

Molekularbiologischer Nachweis von *Enterobacter sakazakii*

(*Cronobacter* spp.) in Säuglings- und Kleinkindernahrung

Anne Edith Funk

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Braun
Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Dr. h.c. Märtlbauer
Koreferent: Priv.-Doz. Dr. Werckenthin

Tag der Promotion: 13. Februar 2010

Aus dem Veterinärwissenschaftlichen Department
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München
Lehrstuhl für Hygiene und Technologie der Milch
- Prof. Dr. E. Märtlbauer -

Molekularbiologischer Nachweis von *Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter* spp.)

in Säuglings- und Kleinkindernahrung

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von

Anne Edith Funk

aus

Langenhagen

München 2010

Inhaltsverzeichnis

1.	EINLEITUNG	1
2.	LITERATUR	2
2.1	Taxonomische Stellung von <i>Cronobacter</i> spp. (<i>Enterobacter sakazakii</i>)	2
2.2	Physiologische und biochemische Eigenschaften	3
2.4	Vorkommen	7
2.5	Erkrankungen	8
2.6	Nachweis	10
3.	EIGENE UNTERSUCHUNGEN	13
3.1	Material und Methodik	13
3.1.1	Material	13
3.1.1.1	Untersuchungsmaterial	13
3.1.1.2	<i>Enterobacter sakazakii</i> -Stämme	13
3.1.1.3	Isolate von anderen <i>Enterobacteriaceae</i> spp. und von nicht- <i>Enterobacteriaceae</i>	13
3.1.1.4	Nährböden, Reagenzien und Geräte für die kulturellen Untersuchungen	15
3.1.1.4.1	Flüssige Nährmedien (in Klammern im Text verwendete Abkürzungen)	15
3.1.1.4.2	Feste Nährmedien (in Klammern im Text verwendete Abkürzungen)	15
3.1.1.4.3	Reagenzien	16
3.1.1.4.4	Geräte	17
3.1.1.5	Materialien, Reagenzien, und Geräte für die molekularbiologischen Untersuchungen	17
3.1.1.5.1	Extraktion	17
3.1.1.5.2	Materialien für die PCR zum Nachweis von <i>E. sakazakii</i> , für die RAPD-PCR und zum Enzymverdau von <i>E. sakazakii</i>	17
3.1.1.5.2.1	Primer	17
3.1.1.5.2.2	Geräte	18
3.1.1.6	Elektrophorese	18

II

3.1.1.6.1	Materialien	18
3.1.1.6.2	Reagenzien	19
3.1.1.6.3	Geräte	19
3.1.2	Methodik	19
3.1.2.1	Kultureller Nachweis von <i>E. sakazakii</i>	19
3.1.2.1.1	FDA Methode, modifiziert	19
3.1.2.1.2	Methode nach HAHN, modifiziert	20
3.1.2.1.3	DNase-Test	22
3.1.2.1.4	Zusatz einer 2 %-igen Brillantgrünlösung zum GPW	22
3.1.2.1.5	Zusatz von Kristallviolett und Gallensalzen zum TSA + α -MUG-Agar	22
3.1.2.2	Molekularbiologischer Nachweis von <i>E. sakazakii</i>	23
3.1.2.2.1	Extraktion der DNA	23
3.1.2.2.1.1	Kochextraktion	23
3.1.2.2.1.2	DNeasy Tissue Kit	23
3.1.2.2.1.3	PrepMan Ultra Testkit	23
3.1.2.2.2	PCR, Vorbereitung und Durchführung	24
3.1.2.2.2.1	Primer	24
3.1.2.2.2.2	PCR	24
3.1.2.2.3	Interne Amplifikationskontrolle, Herstellung und Anwendung	25
3.1.2.2.4	Gelelektrophorese und Auswertung	26
3.1.2.2.5	Differenzierung von <i>E. sakazakii</i> -Stämmen mittels Random Amplification of Polymorphic DNA-PCR (RAPD-PCR)	27
3.1.2.2.5.1	Durchführung der RAPD-PCR	27
3.1.2.2.6	Restriktionsverdau	28
3.1.2.3	Untersuchungen an künstlich mit <i>E. sakazakii</i> kontaminierten Proben von Säuglingstrockennahrung	29
3.1.2.3.1	Vorbereitende Untersuchungen	29
3.1.2.3.1.1	Untersuchung der künstlich zu kontaminierenden Probenmaterialien	29

III

3.1.2.3.1.2	Prüfung der <i>E. sakazakii</i> -Stämme auf Individualität	30
3.1.2.3.2	Herstellung des Kontaminationsinokulums	30
3.1.2.3.3	Künstliche Kontamination des Probenmaterials	31
3.1.2.3.4	Durchführung der PCR	31
4.	ERGEBNISSE	33
4.1	Kulturelle Methoden zum Nachweis von <i>E. sakazakii</i>	33
4.1.1	FDA-Methode, modifiziert (Abb. 3.1)	33
4.1.2	Methode nach HAHN, modifiziert (Abb. 3.1)	33
4.1.3	Ergebnis des DNase-Tests	35
4.1.4	Zugabe von 2 %-iger Brillantgrünlösung zum Voranreicherungsmedium (GPW)	35
4.1.5	Zugabe von Kristallviolett und Gallensalzen zum TSA + α -MUGs in der mod. Methode nach HAHN	36
4.2	Molekularbiologische Methoden zum Nachweis von <i>E. sakazakii</i>	37
4.2.1	Vergleich von DNeasy Tissue Kit mit PrepMan Ultra Testkit	37
4.2.2	Primer	38
4.2.3	Untersuchung von <i>E. sakazakii</i> -Reinkulturen und von Reinkulturen anderer Bakterien mittels PCR	39
4.2.4	Überprüfung der <i>E. sakazakii</i> -Stämme mittels RAPD	40
4.2.5	Restriktionsverdau der <i>E. sakazakii</i> - und <i>Hafnia-alvei</i> -Stämme	41
4.3	Nachweis von <i>E. sakazakii</i> in künstlich kontaminierter Säuglingsnahrung mit verschiedenen Methoden	42
4.3.1	Untersuchung der Kontrollproben	42
4.3.2	Überprüfung der zehn für die künstliche Kontamination verwendeten Stämme von <i>E. sakazakii</i>	43
4.3.3	Ergebnisse der qualitativen Nachweise von <i>E. sakazakii</i>	43
5.	BESPRECHUNG DER ERGEBNISSE UND DISKUSSION	44
5.1	Einleitung	44
5.2	Entwicklung des PCR-Verfahrens	44

IV

5.3	Prüfung der Sensitivität und Spezifität des PCR-Verfahrens mit Reinkulturen	45
5.4	Überprüfung der Leistungsfähigkeit des PCR-Verfahrens mittels künstlich kontaminierter pulverförmiger Säuglingsnahrung	46
5.5	Kulturelle Verfahren zum Nachweis von <i>E. sakazakii</i>	47
6.	ZUSAMMENFASSUNG/SUMMARY	49
7.	LITERATURVERZEICHNIS	51
ANHANG		59
I.	Reagenzien zur Herstellung von TE-Puffer	59
II.	Anleitung zur Herstellung von TAE-Puffer	59
III.	PrepMan Ultra Testkit	60
IV.	DNeasy Tissue Kit	60

1. EINLEITUNG

Enterobacter sakazakii (nach der neuen Klassifizierung *Cronobacter* spp., IVERSEN et al., 2008a) gilt als zwar seltener aber sehr gefährlicher Erreger verschiedener Infektionskrankheiten, wie Meningitiden, nekrotisierenden Enterokolitiden u. a. m., insbesondere bei Frühgeburten, Neugeborenen und Kindern in den ersten sechs Lebensmonaten (GURTNER et al., 2005). Als eine wesentliche Ursache für die Erkrankungen gilt kontaminierte pulverförmige Säuglingsnahrung (FRIEDEMANN, 2008). Deshalb wurde durch die "Verordnung (EG) Nr. 1441/2007 der Kommission vom 5. Dezember 2007 zur Änderung der Verordnung (EG) Nr. 2073/2005 über mikrobiologische Kriterien für Lebensmittel" für "Getrocknete Säuglingsanfangsnahrung und getrocknete diätetische Lebensmittel für besondere medizinische Zwecke, die für Säuglinge unter 6 Monaten bestimmt sind" ein Grenzwert eingeführt, der besagt, dass in 30 Proben zu jeweils 10 g *E. sakazakii* nicht nachweisbar sein darf (Lebensmittelsicherheitskriterium).

Die Konzentrationen des Erregers in pulverförmiger Säuglingsnahrung sind sehr gering und liegen im Allgemeinen nur bei einigen wenigen Keimen pro 100 g. Die US Food and Drug Administration hat daher bereits 2002 eine empfindliche MPN-Technik zum Nachweis von *E. sakazakii* in derartigem Untersuchungsmaterial entwickelt (FDA/SCAN, 2002), die eine Nachweisgrenze von 0,003 Keimen/g aufweist. Allerdings ist das Verfahren sehr zeit- und arbeitsaufwendig und nicht spezifisch für *E. sakazakii*. Bei der 2006 veröffentlichten ISO/IDF-Methode (ISO/TS | IDF/RM 210:2006 Milk and milk products – Detection of *Enterobacter sakazakii*) handelt es sich um ein qualitatives Verfahren, das ebenfalls nicht als optimal bezeichnet werden kann und sich daher bereits seit einiger Zeit in Überarbeitung befindet.

In der vorliegenden Arbeit sollte ein auf der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) basierender Suchtest entwickelt werden, der ohne großen apparativen Aufwand in kurzer Zeit einen sicheren und schnellen Nachweis von *E. sakazakii* in pulverförmiger Säuglingsnahrung erlaubt.

2. LITERATUR

2.1 Taxonomische Stellung von *Cronobacter* spp. (*Enterobacter sakazakii*)

Enterobacter (*E.*) *sakazakii* wurde zunächst als gelb pigmentierte Biogruppe von *E. cloacae* innerhalb der Familie der *Enterobacteriaceae* beschrieben. FARMER et al. (1980) fanden durch DNA-DNA-Hybridisierungen eine hohe Übereinstimmung (83 – 89 %) des Genoms dieser gelb pigmentierten *E. cloacae*-Stämme untereinander, während der Genomvergleich von pigmentierten und unpigmentierten *E. cloacae* nur eine geringe Übereinstimmung (31 – 49 %) zeigte. Sie schlugen daher vor, die gelb pigmentierten Stämme in einer eigenen Species zusammenzufassen und gaben dieser zu Ehren des japanischen Bakteriologen Richii Sakazaki den Namen *Enterobacter sakazakii*.

Da sie innerhalb der neuen Spezies 15 Biogruppen unterscheiden konnten, hatten bereits FARMER et al. (1980) vermutet, dass es sich in Wirklichkeit um mehrere Species handeln könnte. 2007 zeigten IVERSEN et al. mit Hilfe von f-AFLP (fluorescent amplified fragment length polymorphisms), Ribotypisierung, DNA-DNA-Hybridisierung und Gensequenzierung der 16S rRNA, dass der Organismus mindest fünf Genomspecies umfaßt und schlugen die Bildung eines Genus "*Cronobacter*" innerhalb der Familie der *Enterobacteriaceae* vor. Basierend auf dieser Arbeit und weiteren Studien ergibt sich folgende Struktur dieser neuen Gattung (Tab. 1).

Tabelle 1: Neue taxonomische Stellung von *Enterobacter sakazakii* (IVERSEN et al., 2008a)

Taxon	Bezeichnung	Benennung durch
Familia	<i>Enterobacteriaceae</i>	CASTELLANI & CHALMER (1919)
Genus	<i>Cronobacter</i>	IVERSEN et al. (2008a)
Species	<i>C. sakazakii</i>	
Species	<i>C. malonaticus</i>	
Species	<i>C. turicensis</i>	
Species	<i>C. muytjensii</i>	
Species	<i>C. dublinensis</i>	
Subspecies	<i>C. dublinensis</i> subsp. <i>dublinensis</i>	
	<i>C. dublinensis</i> subsp. <i>lausannensis</i>	
	<i>C. dublinensis</i> subsp. <i>lactaridi</i>	

Zwei weitere Stämme werden in diesem Schema als *Cronobacter* genomospecies 1 bezeichnet (IVERSEN et al., 2008a). Durch die Neuklassifizierung von *Cronobacter* spp. ändert sich hinsichtlich der Risikobewertung nichts. Alle fünf neuen Species des Genus enthalten klinische Isolate (IVERSEN et al., 2007).

2.2 Physiologische und biochemische Eigenschaften

Cronobacter spp. sind fakultativ anaerobe, motile, peritrich begeißelte, gramnegative Stäbchen, mit einer Größe von etwa 3 µm x 1 µm (IVERSEN et al., 2008a).

Charakteristische Eigenschaften von *Cronobacter* spp. sind die Bildung gelben Pigments sowie die α -Glucosidase-Aktivität, welche MUYTJENS et al. (1984) bei allen 129 getesteten *Cronobacter*-Stämmen, aber bei keinem der 97 anderen *Enterobacter*-Stämmen fanden. Die gelbe Pigmentierung wird bei einer Inkubationstemperatur von 25 °C am deutlichsten ausgebildet. Sie variiert zwischen den Stämmen in ihrer Intensität. In seltenen Fällen ist sie nur schwer erkennbar oder nicht vorhanden (FARMER et al. 1980). In Untersuchungen von IVERSEN und FORSYTHE (2007) produzierten 2 % der geprüften *Cronobacter*-Stämme kein gelbes Pigment. In Israel wurde 1993 im Verlauf einer neonatalen Bakteriämie ein *Cronobacter*-Stamm isoliert, der ebenfalls kein Pigment bildete (BLOCK et al., 2002). Gelbfärbung zeigen auch Kolonien von *E. agglomerans* (NAZAROWEC-WHITE und FARBER, 1997a) sowie *Acinetobacter* spp., *Escherichia hermannii*, *Cedacea lapagei* und *Leclercia adecarboxylata*, die aber keine α -Glucosidase-Aktivität besitzen (LEUSCHNER und BEW, 2004).

Cronobacter spp. sind, wie oben bereits erwähnt, fakultativ anaerob und wachsen mit Glucose und Citrat als einziger Energie- oder Kohlenstoffquelle (FARMER et al., 1980). Die Gasbildung aus Lactose ist von der Art des Mediums abhängig. So bildeten drei von 57 Stämmen kein Gas in Laurylsulfat-Tryptose- oder Brillantgrün-Galle-Bouillon, und 17 Stämme wiesen keine Gasbildung in Lactose-Bouillon auf. Somit waren 70 – 95 % der getesteten Stämme als Coliforme (Gasbildung aus Lactose bei 35 °C) anzusehen. Zu ähnlichen Ergebnissen kamen später auch IVERSEN et al. (2004a). Nur 33 der 57 von FARMER et al. (1980) getesteten Isolate bildeten bei 44,5 °C Gas in *Escherichia coli*-Bouillon, in den Untersuchungen von IVERSEN et al. (2004a) waren bei 44 °C nur 23 % der Isolate hierzu in der Lage.

Cronobacter spp. werden demnach weder beim Coliformen- noch beim Fäkalcoliformentest sicher erfaßt.

Zur Abgrenzung gegenüber *E. cloacae*, der ähnliche Eigenschaften wie *Cronobacter* spp. besitzt, eignen sich auf phänotypischer Ebene neben der Pigmentbildung der negative Sorbit-Test und der positive Desoxyribonuklease-Test (FARMER et al. 1980). Neuerdings konnte jedoch gezeigt werden, dass manche Stämme von *Cronobacter* Sorbit verstoffwechseln (HEUVELINK et al., 2001). Auch dieses Kriterium ist daher, wie die gelbe Pigmentierung, nicht uneingeschränkt gültig. Als weitere Differenzierungsmöglichkeiten zwischen *Cronobacter* spp. und *E. cloacae* werden die Tween-80-Esterase-Aktivität (ALDOVA et al., 1983) sowie unterschiedliche Antibiotikaempfindlichkeiten (FARMER et al., 1980) genannt. Eine umfangreiche Zusammenstellung verschiedener biochemischer Reaktionen findet sich bei FARMER et al. (1980).

Auf festen Nährböden bilden *Cronobacter* spp. bei der Erstisolierung zwei unterschiedliche Kolonieförmigkeiten (FARMER et al., 1980). Kolonietyp A ist entweder trocken oder mukös mit eingekerbtem oder bogenförmig ausgezacktem Rand und von gummiartiger Konsistenz. Typ B ist schleimig, weich und leicht mit der Öse vom Untergrund abzunehmen. Typ A wandelt sich bei Subkultivierung rasch in Typ B um. Ob Virulenz- oder andere Unterschiede zwischen den beiden morphologischen Varianten bestehen, ist zur Zeit nicht bekannt (NAZAROWEC-WHITE und FARBER, 1997a).

In flüssigen Medien wachsen *Cronobacter* spp. sehr rasch und bilden große Mengen an Sediment (FARMER et al., 1980). Alle 57 von FARMER et al. (1980) getesteten *Cronobacter*-Stämme wuchsen in Bouillon bei Temperaturen von 25 °C, 36 °C und 45 °C, 50 auch bei 47 °C. Bei 4 °C und 50 °C war in keinem Fall Wachstum zu registrieren. NAZAROWEC-WHITE und FARBER (1997b) fanden in Untersuchungen an elf klinischen und aus Säuglingstrockennahrung isolierten Stämmen minimale Wachstumstemperaturen in Hirn-Herz-Bouillon zwischen 5,5 °C und 8 °C. Nur zwei Stämme konnten sich bei 45 °C vermehren. Die durchschnittlichen Generationszeiten in rekonstituierter Säuglingsnahrung betragen 4,98 h bei 10 °C und 40 min bei 23 °C. IVERSEN et al. (2004b) registrierten im gleichen Medium bei 21 °C eine Generationszeit von 1,7 h. In rekonstituierter Säuglingsnahrung lag die minimale Wachstumstemperatur bei 6,0 °C, die optimale Temperatur betrug 37 °C – 43 °C, die maximale 45 °C (IVERSEN et al., 2004b). Bei Kühlungstemperaturen (6 °C) lag die Generationszeit des Erregers in rekonstituierter Säuglingsnahrung bei 13,7 h (IVERSEN et al., 2004b).

Die Autoren halten es daher für unwahrscheinlich, dass unter diesen Bedingungen die, allerdings bisher unbekannte, infektiöse Dosis erreicht wird. In diesem Zusammenhang sollte auch erwähnt werden, dass die Anlaufphase in rekonstituierter Säuglingsnahrung bei aus Lebensmitteln isolierten Stämmen und einer Bebrütungstemperatur von 10 °C im Mittel $28,56 \pm 7,44$ h (NAZAROWEC-WHITE und FARBER, 1997b) bzw. (mathematisch geschätzt) $83,3 \pm 18,7$ h (KANDHAI et al., 2006) betrug. Bei 23 °C lag sie allerdings nur noch bei $2,76 \pm 0,51$ h (NAZAROWEC-WHITE und FARBER, 1997b) und bei 37 °C (mathematisch geschätzt) nur bei $1,73 \pm 0,43$ h (KANDHAI et al., 2006).

Untersuchungen zur Hitzetoleranz von *Cronobacter* spp. wurden unter anderem von NAZAROWEC-WHITE und FARBER (1997c), BREEUWER et al. (2003) und IVERSEN et al. (2004b) durchgeführt. Die gefundenen Werte der letztgenannten Arbeitsgruppe liegen etwa zwischen denen der beiden anderen und sollen im folgenden zusammenfassend referiert werden: Die $D_{54\text{ °C}}$ – Werte in Trypton-Soja-Bouillon und rekonstituierter Säuglingsnahrung, die an zwei Stämmen ermittelt wurden, bewegten sich zwischen $10,2 \pm 3,56$ und $16,4 \pm 0,67$ min, bei 62 °C zwischen $0,2 \pm 0,13$ und $0,4 \pm 0,08$ min. Basierend auf einem $D_{60\text{ °C}}$ -Wert von 1,1 min und einem z-Wert von 5,7 °C in rekonstituierter Säuglingsnahrung berechneten die Autoren für die Kurzzeitpasteurisierung bei 71,2 °C über 15 s eine Reduktion der Keimzahl des Erregers um 26 Zehnerpotenzen, was für die Effizienz der gängigen Pasteurisierungsverfahren spricht. Zu einem ähnlichen Schluss waren auch schon NAZAROWEC-WHITE et al. (1999) gekommen. Eine Belastung von Säuglingstrockennahrung mit *Cronobacter* spp. müsste demnach auf eine Rekontamination nach der Wärmebehandlung zurückzuführen sein. Allerdings sprechen Versuche von ARKU et al. (2008) dafür, dass der Erreger die Sprühtrocknung überleben kann. Abschließend soll noch erwähnt werden, dass EDELSON-MAMMEL und BUCHANAN (2004), die ebenfalls Versuche zur Hitzeresistenz von *Cronobacter* spp. in rekonstituierter Säuglingsnahrung durchführten, erhebliche Unterschiede zwischen den einzelnen von Ihnen geprüften zwölf Stämmen registrieren konnten. So lagen die $D_{58\text{ °C}}$ -Werte von sechs Stämmen im Bereich von $30,5 \pm 0,1$ s bis $47,9 \pm 0,1$ s, die der anderen sechs im Bereich von $307,8 \pm 6,7$ s bis $591,9 \pm 49,9$ s. WILLIAMS et al. (2005) fanden später ein Protein, das nur bei den sechs resistenteren Stämmen vorkam, und das als Biomarker für derartige Isolate dienen kann.

Gegenüber erniedrigten Wasseraktivitäten sind, nach Untersuchungen von BREEUWER et al. (2003), *Cronobacter* spp. resistenter als andere *Enterobacteriaceae*. So nahmen z. B. die Keimzahlen von zwei *Cronobacter*-Stämmen bei einem a_w -Wert von 0,81 innerhalb von zwei

Wochen um drei bis vier, die von Salmonellen (*S. Enteritidis*, *S. Typhimurium*), *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Serratia rubidea* und *Citrobacter freundii* dagegen um mehr als sechs Zehnerpotenzen ab. Die gleiche Tendenz zeigte sich auch bei einer Trocknung und anschließenden Lagerung. So sank nach einer Bebrütung in der stationären Phase getrockneter *Cronobacter*-Zellen bei 25 °C über 46 d die Keimzahl um ein bis eineinhalb, die von *E. coli* um vier Zehnerpotenzen. In der exponentiellen Phase getrocknete *Cronobacter*-Zellen waren allerdings wesentlich empfindlicher (Abnahme um sechs Zehnerpotenzen bei einer Lagerung bei 25 °C über zwei Wochen). Für die hohe Resistenz des Erregers gegenüber osmotischem Stress sprechen auch die Untersuchungen von EDELSON-MAMMEL et al. (2005), die nach einer zweijährigen Lagerung bei Zimmertemperatur von mit etwa 10^6 *Cronobacter*/g kontaminierter Säuglingstrockennahrung noch 300 Keime/g isolieren konnten. Ein Grund für die hohe Resistenz des Erregers gegenüber Trockenheit, ist nach Untersuchungen von BREEUWER et al. (2003) in der Fähigkeit zu sehen, während der stationären Wachstumsphase Trehalose anzuhäufen, die Phospholipidmembranen und Proteine stabilisiert. Daneben scheinen auch die Akkumulation bestimmter Proteine, die eine protektive Wirkung besitzen (RIEDEL und LEHNER, 2007), bzw. die Ausbildung einer Kapsel (RIEDEL und LEHNER, 2007), eine Rolle bei der Anpassung an trockene Bedingungen zu spielen.

IVERSEN et al. (2004b) und LEHNER et al. (2005) konnten in ihren Untersuchungen unter anderem die Biofilmbildung an Latex-, Silikon- Polycarbonat- und Polyvinylchloridoberflächen sowie in geringerem Ausmaß auch an Glas und Edelstahl nachweisen. KIM et al. (2006) untersuchten die Biofilmbildung an Magensonden aus Polyvinylchlorid und an Edelstahl. Hierbei zeigten sich deutliche Abhängigkeiten der Anheftungsfähigkeit und Biofilmbildung vom Nährstoffangebot und der Temperatur. So heftete sich der Erreger an beide Materialien besser bei 25 °C als bei 12 °C an. Bei 25 °C bildete er nach der Anheftung Biofilme in Anwesenheit von rekonstituierter Säuglingsnahrung. Die Ergebnisse der zitierten Arbeiten unterstreichen sowohl die Bedeutung der Temperaturkontrolle bei der Produktion von Säuglingsnahrung, als auch die Notwendigkeit, Babyflaschen und andere bei der Ernährung von Säuglingen verwendete Utensilien unmittelbar nach dem Gebrauch sorgfältig zu reinigen.

2.3 Pathogenitätsmechanismen

Cronobacter spp. zählen, wie *Enterobacter* spp. auch, zu den opportunistisch pathogenen Bakterien. Erkrankungen sind zwar relativ selten, betreffen aber insbesondere Frühgeburten und junge Säuglinge, bei denen eine *Cronobacter*-Infektion zu einer schweren, häufig fatal

verlaufenden Septikämie, Meningitis, nekrotisierenden Meningoenzephalitis oder nekrotisierender Enterokolitis führen kann. Erkrankungen Erwachsener sind selten (GURTLER et al., 2005). Über die Pathogenese bzw. Virulenzfaktoren ist noch wenig bekannt. Enterotoxin- bzw. Cytotoxinbildung (PAGOTTO et al., 2003), nicht auf Fimbrien basierende Adhäsion an humanen epithelialen und an zerebralen Endothelien-Zellen (MANGE et al., 2006), Fähigkeit zur Invasion in zerebrale Kapillarendothelien der Ratte und Überleben in menschlichen Makrophagen (TOWNSEND et al., 2007; 2008) werden in diesem Zusammenhang genannt.

2.4 Vorkommen

Cronobacter spp. sind in der Umwelt und in Lebensmitteln weit verbreitet. So konnten KUZINA et al. (2001) und HAMILTON et al. (2003) den Erreger aus dem Darm verschiedener Insekten (Stallfliege, Fruchtfliege, Hausfliege) isolieren. Über den Nachweis in Mineralwasserquellen berichten MOSSO et al. (1994).

Auch in verschiedenen Lebensmitteln pflanzlicher Art (KIM und BEUCHAT, 2005), tierischen Ursprungs, wie Fleischerzeugnissen (LECLERCQ et al., 2002), Milch (LAFARGE et al., 2004), Milcherzeugnissen (CHAVES-LOPEZ et al., 2006), Speiseeis (KRAEMER, 2008), Eiern (GURTLER et al., 2005), Fisch (LIU et al., 2005) und in Trinkwasser (LECLERCQ et al., 2001) wurden *Cronobacter* spp. nachgewiesen. Eine detaillierte Zusammenstellung zum Vorkommen des Erregers in Lebensmitteln (außer Säuglingsnahrung und Milchtrockenprodukten) und Getränken findet sich bei FRIEDEMANN (2007).

Von großer Bedeutung für die Entstehung von Erkrankungen durch *Cronobacter* spp. ist die Kontamination von Säuglingsnahrung auf Milchpulverbasis. Eine Reihe zum Teil tödlich verlaufender Infektionen bei Frühgeburten und Neugeborenen konnte auf diese Quelle zurückgeführt werden (FAO/WHO, 2006). Einer Zusammenstellung von Untersuchungen zum Vorkommen des Erregers in derartigen Produkten zufolge betrug der Anteil positiver Proben zwischen 2 und 14 % (KRAEMER, 2008, basierend auf FAO/WHO, 2006). O'BRIEN et al. (2009) fanden allerdings bei Untersuchungen an 470 Proben 31 verschiedener Folgenahrungen und Getränke von sieben Herstellern weder in solchen auf Milch- noch in solchen auf Sojabasis *Cronobacter* spp.. Lediglich zwei Getränke auf Getreidebasis waren positiv (weniger als 1 Keim/10 g).

Neben der Säuglingsnahrung selbst kommen aber auch die bei deren Zubereitung und Verfütterung (Sauger, Fläschchen etc.) verwendeten Gerätschaften als Infektionsquelle in Betracht. Deshalb ist eine gute Hygienepraxis in diesem Bereich unbedingt notwendig (FRIEDEMANN, 2008).

2.5 Erkrankungen

Durch *Cronobacter* spp. hervorgerufene Erkrankungen sind selten. O'BRIEN et al. (2009) fanden im Zeitraum der letzten 48 Jahre 123 dokumentierte Fälle bei Kindern, von denen nur sechs älter als drei Monate waren. Neun Erkrankungsfälle betrafen Erwachsene, die allerdings immunkompromittiert waren (PAGOTTO et al., 2007). Die Erkrankung nimmt jedoch in der Regel einen schweren Verlauf, und Todesfälle oder Folgeschäden sind häufig. Der Erreger wird daher von der "International Commission on Microbiological Specification for Foods" als "severe hazard for restricted populations, life threatening or substantial chronic sequelae or long duration" klassifiziert (ICMSF, 2002). Die Infektionen kommen hauptsächlich in Krankenhäusern vor, und die Patienten sind in den meisten Fällen frühgeborene, untergewichtige Säuglinge oder Säuglinge in den ersten beiden Lebensmonaten. Septikämien, Meningitiden, auch mit Abszessbildung, und nekrotisierende Enterokolitiden wurden als häufigste Krankheitsbilder beobachtet, daneben können aber auch Durchfälle, Konjunktivitiden, Harnwegsinfektionen und anderes mehr auftreten (IVERSEN und FORSYTHE, 2003; PAGOTTO et al., 2007). LAI verfasste 2001 eine Übersicht von *Cronobacter*-bedingten Erkrankungen in der englischsprachigen Literatur. Er berichtete über insgesamt 31 Infektionen bei Säuglingen, Babys und Kindern. 21 Patienten litten an Meningitis, zwölf hatten eine zusätzliche Bakteriämie. Untergewichtig waren 55 % der betroffenen Säuglinge, 75 % waren entweder Frühgeborene oder es waren Komplikationen während der Geburt aufgetreten. In dieser Untersuchung lag die Todesrate bei 33 %. Betrachtet man nur die Meningitiserkrankungen, steigt die Todesrate auf 45 %. Die betroffenen Säuglinge, die zu früh und mit Untergewicht geboren wurden, wiesen eine Todesrate von 50 % auf. Neun von elf überlebenden Meningitispatienten litten unter Spätschäden, wie Hydrocephalus, gravierenden Entwicklungsdefiziten und neurologischen Ausfällen.

Wie oben bereits erwähnt, war in mehreren Fällen kontaminierte Säuglingsnahrung für die Entstehung der Erkrankungen verantwortlich. So wurden bei einem Ausbruch in Island die *Cronobacter*-Isolate aus klinischem Probenmaterial der drei Patienten mit solchen, die in der Säuglingsnahrung nachgewiesen worden waren mit verschiedenen Verfahren verglichen. Der

Biotyp, das Profil der Plasmid-DNA und das Antibiotogramm waren bei den Patientenisolaten und bei denen aus dem Lebensmittel identisch (BIERING et al. 1989). Ähnliches fanden SIMMONS et al. (1989) bei einem Ausbruch in Memphis, USA. Hier traten vier Erkrankungen mit Durchfall auf. *Cronobacter* spp. wurden in einem Mixer der Milchküche und in der Säuglingsnahrung gefunden. Auch in diesem Fall bestätigten entsprechende Untersuchungen dass diese Isolate mit denen von den Patienten identisch waren.

In Brüssel trat von Juni bis Juli 1998 eine Häufung von *Cronobacter*-Infektionen auf. Alle betroffenen Säuglinge waren Patienten in einem Krankenhaus, wogen weniger als 2000 g und litten an nekrotisierender Enterokolitis. Auch in diesen Fällen konnte im klinischen Probenmaterial und in der Säuglingsnahrung derselbe *Cronobacter*-Stamm nachgewiesen werden (VAN ACKER et al., 2001). In Tab. 2 findet sich eine Zusammenstellung von durch *Cronobacter* spp. hervorgerufenen Erkrankungen, bei denen zum Teil kontaminierte Säuglingsnahrung als Ursache nachgewiesen werden konnte.

Tabelle 2.: *Cronobacter*-Erkrankungen bei Kindern (nach DRUDY et al., 2006)

Jahr	Land	Fälle	Todesfälle	Ursache
1958	England	2	2	unbekannt
1958	Dänemark	1	1	unbekannt
1958	USA (Georgia)	1	0	unbekannt
1958	USA (Oklahoma)	1	1	unbekannt
1981	USA (Indiana)	1	0	unbekannt
1977 – 1981	Griechenland	1	1	unbekannt
1983	Dänemark	8	6	Säuglingsnahrung
1984	Griechenland	11	4	unbekannt
1984	USA (Missouri)	1	0	unbekannt
1984	(USA) Massachusetts	2	1	unbekannt
1986 – 1987	Island	3	1	Säuglingsnahrung
1988	USA (Tennessee)	4	0	Säuglingsnahrung
1990	USA (Maryland)	1	0	Säuglingsnahrung
1991	Ohio	1	0	unbekannt
1998	Belgien	12	2	Säuglingsnahrung
1999 – 2000	Israel	2	0	Säuglingsnahrung

Jahr	Land	Fälle	Todesfälle	Ursache
2001	USA (Tennessee)	10	1	Säuglingsnahrung
2002	Belgien	1	1	Säuglingsnahrung
2004	Neuseeland	5	1	Säuglingsnahrung
2004	Frankreich	4	2	Säuglingsnahrung

2.6 Nachweis

Auf internationaler Ebene werden zur Zeit im wesentlichen zwei kulturelle Verfahren zum Nachweis von *Cronobacter* spp. eingesetzt: Die sogenannte FDA-Methode der U. S. Food and Drug Administration "Isolation and Enumeration of *Enterobacter sakazakii* from Dehydrated Powdered Infant Formula" (FDA/CFR, 2002) sowie die Technische Spezifikation ISO/TS 22964 | IDF/RM 210:2006 "Milk and milk products – Detection of *Enterobacter sakazakii*". Letztere wird in der "Verordnung (EG) Nr. 2073/2005 der Kommission vom 15. November 2005 über mikrobiologische Kriterien für Lebensmittel" als analytisches Referenzverfahren für den Nachweis von *Cronobacter* spp. (*Enterobacter sakazakii*) genannt. Das Verfahren befindet sich allerdings im Hinblick auf eine Optimierung und Ausdehnung auch auf die Untersuchung anderer Lebensmittel in Überarbeitung.

Die FDA-Methode ist kein spezifisches Nachweisverfahren für *Cronobacter* spp. sondern weist allgemein der Familie der *Enterobacteriaceae* zugehörige Keime nach. Hierzu werden zunächst 3 x 100 g, 3 x 10 g und 3 x 1 g des Untersuchungsmaterials (MPN-Verfahren) in Wasser gelöst und bei 36 °C über 24 h vorangereichert. Danach wird in die selektive EE-Boullion (*Enterobacteriaceae* Enrichment) übertragen und bei 36 °C über 24 h angereichert. Anschließend erfolgen Ausstriche auf Kristallviolett-Galle-Glucose-Agar (VRBD-Agar) und nach einer Inkubation von 24 h bei 36 °C die Übertragung von fünf typischen Kolonien auf Trypton-Soja-Agar. Gelbe Kolonien werden mit einem miniaturisierten Testsystem (API 20E) auf Zugehörigkeit zur Gattung *Cronobacter* geprüft.

Bei der Untersuchung nach ISO/TS 22964 | IDF/RM 210:2006 wird ebenfalls zunächst vorangereichert – allerdings in Gepuffertem Peptonwasser (37 °C/18 h) – und anschließend in modifizierte Laurylsulfat-Tryptose-Bouillon mit Novobiocinzusatz (mLST+n) übertragen. Die Bebrütung erfolgt bei 45 °C über 24 h. Danach werden Ausstriche auf einem festen

chromogenen Selektivmedium ESIA (*Enterobacter sakazakii* Isolation Agar) angelegt und nach der Inkubation bei 44 °C über 24 h typische, aufgrund der alpha-Glucosidase-Aktivität des Erregers und des damit verbundenen Farbumschlag des Chromogens blau-grün gefärbte Kolonien, auf Trypton-Soja-Agar übertragen. Auf diesem Medium gelb pigmentierte Kolonien werden biochemisch auf Zugehörigkeit zur Gattung *Cronobacter* getestet.

Bei beiden Verfahren handelt es sich nicht um optimale Methoden. So wachsen nicht alle *Cronobacter*-Stämme in EE- oder mLST+n-Bouillon (IVERSEN und FORSYTHE, 2007) und ein gewisser Prozentsatz der Isolate ist, wie unter 2.2 bereits erwähnt, nicht gelb pigmentiert (IVERSEN und FORSYTHE, 2007). Auch die Bebrütungstemperaturen von 44 bzw. 45 °C sind für einige Stämme zu hoch, weshalb im Erstentwurf der Revision des ISO/IDF-Verfahrens das Auswahlkriterium "Gelbpigmentierung" entfällt, eine Inkubation bei 41,5 °C vorgesehen ist, und außerdem mLST+n-Bouillon durch die saccharosehaltige "*Cronobacter* Screening Broth" (IVERSEN et al., 2008b) ersetzt werden soll (BECKER, 2009, pers. Mitteilung). Für den Nachweis ist als festes Selektivmedium der "Chromogenic *Cronobacter* Isolation (CCI) agar" (IVERSEN et al., 2008b) vorgesehen. Dieses Medium basiert, wie die übrigen chromogenen Medien zum Nachweis von *Cronobacter* spp. auch, auf der bereits erwähnten alpha-Glucosidase-Aktivität (MUYTJENS et al., 1984) der als Substrat 5-Brom-4-chlor-3-indolyl-alpha-D-glucopyranosid angeboten wird. *Proteus vulgaris* besitzt ebenfalls alpha-Glucosidase-Aktivität, kann aber anhand der Graufärbung der Kolonien infolge Schwefelwasserstoffbildung von *Cronobacter* (blau-grüne Kolonien) abgegrenzt werden (IVERSEN et al., 2004a).

Die Polymerase Chain Reaction (PCR) hat als Nachweismethode die Vorteile, dass sie schnell durchzuführen ist, im allgemeinen nur eine Anreicherung benötigt und sehr spezifisch reagiert (LEHNER et al., 2004). Von den bisher entwickelten oder angewendeten molekularbiologischen Verfahren zum Nachweis, zur Identifizierung und zur Feindifferenzierung von *Cronobacter* spp. sollen die PCR-Techniken von HEUVELINK et al. (2004) und LIU et al. (2006) erwähnt werden. In beiden Arbeiten wurde Säuglingsnahrung untersucht. Bei den beiden Verfahren nach LIU et al. (2006) handelt es sich jeweils um eine real-time PCR unter Verwendung des TaqMan-Systems bzw. unter Verwendung von SYBR Green. Bei der Methode nach HEUVELINK et al. (2004) handelt es sich ebenfalls um eine real-time PCR unter Verwendung des TaqMan-Systems.

Abschließend soll noch erwähnt werden, dass nach Beendigung der eigenen Untersuchungen das in der vorliegenden Arbeit als PCR-Target verwendete 16S-rRNA-Gen von *E. sakazakii* durch HASSAN et al. (2007) näher charakterisiert wurde.

3. EIGENE UNTERSUCHUNGEN

3.1 Material und Methodik

3.1.1 Material

3.1.1.1 Untersuchungsmaterial

Das Untersuchungsmaterial war kommerziell verfügbare Säuglingstrockennahrung von vier verschiedenen Herstellern in Originalverpackungen. Die Proben wurden zufällig ausgewählt und umfaßten die Produktgruppen Anfangsnahrung, Folgenahrung, Dauernahrung, Diät-nahrung und Heilnahrung. Insgesamt wurden 218 derartige Proben untersucht. Außerdem standen insgesamt zehn Proben Staubsaugerinhalt und andere Umfeldproben von den Produktionsstätten der Säuglingsnahrung, sowie zehn Proben aus den Dienstleistungsuntersuchungen des Instituts zur Verfügung.

3.1.1.2 *Enterobacter sakazakii*-Stämme

Zur Feststellung der Sensitivität der PCR-Methode (3.1.2.2) zum Nachweis von *E. sakazakii* lagen 57 verschiedene Stämme vor (Tab. 3.1). Mittels Random Amplified Polymorphic DNA-PCR (RAPD; 3.1.2.2.5) war die genetische Vielfalt dieser Stämme bestätigt worden. Alle Isolate zeigten typisches Verhalten in den miniaturisierten Testkits API 20E oder Enterotube II und reagierten positiv in den Tests für extrazelluläre Desoxyribonuklease und α -Glucosidase.

3.1.1.3 Isolate von anderen *Enterobacteriaceae* spp. und von nicht-*Enterobacteriaceae*

Die Isolate der in Tab. 3.2 genannten Species wurden zur Bestimmung der Spezifität der PCR-Methode für den Nachweis von *E. sakazakii* (3.1.2.2) eingesetzt. Herkunft und Zahl der Stämme sind Tab. 3.2 zu entnehmen.

Eine weitere nicht zur Familie *Enterobacteriaceae* gehörige Species (*Bacillus cereus* MHI 161) wurde zur Erstellung der internen Amplifikationskontrolle verwendet.

Tabelle 3.1: Herkunft und Anzahl der verschiedenen Stämme von *E. sakazakii* (n = 57)

Herkunft der Stämme	Anzahl der Stämme	Stamm-Nummern (soweit vorhanden)
Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ)	1	DSM 4485
National Collection of Type Cultures (NCTC) Public Health Laboratory Service (PHLS)	5	NCTC 8155, NCTC 9238, NCTC 9844, NCTC 9846, NCTC 9529
Dienstleistungsproben des Instituts	2 (10) ³	
Niederlande ¹⁾	6	
Professur für Milchwissenschaften, Justus-Liebig-Universität Gießen	11	
Isolate aus Säuglings- und Kleinkindernahrung verschiedener Hersteller ²⁾	23	
Staubsaugerinhalt (Umfeldprobe eines Herstellers)	1 (10) ³	
Eigene Isolate aus Säuglings- und Kleinkindernahrung verschiedener Hersteller	8 (218) ³	

¹⁾ Food and Consumer Product Safety Authority, Zutphen, Netherlands

²⁾ Die an der Studie beteiligten Säuglingsnahrungshersteller stellten Isolate zur Verfügung, die in den Betriebslaboratorien isoliert worden waren.

³⁾ In Klammern Anzahl der getesteten Proben (Säuglingsnahrung, Umfeldproben, siehe 3.1.1.1).

Tabelle 3.2: Herkunft und Anzahl von Isolaten verschiedener Species (n = 169)

Species	Anzahl und Herkunft der Isolate		
	Gießen ¹⁾	München ²⁾	Säuglingsnahrungshersteller ³⁾
<i>Citrobacter freundii</i>	7	2	16 (8)
<i>Enterobacter agglomerans</i>	3	0	21 (10)
<i>Enterobacter cloacae</i>	3	1	21 (4)
<i>Enterobacter gergoviae</i>	1	0	3 (1)
<i>Enterobacter amnigenus</i>	0	0	1 (1)
<i>Escherichia coli</i>	2	11	8 (3)

Species	Anzahl und Herkunft der Isolate		
	Gießen ¹	München ²	Säuglingsnahrungshersteller ³
<i>Escherichia hermanii</i>	0	0	1 (1)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1	0	5 (3)
<i>Klebsiella oxytoca</i>	0	0	3
<i>Klebsiella ozaenae</i>	1	0	1
<i>Hafnia alvei</i>	0	3	0
<i>Salmonella</i> spp.	0	6	0
<i>Serratia</i> spp.	1 [<i>S. rubidea</i>]	2	0
<i>Shigella</i> spp.	0	2	1 [<i>S. flexneri</i>]
<i>Staphylococcus</i> spp.	0	8	0
<i>Enterococcus</i> spp.	0	3	0

¹⁾ Professur für Milchwissenschaften, Institut für Nahrungsmittelkunde, Justus-Liebig-Universität Gießen

²⁾ Lehrstuhl für Hygiene und Technologie der Milch, Ludwig-Maximilians-Universität München

³⁾ Von den Herstellern (siehe 3.1.1.1) zur Verfügung gestellte Isolate sowie Isolate (in runden Klammern), die im Rahmen der Dissertation aus Proben von Säuglingsnahrungen der beteiligten Hersteller isoliert worden waren.

3.1.1.4 Nährböden, Reagenzien und Geräte für die kulturellen Untersuchungen

3.1.1.4.1 Flüssige Nährmedien (in Klammern im Text verwendete Abkürzungen)

Hirn-Herz-Bouillon (BHI)	Merck 110493
Doppelt gepuffertes Peptonwasser (GPW)	Oxoid CM509
Enterobacteriaceen-Anreicherungs-Bouillon (EE-broth)	Oxoid CM0317
Laurylsulfat-Tryptose-Laktose-Bouillon (LST)	Oxoid CM0451

3.1.1.4.2 Feste Nährmedien (in Klammern im Text verwendete Abkürzungen)

Standard II-Nähragar (St II)	Merck 107883
Kristallviolett-Galle-Glukose-Agar (VRBD)	Oxoid CM0451

Trypton-Soya-Agar (TSA)	Oxoid CM131
Trypton-Soya-Agar mit	Oxoid CM131
4-Methylumbelliferyl- α -D-glucosid (TSA + α -MUG)	Sigma-Aldrich M9766

Toluidinblau O-DNA-Agar (DNase-Agar)

Agar	10 g	Oxoid L11
NaCl	10 g	Merck 1.06400
DNA	0,3 g	Sigma D 6898
Trispuffer	1000 ml	
Toluidinblau O-Lösung	0,1 mol/l	Sigma C.I. 52040, Basic Blue 17

Trispuffer

Trihydroxymethylaminomethan	0,05 mol/l	Merck 1.08382
CaCl ₂	0,001 mol/l	Merck 631K2267987
Aqua dest.	ad 1000 ml	

<i>Enterobacter-sakazakii</i> -Isolation-Agar (ESIA)	AES AEB520010
<i>Enterobacter-sakazakii</i> -Chromogen-Agar (ESCA)	Oxoid CM1055B
BBL-Enterotube II	Becton Dickinson 4373176
API 20E	bioMérieux REF20100

3.1.1.4.3 Reagenzien

Ringer-Lösung	Oxoid BR52
Kalilauge 3 %-ig [3 g Kaliumhydroxid (Merck 105012), Aqua dest. ad 100ml]	
Kovacs Indolreagenz	Merck 109293
Voges-Proskauer-Reagenzien VP 1 bioMerieux 70420, VP 2 bioMerieux 70430	
Oxidase-Teststäbchen	Oxoid BR64
Brillantgrün	Merck 1.01310
Kristallviolett	Merck 1.15940
Gallensalze Nr. 3	Oxoid L56

3.1.1.4.4 Geräte

Brutschrank 37 °C	Memmert, Schwabach
Brutschrank 44 °C	Memmert, Schwabach
Bruttschrank 25 °C	Memmert, Schwabach
Analysenwaage Research R 200 D	Sartorius, Deutschland
Waage L 2200P	Sartorius Deutschland
Reagenzglasschüttler Vortex Genie 2	Scientific Industries, USA
Stanze für DNase-Agar, 2 µm Durchmesser	
UV-Lampe mit langwelligem UV-Licht	

3.1.1.5 Materialien, Reagenzien, und Geräte für die molekularbiologischen Untersuchungen

3.1.1.5.1 Extraktion

DNeasy Tissue Kit	Qiagen, Cat.No.69506
PrepMan® Ultra Testkit	Applied Biosystems PIN 4318930
Reaktionsgefäße Safe-Lock 1,5 ml	Eppendorf 0030 120.086
Ethanol, absolut	J.T.Baker UN1170
Ringer-Lösung	Oxoid BR52
Tischzentrifuge Biofuge pico	Heraeus, Osterode
Wasserbad	Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel
Thermomixer comfort 1,5 ml	Eppendorf

3.1.1.5.2 Materialien für die PCR zum Nachweis von *E. sakazakii*, für die RAPD-PCR und zum Enzymverdau von *E. sakazakii*

3.1.1.5.2.1 Primer

Die verwendeten Primer wurden von MWG Biotech AG, Ebersberg bezogen.

Primersequenzen:

16FP1 TGC ATT TGA AAC TGG TCA GC

16RP1 CTC TGC AGG ATT CTC TGG ATG

RAPD1: CCG AGT CCA (NILSSON et al., 1998)

RAPD2: CCG GCG GCG (NILSSON et al., 1998)

RAPD3: CCG AGT CCA (NILSSON et al., 1998)

RAPD4: CCG GCG GCG (NILSSON et al., 1998)

Ph1: CGT GCC GAT TTA ATT GGG GC (HSIEH et al., 1999)

Ph2: CAA TGT TTT AAA CAT GGA TGC G (HSIEH et al., 1999)

3.1.1.5.2.2 Reagenzien

TE-Puffer (10 mM Tris / HCl, 1 mM EDTA; pH 7,5 – 8)

Taq-Polymerase Thermoprime Plus DNA Polymerase	ABgene AB-0301/B
Magnesium Chloride Solution	ABgene N/A
Reaction Buffer IV	ABgene AB-0289
dNTP's	ABgene AB-0315
Lysozym	Merck 1.05281
MvaI Enzym	MBI Fermentas #ER 0551
Restriktionsenzym puffer (inkl. BSA)	MBI Fermentas #BR
Eis, zerkleinert	
Aqua bidest., steril	

3.1.1.5.2.2 Geräte

Cleanbench	
Thermocycler PCR Express	HYBAID HBPX 220
Thermocycler PCR SPRINT	Thermo IP20

3.1.1.6 Elektrophorese

3.1.1.6.1 Materialien

Agarose (ABgene, Midi ABgarose AG-0300/B), 2 %-ig und 1,4 %-ig, in TAE-Puffer
TAE Puffer für die Gelelektrophorese (0,04mol/l, pH 8,2 mit 1mmol/l EDTA)

EDTA	Sigma E5134
NaOH-Plätzchen	Merck 106495
Trizma-Base	Sigma T8524
Essigsäure 96 %	Riedel de Haen 33206

3.1.1.6.2 Reagenzien

Ethidiumbromid-Lösung:

200 ml Ethidiumbromid 1 %

Serva 21251

plus 400 ml Aqua dest.

Gel Loading Solution

Sigma G2526

DNA-Leiter, 100 Basenpaare

Diagonal p-805

DNA-Leiter Φ 174 Hae III digest

BioLabs Inc.

3.1.1.6.3 Geräte

Waage Excellence

Sartorius, Deutschland

Elektrophoresekammer Agagel Mini

Biometra, Göttingen

Elektrophoresekammer Agagel Standard

Biometra, Göttingen

Electrophoresis Power Supply, EPS 200

Pharmacia Biotech, Freiburg

Transilluminator

Biostep, Jahnsdorf

Videodokumentationssystem, Video 8 Entry

Biostep, Jahnsdorf

3.1.2 Methodik

3.1.2.1 Kultureller Nachweis von *E. sakazakii*

3.1.2.1.1 FDA Methode, modifiziert

Die FDA-Methode (FDA/CFSAN, 2002), ein MPN-Verfahren mit einem Ansatz von 3 x 100 g, 3 x 10 g und 3 x 1 g (insgesamt 333 g) zum Nachweis von *E. sakazakii* in Milchpulver besteht aus der nichtselektiven Voranreicherung in Aqua dest., der selektiven Anreicherung in EE-broth, sowie dem Nachweis auf dem selektiven, aber nicht für *E. sakazakii* spezifischen VRBD-Agar. Von diesem Medium werden fünf verdächtige Kolonien auf TSA übertragen. Nach der Bebrütung gelten gelb pigmentierte Kolonien als potentielle *E. sakazakii* und werden mit einem miniaturisierten biochemischen Testsystem (API 20E) betstätigt.

Folgende Modifikationen wurden in der vorliegenden Arbeit an der FDA-Methode vorgenommen (Abb. 3.1, linke Pfeilfolge):

1. es wurden von den Proben je 1 x 100 g untersucht (qualitativer Nachweis in 100 g);

2. von allen *E. sakazakii*-positiven Proben wurden dann erst in einem zweiten Schritt die fehlenden 233 g für das MPN-Verfahren untersucht;
3. die Voranreicherung wurde anstatt in Aqua dest. in GPW durchgeführt, und bei 37 °C statt bei 36 °C inkubiert;
4. die Identifizierung erfolgte teilweise auch mit Enterotube II und immer unter Zuhilfenahme des DNase-Tests.

Der kulturelle Nachweis mittels modifizierter FDA-Methode wurde bei den Untersuchungen als Referenzverfahren für den Nachweis von *E. sakazakii* in Säuglingsnahrung eingesetzt. Es wurden 218 Proben kommerziell verfügbarer Säuglingsnahrung sowie zehn Proben aus Staubsaugerinhalten bzw. andere Umfeldproben, die vom Produktionsort der Säuglingsnahrung entnommen worden waren, untersucht. Für die Untersuchung der zehn Dienstleistungsproben des Instituts mußte die FDA-Methode weiter modifiziert werden, da nicht in allen Fällen genügend Material zur Verfügung stand. Statt 100 g wurde daher teilweise weniger Probenmaterial eingewogen, auch das Verhältnis Probenmaterial zu GPW betrug nicht immer 1:10.

3.1.2.1.2 Methode nach HAHN, modifiziert

Dieses Verfahren (HAHN, 2003) berücksichtigt neben der gelben Pigmentierung noch weitere für *E. sakazakii* charakteristische Eigenschaften, nämlich die Gasbildung aus Laktose, die Fähigkeit zur Vermehrung bei erhöhten Bebrütungstemperaturen (hier 45 °C), sowie die Spaltung von α -MUG. Letztere wird anhand der Fluoreszenzbildung unter langwelligem UV-Licht (350 nm) nachgewiesen.

Folgende Modifikationen wurden in der vorliegenden Arbeit an der Methode vorgenommen (Abb. 3.1 rechte Pfeilfolge):

1. die Voranreicherung wurde anstatt in Aqua dest. in GPW durchgeführt, und bei 37 °C inkubiert;
2. die Identifizierung erfolgte mittels Enterotube II,
3. zusätzlich zum Enterotube-Test wurden stets der DNase Test sowie der Oxidase-Test durchgeführt.

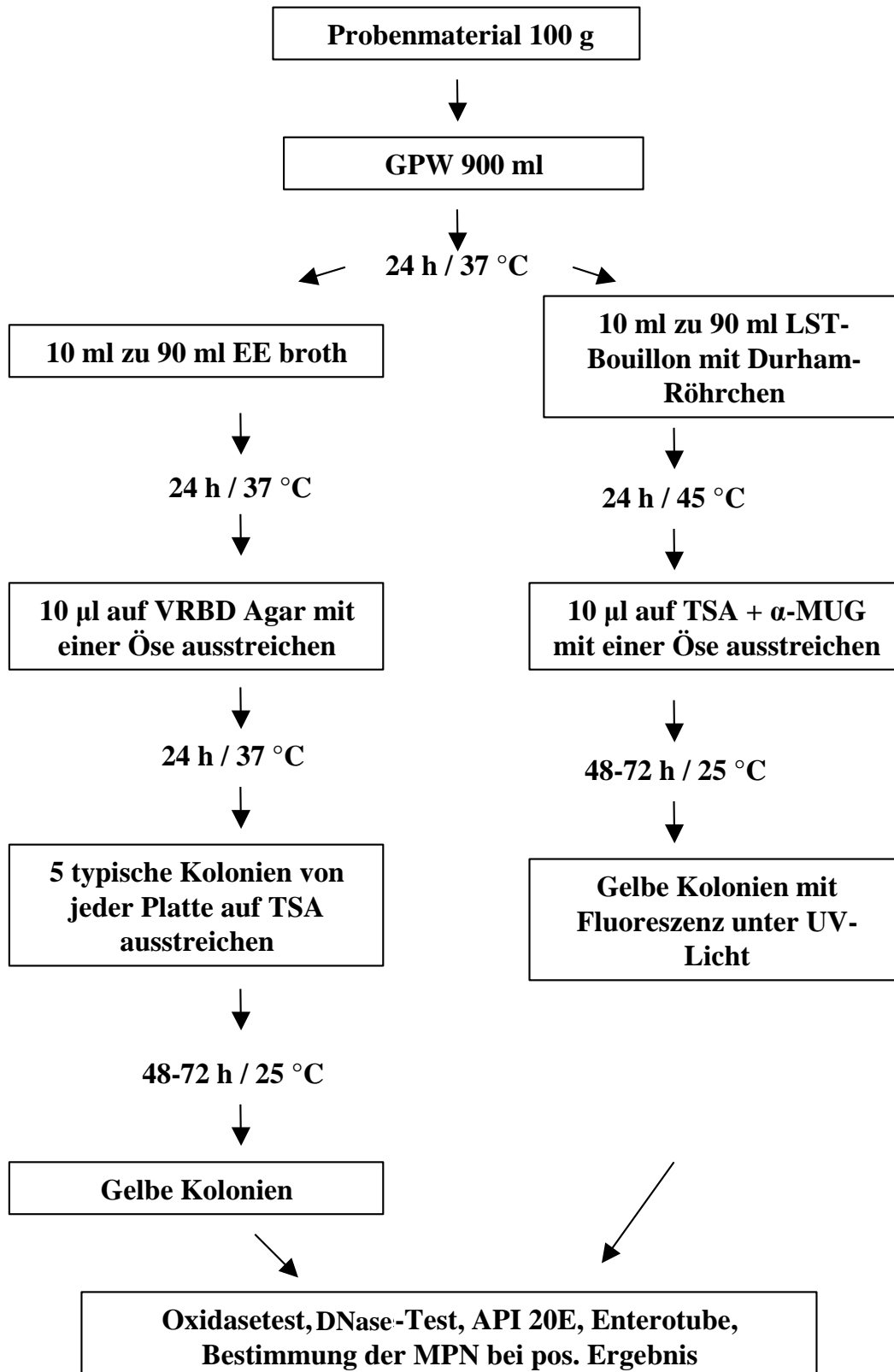


Abbildung 3.1: FDA-Methode modifiziert (linke Pfeilfolge) und HAHN-Methode modifiziert (rechte Pfeilfolge)

Bei zehn Proben aus Staubsaugerinhalten, die vom Produktionsort der Säuglingsnahrung entnommen wurden, fünf *E. sakazakii*-verdächtigen Proben aus Säuglingsnahrung (V1-V5) und 70 Proben der kommerziell verfügbaren Säuglingsnahrung wurde die modifizierte Methode nach HAHN parallel zur modifizierten FDA-Methode eingesetzt. Proben, die bei der qualitativen Untersuchung mit der FDA-Methode positiv in 100 g waren, wurden ebenfalls mittels MPN-Verfahren untersucht (siehe 3.1.2.1.1).

3.1.2.1.3 DNase-Test

In den Toluidinblau-O-DNA-Agar (3.1.1.4.2) wurden drei Löcher gestanzt, jeweils ein Loch für die Negativ-, die Positivkontrolle und für den zu testenden Stamm. Als Positivkontrolle diente der Stamm *E. sakazakii* DSM 4485 (3.1.1.2), von dem eine Kolonie in BHI überimpft und über Nacht bei 37 °C angezchtet worden war. Die Negativkontrolle bestand aus unbeimpfter BHI. Jeweils 7 µl der Kulturen bzw. der BHI wurden in die Löcher einpipettiert und bei 37 °C drei bis sechs Tage inkubiert. Als positive Reaktion wurde die Bildung eines rosafarbenen Hofes um das ausgestanzte Loch gewertet.

3.1.2.1.4 Zusatz einer 2 %-igen Brillantgrünlösung zum GPW

100 g des Probenmaterials wurden in 900 ml GPW im doppelten Ansatz eingewogen und künstlich mit einer bestimmten Zahl an *E. sakazakii* DSM 4485 (3.1.1.2, Tab. 4.3) kontaminiert. Anschließend wurden die Ansätze 24 h bei 37 °C inkubiert, wobei jeweils einem der Ansätze nach Ablauf von zwei Stunden 4 ml einer 2 %-igen Brillantgrünlösung hinzugefügt wurden, während der andere ohne Brillantgrünzusatz blieb. Nach Ablauf der 24stündigen Inkubation wurden die Zahlen an *E. sakazakii* in den einzelnen Ansätzen auf TSA und VRBD bestimmt.

3.1.2.1.5 Zusatz von Kristallviolett und Gallensalzen zum TSA + α -MUG-Agar

Dem TSA + α -MUG-Agar (3.1.1.4.2) wurden Gallensalze Nr. 3 und Kristallviolett in den beim VRBD-Agar verwendeten Konzentrationen zugesetzt (0,002 g Kristallviolett und 1,5 g Gallensalze Nr. 3/1). Insgesamt sechs natürlich kontaminierte Proben wurden qualitativ vergleichend mit dem supplementierten und dem nicht supplementierten TSA + α -MUG-Agar untersucht.

3.1.2.2 Molekularbiologischer Nachweis von *E. sakazakii*

3.1.2.2.1 Extraktion der DNA

Drei verschiedene Extraktionsmethoden wurden angewandt: die Kochextraktion sowie die kommerziellen Extraktionsverfahren DNeasy Tissue Kit und PrepMan Ultra Reagenz.

3.1.2.2.1.1 Kochextraktion

Dieses Extraktionsverfahren wurde ausschließlich für die Extraktion von Reinkulturen verwendet. Eine Kolonie wurde mit der sterilen Impföse in 50 µl Aqua bidest in einem 1,5 ml Safelock Eppendorf-Reaktionsgefäß verbracht, und das Reaktionsgefäß zehn Minuten im Wasserbad bei 100 °C inkubiert. Die so extrahierte DNA wurde direkt in die PCR eingesetzt, oder im Gefrierschrank bei -20 °C aufbewahrt.

3.1.2.2.1.2 DNeasy Tissue Kit

Dieses DNA-Extraktionsverfahren basiert auf der Adsorption der in der Probe enthaltenen DNA an eine Silikasäule. Es folgen zwei Waschschrte und schließlich die Elution der gereinigten DNA. Im Gefrierschrank bei -20 °C kann das Eluat 3 - 4 Monate lang gelagert werden. Alle erwähnten Reagenzien mit Ausnahme der Eppendorfgefäße und des Ethanol (96 %-ig) sind im Kit enthalten.

3.1.2.2.1.3 PrepMan Ultra Testkit

Der PrepMan Ultra Testkit eignet sich zur schnellen Erstellung von DNA-Templaten (Matrizen) gramnegativer Bakterien aus Lebensmitteln. In dem Reagenz sind Substanzen enthalten, die für die PCR störende Probenbestandteile, wie Proteine, denaturieren. Die Bakterien werden durch Zentrifugieren pelletiert und danach in dem PrepMan Ultra Reagenz aufgenommen. Die Bakterienwand wird durch Erhitzen zerstört und die DNA geht in Lösung. Sie kann im Kühlschrank bis zu sechs Wochen aufbewahrt werden.

3.1.2.2.2 PCR, Vorbereitung und Durchführung

3.1.2.2.2.1 Primer

Als Grundlage für den PCR-Nachweis wurden Sequenzen des 16S-rRNA-Gens verwendet. Das 16S-rRNA-Gen besteht sowohl aus hochkonservierten Anteilen, die bei allen Prokaryoten einen sehr hohen Grad an Übereinstimmung aufweisen, als auch aus Abschnitten, die sehr variabel sind und eine Differenzierung bis auf Speziesebene erlauben. Diese variablen Abschnitte des 16S-rRNA-Gens wurden auf Sequenzen untersucht, die nach einer Recherche in der Datenbank Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/index.html>) für einen spezifischen PCR-Nachweis von *E. sakazakii* geeignet erschienen. Die PCR-Primer wurden unter Verwendung des Programms Primer3 (ROZEN und SKALETSKY, 2000) anhand der Sequenz mit der Genbank-Nr. AB004746 konstruiert. Die Primersequenzen wurden gegen alle bekannten Sequenzen anderer *Enterobacteriaceae*-Species abgeglichen (BLAST <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), um die Möglichkeit von Kreuzreaktionen weitestgehend auszuschließen.

3.1.2.2.2.2 PCR

In orientierenden Vorversuchen wurde zunächst die höchstmögliche Annealingtemperatur bestimmt, bei der noch ausreichend Amplifikate gebildet wurden, und die Konzentration des $MgCl_2$ im Reaktionsansatz optimiert. Für die weiteren Versuche wurde die PCR dann unter den nachfolgend aufgeführten Bedingungen durchgeführt.

Mastermix: für 1 Probe

-	10x PCR-Puffer	5	µl
-	MgCl ₂ (25 mmol/l)	5	µl
-	dNTP (200 nmol/l)	1	µl
-	Primer 16FP1 (10 µmol/l)	2,5	µl
-	Primer 16RP1 (10 µmol/l)	2,5	µl
-	Taq Polymerase (5 U/µl)	0,5	µl
-	Aqua bidest. steril	32,5	µl
-	DNA-Probe	2	µl

Thermocycler Programm:

1. Initiale Denaturierung: 94 °C 5 min
2. Denaturierung: 94 °C 1 min
- Annealing: 66 °C 1 min 30 Zyklen des 2. Schrittes
- Elongation: 72 °C 1 min
3. Finale Elongation: 72 °C 5 min
4. Kühlung: 10 °C so lange wie nötig

3.1.2.2.3 Interne Amplifikationskontrolle, Herstellung und Anwendung

Die interne Amplifikationskontrolle dient als Nachweis für den Ablauf einer PCR in einem Reaktionsansatz.

Idealerweise werden für die interne Amplifikationskontrolle die gleichen Primer verwendet wie für die Nachweisreaktion. Zu diesem Zweck wurde ein Konstrukt aus einem DNA-Abschnitt des Sphingomyelinase-Gens von *Bacillus cereus* hergestellt, an das die Sequenzen der für den Nachweis von *E. sakazakii* verwendeten Primer angehängt wurden (chimäre Primer).

Von einem unter Verwendung der Primer Ph1 und Ph2 aus dem *B. cereus* Stamm MHI 161 (Stammsammlung des Instituts) hergestellten Amplifikat wurde ein Aliquot mit den Primern AmplF2 und AmplR2a reamplifiziert. Die Sequenz des Vorwärtsprimers AmplF2 ist identisch mit der des für den Nachweis von *E. sakazakii* verwendeten Primers 16FP1, der Primer ist jedoch am 3'-Ende um 9 Basen des 5'-Endes von Primer Ph1 verlängert. Der Rückwärtsprimer AmplR2a entspricht Primer 16RP1, wobei am 3'-Ende 14 Basen vom 5'-Ende des Primers Ph2 angehängt sind. Das so erhaltene Konstrukt von 599 bp kann mit den Primern 16FP1/16RP1 amplifiziert und als Kontrollbande gut von der Nachweisbande für *E. sakazakii* von 383 bp differenziert werden.

AmplF2 5'-tgcatttgaaactggtcagcgcgtccgat-3' = 16FP1 + Anfang Ph1

AmplR2a 5'-ctctgcaggattctctggatgcaatgttttaaca-3' = 16RP1 + Anfang Ph2

Erstellung der Amplifikationskontrolle

1. PCR mit DNA-Extrakt aus *B. cereus* MHI 161 mit Primern Ph1/Ph2; Durchführung analog zu 3.1.2.2.2, Annealingtemperatur 52 °C
2. Reamplifikation von 1 µl einer 1:100 Verdünnung des PCR-Produktes aus 1. unter Verwendung der Primer AmplF2/AmplR2a bei einer Annealingtemperatur von 56 °C
3. Elektrophorese wie in Kap. 3.1.2.2.4, Ausschneiden der Bande des PCR-Produktes (599 bp), das ausgeschnittene Gelstück wiegen und mit der 4-fachen Menge an TE-Puffer in einem Eppendorfgefäß 15 min im 60 °C warmen Wasserbad schmelzen.
4. Aus dem Ansatz 3 wurde 1 µl als Probe in die PCR zum Nachweis von *E. sakazakii* (3.1.2.2.2) eingesetzt und das PCR-Produkt auf einem Agarosegel überprüft
5. Das PCR-Produkt aus 4. wurde dezimal verdünnt und 2 µl jeder Verdünnungsstufe in den PCR-Nachweis für *E. sakazakii* eingesetzt. Die höchste Verdünnungsstufe, die noch zuverlässig eine deutliche Bande in der Elektrophorese ergab, wurde als interne Amplifikationskontrolle eingesetzt (1 µl pro PCR-Ansatz)

3.1.2.2.4 Gelelektrophorese und Auswertung

Die Gelelektrophorese diente zur Visualisierung der PCR Ergebnisse. Es wurden 2 %-ige Agarosegele verwendet.

1. 5 µl Gelladungspuffer werden nach Ablauf der PCR zu jedem Reaktionsansatz hinzugefügt und beides mittels Vortex gemischt
2. 7 µl (kleine Elektrophoresekammer) bzw. 10 µl (große Elektrophoresekammer) der Proben jeweils in eine Kavität des Agarosegels pipettieren
3. Eine 100 bp DNA-Leiter dient als Referenz
4. Elektrophorese: 45 min bei 125 mA und 400 V
5. die Gele für 10 min in 1 %-iger Ethidiumbromid-Lösung (0,5 mg/l) färben
6. die Gele 10 min in Aqua dest. waschen
7. im Transilluminator bei UV-Licht mit dem Videodokumentationssystem auswerten und dokumentieren

3.1.2.2.5 Differenzierung von *E. sakazakii*-Stämmen mittels Random Amplification of Polymorphic DNA-PCR (RAPD-PCR)

Die RAPD-PCR wurde zur Feindifferenzierung der *E. sakazakii*-Stämme verwendet.

Die verwendeten Primer sind sehr kurz und setzen an mehreren Stellen des Genoms an. Die dabei entstehenden Amplifikate bilden in der Elektrophorese für jeden Stamm ein charakteristisches Bandenmuster und erlauben so die Differenzierung von Stämmen.

DNA-Extrakte aller *E. sakazakii*-Isolate wurden einer RAPD-PCR unterzogen, um sicherzustellen, dass für die Bestimmung der Sensitivität der PCR zum Nachweis für *E. sakazakii* keine identischen Isolate verwendet wurden. Die für die RAPD-PCR verwendeten DNA-Extrakte wurden mittels Kochextraktion (3.1.2.2.1.1) gewonnen.

3.1.2.2.5.1 Durchführung der RAPD-PCR

Alle vorhandenen *E. sakazakii*-Stämme (102) wurden mit den Primerpaaren RAPD1/RAPD2 und RAPD3/RAPD4 (NILSSON et al., 1998) untersucht. Die Durchführung der PCR erfolgte nach folgendem Protokoll:

Mastermix: für 1 Probe

-	10x-Puffer	5	µl
-	MgCl ₂ (25 mmol/l)	5	µl
-	dNTP (200 nmol/l)	1	µl
-	Primer 1 (10 µmol/l)	5	µl
-	Primer 2 (10 µmol/l)	5	µl
-	Taq Polymerase (5 U/µl)	0,5	µl
-	Aqua bidest. steril	23,5	µl
-	DNA	5	µl

Thermocycler Programm:

- | | | | | |
|----|-------------------------|-------|--------|----------------------------|
| 1. | Initiale Denaturierung: | 94 °C | 3 min | |
| 2. | Denaturierung: | 94 °C | 45 s | |
| | Annealing: | 30 °C | 2 min | 4 Zyklen des 2. Schrittes |
| | Elongation: | 72 °C | 60 s | |
| 3. | Denaturierung: | 94 °C | 45 s | |
| | Annealing: | 36 °C | 60 s | 26 Zyklen des 3. Schrittes |
| | Elongation: | 72 °C | 2 min | |
| 4. | Finale Elongation: | 72 °C | 10 min | |
| 5. | Kühlung: | 10 °C | | |

Die Auswertung der RAPD-PCR erfolgte mittels Gelelektrophorese analog zu 3.1.2.2.4, wobei ein 1,4 %-iges Agarosegel verwendet wurde und die Elektrophorese bei 400 mA und 80 V über 70 min durchgeführt wurde.

3.1.2.2.6 Restriktionsverdau

Zur Bestätigung positiver PCR-Ergebnisse wurde ein Enzymverdau mit dem Restriktionsenzym *MvaI* durchgeführt. Analysen des von dem Primerpaar 16FP1/16RP1 für *E. sakazakii* gebildeten Amplikons mit dem Programm WebCutter (<http://www.firstmarket.com/cutter/cut2.html>) hatten gezeigt, dass dieses Enzym das Amplikon an den in Abbildung 3.2 angegebenen Positionen schneidet. Die Amplifikate aller *E. sakazakii*-Stämme sowie die der *Hafnia-alvei*-Stämme, die in der PCR zum Nachweis von *E. sakazakii* falsch positiv reagiert hatten, wurden folgendem Restriktionsverdau unterzogen:

Im Anschluss an die PCR (Kap. 3.1.2.2.2 – 3) wurden zu 12 µl des PCR-Ansatzes 40 U *MvaI*, 2,5 µl Restriktionspuffer mit BSA sowie A. bidest. ad 20 µl hinzugefügt und der Ansatz 3 h lang bei 37 °C inkubiert. Die Auswertung erfolgte mittels Gelelektrophorese (3.1.2.2.4.). Als DNA-Leiter diente die Φ 174 HaeIII digest.

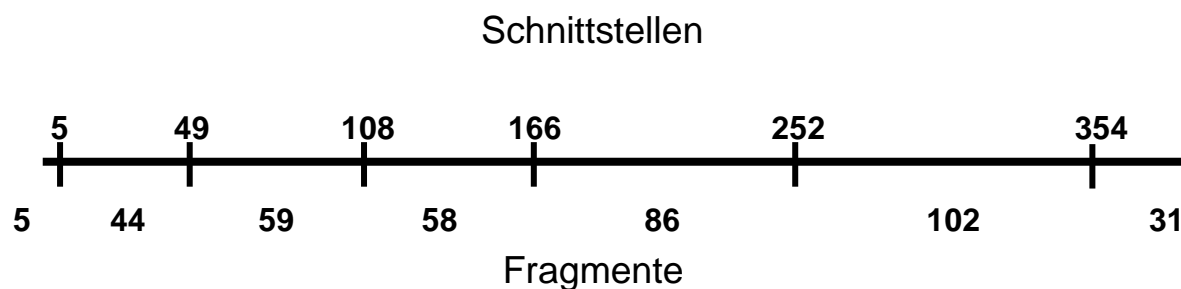


Abbildung 3.2: Schnittstellen des Enzyms *MvaI* im Amplifikat für *E. sakazakii* (384 bp) und die daraus resultierenden Fragmente.

3.1.2.3 Untersuchungen an künstlich mit *E. sakazakii* kontaminierten Proben von Säuglingstrockennahrung

In diesem Versuchsabschnitt sollten die Sensitivität und Spezifität des PCR-Verfahrens ermittelt werden. Außerdem waren inzwischen im Fachhandel spezielle chromogene Medien (ESIA und ESCA, 3.1.1.4.2) verfügbar, die in die Untersuchungen einbezogen werden sollten. Da natürlich kontaminierte Säuglingstrockennahrung nicht in ausreichendem Umfang zur Verfügung stand, mußte mit künstlich kontaminiertem Material gearbeitet werden. Zu diesem Zweck wurden 52 Proben (1 - 53, außer Probe 34, die nicht mehr zur Verfügung stand; siehe Tab. 3.4) Säuglingstrockennahrung (Anfangsnahrung, Folgenahrung, Dauernahrung, Diät-nahrung und Heilnahrung) von vier Herstellern mit zehn verschiedenen *E. sakazakii*-Stämmen kontaminiert (Tab. 3.3.). Der Nachweis von *E. sakazakii* wurde mittels modifizierter FDA-Methode auch unter Einbeziehung von ESIA und ESCA, modifizierter Methode nach HAHN, sowie mit dem PCR-Verfahren geführt.

3.1.2.3.1 Vorbereitende Untersuchungen

Die vorbereitenden Untersuchungen sollten sicherstellen, daß die in den Versuchen verwendeten Proben frei von *E. sakazakii* waren, und dass es sich bei den zur künstlichen Kontamination verwendeten Isolaten um unterschiedliche *E. sakazakii*-Stämme handelte.

3.1.2.3.1.1 Untersuchung der künstlich zu kontaminierenden Probenmaterialien

Die Untersuchung des Probenmaterials für die künstliche Kontamination auf Freiheit von *E. sakazakii* fand im Rahmen der eigentlichen Untersuchungen statt (3.1.2.3.3, Kontrollansatz). Alle auf VRBD-Agar gewachsenen Kolonien wurden mittels Enterotube II identifiziert.

3.1.2.3.1.2 Prüfung der *E. sakazakii*-Stämme auf Individualität

Die zehn Stämme von *E. sakazakii* (Stamm Nr. 1 aus der DSMZ, Nr. 2 und 9 aus den Niederlanden, Nr. 3 von der Professur für Milchwissenschaften der Justus-Liebig-Universität Gießen, Nr. 4, 5, 6, 7 und 10 aus Säuglings- und Kleinkindernahrung verschiedener Hersteller und Nr. 8 aus der National Collection of Type Cultures (NCTC) Public Health Laboratory Service (PHLS), siehe Tab.3.1) wurden zunächst nochmals auf Reinheit überprüft (Ausstriche auf St II, Beurteilung der Koloniemorphologie, mikroskopische Beurteilung, KOH-, Oxidase- und DNase-Test, biochemische Überprüfung mittels Enterotube II (3.1.1.4.2 und 3.1.2.1.3). Die Feststellung der Individualität der Stämme wurde mit Hilfe der RAPD (3.1.2.2.5) vorgenommen.

3.1.2.3.2 Herstellung des Kontaminationsinokulums

Die Stämme wurden auf St II überimpft und 24 h bei 37 °C bebrütet. Danach wurde jeweils eine Kolonie in BHI übertragen. Nach der Inkubation über 24 h bei 37 °C wurde eine dezimale Verdünnungsreihe in Ringer-Lösung angelegt und aus der Verdünnungsstufe 10^{-8} ein ml des Probenmaterials, wie unter 3.1.2.3.3 beschrieben, entnommen. Parallel hierzu wurde ein ml derselben Verdünnung auf drei TSA-Platten ausgespatelt und über 24 h bei 37 °C bebrütet, um die Anzahl der KbE zu ermitteln. Die zur Kontamination verwendeten Keimzahlen finden sich in Tab. 3.3.

Tabelle 3.3: Keimzahlen der zehn Stämme *E. sakazakii* für die künstliche Kontamination

Stammnr.	KbE/100 g Probe	Stammnr.	KbE/100 g Probe
1	8	6	13
2	6	7	6
3	10	8	10
4	24	9	5
5	13	10	13

3.1.2.3.3 Künstliche Kontamination des Probenmaterials

Jeweils 100 g Probenmaterial wurden zwei Mal in 900 ml GPW eingewogen. Einer der beiden Ansätze diente als Kontrollansatz, um abzuschließen, dass das Probenmaterial nicht schon vor der künstlichen Kontamination mit *E. sakazakii* belastet war (3.1.2.3.1.1). Der andere Ansatz (Versuchsansatz) wurde mit einem ml des Kontaminationsinokolums (3.1.2.3.2) beschickt. Die Untersuchung beider Ansätze (Versuchs- und Kontrollansatz) erfolgte mit der modifizierten FDA-Methode (Abb. 3.1), die des Versuchsansatzes zusätzlich auch mit der modifizierten Methode nach HAHN (Abb. 3.1). Nach einer Inkubation über 24 h bei 37 °C wurden 10 ml jeden Ansatzes (Versuchs- und Kontrollansatz) entnommen und in je ein Reagenzglas übertragen. Letztere dienen der DNA-Extraktion mittels PrepMan Ultra Testkit (3.1.2.2.1.3) für die anschließend durchgeführte PCR. Die weitere Untersuchung erfolgte wie in Abb. 3.1 beschrieben. Nach der Bebrütung der EE-Bouillon wurden Ausstriche auf ESIA und ESCA angelegt und über 24 h bei 44 °C (ESIA) bzw. 37 °C (ESCA) bebrütet (Abb. 3.3).

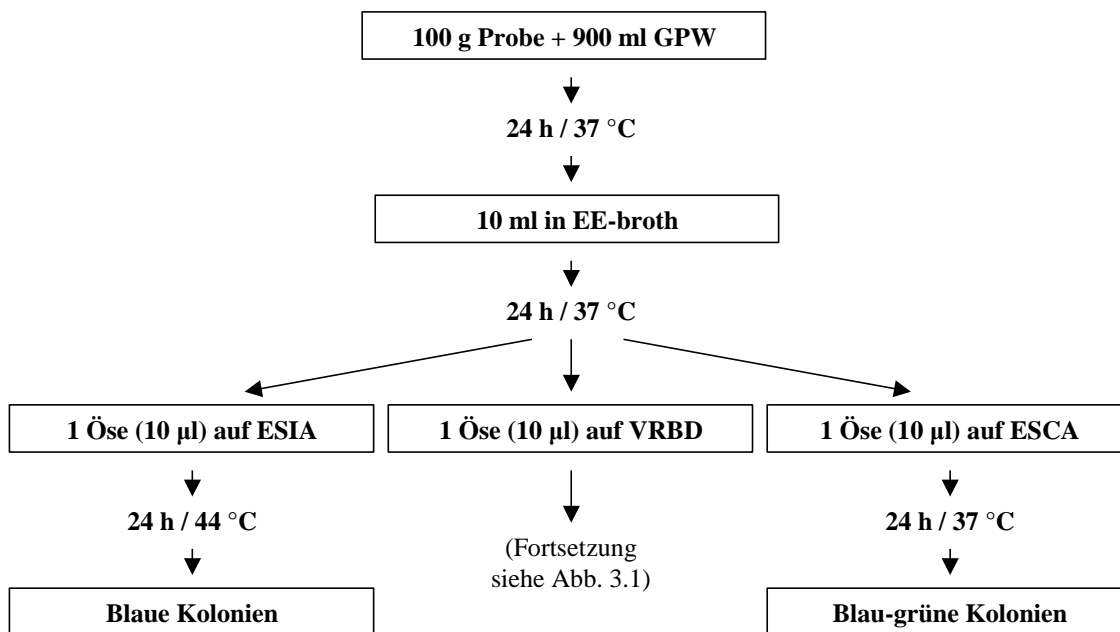


Abbildung 3.3.: Nachweis von *E. sakazakii* mittels ESIA und ESCA

3.1.2.3.4 Durchführung der PCR

Die mittels PrepMan Ultra Reagenz extrahierte DNA aus der Voranreicherung in GPW (Versuchs- und Kontrollansätze) wurde anschließend in der PCR zum Nachweis von *E. sakazakii* (3.1.2.2.2.) eingesetzt. Die Amplifikationskontrolle lief bei jeder Probe mit. Mit der Gelelektrophorese (3.1.2.2.4.) wurde das Ergebnis dargestellt.

Tabelle 3.4: Benennung und Zuordnung von Säuglingsnahrungsproben und *E. sakazakii*-Stämmen (AN=Anfangsnahrung; FN=Folgenahrung; HN=Heilnahrung; DN=Diät-nahrung; DaN=Dauernahrung)

Versuch Nr.	Proben-art	Stamm-Nr.	Her-steller	Versuch Nr.	Proben-art	Stamm-Nr.	Her-steller
1	AN	1	A	27	AN	9	C
2	AN	2	A	28	FN	1	C
3	AN	7	A	29	FN	2	C
4	AN	8	A	30	FN	3	C
5	AN	4	A	31	FN	4	C
6	AN	9	A	32	DN	3	C
7	AN	5	B	33	AN	5	C
8	AN	6	B	34	FN	5	C
9	AN	9	B	35	FN	6	C
10	AN	10	B	36	FN	7	C
11	AN	3	B	37	FN	8	C
12	AN	4	B	38	FN	9	D
13	AN	5	B	39	FN	10	D
14	AN	6	B	40	FN	6	D
15	AN	1	B	41	FN	7	D
16	AN	2	B	42	HN	10	D
17	HN	6	B	43	AN	8	D
18	AN	7	B	44	DaN	1	D
19	AN	9	B	45	DaN	2	D
20	HN	7	B	46	DaN	3	D
21	AN	10	B	47	DaN	4	D
22	AN	3	B	48	HN	5	D
23	HN	8	B	49	FN	3	D
24	AN	4	B	50	FN	2	D
25	AN	8	B	51	HN	1	D
26	AN	10	C	52	HN	2	D

4. ERGEBNISSE

4.1 Kulturelle Methoden zum Nachweis von *E. sakazakii*

4.1.1 FDA-Methode, modifiziert (Abb. 3.1)

Die Untersuchung mit der mod. FDA-Methode wurde an 218 Proben kommerziell verfügbarer Säuglingsnahrung durchgeführt, die von verschiedenen Herstellern zur Verfügung gestellt worden waren. In 18 der insgesamt 218 Proben konnte *E. sakazakii* qualitativ nachgewiesen werden. Die Keimzahlen bei der Nachuntersuchung mittels MPN-Verfahren lagen zwischen 0,36 und 46,00 *E. sakazakii*/100 g. Die einzelnen Werte, die Kategorie (ein Maß für die Plausibilität eines MPN-Ergebnisses) sowie die Vertrauensbereiche finden sich in Tab. 4.1.

4.1.2 Methode nach HAHN, modifiziert (Abb. 3.1)

Mit der mod. Methode nach HAHN wurden qualitativ 85 Proben untersucht. Bei 39 Proben konnte eine Gasbildung in LST beobachtet werden. Die für die meisten *E. sakazakii*-Stämme typische Gelbfärbung der Kolonien auf dem TSA-Nährboden trat bei 14 Proben auf. Eine gleichzeitige blaue Fluoreszenz zeigten 13 Proben. 38 Proben hatten eine blaue Fluoreszenz, ohne gelb gefärbt zu sein. In elf Proben, die mit der mod. FDA-Methode und der mod. Methode nach HAHN untersucht wurden, wurde *E. sakazakii* nachgewiesen. In Tab. 4.2 finden sich die einzelnen Reaktionen der verschiedenen Stämme. Eine Probe zeigte eine so starke Überwucherung des TSA+ α -MUG durch *B. cereus* und Enterokokken, dass eine Auswertung nicht möglich war. Gasbildung in LST trat nur bei vier Proben auf. Gelbfärbung der Kolonien und blaue Fluoreszenz waren bei allen positiven, auswertbaren Proben vorhanden.

Die MPN-Bestimmung wurde bei sechs der oben beschriebenen positiven Proben parallel zur FDA-Methode durchgeführt. Die Ergebnisse finden sich in der Tab. 4.1.

Tabelle 4.1: MPN-Ergebnisse der *E. sakazakii* positiven Proben (mod. FDA-Methode und mod. Methode nach HAHN)

Lfd. Proben- Nr.	Mod. FDA-Methode			Mod. Methode nach HAHN		
	MPN /100 g	Kat.	Vertrauensbereiche (95 %)	MPN (/100 g)	Kat.	Vertrauensbereiche (95 %)
2	2,30	1	0,30 - 11,10	n. d.		
3	46,00	1	7,00 - 235,00	n. d.		
5	0,36	1	0,01 - 2,00	n. d.		
6	2,30	1	0,30 - 11,10	n. d.		
7	1,50	1	0,30 - 4,30	n. d.		
8	9,30	1	1,60 - 36,00	n. d.		
9	21,00	2	3,00 - 47,00	n. d.		
97	0,92	1	0,10 - 3,60	0,92	1	0,10 - 3,60
106	0,92	1	0,10 - 3,60	0,92	1	0,10 - 3,60
117	2,00	2	0,30 - 4,40	2,00	0	0,90 - 9,40
127	keine MPN-Bestimmung möglich, da zu wenig Material vorhanden (positiv in 10 g)					
139	0,36	1	0,01 - 2,00	0,36	1	0,01 - 2,00
190	0,74	1	0,09 - 2,00	1,10	2	0,03 - 360,00
199	0,36	1	0,01 - 2,00	0,36*	1	0,01 - 2,00
212	keine MPN-Bestimmung möglich, da zu wenig Material vorhanden (positiv in 10 g)					
213	keine MPN-Bestimmung möglich, da zu wenig Material vorhanden (positiv in 10 g)					
214	keine MPN-Bestimmung möglich, da zu wenig Material vorhanden (positiv in 10 g)					
215	keine MPN-Bestimmung möglich, da zu wenig Material vorhanden (positiv in 10 g)					

Kat.: Kategorie; n. d.: nicht durchgeführt; * nur anhand der Gasbildung auswertbar, Wachstum aber als *E. sakazakii* bestätigt

Tabelle 4.2: Reaktionen der mit der Methode nach HAHN (qualitative Untersuchung) positiven Proben

Probennr.	Gas in LST	Gelbes Pigment auf TSA+ α -MUG	Fluoreszenz auf TSA+ α -MUG	Begleitflora (<i>Bacillus cereus</i> , Enterokokken)
97	-	+	+	+
106	+	+	+	+
117	+	+	+	-
127	+	+	+	-
139	-	+	+	-
190	-	+	+	-
199*	+	n. a.	n. a.	+
212	-	+	+	-
213	-	+	+	-
214	-	+	+	+
215	+	+	+	+

n. a.: nicht auswertbar; * nur anhand der Gasbildung auswertbar, Wachstum aber als *E. sakazakii* bestätigt

4.1.3 Ergebnis des DNase-Tests

Der DNase-Test war bei allen in die Untersuchungen einbezogenen *E. sakazakii*-Stämmen (Tab. 3.1) positiv.

4.1.4 Zugabe von 2 %-iger Brillantgrünlösung zum Voranreicherungsmedium (GPW)

Wie Tab. 4.3 zu entnehmen ist, lagen die Keimzahlen von *E. sakazakii* nach dem Zusatz von Brillantgrün im Vergleich zum Ansatz ohne Brillantgrün, bei den Proben 1a und 1b um etwa zwei Zehnerpotenzen höher. Bei der Probe 2a war kein Unterschied zu registrieren, bei Probe 2b konnten *E. sakazakii* nur im Ansatz mit Brillantgrün nachgewiesen werden. Bei einer natürlich kontaminierten Säuglingsnahrung (Probe 5) betrug der Unterschied zwischen beiden

Ansätzen etwa eine Zehnerpotenz. *B. cereus* konnte durch den Brillantgrünzusatz im Gegensatz zu den nicht supplementierten Proben erheblich bis vollständig unterdrückt werden.

Tabelle 4.3: Keimzahlen von *E. sakazakii* in GPW ohne und mit Zusatz von Brillantgrün.

Proben-Nr.	Kontaminiert mit KbE/100 g	Zusatz von Brillantgrün	VRBD KbE/g	TSA KbE/g
1a	14	-	$2,7 \times 10^7$	$8,0 \times 10^7$
1a	18	+	$2,3 \times 10^9$	$2,6 \times 10^9$
1b	1,4	-	$9,3 \times 10^6$	$1,3 \times 10^7$
1b	1,8	+	$1,1 \times 10^9$	nicht auswertbar
2a	14	-	$1,1 \times 10^9$	$1,1 \times 10^9$
2a	18	+	$2,0 \times 10^9$	$3,2 \times 10^9$
2b	1,4	-	< 100	< 100
2b	1,8	+	$1,0 \times 10^9$	$1,0 \times 10^9$
5	natürlich kontaminiert	-	nicht durchgeführt	4×10^8
5	natürlich kontaminiert	+	nicht durchgeführt	$1,1 \times 10^9$

4.1.5 Zugabe von Kristallviolett und Gallensalzen zum TSA + α -MUGs in der mod. Methode nach HAHN

In Probe Nr. 1 war *E. sakazakii* nicht nachweisbar (Tab. 4.4). Auf dem supplementierten Nährboden wurde die Begleitflora (im Wesentlichen *B. cereus* und *Micrococcus* spp.) zwar unterdrückt (Tab. 4.4), doch war die Pigmentierung von *E. sakazakii* durch die Eigenfarbe des Kristallvioletts nicht mehr zu erkennen.

Tabelle 4.4: Ergebnisse des Vergleichs der Untersuchungen mit un-supplementiertem und supplementiertem (Kristallviolett/Gallensalze) TSA + α -MUG

Proben-Nr.	TSA + α -MUG		TSA + α -MUG + Kristallviolett/ Gallensalze	
	Koloniefarbe	Begleitflora (<i>B. cereus</i> , <i>Micrococcus</i> spp.)	Koloniefarbe	Begleitflora (<i>B. cereus</i> , <i>Micrococcus</i> spp.)
1	-	+	-	-
2	gelb	+	blau	-
3	weiß	-	blau	-
4	n. a.	+	-	-
5	weiß	+	blau	-
6	gelb	-	blau	-

n. a.: nicht auswertbar, weil mit *B. cereus* überwachsen

4.2 Molekularbiologische Methoden zum Nachweis von *E. sakazakii*

4.2.1 Vergleich von DNeasy Tissue Kit mit PrepMan Ultra Testkit

In diesem Versuchsabschnitt sollte die Praktikabilität der Extraktionsmethoden verglichen werden. Der DNeasy Tissue Kit enthält sechs Reagenzien, benötigt 15 Arbeitsschritte zur DNA-Extraktion und dauert ca. 100 min. Der PrepMan Ultra Testkit benötigt nur 1 Reagenz und die 10 Arbeitsschritte sind in ca. 45 min abgeschlossen.

Tabelle 4.5: Vergleich von DNeasy Tissue Kit und PrepMan Ultra Testkit

	DNeasy Tissue Kit	PrepMan Ultra Testkit
Anzahl der Reagenzien	6	1
Arbeitsschritte	15	10
Arbeitszeit	ca. 100 min	ca. 45 min

Zum Vergleich der Qualität der Extraktion wurden zwölf künstlich kontaminierte Proben parallel mit beiden Methoden untersucht (Tab. 4.6). Nach der Extraktion mit dem PrepMan Ultra Testkit reagierten alle Proben in der PCR positiv, während der DNeasy Tissue Kit nur fünf positive Ergebnisse erbrachte. Bei den Untersuchungen von Lebensmitteln wurde daher der PrepMan Ultra Testkit zur Extraktion verwendet.

Tab. 4.6: Vergleich der PCR-Ergebnissen mit zwei verschiedenen Extraktionsverfahren

Proben-Nr.	PCR (DNeasy Tissue Kit)	PCR (PrepMan Ultra Testkit)
4	+	+
21	-	+
23	-	+
25	-	+
28	+	+
32	-	+
40	+	+
43	+	+
44	-	+
45	+	+
46	-	+
50	-	+

4.2.2 Primer

In orientierenden Vorversuchen (Ergebnisse nicht dargestellt) erwies sich die Kombination der Primer FP1/RP1 als die am besten geeignete Kombination für den Nachweis von *E. sakazakii*. Für alle weiteren Versuche wurde daher dieses Primerpaar verwendet.

4.2.3 Untersuchung von *E. sakazakii*-Reinkulturen und von Reinkulturen anderer Bakterien mittels PCR

Wie aus Tab. 4.7 hervorgeht, konnten alle *E. sakazakii*-Stämme mit der PCR nachgewiesen werden.

Tabelle 4.7: Ergebnisse der Untersuchung von *E. sakazakii*-Stämmen mittels PCR (n = 57)

Herkunft der Stämme (siehe Tab. 3.1)	Anzahl der Stämme	Extraktionsmethode	PCR-Ergebnis
Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ)	1	K	+
National Collection Of Type Cultures (NCTC) Public Health Laboratory Service (PHLS)	5	K	+
Dienstleistungsproben des Instituts	2	K	+
Niederlande	11	K	+
Professur für Milchwissenschaften, Justus-Liebig-Universität Gießen	6	K	+
Isolate aus Säuglings- und Kleinkinderhahrung verschiedener Hersteller	23	K	+
Staubsaugerinhalt (Umfeldprobe eines Herstellers)	1	DNeasy Tissue Kit	+
Eigene Isolate aus Säuglings- und Kleinkinderhahrung verschiedener Hersteller	8	DNeasy Tissue Kit / PrepMan Ultra Testkit	+

K : Kochextraktion

Die in Tab. 3.2 aufgelisteten Bakterien wurden zur Spezifitätsprüfung der PCR herangezogen. Die drei Isolate von *Hafnia alvei* (Tab. 3.2) zeigten in der PCR ein falschpositives Ergebnis (Abb. 4.1). Wie eine DNA-Sequenzierung des Amplifikats eines der getesteten *H. alvei*-Isolate bestätigte, besitzt diese Species eine mit *E. sakazakii* identische DNA-Sequenz im Be-

reich des 16S-rRNA-Gens, der als Nachweissequenz diente. Zur Differenzierung zwischen *H. alvei* und *E. sakazakii* mittels Restriktionsenzymen siehe Kap. 4.2.4.

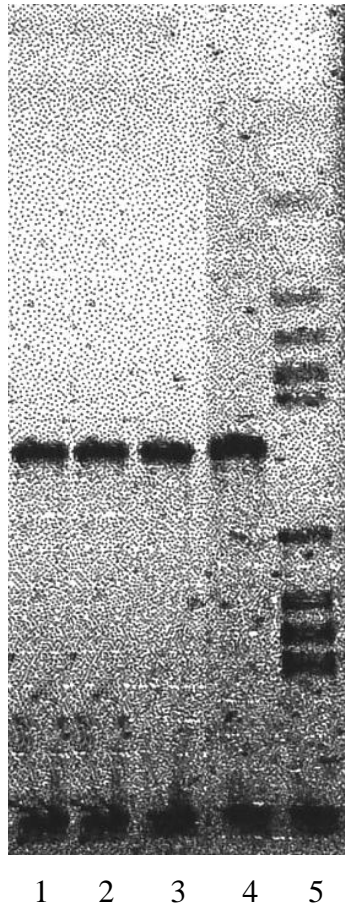
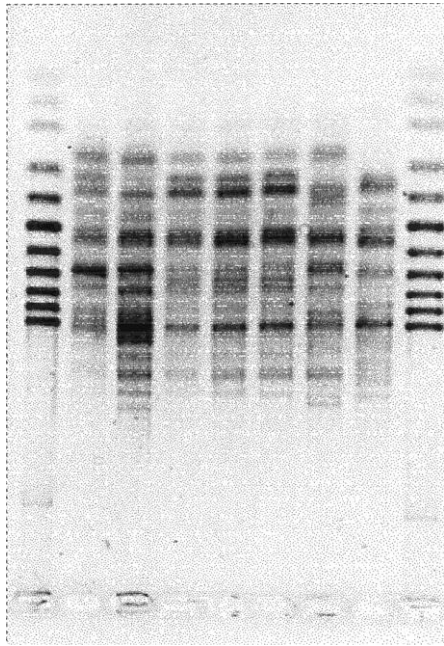


Abbildung 4.1: PCR-Amplifikate dreier Isolate von *Hafnia alvei* und des DSMZ-Stamms von *E. sakazakii* DSM 4485 (1 - 3: *Hafnia alvei*, 4: DSM 4485, 5: DNA-Leiter Φ 174 HaeIII digest)

4.2.4 Überprüfung der *E. sakazakii*-Stämme mittels RAPD

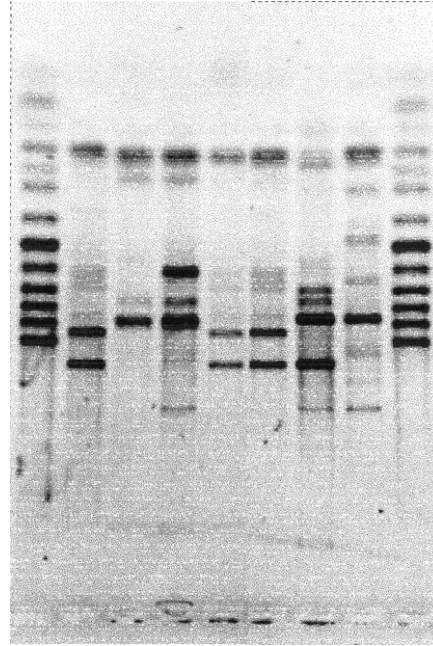
Von den 102 mittels RAPD überprüften Stämmen von *E. sakazakii* erwiesen sich 57 als solche mit unterschiedlichen Gensequenzen (siehe Abb 4.2 a) 1, 2, 3, 6 und 7 sowie b): 4, 1, 2, 6 und 7). Mehrere Isolate aus den Säuglingsnahrungsmitteln waren identisch (Abb. 4.2 a) 3, 4 und 5, sowie b) 3, 4 und 5) und zeigten dementsprechend die gleichen Bandenmuster.

a)



1 2 3 4 5 6 7

b)



4 1 2 3 5 6 7

Abbildung 4.2: RAPD einiger *E. sakazakii*-Stämme mit den Primern RAPD 1 + 2 und 3 + 4

a) DNA Leiter, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, DNA Leiter, b) DNA Leiter, 4, 1, 2, 3, 5, 6, 7, DNA Leiter

4.2.5 Restriktionsverdau der *E. sakazakii*- und *Hafnia-alvei*-Stämme

PCR-Amplifikate der 57 verschiedenen Stämme von *E. sakazakii* (Tab. 3.1) wurden einem Enzymverdau mit dem Enzym *MvaI* unterzogen. Alle Amplifikate zeigten in der Elektrophorese neben den im Methodenteil beschriebenen Fragmenten (Abb. 3.2) von 86 bzw. 58/59 bp auch die beiden Banden bei 102 bp und 31 bp. Die kleineren Fragmente waren nicht von den Primern bzw. Primerdimeren differenzierbar (Abb. 4.3).

Die Amplifikate der drei zur Verfügung stehenden Stämme von *H. alvei* wurde ebenfalls dem Enzymverdau unterzogen. Von allen drei Isolaten wurde anstelle der beiden Banden von 102 bp und 31 bp nur eine Bande von 133 bp erhalten, da dieser Spezies die Schnittstelle bei Basenpaar 354 fehlt (Abb. 3.2). Amplifikate von *H. alvei* und *E. sakazakii* können somit eindeutig differenziert werden (Abb. 4.3).

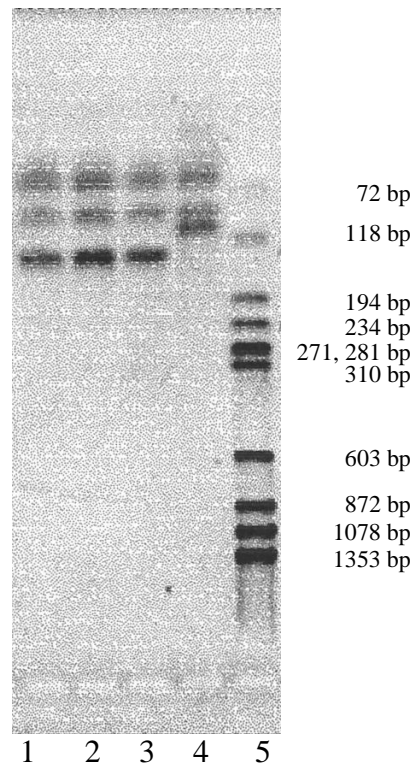


Abbildung 4.3: Restriktionsverdau der Amplifikate von 3 *H. alvei*-Stämmen (1, 2, 3) und *E. sakazakii* DSM 4485 (4), DNA-Leiter (5)

4.3 Nachweis von *E. sakazakii* in künstlich kontaminierter Säuglingsnahrung mit verschiedenen Methoden

4.3.1 Untersuchung der Kontrollproben

Die in Tab. 3.4 aufgelisteten Proben (1 – 52) wurden parallel zu den künstlich kontaminierten Versuchsproben kulturell und mittels PCR auf eine Kontaminationen mit *E. sakazakii* untersucht (3.1.2.3.3). Zwei Proben waren positiv. Drei weitere Proben enthielten *E. agglomerans*, eine Probe war mit *E. coli* kontaminiert (Tab. 4.8).

Tabelle 4.8: Natürliche Kontaminationen der für die künstliche Kontamination verwendeten Proben

Versuchsnr.	Species	PCR
2	<i>Enterobacter sakazakii</i>	+
15	<i>Enterobacter sakazakii</i>	+
10	<i>Enterobacter agglomerans</i>	-
44	<i>Enterobacter agglomerans</i>	-
51	<i>Enterobacter agglomerans</i>	-
42	<i>Escherichia coli</i>	-

4.3.2 Überprüfung der zehn für die künstliche Kontamination verwendeten Stämme von *E. sakazakii*

Die zehn Stämme, die zur künstlichen Kontamination vorgesehen waren, verhielten sich in den mikrobiologischen Tests typisch und zeigten in der RAPD unterschiedliche Bandenmuster.

4.3.3 Ergebnisse der qualitativen Nachweise von *E. sakazakii*

Die 52 künstlich mit *E. sakazakii* kontaminierten Proben (3.1.2.3), wurden dem qualitativen Nachweis von *E. sakazakii* unterzogen. Hierbei wurden die modifizierte FDA-Methode (Nachweis in 100 g) jeweils mit VRBD, ESIA und ESCA als festem Selektivmedium sowie das PCR-Verfahren eingesetzt.

Sämtliche Untersuchungen verliefen positiv, d. h., es konnte auf allen festen Nährböden (VRBD, ESIA und ESCA) *E. sakazakii* nachgewiesen werden. Die Ergebnisse der entsprechenden PCR-Nachweise waren ebenfalls positiv. Auf die Bestätigung der PCR-Ergebnisse mittels Restriktionsverdau (3.1.2.2.6) wurde verzichtet, da die Proben, wie unter 3.1.2.3.1.1 beschrieben, mikrobiologisch untersucht worden waren, und *H. alvei* nicht nachgewiesen werden konnte (4.3.1).

5. BESPRECHUNG DER ERGEBNISSE UND DISKUSSION

5.1 Einleitung

Enterobacter (E.) sakazakii (*Cronobacter* spp., IVERSEN et al., 2008a) ist ein relativ seltener Erreger verschiedener lebensbedrohlicher Infektionskrankheiten insbesondere bei Frühgeburten, Neugeborenen und Kindern in den ersten sechs Lebensmonaten (GURTLER et al., 2005). Häufig waren diese Erkrankungen auf mit geringen Zahlen an *E. sakazakii* kontaminierte pulverförmige Säuglingsnahrung zurückzuführen (FRIEDEMANN, 2008), weshalb ein Bedarf nach sicheren, empfindlichen und schnellen Nachweismethoden für den Erreger in derartigen Lebensmitteln besteht. Zur Zeit des Beginns der vorliegenden Arbeit existierte als standardisiertes Nachweisverfahren nur die von der US Food and Drug Administration 2002 entwickelte MPN-Technik (FDA/SCAN, 2002), die bei einer Untersuchung von insgesamt 333 g des Probenmaterials eine Nachweisgrenze von 0,003 Keimen/g aufweist. Die Methode ist allerdings sehr zeit-, arbeitsaufwendig und nicht spezifisch für *E. sakazakii* (siehe 2.6).

Ziel der hier vorgestellten Studie war daher die Entwicklung eines Verfahrens auf PCR-Basis zum Nachweis von *E. sakazakii* in pulverförmiger Säuglings- und Kleinkindernahrung. Im einzelnen umfaßte das Arbeitsprogramm die Auswahl geeigneter Primer und deren Optimierung hinsichtlich der Sensitivität und Spezifität, sowie die Entwicklung eines möglichst einfachen aber effektiven Anreicherungs- und Extraktionsverfahrens. Die Überprüfung der Leistungsfähigkeit der Methode sollte durch vergleichende Untersuchungen mit dem oben erwähnten kulturellen Verfahren an einer möglichst weitgefächerten Palette entsprechender Produkte erfolgen.

5.2 Entwicklung des PCR-Verfahrens

Als Ziel-DNA dienten variable Sequenzen des 16S-rRNA-Gens, die nach einer Recherche in der Datenbank "Genbank" für den spezifischen Nachweis von *E. sakazakii* geeignet erschienen. Die Primer selbst wurden mit Hilfe des Programms Primer3 (ROZEN und SKALETSKY, 2000) konstruiert (siehe Abschnitt 3.1.1.5.2.1). Die optimierten Bedingungen für den Reaktionsansatz (Mastermix und Thermocycler Programm) sind Abschnitt 3.1.2.2.2.2 zu entnehmen. Zur Vermeidung falschnegativer Ergebnisse aufgrund inhibitorischer Effekte wurde bei den Untersuchungen eine interne Amplifikationskontrolle unter Verwendung chimärer Primer (siehe 3.1.2.2.3) mitgeführt. Eine derartige Kontrolle ist in den "Allgemeinen

verfahrensspezifischen Anforderung zum Nachweis von Mikroorganismen mit der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) in Lebensmitteln – L 00.00-45:2006" der Amtlichen Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 LFGB zwingend vorgeschrieben. Die Auswertung der PCR-Ansätze erfolgte mittels Gelelektrophorese.

5.3 Prüfung der Sensitivität und Spezifität des PCR-Verfahrens mit Reinkulturen

In diesem Versuchsabschnitt sollten zunächst mit Reinkulturen von *E. sakazakii* und solchen anderer Bakterienspecies die Sensitivität und Spezifität des PCR-Verfahrens überprüft werden. Insgesamt standen 102 *E. sakazakii*-Isolate zur Verfügung. Sechs davon kamen aus Stammsammlungen (DSMZ und NCTC), bei den übrigen handelte es sich um Isolate aus pulverförmiger Säuglingsnahrung verschiedener Herkunft (siehe Tab. 3.1) bzw. um solche, die bei eigenen Untersuchungen an 218 Proben derartiger Lebensmittel mit der FDA-Methode bzw. der Methode nach HAHN gefunden worden waren (siehe 5.5). Da zumindest im Fall der Isolate aus pulverförmiger Säuglingsnahrung nicht auszuschließen war, daß es sich bei einem gewissen Prozentsatz um identische Stämme handelte, wurden alle 102 Kulturen mittels Random Amplified Polymorphic DNA PCR (RAPD) auf ihre Individualität geprüft. Hierbei konnte festgestellt werden, dass sich die 102 Isolate auf insgesamt 57 Stämme verteilten (siehe Tab. 3.1 und Abb. 4.2). Zur Prüfung der Spezifität wurden 169 Isolate von 16 Species bzw. Genera anderer Bakterien herangezogen (siehe Tab. 3.2).

Wie aus Tab. 4.7 hervorgeht, konnten alle 57 in die Untersuchung einbezogenen *E. sakazakii*-Stämme mit dem PCR-Verfahren nachgewiesen werden. Bei der Prüfung der Spezifität zeigte sich, dass *Hafnia alvei* (drei Isolate) in der PCR ebenfalls positiv reagierte. Durch eine DNA-Sequenzierung wurde ermittelt, dass dieser Keim eine mit der Ziel-DNA von *E. sakazakii* identische Sequenz im Gen der 16S-rRNA aufweist (siehe Abb. 4.1). Um falschpositive Ergebnisse durch *H. alvei* ausschließen zu können, wurden deren Amplifikate sowie die der 57 *E. sakazakii*-Stämme einem Restriktionsverdau mit dem Restriktionsenzym *MvaI* unterzogen. Die Amplifikate aller vorhandenen Stämme von *E. sakazakii* zeigten nach der Enzymspaltung das erwartete Bandenmuster (siehe Abb. 4.3), während den Amplifikaten der drei untersuchten Stämme von *H. alvei* die Schnittstelle bei Basenpaar 354 fehlte (siehe Abb. 3.2). In der Routineuntersuchung ist allerdings die zusätzliche Durchführung eines Restriktionsverdaus im Allgemeinen nicht notwendig, da es sich bei dem PCR-Verfahren um einen Suchtest handelt, bei dessen positivem Ausfall eine kulturelle Nachuntersuchung und Erregerisolierung

vorzunehmen ist. Wenn diese allerdings negativ verläuft, z. B. weil die Keimzahlen unterhalb der Nachweisgrenze des kulturellen Verfahrens liegen, kann eine Bestätigung mittels Restriktionsverdau hilfreich sein.

5.4 Überprüfung der Leistungsfähigkeit des PCR-Verfahrens mittels künstlich kontaminierter pulverförmiger Säuglingsnahrung

Da keine ausreichenden Mengen an natürlich kontaminiertem Probenmaterial zur Verfügung standen, mußte die Überprüfung der Leistungsfähigkeit des PCR-Verfahrens mit künstlich kontaminierten Proben vorgenommen werden. Zu diesem Zweck wurden insgesamt 52 Proben verschiedener Säuglingsnahrungen von vier Herstellern (siehe Tab. 3.4) mit zehn der in Tab. 3.1 aufgelisteten *E. sakazakii*-Stämme (siehe 3.1.2.3.1.2) in niedrigen Keimzahlen (5 – 24 Keime/100 g, siehe Tab. 3.3) beim Ansatz von jeweils 100 g pulverförmiger Säuglingsnahrung in 900 ml gepuffertem Peptonwasser beimpft. Als Kontrolle wurden jeweils Parallelansätze von 100 g der gleichen Säuglingsnahrung in 900 ml gepuffertem Peptonwasser ohne Zusatz von *E. sakazakii* mitgeführt. Beide Ansätze, Versuchs- und Kontrollansatz, wurden anschließend kulturell wie in Abb. 3.1 dargestellt untersucht (der Kontrollansatzes nur mit der FDA-Methode). Zusätzlich zum VRBD-Agar wurde aus der Selektivanreicherung (EE-Bouillon) noch auf zwei feste chromogene Medien (ESIA und ESCA) ausgestrichen (siehe Abb. 3.3). Der Nachweis mit dem PCR-Verfahren erfolgte nach einer Bebrütung bei 37 °C über 24 h im gepufferten Peptonwasser. In Vorversuchen waren hinsichtlich der DNA-Extraktion aus diesem Kulturmateriale zwei kommerzielle Testsysteme verglichen worden, nämlich der DNeasy Tissue Kit und der PrepMan Ultra Testkit. Hierbei stellte sich der PrepMan Ultra Testkit als dem anderen Testsystem deutlich überlegen heraus (Tab. 4.6) und wurde folglich für die DNA-Extraktion aus dem gepuffertem Peptonwasser verwendet.

In allen 52 Versuchsansätzen konnte sowohl kulturell (auf VRBD, ESIA und ESCA) als auch mit dem PCR-Verfahren *E. sakazakii* nachgewiesen werden, d. h., es war eine vollständige Übereinstimmung zwischen dem kulturellen und dem molekularbiologischen Verfahren zu registrieren. In zwei der Kontrollansätze wurde *E. sakazakii*, in weiteren vier *Enterobacter agglomerans* und *Escherichia coli* (Tab. 4.8) nachgewiesen.

Zusammenfassend läßt sich also feststellen, dass das hier vorgestellte PCR-Verfahren die gleiche Nachweissicherheit zeigt, wie die kulturelle Methode, aber bei negativen Proben, die in der Praxis den weitaus größten Anteil an den Untersuchungsergebnissen ausmachen, ge-

genüber der FDA-Methode eine Zeitersparnis von mindestens fünf Tagen erbringt. Bei der originalen FDA-Methode handelt es sich um eine quantitative MPN-Technik, bei dem PCR-Verfahren um eine qualitative Methode. Dies ist aber für die Routineuntersuchung nicht von Nachteil, da, wie unter 5.1 bereits erwähnt, die Verordnung (EG) Nr. 1441/2007 ebenfalls nur eine qualitative Untersuchung vorsieht. Es bleibt natürlich zu prüfen, ob die sehr guten Resulte bei der Untersuchung von natürlich kontaminiertem Material reproduzierbar sind.

5.5 Kulturelle Verfahren zum Nachweis von *E. sakazakii*

Wie in Abschnitt 3.1.2.1.1 erwähnt, wurden im Zusammenhang mit der vorliegenden Arbeit einige Modifikationen der FDA-Methode vorgenommen. So erschien es sinnvoll, die Bebrütungstemperatur des Voranreicherungsmediums von 36 °C auf die im europäischen Raum üblichen 37 °C anzuheben. Die Verwendung von sterilem Aqua dest. als Voranreicherungsmedium ist ungewöhnlich, es wurde daher gepuffertes Peptonwasser eingesetzt, welches auch den Vorteil hat, dass das Untersuchungsmaterial gleichzeitig auf die Anwesenheit von Salmonellen geprüft werden kann, die in gepulverter Säuglingsnahrung und Milchtrockenprodukten eine nicht unerhebliche Rolle spielen (BECKER et al., 2002) und auf die entsprechend der Verordnung (EG) Nr. 1441/2007 Säuglingsnahrung ebenfalls zu untersuchen ist. Da nach IVERSEN et al. (2004a) bei der Identifizierung von *E. sakazakii* unter Verwendung von API20E Probleme mit *Pantoea* spp. auftreten können, wurde zusätzlich der Desoxyribonuklease- (DNase-) Test eingesetzt, der nach FARMER et al. (1980) ein sehr stabiles Merkmal von *E. sakazakii* darstellt, während *Pantoea* spp. DNase-negativ sind (GAVINI et al. (1989), und auch eine Abgrenzung gegen *Enterobacter cloacae* erleichtert. In den vorliegenden Untersuchungen reagierten dementsprechend alle *E. sakazakii*-Stämme (siehe Tab. 3.1) im DNase-Test positiv. Eine weitere Modifikation bestand darin, dass zunächst 100 g entsprechend dieser modifizierten FDA-Methode untersucht wurden und nur bei positivem Befund eine Quantifizierung mittels MPN-Technik erfolgte. In einigen Fällen konnten auch nur 10 g geprüft werden, da zu wenig Probenmaterial vorlag. Achtzehn der 218 Proben enthielten *E. sakazakii*, die 13, bei denen die MPN-Bestimmung möglich war, in sehr geringen Konzentrationen (0,36 – 46,00 Keime/100 g, siehe Tab. 4.1). Allerdings gehörten, wie oben bereits erwähnt, die 18 Isolate nur acht verschiedenen Stämmen an. Auch in den vorliegenden Untersuchungen bestätigte sich demnach zumindest tendenziell die Beobachtung, dass *E. sakazakii* in pulverisierter Säuglingsnahrung in niedrigen Keimzahlen vorliegt (GURTLER et al., 2005).

Aufbauend auf den Untersuchungen von MUYTJENS et al. (1984), die festgestellt hatten, daß alle von ihnen geprüften *E. sakazakii*-Stämme im Gegensatz zu anderen *Enterobacteriaceae*-Species α -Glucosidase-Aktivität zeigten (eine Eigenschaft, auf der auch chromogene Medien, wie die in der vorliegenden Arbeit ebenfalls eingesetzten ESIA- und ESCA-Nährböden basieren), schlug HAHN (2003) vor, nach einer Voranreicherung in gepuffertem Peptonwasser und einer selektiven Anreicherung in Laurylsulfat-Tryptose-Bouillon (Bebrütung bei 45 °C) auf einen mit dem Enzymsubstrat 4-Methylumbellifery- α -D-glucosid (α -MUG) supplementierten Trypton-Soja-Agar auszustreichen und gelbe, im UV-Licht blau fluoreszierende Kolonien als präsumtive *E. sakazakii*-Keime anzusehen (siehe Abb. 3.1). Wie Tab. 4.1 und 4.2 zu entnehmen, waren von den 85 Proben, die mit diesem Verfahren untersucht worden waren, zehn positiv, was sich mit den Ergebnissen, die mit der FDA-Methode erzielt wurden, deckt. Eine Probe (199) war so stark mit Keimen der Begleitflora überwachsen, dass nur eine Auswertung der Gasbildung möglich war. In dem weiter untersuchten Kulturmaterial konnte allerdings *E. sakazakii* nachgewiesen werden. Die Gasbildung aus Lactose in der Laurylsulfat-Tryptose-Bouillon korrelierte nicht mit den beiden anderen Kriterien (Gelbpigmentierung, Fluoreszenz). *E. sakazakii* wird daher im ("Fäkal")-Coliformentest nicht sicher erfasst, worauf auch bereits FARMER et al. (1980) hinwiesen. Im übrigen stimmten die Ergebnisse der Proben, die mit beiden Verfahren (FDA, HAHN) untersucht worden waren, überein.

In einigen orientierenden Versuchen wurde geprüft, ob durch Zugabe von Selektivsubstanzen, wie sie auch im VRBG enthalten sind, nämlich Kristallviolett und Gallensalze, das Wachstum der Begleitflora (hauptsächlich *Bacillus cereus* und Mikrokokken) auf dem festen Nährboden (TSA mit α -MUG) unterdrückt werden kann. Dies führte allerdings zu Problemen bei der Beurteilung der Kolonien, da sowohl die Gelbpigmentierung als auch die Fluoreszenz nicht mehr eindeutig zu erkennen waren (siehe Tab. 4.4). Besser bewährte sich der Zusatz von Brillantgrün zur Voranreicherung, wie er auch bei der Untersuchung von Kakao und kakaohaltigen Produkten auf Salmonellen üblich ist (DIN EN ISO 6579:2007 – Mikrobiologie von Lebensmitteln und Futtermitteln – Horizontales Verfahren zum Nachweis von *Salmonella* spp.). In einigen orientierenden Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass insbesondere *Bacillus cereus* erheblich bis vollständig unterdrückt wurde, und in den mit Brillantgrün supplementierten Ansätzen tendenziell höhere Keimzahlen an *E. sakazakii* vorlagen (Tab. 4.3).

6. ZUSAMMENFASSUNG/SUMMARY

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Entwicklung eines Suchtests auf PCR-Basis zum Nachweis von *Enterobacter (E.) sakazakii* (*Cronobacter* spp., IVERSEN et al., 2008a) in pulverförmiger Säuglings- und Kleinkindernahrung.

Als Ziel-DNA dienten variable Abschnitte des 16S-rRNA-Gens von *E. sakazakii*, für deren Amplifizierung mit Hilfe des Computerprogramms Primer3 (ROZEN und SKALETSKY, 2000) geeignete Primer konstruiert wurden. Als interne Amplifikationskontrolle wurden chimäre Primer eingesetzt. Der Nachweis des PCR-Produktes erfolgte gelelektrophoretisch.

Die Überprüfung der Sensitivität und Spezifität des PCR-Verfahrens wurde mit 57 *E. sakazakii*-Stämmen, deren Individualität vorher mit Hilfe einer RAPD-PCR gesichert worden war, sowie mit 169 Isolaten von 16 Species bzw. Genera anderer Bakterien, vorgenommen. Alle *E. sakazakii*-Stämme reagierten in der PCR positiv. Allerdings war dies auch bei drei *Hafnia-alvei*-Isolaten der Fall. Mit einer DNA-Sequenzierung konnte gezeigt werden, dass *H. alvei* eine mit der Ziel-DNA von *E. sakazakii* identische Sequenz im 16S-rRNA-Gen aufweist. Die Amplifikate der *E. sakazakii*-Stämme sowie der *H. alvei*-Isolate wurden daher einem Restriktionsverdau mit dem Enzym *MvaI* unterzogen. Anhand der unterschiedlichen Bandenmuster waren beide Species eindeutig zu differenzieren.

Die Überprüfung der Leistungsfähigkeit des PCR-Verfahrens bei der Untersuchung von Lebensmitteln wurde an 52 Proben künstlich mit zehn verschiedenen *E. sakazakii*-Stämmen kontaminierter Säuglings- und Kleinkindernahrung vorgenommen. Die Proben stammten von vier Herstellern und umfassten Anfangsnahrung, Folgenahrung/Dauernahrung, Heilnahrung und Diätahrung. Die Kontaminationsdosis lag zwischen 5 und 24 Keimen pro 100 g. Vor der Untersuchung wurde eine Voranreicherung des kontaminierten Probenmaterials (je 100 g) sowie der entsprechenden nicht kontaminierten Kontrollproben in gepuffertem Peptonwasser über 24 h bei 37 °C durchgeführt. Die DNA-Extraktion erfolgte mit einem kommerziellen Testkit (PrepMan Ultra). Als Vergleich wurde die kulturelle FDA-Methode herangezogen (FDA/SCAN, 2002). In allen 52 Proben konnte *E. sakazakii* mit beiden Verfahren nachgewiesen werden.

Detection of *Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter* spp.) in powdered infant formulae using a molecular biological method

The aim of the studies presented here was the development of a screening test based on PCR technique for the detection of *Enterobacter* (*E.*) *sakazakii* (*Cronobacter* spp., IVERSEN et al., 2008a) in powdered infant formulae.

Variable regions of the 16S RNA gene of *E. sakazakii* were chosen for amplification by primers designed with the help of the computer programme Primer3 (ROZEN und SKALETSKY, 2000). Chimeric primer were used as internal amplification control. To check whether the amplicon was generated agarose gel electrophoresis was employed.

To test the sensitivity and specificity of the PCR method 57 *E. sakazakii* strains as well as 169 isolates belonging to 16 species or genera of other bacteria than *E. sakazakii* were used. Before testing, the *E. sakazakii* strains were examined by RAPD-PCR to ensure individuality. The PCR method gave positive results for all 57 *E. sakazakii* strains, three *Hafnia alvei* isolates, however, were also positive. It could be shown by DNA sequence analysis that *H. alvei* has a 16S rRNA gene sequence identical with the target DNA used for the detection of *E. sakazakii*. Therefore, the amplicons of the *E. sakazakii* strains and the *H. alvei* isolates were analysed by restriction digest using *MvaI* as restriction enzyme. Both species could be differentiated clearly by their electrophoretic band patterns.

To test the performance of the PCR method if food has to be examined 52 samples of powdered infant formulae were artificially contaminated with ten different strains of *E. sakazakii* (5 to 24 bacteria per 100 g). The samples were from four producers and they included different types of infant formulae, follow-up formulae and powdered formulae for special medical purposes. 100 g in each case of the artificially contaminated as well as 100 g in each case of non contaminated (negative control) sample material was preenriched in buffered peptone water for 24 h at 37 °C. After preenrichment DNA was extracted using a commercial test kit (PrepMan Ultra) and tested by the PCR method. A culture technique for the detection of *E. sakazakii* (FDA/SCAN, 2002) was carried along as reference method. *E. sakazakii* was detected in all samples with both methods.

7. LITERATURVERZEICHNIS

ALDOVA, E., HAUSNER, O., POSTUPA, R. (1983): Tween-esterase activity in *Enterobacter sakazakii*. Zbl. Bakt. Hyg. A. 256, 103 - 108

ARKU, B.; MULLANE, N.; FOX, E.; FANNING, S.; JORDAN, K. (2008): *Enterobacter sakazakii* survives spray drying. Int. J. Dairy Technol. 61, 102 – 108

BECKER, H., MÄRTLBAUER, E., TERPLAN, G. (2002): Salmonellen in Milch und Milch-erzeugnissen. In: HETZNER, E. (Hg.) Handbuch Milch; Abschnitt 3.6. Behrs Verlag, Hamburg

BIERING, G., KARLSSON, S., CLARK, N.C., JONSDOTTIER, K. E., LUDVIGSSON, P., STEINGRIMSSON, O. (1989): Three cases of neonatal meningitis caused by *Enterobacter sakazakii* in powdered milk. J. Clin. Microbiol. 27, 2054 - 2056

BLOCK, C., PELEG, O., MINSTER, N., BAR-OZ, B., SIMHON, A., ARAD, I., SHAPIRO, M. (2002): Cluster of neonatal infections in Jerusalem due to an unusual biochemical variant of *Enterobacter sakazakii*. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 21, 613 - 636

BREEUWER, P., LARDEAU, A., PETERZ, M., JOOSTEN, HM. (2003): Dessication and heat tolerance of *Enterobacter sakazakii*. J. Appl. Microbiol. 95, 967 - 973

CASTELLANI, A., CHALMERS, A. J. (1919): Manual of tropical medicine. 3rd ed. William Wood and Company, New York

CHAVEZ-LOPEZ, C., DE ANGELIS, M., MARTUSCELLI, M., SERIO, A., PAPARELLO, A., SUZZI, G. (2006): Characterization of the *Enterobacteriaceae* isolated from an artisanal Italian ewe's cheese (Pecorino Abruzzese). J. Appl. Microbiol. 101, 353 - 360

DRUDY, D., MULLANE, N. R., QUINN, T., WALL, P. G., FANNING, S. (2006): *Enterobacter sakazakii*: an emerging pathogen in powdered infant formula. Clin. Infect. Dis. 42, 996 - 1002

EDELSON-MAMMEL, S. G., BUCHANAN, R. L. (2004): Thermal inactivation of *Enterobacter sakazakii* in rehydrated infant formula. J. Food Prot. 67, 60 - 63

EDELSON-MAMMEL, S. G., PORTOUS, M. K., BUCHANAN, R. L. (2005): Survival of *Enterobacter sakazakii* in dehydrated powdered infant formula. J. Food Prot. 68, 1900 - 1902

FAO/WHO (2006): *Enterobacter sakazakii* and *Salmonella* in powdered infant formula: meeting report. Microbiological Risk Assessment Series 10.

<http://www.fao.org/ag/agn/agns/jemra_riskassessment_enterobacter_en.asp>

FDA/CFSAN (2002): Isolation and enumeration of *Enterobacter sakazakii* from dehydrated powdered infant formula. July 2002; revised August 2002.

< <http://www.fda.gov/Food/ScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm114665.htm>>

FARMER, J. J., ASBURY, M. A., HICKMAN, F. W., BRENNER, D. J., ENTEROBACTERIACEAE STUDY GROUP (1980): *Enterobacter sakazakii*. A new species of “*Enterobacteriaceae*” isolated from clinical specimens. Int. J. Syst. Bacteriol. 30, 569-584

FRIEDEMANN, M. (2007): *Enterobacter sakazakii* in food and beverages (other than infant formula and milk powder). Int. J. Food Microbiol. 116, 1 - 10

FRIEDEMANN, M. (2008): Gesundheitliches Gefährdungspotenzial von *Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter* spp. nov.) in Säuglingsnahrung. Bundesgesundheitsbl. Gesundheitsforsch. Gesundheitsschutz 51, 664 - 674

GAVINI , F., MERGAERT, J., BEJI, A., MIELCAREK, C., IZARD, D., KERSTERS, K., DE LEY, J. (1989): Transfer of *Enterobacter agglomerans* (Beijerinck 1888) Ewing and Fife 1972 to *Pantoea* gen. nov. as *Pantoea agglomerans* comb. nov. and description of *Pantoea dispersa* sp. nov. Int. J. Syst. Bacteriol. 39, 337 - 345

GURTLER, J. B., KORNACKI, J. L., BEUCHAT, L.R. (2005): *Enterobacter sakazakii*: a coliform of increased concern to infant health. Int. J. Food Microbiol. 104, 1 - 34

HAHN, G. (2003): Vereinfachte konventionelle Methodik zur Isolierung von *Enterobacter sakazakii* aus Milchpulver. Entwurf für das Institut für Technologie und Hygiene der Milch der LMU München

HAMILTON, J. V., LEHANE, M. J., BRAIG, H.R. (2003): Isolation of *Enterobacter sakazakii* from midgut of *Stomoxys calcitrans*. Emerging Infect. Dis. 9, 1355 - 1356

HASSAN, A. A., AKINEDEN, Ö. CLAUDIA KRESS, C., ESTUNINGSIH, S. SCHNEIDER, E., USLEBER, E. (2007): Characterization of the gene encoding the 16S rRNA of *Enterobacter sakazakii* and development of a species-specific PCR method. Int. J. Food Microbiol. 116, 214 - 220

HEUVELINK, A. E., KODDE, F.D., ZWARTKRUIS-NAHUIS, J. T. M., DE BOER, E. (2001): *Enterobacter sakazakii* in melkpoeder. Keuringsdienst van Waren Oost. Project number OT 0110

HEUVELINK, A. E., MOES, H., TILBURG, J. J. H. C., DE BOER, E. (2004): Handhavingsactie *Enterobacter sakazakii* in poedervormige producten. Voedsel en Waren Autoriteit/Keuringsdienst van Waren Oost, Projekt number: OT03H006

HSIEH, Y. M., SHEU, S. J., CHEN Y. L., TSEN, H. Y. (1999): Enterotoxigenic profiles and polymerase chain reaction detection of *Bacillus cereus* group cells and *B. cereus* strains from foods and food-borne outbreaks. J. Appl. Microbiol. 87,481 - 490

ICMSF (2002): Microorganism in foods. Vol. 7. Microbiological testing in food safety management, Chap. 8 Selection of cases and attribute plans. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York

IVERSEN, C., FORSYTHE, M. (2003): Risk profile of *Enterobacter sakazakii*, an emergent pathogen associated with infant milk formula. Food Sci. Technol. Res. 14, 443 – 454

IVERSEN, C., DRUGGAN, P., FORSYTHE S. J. (2004a): A selective differential medium for *Enterobacter sakazakii*, a preliminary study. Int. J. Food Microbiol. 96, 133 - 139

IVERSEN, C., LANE, M., FORSYTHE, S. J. (2004b): The growth profile, thermotolerance and biofilm formation of *Enterobacter sakazakii* grown in infant formula milk. *Lett. Appl. Microbiol.* 38, 378 - 382

IVERSEN, C., FORSYTHE, M. (2007): Comparison of media for the isolation of *Enterobacter sakazakii*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 48 - 52

IVERSEN, C., LEHNER, A., MULLANE, N., BIDLAS, E., CLEENWERCK, I., MARUGG, J., FANNING, S., STEPHAN, R., JOOSTEN, H. (2007): The taxonomy of *Enterobacter sakazakii*: proposal of a new genus *Cronobacter* gen. nov. and descriptions of *Cronobacter sakazakii* comb. nov., *Cronobacter sakazakii* subsp. *sakazakii*, comb. nov., *Cronobacter sakazakii* subsp. *malonaticus* subsp. nov., *Cronobacter turicensis* sp. nov., *Cronobacter muytjensis* sp. nov., *Cronobacter dublinensis* sp. nov. and *Cronobacter* genomospecies I. *BMC Evol. Biol.* 7, 64

IVERSEN, C.; MULLANE, N.; MCCARDELL, B.; TALL, B.D.; LEHNER, A.; FANNING, S.; STEPHAN, R.; JOOSTEN, H. (2008a): *Cronobacter* gen. nov., a new genus to accommodate the biogroups of *Enterobacter sakazakii*, and proposal of *Cronobacter sakazakii* gen. nov., comb. nov., *Cronobacter malonaticus* sp. nov., *Cronobacter turicensis* sp. nov., *Cronobacter muytjensis* sp. nov., *Cronobacter dublinensis* sp. nov., *Cronobacter* genomospecies 1, and of three subspecies, *Cronobacter dublinensis* subsp. *dublinensis* subsp. nov., *Cronobacter dublinensis* subsp. *lausannensis* subsp. nov. and *Cronobacter dublinensis* subsp. *lactaridi* subsp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 58, 1442 - 1447

IVERSEN, C., DRUGGAN, P., SCHUMACHER, S., LEHNER, A., FEER, C., GSCHWEND, K., JOOSTEN, H., STEPHAN, R. (2008b): Development of a novel screening method for the isolation of “*Cronobacter*” spp. (*Enterobacter sakazakii*). *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 2550 - 2553

KANDHAI, M. C., REIJ, M. W., GROGNOU, C., VAN SCHOTHORST, M., GORRIS, L. G. M., ZWIETERING, M. H. (2006): Effects of preculturing conditions on lag time and specific growth rate of *Enterobacter sakazakii* in reconstituted powdered infant formula. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2721 - 2729

KIM, H., BEUCHAT, L. R. (2005): Survival and growth of *Enterobacter sakazakii* on fresh-cut fruits and vegetables and in unpasteurized juices as affected by storage temperature. J. Food Prot. 68, 2541 - 2552

KIM, H., RYU, J.-H., BEUCHAT, L. (2006): Attachment of and biofilm formation by *Enterobacter sakazakii* on stainless steel and enteral feeding tubes. Appl. Environ. Microbiol. 72, 5846 - 5856

KRAEMER, I. B. (2008): Untersuchungen zum Vorkommen von *Enterobacter sakazakii* in Speiseeis mit real-time-PCR-Verfahren. Diss. med. vet., München

KUZINA, L. V., PELOQUIN, J. J., VACEK, D. C., MILLER, T. A. (2001): Isolation and identification of bacteria associated with adult laboratory Mexican fruit flies, *Anastrepha ludens* (Diptera: Tephritidae) Curr. Microbiol. 42, 290 - 294

LAFARGE, V., OGIER, J. C., GIRARD, V., MALADEN, V., LEVEAU, J. Y., GRUSS A., DELACROIX-BUCHET A. (2004): Raw cow milk bacterial population shifts attributable to refrigeration, Appl. Environ. Microbiol. 70, 5644 - 5650

LAI, K. K., (2001): *Enterobacter sakazakii* infections among neonates, infants, children, and adults. Case reports and a review of the literature. Medicine 80, 113 - 122

LECLERC, H., MOSSEL, D. A. A. , EDBERG, S. C., STRUIJK, C. B. (2001): Advances in the bacteriology of the coliform group: their suitability as markers of microbial water safety. Annu. Rev. Microbiol. 55, 201 – 234

LECLERCQ, A., WANEGUE, C., BAYLAC, P. (2002): Comparison of fecal coliform agar and violet red bile lactose agar for fecal coliform enumeration in foods. Appl. Environ. Microbiol. 68, 1631 - 1638

LEHNER, A., TASARA, T., STEPHAN, R. (2004): 16S rRNA gene based analysis of *Enterobacter sakazakii* strains from different sources and development of a PCR assay for identification. BMC Microbiol. 4, 43

LEHNER, A., RIEDEL, K., EBERL, L., BREEUWER, P., DIEP, B., STEPHAN, R. (2005): Biofilm formation, extracellular polysaccharide production, and cell-to-cell signaling in various *Enterobacter sakazakii* strains: aspects promoting environmental persistence. J. Food Prot. 68, 2287 - 2294

LEUSCHNER, R. G., BEW, J. (2004): A medium for the presumptive detection of *Enterobacter sakazakii* in infant formula: interlaboratory study. J. AOAC Int. 87, 604 - 613

LIU, Y., CAI, X., ZHANG, X., GAO, Q., YANG, X., ZHENG, Z., LUO, M., HUANG, X. (2005): Real time PCR using TaqMan and SYBR Green for detection of *Enterobacter sakazakii* in infant formula. J. Microbiol. Methods 65, 21 - 31

MANGE, J. P., STEPHAN, R., BOREL, N., WILD, P., KIM, K. S., POSPISCHIL, A., LEHNER, A. (2006): Adhesive properties of *Enterobacter sakazakii* to human epithelial and brain microvascular endothelial cells. BMC Microbiol. 6, 58

MOSSO, D. L. A., DA LA ROSA, M. D. C., VIVAR, C., MEDINA, M. D. R. (1994): Heterotrophic bacterial populations in the mineral waters of thermal springs in Spain. J. Appl. Bacteriol. 77, 370 - 381

MUYTJENS, H. L., VAN DER ROS-VAN DE REPE, J., VAN DRUTEN, H. A. M. (1984): Enzymatic profiles of *Enterobacter sakazakii* and related species with special reference to the α -glucosidase reaction and reproducibility of the test system. J. Clin. Microbiol. 20, 684 - 686

NAZAROWEC-WHITE, M., FARBER, J. M. (1997a): *Enterobacter sakazakii*: a review. Int. J. Food Microbiol. 34, 103 - 113

NAZAROWEC-WHITE, M., FARBER, J. M. (1997b): Incidence, survival, and growth of *Enterobacter sakazakii* in infant formula. J. Food Prot. 60, 226 - 230

NAZAROWEC-WHITE, M., FARBER, J. M. (1997c): Thermal resistance of *Enterobacter sakazakii* in reconstituted dried-infant formula. Lett. Appl. Microbiol. 24, 9 - 13

NAZAROWEC-WHITE, M., FARBER, J. M. (1999): Phenotypic and genotypic typing of food and clinical isolates of *Enterobacter sakazakii*. J. Med. Microbiol. 48, 559 - 567

NILSSON, J., SVENSSON, B., EKELUND, K., CHRISTIANSSON, A. (1998): A RAPD-PCR method for large-scale typing of *Bacillus cereus*. Lett. Appl. Microbiol. 27, 168 - 172

O'BRIEN, S., HEALY, B., NEGREDO, C., ANDERSON, W., FANNING, S., IVERSEN, C. (2009): Prevalence of *Cronobacter* species (*Enterobacter sakazakii*) in follow-on infant formulae and infant drinks. Lett. Appl. Microbiol. 48, 536 - 541

PAGOTTO, F. J., NAZAROWEC-WHITE, M., BIDAWID, S., FARBER, J. M. (2003): *Enterobacter sakazakii*: infectivity and enterotoxin production in vitro and in vivo. J. Food Prot. 66, 370 - 375

PAGOTTO, F. J., LENATI, R. F., FARBER, J. M. (2007): *Enterobacter sakazakii*. In: DOYLE, M. P., BEUCHAT, L. R. (eds) Food microbiology: fundamentals and frontiers, pp. 271 – 291. ASM Press, Washington, D. C.

RIEDEL, K., LEHNER, A. (2007): Identification of proteins involved in osmotic stress response in *Enterobacter sakazakii* by proteomics. Proteomics, 7, 1217 - 1231

ROZEN, S., SKALETSKY, H. J. (2000): Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: Krawetz S, Misener S (eds) Bioinformatics methods and protocols: methods in molecular biology. Humana Press, Totowa, NJ, pp. 365-386

< <http://fokker.wi.mit.edu/primer3/input.htm> >

SIMMONS, B. P., GELFAND, M. S., HAAS, M., METTS, L., FERGUSON, J. (1989): *Enterobacter sakazakii* infections in neonates associated with intrinsic contamination of powdered infant formula. Infect. Control. Hosp. Epidemiol. 10, 398 - 401

TOWNSEND, S. M., HURRELL, E., GONZALEZ-GOMEZ, I., LOWE, J., FRYE, J. G., FORSYTHE, S., BADGE, J. L. (2007): *Enterobacter sakazakii* invades brain capillary endothelial cells, persists in human macrophages influencing cytokine secretion and induces severe brain pathology in the neonatal rat. Microbiology 153, 3538 - 3547

TOWNSEND, S., EDWARD HURRELL, E., FORSYTHE, S. (2008): Virulence studies of *Enterobacter sakazakii* isolates associated with a neonatal intensive care unit outbreak. BMC Microbiol., 8, 64

VAN ACKER, J., DE SMET, F., MUYLDERMANS, G., BOUGATEF, A., NAESSENS, A., LAUWERS, S. (2001): Outbreak of necrotizing enterocolitis associated with *Enterobacter sakazakii* in powdered milk formula. J. Clin. Microbiol. 39, 293 - 297

WILLIAMS, T. L., MONDAY, S. R., EDELSON-MAMMEL, S. (2005): A top-down proteomics approach for differentiating thermal resistant strains of *Enterobacter sakazakii*. Proteomics 5, 4161 - 4169

ANHANG

I. Reagenzien zur Herstellung von TE-Puffer

TE-Puffer (10 mM Tris / HCl, 1 mM EDTA; pH 7,5 – 8)

- 0,1 M EDTA (100 ml)
 - 3,72 g EDTA ($\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) zu 80 ml A. dest. Geben, stark rühren, evtl. leicht erwärmen, bis es sich vollständig gelöst hat
 - mit 1 N NaOH pH auf 8,0 einstellen, mit A. dest. auf 100 ml auffüllen
 - autoklavieren
- 0,1 M Tris/HCL, pH 8,0 (1000 ml)
 - 12,11 g Tris-Base in 800 ml A. dest lösen
 - mit 1N HCL pH auf 8,0 einstellen, mit A. dest. auf 1 l auffüllen
 - autoklavieren
- TE-Puffer (10 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA; pH 7,5 – 8)
 - 100 ml 0,1 M Tris/HCl, pH 8,0 und 0,1 M EDTA zu 800 ml A. dest. geben
 - mit A.dest. auf 1 l auffüllen

II. Anleitung zur Herstellung von TAE-Puffer

TAE Puffer

- EDTA- Na_2 -Lösung:
 - 18,61 g EDTA (Sigma E5134) in 80 ml Aqua bidest. lösen
 - 2 g NaOH-Plätzchen (Merck 106495) zugeben, zur Einstellung des pH-Wertes auf 8,2, in einen Messzylinder umfüllen und mit Aqua bidest. auf 100 ml auffüllen
 - 30 min bei 121 °C autoklavieren
- TAE-Stammlösung:
 - 121 g Trizma-Base (Sigma T8524) in eine sterile Schottflasche einwiegen
 - 28,5 ml Essigsäure 96 % (Riedel de Haen 33206) und
 - 50 ml EDTA- Na_2 -Lösung zugeben
 - mit sterilem Aqua bidest. auf 500 ml auffüllen
- TAE-Puffer Gebrauchslösung: 20 ml Stammlösung + 980 ml Aqua dest.

III. PrepMan Ultra Testkit

Die Durchführung erfolgte nach Anleitung des Herstellers:

1. 1 ml Anreicherungsflüssigkeit in 1,5 ml Eppendorfgefäße überführen, dabei möglichst wenig grobe Partikel mitnehmen
2. 3 min bei 13 000 upm zentrifugieren
3. Überstand vorsichtig abpipettieren, soviel Überstand wie möglich abnehmen, ohne dass das Pellet zerstört wird. Einen eventuell vorhandenen Fettfilm entfernen.
4. PrepMan Ultra Reagenz gut aufschütteln, dann stehen lassen, bis keine Blasen mehr vorhanden sind
5. 200 µl PrepMan Reagenz in jede Probe pipettieren (Pipettenspitzenwechsel ist wichtig!)
6. Eppendorfgefäße vortexen, bis das Pellet gelöst ist
7. Proben 10 min im kochenden Wasserbad inkubieren
8. Proben aus Wasserbad entnehmen und 2 min auf Raumtemperatur abkühlen lassen
9. 3 min bei 13 000 upm zentrifugieren
10. 50 µl des klaren Überstandes in neue 1,5 ml Eppendorfgefäße pipettieren
11. ist die Probe nicht ganz klar, so wird mit A. dest. verdünnt
12. die fertigen Proben können bei 4 °C im Kühlschrank bis zu sechs Wochen gelagert werden.

IV. DNeasy Tissue Kit

1. 200 µl Bakteriensuspension bzw. Anreicherungskultur in Eppendorfgefäß (1,5-2 ml) pipettieren
2. 10 min bei 7500 upm (5000 g) zentrifugieren
3. Überstand wegkippen
4. 25 µl Proteinkinase K hinzufügen, vortexen
5. 200 µl Puffer AL hinzufügen, vortexen

6. 30 min im Wasserbad, bei 70 °C
7. 200 µl Ethanol absolut (96 %), gut vortexen
8. Säulen in 2 ml Sammeltubes stecken + 500 µl AW 1-Puffer
9. 1 min bei 8000 upm zentrifugieren
10. Säulen auf neue Sammeltubes stecken + 200 µl AW 2-Puffer
11. 1 min bei 8000 upm zentrifugieren
12. Säulen auf Eppendorfgefäße setzen (1,5 oder 2 ml)
13. 200 µl Puffer AE auf die Membran pipettieren
14. 1 min bei Raumtemperatur stehen lassen
15. 1 min bei 8000 upm zentrifugieren
16. Eluat im Gefrierschrank aufbewahren

Sehr herzlich bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. Erwin Märtlbauer für die Überlassung des Themas und die freundliche Unterstützung.

Mein Dank gilt auch Herrn Dr. Heinz Becker für die fachliche Betreuung und Hilfestellung bei der Abfassung und Fertigstellung der Arbeit.

Vielen Dank auch an meine Betreuerin Frau Dr. Christine Bürk für Rat und Tat im Bereich der PCR.

Danken möchte ich auch dem Team des mikrobiologischen Labors, Frau Ute Ritzerfeld und Frau Susanne Eberhardt für die gute Einarbeitung und hilfreiche Unterstützung. Desgleichen bedanke ich mich bei Frau Marion Lorber für die Unterstützung und Hilfe im Bereich der PCR.

Und zu guter Letzt bedanke ich mich sehr herzlich bei meiner Familie und bei meinen Freunden für die gute Unterstützung während der ganzen Arbeit. Im Besonderen bei Herrn Dr. Markus Bernhardt, Frau Dr. Christine Römermann und meinem Mann, Herrn Dr.-Ing. Kilian Funk, die mir bei der Fertigstellung der Arbeit und für Computerfragen immer zur Seite standen.

Die Arbeit wurde in Teilen vom Bundesverband der Hersteller von Lebensmitteln für besondere Ernährungszwecke e. V. (Diätverband) gefördert.