeigten sich deutliche Stamm-spezifische Unterschiede in der Stärke der Expression sowie eine starke Abhängigkeit von der Medienkomposition. Insbesondere die Verfügbarkeit von Aminosäuren beeinflusst die Promotoraktivität. Im darmsimulierenden Medium wurden stärkere *nhe*- und *hbl*-Promotoraktivitäten als in Labormedien gemessen.

5. Untersuchungen zur metabolischen Aktivität und Proteinsekretion

Die Quantifizierung der sekretierten Proteine unter Berücksichtigung der intrazellulären Proteinmenge und der optischen Wachstumsdichte verdeutlicht, dass simulierte intestinale Bedingungen die Sekretion von Pro-

teinen beschleunigen und die maximale Sekretionseffizienz unter diesen Bedingungen bereits zu Beginn der exponentiellen Phase erreicht ist. Insgesamt ist der Anteil sekretierter Proteine am Gesamtproteom in kond. RPMI deutlich höher als in CGY. Die Ergebnisse zeigen, dass die Sekretion von Proteinen enorm durch die gegebenen Umweltbedingungen und vor allem durch Wirtsfaktoren bestimmt wird. Dies war bisher nicht bekannt und muss bei der Entwicklung künftiger differentialdiagnostischer Systeme berücksichtigt werden.

6. Identifizierung potentieller Markerproteine für enteropathogene *B. cereus*

Zur Identifizierung von Markerproteinen stark toxischer Stämme ist die Auflösung der komplexen Sekretionsmuster durch 1D-Exoproteomstudien nicht ausreichend. Mittels 2D-DIGE-Analysen konnten 15 Proteine identifiziert werden, die nach 2 h in stark toxischen Stämmen hochreguliert sind, während 2 Proteine im Vergleich zu schwach toxischen Stämmen signifikant weniger exprimiert werden. Nach 6 h sind jeweils 7 Proteine in stark toxischen Stämmen herauf- bzw. herunterreguliert. Die entsprechenden Proteine wurden massenspektroskopisch identifiziert.

7. Biologische Aktivität von Markerproteinen in Zellkultursystemen

Rekombinant in *E. coli* erzeugtes und aufgereinigtes HlyII ist hoch toxisch, die Metalloproteasen InhA1 und NprA sind dagegen nicht toxisch gegenüber Vero-, CaCo-2 und A549-Zellen. Ein Beitrag der Proteasen zur Toxizität über den Abbau der Enterotoxin-komponenten (v.a. Hbl) ist jedoch möglich.

8. Auskeimung von Sporen unter intestinalen Bedingungen

Die Untersuchung des Sporenauskeimungsvermögens von 8 *B. cereus*-Stämmen unter optimalen und simulierten Darmbedingungen ergab, dass das Auskeimungsvermögen sehr stark Stamm-spezifisch ist, möglicherweise mit dem Toxinprofil eines Stammes zusammenhängt und zusätzlich von den Umgebungsbedingungen, wie z.B. Hitzeaktivierung, Nährstoffverfügbarkeit und sekretierten Wirtsfaktoren, beeinflusst wird.

9. Etablierung routinetauglicher Immunoassays zur quantitativen Enterotoxinbestimmung

und zum qualitativen Nachweis von Markerproteinen

Der simultane Nachweis der Enterotoxin-komponenten NheB und Hbl L2 ist mittlerweile in nur 30 Minuten möglich. Da allerdings eine starke Abhängigkeit der Toxizität von Hbl L1 und Hbl B gezeigt wurde, muss der Test auch für diese beiden Komponenten angepasst werden. Des Weiteren wurde mit einem bereits bestehenden mAK ein Verfahren zur Bestimmung der Sphingomyelinase getestet. Außerdem wurden die Virulenzfaktoren HlyII, NprA und InhA1 für die Immunisierung aufgereinigt. Die Gewinnung von mAK sowie die Etablierung spezifischer Immunoassays wird in einem Folgeprojekt fortgesetzt.

10. Risikoabschätzung: System zum Nachweis und zur Bewertung präsumtiv enteropathogener *B. cereus*.

In Kooperation mit Mitgliedern des Projektbegleitenden Ausschusses wurde ein erstes System zur Risikoabschätzung ausgearbeitet: Hierbei wird die Keimzahl (KbE/g Lebensmittel) bestimmt. Die Keime werden unter simulierten intestinalen Bedingungen angezogen. Die Hauptpathogenitätsfaktoren Nhe und Hbl werden mittels spezifischer Sandwich-ELISAs quantifiziert. Anhand von im Projekt erhaltenen Referenztitern werden die Isolate als stark, mittel oder schwach toxisch eingruppiert. Zusätzlich werden weitere Virulenzfaktoren, wie Sphingomyelinase und HlyII, quantifiziert. Das toxische Potential, die Keimzahl sowie die Beschaffenheit des Lebensmittels entscheiden dann über eine potentielle Gefährdung, d.h. eine Freigabe oder Sperrung des Produkts.

Wirtschaftliche Bedeutung:

Die Forschungsergebnisse sind insbesondere für die milcherzeugende sowie -verarbeitende Industrie und ihre Zulieferer, wie z.B. Gewürz-, Gemüse- und Kakaohersteller, sowie für Produzenten von Lebensmittelzusatzstoffen und Herstellern diätetischer Lebensmittel von Bedeutung.

Die deutsche Milchindustrie ist mit einem jährlichen Umsatz von über 22 Mrd. € (2012) und einer stetig wachsenden Produktpalette die leistungsstärkste Branche innerhalb der Lebensmittelindustrie. Neue Produkte und innovative Produktionsmethoden stellen die Betriebe auch

bezüglich *B. cereus* vor hygienische Probleme, da dieser Keim in der Milch beste Vermehrungs- und Toxinbildungsbedingungen vorfindet und dessen Bedeutung auch durch die veränderte Altersstruktur der Konsumenten zunimmt. Über den durch das Bakterium entstehenden finanziellen Schaden existieren keine statistischen Erhebungen, nach Schätzungen der Industrie bewegt er sich jedoch allein in Deutschland pro Jahr im zweistelligen Millionenbereich.

Die bisher etablierten Methoden sind zeitaufwendig und erlauben lediglich semiquantitative, teilweise vage Aussagen. Diese langwierigen Untersuchungen führen immer wieder zu einer verzögerten Auslieferung der Produkte, was besonders bei kühl gelagerten Lebensmitteln zu erheblichen Zusatzkosten führen kann. Gerade für kleinere Unternehmen können verzögerte Auslieferungen zu einem hohen wirtschaftlichen Schaden führen. Eine Kontamination mit rufschädigenden Rückrufaktionen oder Schadensersatzforderungen kann gerade für kleinere Unternehmen im schlimmsten Fall Existenz gefährdende Formen annehmen.

Die Ergebnisse schaffen die Basis, Gefahren für die Gesundheit der Konsumenten zu erkennen und zu bewerten. Der wirtschaftliche Vorteil eines zuverlässigen Schemas zur Unterscheidung von hoch toxischen und nicht toxischen *B. cereus* für die milchverarbeitende Industrie liegt in der schnellen, auf objektiven Daten beruhenden Entscheidung hinsichtlich einer Freigabe oder Sperre von Produktchargen. Ein Einsatz - nach entsprechender Adaption - auch in anderen Bereichen der Lebensmittelproduktion, wie z.B. bei der Herstellung von Säuglings- und Kleinkindernahrung, Teigwaren, Backwaren, Frühstückscerealien und diätetischen Produkten ist möglich. Die Ergebnisse helfen darüber hinaus der Diagnostikindustrie bei der Entwicklung von Nachweissystemen zur gleichzeitigen Analyse mehrerer Pathogenparameter. Weitere Anwendungsmöglichkeiten liegen im medizinischen Bereich bei der Diagnose und Beurteilung von infektiösen *B. cereus*-Erkrankungen sowie in der pharmazeutischen Industrie beim Monitoring und der Diagnostik von Mikroorganismen im Reinraumbereich.

Publikationen (Auswahl):

1. FEI-Schlussbericht 2015.
2. Jeßberger, N., Krey, V.M., Rademacher, C., Böhm, M.-E., Mohr, A.-K., Ehling-Schulz, M.,

- Scherer, S. und Märtlbauer, E.: From genome to toxicity: a combinatory approach highlights the complexity of enterotoxin production in *Bacillus cereus*. *Front. Microbiol.* 6 (560), Doi: 10.3389/fmicb.2015.00560 (2015).
3. Jeßberger, N., Dietrich, R., Bock, S., Didier, A. und Märtlbauer, E.: *Bacillus cereus* enterotoxins act as major virulence factors and exhibit distinct cytotoxicity to different human cell lines. *Toxicon.* 77, 49-57 (2014).
 4. Ehling-Schulz, M.: Opportunist *Bacillus cereus* - Verbesserte Diagnostik zeigt Risiken auf. *Vetmed Mag.* 2, 18-19 (2013).
 5. Ehling-Schulz, M. und Messelhäusser, U.: *Bacillus* „next generation“ diagnostics: moving from detection toward subtyping and risk-related strain profiling. *Front. Microbiol.* 4 (32) 1-8, Doi: 10.3389/fmicb.2013.00032 (2013).
 6. Doll, V., Ehling-Schulz, M. und Vogelmann, R.: Concerted action of sphingomyelinase and non-hemolytic enterotoxin in pathogenic *Bacillus cereus*. *PLoS One*, 8 (4) e61404 (2013).
 7. Heilenbrinker, U., Dietrich, R., Didier, A., Zhu, K., Lindbäck, T., Granum, P.E. und Märtlbauer, E.: Complex Formatin between NheB and NheC is Necessary to induce cytotoxic activity by the three-component *Bacillus cereus* Nhe Enterotoxin. *PLoS one* 8, e63104. Doi: 10.1371/journal.pone.0063104 (2013).
 8. Zhu, K., Dietrich, R., Didier, A., Acar, G. und Märtlbauer, E.: Versatile antibodiesensing boolean logic for the simultaneous detection of multiple bacterial toxins. *Chem. Commun.* 49, 9314-9316 (2013).

Weiteres Informationsmaterial:

Technische Universität München
Zentralinstitut für Ernährungs- und Lebensmittel-
forschung, Abt. Mikrobiologie
Weihenstephaner Berg 3, 85354 Freising
Tel.: +49 8161 71-3516
Fax: +49 8161 71-4512
E-Mail: siegfried.scherer@wzw.tum.de

Universität München
Lehrstuhl für Hygiene und Technologie der Milch
Schönleutner Str. 8, 85764 Oberschleißheim
Tel.: +49 89 2180-78601
Fax: +49 89 2180-78602
E-Mail: milchhygiene@mh.vetmed.uni-
muenchen.de

Veterinärmedizinische Universität Wien
Department für Pathobiologie
Institut für Funktionelle Mikrobiologie
Veterinärplatz 1, 1210 Wien
Tel.: +43 1 25077-5223,
Fax: +43 1 25077-5290
E-Mail: monika.ehling-schulz@vu-wien.ac.at

Forschungskreis der Ernährungsindustrie e.V. (FEI)
Godesberger Allee 142-148, 53175 Bonn
Tel.: +49 228 3079699-0
Fax: +49 228 3079699-9
E-Mail: fei@fei-bonn.de

... ein Projekt der **Industriellen Gemeinschaftsforschung (IGF)**

gefördert durch/via



Das o. g. IGF-Vorhaben der Forschungsvereinigung Forschungskreis der Ernährungsindustrie e. V. (FEI), Godesberger Allee 142-148, 53175 Bonn, wird/wurde über die AiF im Rahmen des Programms zur Förderung der Industriellen Gemeinschaftsforschung (IGF) vom Bundesministerium für Wirtschaft und Energie aufgrund eines Beschlusses des Deutschen Bundestages gefördert.