Charakterisierung der Toxizität von *Bacillus cereus* Isolaten aus Verpflegungseinrichtungen der Bundeswehr

Christine Kreuzberger

München 2007

Aus dem Institut für Hygiene und Technologie der
Lebensmittel tierischen Ursprungs
(Lehrstuhl: Prof. Dr. E. Märtlbauer)
der Tierärztlichen Fakultät der Universität München

Charakterisierung der Toxizität von *Bacillus cereus* Isolaten aus Verpflegungseinrichtungen der Bundeswehr

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

von
Christine Kreuzberger
aus
Mömbris

München 2007

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

Dekan:	Univ.-Prof. Dr. E. P. Märtlbauer
Referent:	Univ.-Prof. Dr. E. P. Märtlbauer
Korreferent(en):	Univ.-Prof. Dr. R. Mansfeld

Tag der Promotion: 9. Februar 2007

Für meinen Vater und meine Mutter

Für meinen Sohn

Für alle die an mich geglaubt haben

Abkürzungsverzeichnis

ATCC	American Type Culture Collection
BHI-Bouillon	Brain Heart Infusion-Bouillon
CDC	Centers for Disease Control and Prevention Surveillance Summaries für die USA
CGY-Bouillon	Caseinhydrolysat-Bouillon mit 1% Glucosezusatz
DGE	Deutsche Gesellschaft für Ernährung
DSM	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
EIA	Enzymimmunoassay
FCS	Fetales Kälberserum
HBL	Hämolysin-BL
HRP	Horse Radish Peroxidase (Meerrettichperoxidase)
IfSG	Infektionsschutzgesetz
kDa	Kilodalton
mAk	Monoklonale Antikörpger
MHI	Stammsammlung des Lehrstuhls für Hygiene und Technologie der Milch
Nhe-Komplex	Non-Haemolytic-Enterotoxin Komplex
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PC-Agar	Plate count Agar
SMM	Skim Milk Medium (Magermilch-Medium)
WHO	World Health Organisation
WST	Tetrazoliumsalz (4-[3-(4-Iodophenyl)-2-(4-nitrophenyl)-2H-5-tetrazolio]-1,3-benzene disulfonate)
ZDv 46/28	Zentrale Dienstvorschrift “Lebensmittelhygiene” der Bundeswehr
ZInstSanBw	Zentrales Institut des Sanitätsdienstes der Bundeswehr

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung **1**

2 Schrifttum **2**

2.1 Hintergrund 2
2.2 Toxine von *Bacillus cereus* 3
2.2.2 Hämolysin BL (HBL) 3
2.2.3 Non- hemolytic enterotoxin (Nhe) 4
2.2.4 Cytotoxin K 4
2.2.5 Cereulid 5
2.3 Krankheitsbilder und Epidemiologie von *B. cereus* 6
2.3.1 Krankheitsbilder durch *B. cereus* in Lebensmitteln 6
2.3.2 Epidemiologie von *B. cereus* in Lebensmitteln 7
2.4 Nachweisverfahren für *Bacillus cereus* Toxine 8
2.5 Lebensmittel- und Hygieneüberwachung in Verpflegungseinrichtungen der Bundeswehr 10
2.5.1 Reinigung und Desinfektion in Verpflegungseinrichtungen der Bundeswehr 12

3 Eigene Untersuchungen **13**

3.1 Material 13
3.1.1 Chemikalien und Biochemika 13
3.1.2 Nährmedien, Puffer und Lösung 14
3.1.3 Mikroorganismen und Zellkultur 17
3.1.4 Immunreagenzien 17
3.1.5 Sonstige Materialien 18
3.1.6 Geräte 18

3.2 Methodik 19
3.2.1 Probengewinnung 19
3.2.1.1 Probenahmeplan 20
3.2.2 Identifizierung der *Bacillus cereus* Isolate 20
3.2.3 Charakterisierung der *Bacillus cereus* Isolate 21
3.2.3.1 Stärkehydrolyse Test 21
3.2.3.2 Anzuchtbedingungen für *B. cereus* zur Toxinproduktion 21
3.2.3.3 Enzymimmunoassay 22
3.2.3.4 Zytotoxizitätstest 23
3.2.3.4.1 Vero-Zellen Zytotoxizitätstest 23
3.2.3.4.2 Hep-Zellen Zytotoxizitätstest 24
3.3 Ergebnisse 25
3.3.1 Prävalenz von *Bacillus cereus* Isolaten 25
3.3.2 Toxinprävalenz 25
3.3.3 Prävalenz innerhalb der Arbeitsbereiche 27
3.3.4 Prävalenz auf Oberflächen 28
3.3.5 Toxinprofile innerhalb der Arbeitsbereiche und auf Oberflächen 29
3.3.6 Nhe Toxinproduktivität 33
3.3.7 Toxinproduktivität der *B. cereus* Stämme innerhalb der Arbeitsbereiche 35
3.3.8 Toxinproduktivität der *B. cereus* Stämme auf Oberflächen 37
3.3.9 Cereulid Produktivität 40
3.3.10 Prävalenz in Verpflegungseinrichtungen 41

4 Diskussion 44

5 Zusammenfassung/ Summary 50

6 Literaturverzeichnis 52

7 Anhang 65

1 Einleitung

Die Bedeutung von *Bacillus cereus* als Erreger von lebensmittelassoziierten Erkrankungen wächst stetig. Des Weiteren gehören Vertreter des weit verbreiteten Genus *Bacillus* aufgrund ausgeprägter proteolytischen Eigenschaften zu den wichtigsten Verderbniserregern bei Lebensmitteln. Die hohe Prävalenz sowie die charakteristischen Eigenschaften von *B. cereus* machen ihn zu einem Problemkeim in der Lebensmitteltechnologie und – hygiene. Entgegen verschiedener nationaler Statistiken (CDC, 2000; WHO, 2003), in denen die Bedeutung von *B. cereus*- bedingter Lebensmittelinfektionen bzw. –intoxikationen stark variiert bzw. nur eine untergeordnete Rolle einnimmt, ließ er sich jedoch bei mehr als der Hälfte aller lebensmittelbedingter Gruppenerkrankungen innerhalb der Bundeswehr als Auslöser ermitteln. Zur Ermittlung des tatsächlichen Risikos durch *B. cereus* kommt, neben der qualitativen Bestimmung der Toxinprofile und der quantitativ produzierten Toxinmenge, vor allem den Kontaminationswegen innerhalb der Lebensmittel verarbeitenden Bereichen eine wichtige Rolle zu.

Aufgabe dieser Arbeit war es daher, zur Bewertung des Risikos von *B. cereus* innerhalb der Lebensmittelverarbeitung in Verpflegungseinrichtungen der Bundeswehr, das Verteilungsmuster Toxin-bildender *B. cereus*-Stämme auf verschiedenen Materialien, innerhalb verschiedener Arbeitsbereiche qualitativ und quantitativ zu bestimmen. Hierzu wurden innerhalb eines Feldversuches Statusproben von verschiedenen Oberflächen aus definierten Arbeitsbereichen in Verpflegungseinrichtungen der Bundeswehr gezogen. Die isolierten *B. cereus*-Stämme wurden mit Hilfe mikrobiologischer und immunologischer Untersuchungen charakterisiert. Mittels ELISA-Technik wurde das Toxinbildungsvermögen bestätigter *B. cereus* Isolate quantitativ bestimmt.

Ziel war es, anhand von differenzierten Prävalenzdaten und Toxintitern ein eventuell vorhandenes Verteilungsmuster der besonders relevanten hoch Toxin-bildenden (highproducer) Isolate zu ermitteln. Ferner sollte geklärt werden, ob sich anhand des Verteilungsmusters für highproducer das Risiko durch *B. cereus* bei der Lebensmittelverarbeitung besser einschätzen lässt bzw. sich Maßnahmen zur Risikominimierung ableiten lassen.

2 Schrifttum

2.1 Hintergrund

Bacillus cereus, ein ubiquitärer Keim, ist ein Endosporen bildendes, gram-positives Stäbchen, das sowohl unter aeroben, als auch anaeroben Bedingungen wächst. Aufgrund ausgeprägter proteolytischer Eigenschaften gehören Vertreter des Genus *Bacillus* zu den wichtigsten Verursachern von Qualitätsminderung und Verderb bei Lebensmitteln. Zusätzlich ist *B. cereus* aufgrund seiner Hitzeresistenz, der Kältetoleranz und dem Toxinbildungsvermögen ein Problem in der Lebensmitteltechnologie und –hygiene (KOTIRANTA et al., 2000). *B. cereus* kann beim Menschen sowohl gastrointestinale als auch nicht gastrointestinale Erkrankungen hervorrufen. Zu den nicht gastrointestinalen Erkrankungen gehören systemische (z.B. Septikämien, Endokarditiden, Infektionen des Zentralnervensystems und des Atmungsapparates) sowie lokale Erkrankungen (z.B. Wundinfektionen und Infektionen am Auge; DROBNIEWSKI, 1993). Zu den gastrointestinalen Erkankungen zählen zwei verschiedene Krankheitsbilder von Lebensmittelvergiftungen, das Diarrhoe- Syndrom und das emetische Syndrom (GRANUM, 2001; SCHOENI & WONG, 2005). Bei der Diarrhoe- Form werden gegenwärtig fünf verschiedene Enterotoxine bzw. Enterotoxinkomplexe als ursächliche Pathogenitätsfaktoren diskutiert. Über das enteropathogene Potential von Enterotoxin T (AGATA et al., 1995) und Enterotoxin FM (ASANO et al., 1997) bestehen, nach bisherigem negativem Nachweis in Kulturüberständen von *B. cereus*, starke Zweifel (CHOMA & GRANUM, 2002) und können nach derzeitigem Stand der Forschung als Ursache für Lebensmittel-Vergiftungen vernachlässigt werden. Bei drei Toxinen, Hämolysin BL (HBL; BEECHER & MACMILLAN, 1990), Non-hemolytic enterotoxin (Nhe; LUND & GRANUM, 1996) und Cytotoxin K (Cyt K; LUND et al., 2000) ist die Beteiligung bei Lebensmittelvergiftungen gesichert. Die Prävalenz aller Enterotoxinkomplex-Gene liegt für HBL bei 50 - 60 % und für Nhe bei 90 % und mehr (BUCK et al., 2002; ANDERSEN BORGE et al., 2001 und GUINEBRETIÈRE et al., 2002). Für das von *B. cereus* ausgehende Risiko für die Lebensmitteltechnologie und -hygiene ist allerdings eine Aussage über das toxische Potential eines *B. cereus* -Stammes aufgrund der möglichen, quantitativ stark divergierenden Enterotoxinproduktion, nur über die Quantifizierung der Toxine möglich (MORAVEK et al., 2006). Bei der emetischen Form der Lebensmittelvergiftung durch *B. cereus* handelt es sich um ein hitzestabiles Toxin (Cereulid; AGATA et al., 1994), welches präformiert im Lebensmittel vorliegt und somit eine klassische Intoxikation darstellt.

2.2 Toxine von *Bacillus cereus*

2.2.1 Hämolysin BL (HBL)

Erstmals beschrieben BEECHER & MACMILLAN (1990) den mittlerweile gut charakterisierten Enterotoxin–Komplex, der aus drei Komponenten besteht. Sowohl die B-Komponente mit 37,5 kDa, die L_1-Komponente mit 38,2 kDa, wie auch die L_2-Komponente mit 43,5 kDa sind für sich allein atoxische Proteine. Es sind alle drei Komponenten für eine biologische Aktivität notwendig (BEECHER & WONG, 1994). Molekularbiologisch konnte gezeigt werden, dass die Gene für die drei Komponenten (*hblA, hblD, hblC*) auf dem gleichen Operon liegen und in eine mRNA transkribiert werden (HEINRICHS et al., 1993; RYAN et al., 1997). In Studien von PRÜSS et al. (1999) und HANSEN & HENDRIKSEN (2001) waren 50 - 60 % aller untersuchten *Bacillus cereus* Isolate mit den Genen für alle drei Komponenten des Enterotoxinkomplexes ausgestattet. Auf dem genannten Operon konnte ein weiteres Gen, *hblB*, isoliert werden, welches nach GRANUM et al. (1997) zu 73 % identisch mit der B-Koponente ist. Bisher ist es nicht gelungen, die Funktion des codierten Genproduktes zu entschlüsseln bzw. es in Kulturüberständen zu isolieren. Die Enteropathogenität des HBL-Komplexes zeigt sich durch positive Reaktionen bei klassischen Methoden, wie dem Darmschlingenligationstest (RIL, Rabbit ileal loop test; SPIRA & GOPFERT, 1972; BEECHER et al., 1995), Erhöhung der Kapillarpermeabilität (VPR, Vascular permeability reaction; GLATZ et al., 1974; SHINAGAWA et al., 1985), als auch im Mäuseletalitätstest (MLT, Mouse lethality test; GLATZ & GOEPFERT, 1973; HOSTACKA et al., 1992). HBL wirkt zytotoxisch auf mehrere Zelllinien (CHO-Zellen, Vero-Zellen), wobei über die Wirkung auf zellulärer Ebene noch wenig bekannt ist. Zwei Wirkungsmechanismen wurden vorgeschlagen: (1) nach Bindung der B-Komponente an die Zelloberfläche kommt es zur Einschleusung beider L-Komponenten in die Zelle mit anschließender Beeinflussung der metabolischen Zellaktivität (BEECHER & MACMILLAN, 1991) bzw. (2) nach gemeinsamer Bindung der B- und L-Komponenten an die Zelloberfläche der Zielzelle kommt es zu Membranläsionen. Hinweise für die zweite Variante liefern BEECHER & WONG (1994) mit einer Studie an Schaferythrozyten, wo es zu einer Bildung eines sogenannten „membrane attack complex“ durch alle drei Komponenten auf der Zelloberfläche kommt. Die diskontinuierliche Hämolyse auf Blutagar ist ein weiteres charakteristisches Merkmal von HBL. Hierbei beginnt die Lysis der Erythrozyten zuerst

etwas entfernt von der Kolonie, während die Zone direkt um die Keime erst später hämolysiert.

2.2.2 Non-hemolytic enterotoxin (Nhe)

LUND & GRANUM (1996) isolierten diesen Enterotoxin-Komplex aus einem HBL-negativen *B. cereus* Stamm (NVH 0075/95), der aus einem Lebensmittelvergiftungsgeschehen stammte. Wie HBL handelt es sich bei Nhe um einen Komplex der aus drei Proteinen NheA (41.0 kDa), NheB (39.8 kDa) und NheC (36.5 kDa) besteht, die ebenfalls auf einem Operon durch drei Gene (*nheA, nheB, nheC*) codiert sind und Ähnlichkeiten mit den HBL-Proteinen zeigen (GRANUM et al., 1999). Im Zellkulturtest wird die maximale zytotoxische Aktivität bei Vorhandensein aller drei Komponenten erreicht (LUND & GRANUM, 1997). Über den vollständigen Wirkungsmechanismus von Nhe auf zellulärer Ebene ist wenig bekannt. Gesichert ist, dass die NheB Komponente im Nhe-Komplex als Bindungskomponente für NheA und NheC fungiert (LINDBÄCK et al., 2004). Die Ergebnisse mehrerer Untersuchungen weisen auf eine Prävalenz des Nhe-Komplexes bei *B. cereus* von 90 % und mehr hin (IN`T VELD et al., 2001; HANSEN & HENDRIKSEN, 2001; MORAVEK et al., 2006). Bei *B. thuringiensis* wurde das *nhe*-Operon in einer umfangreichen Studie sogar bei 100 % der Stämme (n = 74) nachgewiesen (RIVERA et al., 2000).

2.2.3 Cytotoxin K (Cyt K)

Bei Cyt K handelt es sich um ein einzelnes Exoprotein mit nekrotischen und hämolytischen Eigenschaften, welches erstmals von LUND et al. (2000) im Zusammenhang mit einer Lebensmittelvergiftung in einem französischen Altersheim beschrieben wurde. Cyt K hat ein Molekulargewicht von 33,8 kDa und besitzt eine 30-prozentige Übereinstimmung der Aminosäuresequenz mit *S.-aureus*-α- und β-Hämolysinen und dem β-Toxin von *Clostridium perfringens*. Die genannten Toxine werden aufgrund ihrer Wirkung, der Bildung von Ionen-durchlässigen Kanälen (MENESTRINA et al., 2001), zu der Gruppe der „pore forming Toxine“ gezählt. Mittels molekularbiologischer Charakterisierung konnte STENFORS et al. (2001, 2002) ein „Cyt K“ ähnliches Toxin noch bei fünf anderen Stämmen nachweisen, die zudem noch über das HBL- und/oder Nhe-Toxinbildungsvermögen verfügten. Das im Zellkulturtest auf permanente Colon Carcinom Zellen (CaCo-2-Zellen) hochtoxische Cyt K

entwickelt in Kombination mit anderen *B. cereus* Toxinen keine synergistischen Effekte im Hinblick auf die zytotoxische Wirkung. In Untersuchungen von GUINEBRETIÈRE et al. (2002) wurde das CytK-Gen bei 73 % der Diarrhoe verursachenden *B. cereus*-Stämme nachgewiesen. Die Expression des originären CytK Proteins konnte allerdings bisher nur bei einem einzigen Stamm nachgewiesen werden.

2.2.4 Cereulid

Cereulid ist ein aus drei identischen Tetrapeptid-Fragmenten bestehendes, zyklisches Dodekadepsipeptid (Abb. 1) mit einem Molekulargewicht von 1191 Da (AGATA et al., 1994). Depsipeptide enthalten nichtproteinogene Bausteine, wie z.B. D-Aminosäuren oder Hydroxycarbonsäuren und werden aufgrund dessen auch als heteromere Peptide bezeichnet. Die Bildung von Peptiden ist bei Mikroorganismen häufig zu finden, wobei diese Verbindungen unterschiedlichste biologische Eigenschaften aufweisen können. So findet sich bei *Bacillus polymyxa* das Cyclopeptid Polymyxin B mit antibiotischer Wirkung (GRÄFE, 1992), bei *Bacillus licheniformis* das Lipopeptid Lichenysin A, welches für Biofilmeigenschaften verantwortlich ist (YAKIMOV et al., 1995) und das von *Streptomyces spp*. (BROCKMANN & SCHMIDT-KASTNER, 1955; ANDERSSON et al., 1998b) produzierte, mit Cereulid strukturverwandte, Antibiotikum Valinomycin. Cereulid ist aufgrund alternierender Ester- und Peptidbindungen stark hydrophob (AGATA et al., 1994), was seine Extraktionseigenschaften bestimmt. Stereochemisch ist Cereulid ein hexagonales zylindrisches Gerüst mit zentral gelegenem K+-Ion, wobei die Synthese über eine nichtribosomale Peptidsynthase erfolgt (EHLING-SCHULZ et al., 2004). Auf zellulärer Ebene beeinflusst das Toxin als selektives Kalium-Ionophor das Membranpotential der Mitochondrien (MIKKOLA et al., 1999). Ebenso wurden immunsuppressive Wirkungen, Senkung der Zytokinproduktion und Hemmung der zytotoxischen Zytokin-Aktivität beobachtet (PAANANEN et al., 2002).

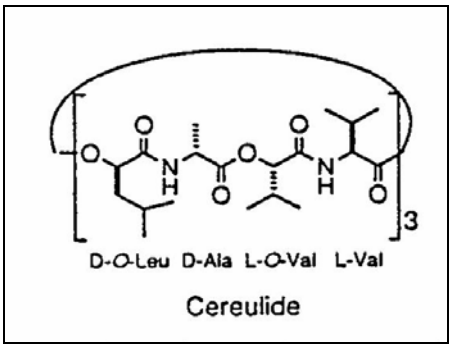


Abbildung 1: Chemische Struktur des emetischen Toxins (Cereulid) von *B. cereus*

2.3 Krankheitsbilder und Epidemiologie von *Bacillus cereus*

Bacillus cereus ist in der Lage beim Menschen zwei unterschiedliche Formen der „Lebensmittelvergiftung" hervorzurufen: *Das Diarrhoe-Syndrom* und das *emetische Syndrom.*

2.3.1 Krankheitsbilder durch *B. cereus* in Lebensmitteln

Diarrhoe-Syndrom: Das Krankheitsbild mit dem Leitsymptom Durchfall wird durch Enterotoxin(e) ausgelöst, hitzelabile und trypsinempfindliche Exoproteine (siehe Punkt 2.2), von denen heute angenommen wird, dass sie in toxischer Dosis erst im Darm nach Verzehr von mit *B. cereus* Keimen oder Sporen kontaminierten Lebensmitteln gebildet werden (GRANUM, 2001). Bei diesem Krankheitsbild kommt es, nach einer Inkubationszeit von 8 - 16 Stunden, zu Durchfall und abdominalen Schmerzen, wobei die Krankheitsdauer meist 12 - 14 Stunden beträgt. Zur infektiösen Dosis, welche geeignet ist das Diarrhoe- Syndrom auszulösen, gibt es in der Literatur unterschiedliche Angaben. KRAMER & GILBERT (1989) und KATSARAS & HILDEBRANDT (1979) berichteten von Erkrankungsfällen nach Aufnahme von Speisen mit Keimzahlen über 10^6 KbE/g. GRANUM (1994) ermittelte *B. cereus*-Gehalte in Lebensmitteln zwischen 200 und 10^9 KbE/g, woraus er eine infektiöse Dosis für das Diarrhoe-Syndrom von 10^5 - 10^7 ableitete.

Emetisches Syndrom: Das Krankheitsbild mit den Leitsymptomen Vomitus und Nausea wird durch das hitzestabile Toxin Cereulid ausgelöst, welches präformiert im Lebensmittel vorliegt. Nach einer Inkubationszeit von 0,5 - 5 Stunden kommt es zu Übelkeit und Erbrechen, wobei die Krankheitsdauer meist 6 - 24 Stunden beträgt und im Allgemeinen keine bleibenden Schäden hinterlässt. Jedoch gibt es auch Berichte über dramatisch verlaufende Fälle mit sogar letalem Ausgang (MAHLER et al., 1997; DIERICK et al., 2005).

Das Erkrankungsbild gleicht dem einer *S. aureus*-Vergiftung und tritt meist im Zusammenhang mit dem Verzehr von stärkehaltigen Lebensmitteln, vor allem Reis und Nudeln, auf (LUND, 1991). Mit einer Lebensmittelintoxikation muss aufgrund der möglicherweise produzierten Toxinmenge ab einem *B. cereus* Gehalt im Lebensmittel von $10^5 – 10^8$ KbE/g gerechnet werden (GRANUM, 1997).

2.3.2 Epidemiologie von *B. cereus* in Lebensmitteln

Als ubiquitärer Keim kann *B. cereus* Lebensmittel über den Erdboden, das Wasser und die Luft kontaminieren. ANDERSSON et al. (1995) zeigten, dass *B. cereus* auf Küchengerätschaften und Oberflächen von Bedarfsgegenständen sowie in Lebensmitteln ein ernsthaftes Gesundheitsrisiko darstellen kann. In den letzten Jahren hat sich immer deutlicher gezeigt, dass *B. cereus*, anders als früher angenommen, einer der wichtigsten Erreger von lebensmittelassoziierten Erkrankungen darstellt. Lebensmittelbedingte Erkrankungen werden in vielen Ländern in unterschiedlich strukturierten Meldesystemen, welche nicht immer vergleichbar sind, eingegeben. In Berichten des Sanitätsamtes der Bundeswehr wird die Zunahme von durch *B. cereus* bedingten lebensmittelassoziierten Krankheitsausbrüchen in der Gemeinschaftsverpflegung der Bundeswehr innerhalb des Zeitraumes 1985 bis 2000 mit einer prozentualen Steigerung von 20 % auf 60 % angegeben (KLEER et al., 2001). *B. cereus* zählt in Deutschland nicht zu den meldepflichtigen bakteriellen Erregern nach Infektionsschutzgesetz §7 (2000) und wird daher in der Statistik des Robert-Koch-Institutes (Epidemiologisches Bulletin) nicht aufgeführt. Die Deutsche Gesellschaft für Ernährung hat Daten für den Zeitraum 1993 - 1997 veröffentlicht (DGE, 2000), nach denen 1,5 % der lebensmittelassoziierten Erkrankungen durch *B. cereus* bedingt sind.
Die CDC Surveillance Summaries für die USA (CDC, 2000) geben für den Zeitraum 1993-1997 eine Beteiligung von *B. cereus* bei lebensmittelbedingten Krankheitsausbrüchen von weniger als 1% an. Wie ERNST (2003) in ihrer Arbeit zusammenfasst, werden in Ländern wie Taiwan (PAN et al., 1997), Japan (SHINAGAWA, 1993; Ministry of Health and Welfare JAPAN, 1998) und Thailand (GASALUK et al., 1996) enterotoxische *B. cereus* Stämme mit nahezu einem Drittel aller erfassten lebensmittelbedingten Gruppenerkrankungen in Verbindung gebracht. Grundsätzlich wird *B. cereus* in einer Vielzahl von Lebensmitteln wie z.B. Milch, Käse, Eiscreme, Kinderfertignahrung, Gemüse, Zerealien, Salaten, Fleisch und Fleischprodukten, Reis und Reisgerichten nachgewiesen, meist allerdings in nur geringer Keimzahl. Bei 200 untersuchen Lebensmittelproben von Nudeln, Reis, Babynahrung und

Fertiggerichten konnten Kontaminationsfrequenzen von 85 % - 90 % nachgewiesen werden, wobei jedoch sehr geringe Kontaminationswerte sowie ein Maximalwert von $3x10^2$ Keimen/g Lebensmittel ermittelt wurde (ERBSLÖH, 2006). Bei erhitzten Produkten ist *B. cereus* häufig der einzig potentiell pathogene Keim, der sich bei anschließenden produktionstechnischen Fehlern besonders gut vermehren kann. Insbesondere Halbfertigprodukte (cooked chilled foods), welche vermehrt auch im Rahmen der Gemeinschaftsverpflegung verwendet werden, stellen ein besonderes Problem dar. Ebenso spielen nach BEUTLING & BÖTTCHER (1998) küchentechnische Fehler bei Massenerkrankungen eine große Rolle.
Nach KRAMER & GILBERT (1989) sind die unzureichende Erhitzung von Lebensmitteln, die Lagerung der Produkte bei nicht geeigneten Temperaturen, eine größere Zeitspanne zwischen der Zubereitung und der Ausgabe bzw. dem Verzehr der Produkte sowie die Kontamination von verzehrfertigen Lebensmitteln durch Flächen und Küchengerätschaften als Hauptfaktoren für das Auskeimen und die Vermehrung von *B. cereus* Sporen und der damit einhergehenden Begünstigung von durch *B. cereus* bedingten Erkrankungen anzusehen. BACH (1999) nennt als Hauptursachen für lebensmittelbedingte Erkrankungen zu 29 % eine zu frühe Speisenzubereitung, zu 27 % mangelhafte Heißhaltung, zu 26 % mangelhafte Personalhygiene, zu 25 % unzureichende Aufwärmung und zu 9 % Gerätehygienemängel. Die Belastung der Oberflächen mit *B. cereus* in Verpflegungseinrichtungen der Bundeswehr beträgt in einer Studie von ERNST (2003) 14 % (n = 4412). Ebenso wird aufgezeigt, dass bei der Bundeswehr die standardmäßige Verwendung von Amphotensiden zur Desinfektion keine sporozide Wirkung zeigt und lediglich ein Desinfektionsverfahren auf Peressigsäurebasis, selbst unter Eiweißbelastung, eine gute sporozide Wirkung zeigt. Allerdings wurden in dieser Arbeit die Oberflächenmaterialien nicht differenziert und auch nicht den verschiedenen Arbeitsbereichen der Produktion und Distribution von Lebensmitteln zugeordnet, wodurch eine genauere Bestimmung des Vorkommens der potentiellen Toxinbildner bzw. Kontaminationspunkte innerhalb der Lebensmittelproduktion bzw. –behandlung nicht möglich ist.

2.4 Nachweisverfahren für *Bacillus cereus* Toxine

Molekularbiologisch sind genotypische Nachweisverfahren der Enterotoxingene auf Grundlage der PCR (Polymerase Chain Reaction) Methode beschrieben worden (HEINRICHS et al., 1993; RYAN et al., 1997; GRANUM et al., 1999; LUND et al., 2000).

Obwohl in Studien die Korrelation von Gen und Genproduktnachweisen mittels molekularbiologischer bzw. immunchemischer Methoden sehr hoch (HSIEH et al., 1999; STENFORS et al., 2002) war, kommt es bedingt durch Polymorphismus der Genprodukte oder durch fehlende bzw. zu geringe Expression der Genprodukte zu Diskrepanzen bei einzelnen Stämmen (HSIEH et al., 1999; PRÜSS et al., 1999; DIETRICH et al., 2005). Anhand der PCR kann nur das potentielle Toxinbildungsvermögen eines *B. cereus* Stammes festgestellt werden. Eine Aussage über die produzierte Toxinmenge und damit über die tatsächliche Enteropathogenität des Stammes ist nicht möglich.

Für den immunchemischen Nachweis sind kommerziell derzeit zwei Tests, basierend auf polyklonalen Antikörpern, zum Nachweis der L_2-Komponente des Hämolysin-BL-Komplexes (BCET-RPLA Toxin Assay, Oxoid, BEECHER & WONG, 1994) und der NheA-Komponente des Nhe-Komplexes (TECRA-BDE, BEECHER & WONG, 1994; LUND & GRANUM, 1996) erhältlich. Durch die Verwendung von monoklonalen Antikörpern gegen die Einzelkomponenten des HBL und Nhe konnte die Spezifität von immunchemischen Nachweisverfahren deutlich verbessert werden (DIETRICH et al., 1999, 2005). Unter Verwendung dieser monoklonalen Antikörper wurde ein Kolonieimmunoblot-Verfahren entwickelt, mit dem einfach und schnell zwischen HBL- und/oder Nhe-produzierenden *B.-cereus*-Isolaten differenziert werden kann (MORAVEK et al., 2004).

Zu den klassischen *in-vivo* Nachweisverfahren für die Toxizität von *B. cereus*-Enterotoxinen gehören verschiedene Tiermodellanordnungen wie Darmschlingenligationstest (rabbit ileal loop test = RIL; SPIRA & GOEPFERT, 1972), Mäuseletalitätstest (MLT; GLATZ & GOEPFERT, 1973) Gefäßpermeabilitäts-Reaktion (vascular permeability reaction = VPR; GLATZ et al., 1974) sowie der Affenfütterungstest (MELLING et al., 1976). Derartige *in-vivo* Verfahren werden mittlerweile ausschließlich für wissenschaftliche Fragestellungen neuer Aspekte verwendet, wie beispielsweise zum Nachweis der Enterotoxizität neuer Proteine. Gegenwärtig werden die aufwendigen Tiermodelle durch *in-vitro* Bioassays, die sich durch eine einfache Durchführung auszeichnen, ersetzt (THOMSON et al., 1984; KRAMER, 1984). Bei Zellkulturtests wird die Anzahl stoffwechselaktiver Vero-Zellen (Affennierenzellen, SEIDEL et al., 1996) oder CaCo-2-Zellen (Coloncarzinomzellen, DIETRICH et al., 1997) durch spektrometrische Messung der mitrochondrialen Transformationsrate von Tetrazoliumsalzen (WST-Test; MTT-Test; MAUERSBERGER, 1997) bestimmt. Weitere Zellkulturtests wurden von BEATTIE & WILLIAMS (1999) beschrieben. Für alle biologischen Verfahren gilt, dass nur die Gesamttoxizität eines *B. cereus*

Isolates nachgewiesen werden kann und keine Aussage über ein spezifisches *B. cereus*-Enterotoxin getroffen werden kann.

Der Nachweis des emetischen Toxins Cereulid war lange Zeit nur über Versuchstiermodelle möglich. Erst Ende der 80er Jahre wurden verschiedene Zellkultur-Nachweisverfahren vorgestellt, wobei die Pathogenität nur qualitativ visuell ermittelt wurde (HUGHES et al., 1988). Der von FINLAY et al. (1999) beschriebene MTT-Zellkulturtest, der auf einer spektrometrischen Messung des Umwandlungsproduktes eines Tetrazoliumsalzes zu Formazan beruht, erhöht die Spezifität des Toxinnachweises deutlich. Nachdem verschiedenste Zelllinien (CHO, Vero, HeLa, HEp-2) auf ihre Toxinempfindlichkeit untersucht worden sind, belegen die Studien von SZABO et al. (1991) und SAKURAI et al. (1994), dass sich HEp-2 Zellen (human larynx carcinoma) am besten zum Nachweis des emetischen Toxins von *B. cereus* eignen. Die toxische Wirkung von Cereulid führt zur Aufhebung von Membranpotentialen der Mitochondrien von Ebersperma, wodurch es zur Motilitätshemmung der Spermien kommt. Dies wurde von ANDERSSON et al. (1998) zur Erstellung eines Nachweisverfahren genutzt. Die Nachweisgrenze für Cereulid im Ebersperma-Test wird mit 2 ng/ml angegeben (JÄÄSKELÄINEN et al., 2003a). Der chemisch-physikalische Nachweis von Cereulid ist aufgrund der geringen Polarität und des Fehlens von Cereulid als Reinsubstanz schwierig. Jedoch ist in einer Kombination von Hochflüssigkeitschromatographie und Massenspektrometrie (LC-MS) der quantitative Nachweis im pg-Bereich möglich (HAGGBLOM et al., 2002; JÄÄSKELÄINEN et al, 2003b). Molekularbiologisch wurde 2004 von EHLING-SCHULZ et al. die Identifizierung Cereulid-produzierender *B. cereus* mittels PCR Methode beschrieben. Hierbei wird ein DNA-Fragment unbekannter Funktion amplifiziert, welches nur bei emetischen Stämmen nachgewiesen werden konnte.

2.5 Lebensmittel- und Hygieneüberwachung in Verpflegungseinrichtungen der Bundeswehr

Nachdem die Bundeswehr einen der größten Anbieter von Gemeinschaftsverpflegung in der Bundesrepublik Deutschland darstellt (REICHE, 1998), geben Daten, die im Rahmen derartig standardisierter Bedingungen erhoben werden, wertvolle Aussagen bezüglich auftretender Lebensmittelinfektionen und –intoxikationen (KLEER et al., 2001). Aus der Fürsorgepflicht des Dienstherren gegenüber dem zu Verpflegenden ergeben sich für die Lebensmittelhygiene sowie die veterinärmedizinische Lebensmittelüberwachung in der Bundeswehr zusätzliche

Anforderungen und besondere Untersuchungsverpflichtungen. Über die gesetzlichen Regelungen hinausgehende restriktive Hygienebestimmungen können im Rahmen von Dienstvorschriften erlassen werden. Innerhalb der Bundeswehr werden die gesetzlichen Vorgaben und zusätzlichen Anforderungen an die Lebensmittelsicherheit durch Erlasse des Bundesministeriums der Verteidigung, durch Weisungen sowie Zentrale Dienstvorschriften (ZDv) festgelegt und die daraus resultierenden amtlichen Aufgaben im Rahmen der Eigenvollzugskompetenz durch zuständige Stellen und deren Sachverständige wahrgenommen. Die Funktion des Veterinäramtes nimmt das Dezernat Veterinärmedizin der Abteilung Gesundheitswesen der Sanitätskommandos (SanKdo) war. Die Sachverständigen der Sanitätskommandos und die veterinärmedizinisch, lebensmittelchemischen Sachverständigen der Zentralen Institute des Sanitätsdienstes (ZInstSanBw) nehmen gemeinsam die Überwachung der Produktionshygiene, Einrichtungshygiene und Lebensmittelhygiene wahr. Vollzug des Lebensmittel-, Bedarfsgegenstände- und Futtermittelgesetzbuches (LFGB) obliegt den Wehrbereichsverwaltungen, wobei die oberste Behörde für die Überwachung des Verkehrs mit Lebensmitteln und Bedarfsgegenständen in der Bundeswehr das Bundesministerium der Verteidigung (BMVg) mit dem Fachreferat Veterinärmedizin (FüSan I2) darstellt. Die Kernpunkte der LMHV § 3 Satz 1, dass Lebensmittel so hergestellt, behandelt und in den Verkehr gebracht werden müssen, dass sie nicht der Gefahr einer nachteiligen Beeinflussung ausgesetzt werden, und nach ZDv 46/28, dass Lebensmittel bis zur Abgabe so zu behandeln sind, dass sie keiner gesundheitlich bedenklichen, Ekel erregenden oder sonst nachteiligen Beeinflussung ausgesetzt sind, werden innerhalb dieser Strukturen mittels Durchführungsbestimmungen (DBBwLMBG, BMVg, 1999) durch Sanitätsoffiziere Veterinär sichergestellt. Konkret werden Hygienevorschriften für Verpflegungseinrichtungen der Bundeswehr z.B. für Einrichtungen, die Ausstattung der Betriebsstätten und den Umgang mit Lebensmitteln, als Anlagen der ZDv 46/28 aufgeführt. Ziel der ZDv 46/28 ist es, durch umfangreiche Hygienemaßnahmen und Kontrollen, strenge Infrastruktur- und Bedarfsgegenständeanforderungen, sowie Zubereitung und Lagerung der Speisen, die Gefahren durch Lebensmittelinfektions- und -intoxikationserreger zu minimieren.

2.5.1 Reinigung und Desinfektion in Verpflegungseinrichtungen der Bundeswehr

Nach der Zentralen Dienstvorschrift „Lebensmittelhygiene“(ZDv 46/28, 1982) wird Reinigung und Desinfektion wie folgt definiert: „ In Betriebsräumen ist durch Maßnahmen eine einwandfreie Umgebungshygiene zu gewährleisten und so eine Kontamination von Lebensmitteln bei deren Behandlung in Verpflegungs- und Betreuungseinrichtungen mit Krankheitserregern zu verhindern“. Dies bedeutet, dass neben einer ordnungsgemäßen und sachgerechten Durchführung der Reinigungs- und Desinfektionsmaßnahmen bestimmte Anforderungen an Bedarfs- und Einrichtungsgegenstände gestellt sind. Grundsätzlich müssen Bedarfs- und Einrichtungsgegenstände rostbeständig, leicht zu reinigen und zu desinfizieren sein. Oberflächen von Arbeits- und Abgabetischen müssen glatt, riss- und spaltfrei sowie ebenfalls leicht zu reinigen und zu desinfizieren sein. Schneidbretter für Fleisch und Fleischerzeugnisse müssen aus Kunststoff bestehen. Täglich hat sich der zuständige Hygienebeauftragte von der ordnungsgemäßen Durchführung der Reinigungs- und Desinfektionsmaßnahmen zu überzeugen. Der Erfolg der durchgeführten Maßnahmen wird anhand optischer Sauberkeit der nach einem Reinigungs- und Desinfektionsplan gereinigten und desinfizierten Räume, Einrichtungs- und Bedarfsgegenstände beurteilt, wobei als kritische Kontrollpunkte die Konzentration und Einwirkzeit der verwendeten Mittel herangezogen wird. Detaillierte Angaben über die Maßnahmen der Eigenkontrolle sind in der Anlage 13 ZDv 46/28 aufgeführt. Die Wirksamkeit der durchgeführten Reinigungs- und Desinfektionsmaßnahmen wird mindestens einmal jährlich anhand mikrobiologischer Raum- und Geräteuntersuchungen durch die Sachverständigen der Zentralen Institute des Sanitätsdienstes der Bundeswehr überprüft. Nach veterinärmedizinischer Auswertung und Beurteilung der nach Probenplan gewonnenen Proben, werden Korrekturempfehlungen ausgegeben, für deren Umsetzung, Einhaltung und Dokumentation der Hygienebeauftragte verantwortlich ist.

3 Eigene Untersuchungen

3.1 Material

3.1.1 Chemikalien und Biochemika - alphabetisch

Aceton	32201, Riedel-de-Haën
Ammoniumsulfat	Art. 1217, Fa. Merck
Casein	C-8654, Sigma-Aldrich GmbH
Caseinhydrolysat	L41, Fa. Oxoid
Cell Proliferation Reagent WST-1	1644807, Roche Diagnostics
Citronensäure Monohydrat	Art. 00244, Fa. Merck
di- Kaliumhydrogenphosphat	Art. 5101, Fa. Merck
di- Natriumhydrogenphosphat	30427, Riedel-de-Haën
EDTA	E-1644, Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Fetales Kälberserum (FCS)	S-0115, Biochrom KG
D(+)Glucose (Monohydrat)	Art. 8342, Fa. Merck
Hefeextrakt	L21, Oxoid
Kalilauge	09108, Fa. Merck
Kaliumdihydrogenphosphat	104871, Fa. Merck
Lugols Lösung	9261, Fa. Merck
Magnesiumsulfat-Heptahydrat	105886, Fa. Merck
MEM-EARLE Zellkulturmedium	F-0325, Biochrom KG
Methanol	6009, Fa. Merck
Natriumchlorid	31434, Riedel-de-Haën
Natriumhydrogencarbonat	06329, Fa. Merck
Natriumpyruvat-Lösung, 100 mmol/l	L-0473, Biochrom
Schwefelsäure 95 - 97 %	100731, Fa. Merck
Stärke, löslich reinst	1253, Fa. Merck
3,3´,5,5´- Tetramethylbenzidin	T-2885, Sigma-Aldrich Chemie GmbH
tri- Natriumcitrat-Dihydrat	106448, Fa. Merck
Trypsin-EDTA-Lösung	T-3924, Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Tween 20	P-1379, Sigma-Aldrich Chemie GmbH

3.1.2 Nährmedien, Puffer und Lösungen

Probenahme

Blut-RODAC

Blut-Agar Nr.2 (Grundsubstrat), Biologische Analysensysteme GmbH, Best.-Nr.7608

Typische Zusammensetzung (g/l Aqua demin.):

Tryptose	15,0
Sojamehlpepton	2,5
Hefeextrakt	5,0
Natriumchlorid	5,0
Agar Nr.2	12,0

Zusatz:

Defibriniertes steriles Schafblut (70 ml/l)

Hergestellt nach der Verfahrensanweisung NM-240007 ZInstSanBw Koblenz

Cereus-Selektivagar nach MOSSEL (1967)

Cereus-Selektivagar-Basis, Merck, Art.Nr 1.05627

Typische Zusammensetzung (g/l Aqua demin.)

Pepton aus Casein	10,0
Fleischextrakt	1,0
D(-) Mannit	10,0
Natriumchlorid	10,0
Phenolrot	0,025
Agar-Agar	12,0

Zusatz:

Eigelb von frischen Eiern (50 ml / 900 ml Ansatz)

Natriumchlorid- Lösung isotonisch (50 ml / 900 ml Ansatz)

Polymyxin-B-Sulfat (100 000 IE zu 900 ml Ansatz (entspricht 2ml, entspricht 2 Fläschchen Poly.-B-S. 50. 000 IE z.B. Merck Nr. 1.08975)

Hergestellt nach der Verfahrensanweisung NM-24013

Peptonwasser (gepuffert)

Merck, Art. Nr. 1.07228

Typische Zusammensetzung (g/l Aqua demin.)

Peptone	10,0

Natriumchlorid	5,0
di- Natriumhydrogenphosphat- Dodecahydrat	9,0
Kaliumhydrogenphosphat	1,5

Hergestellt nach der Verfahrensanweisung NM- 240082

TSB-Bouillon

Trypton-Soya-Broth, Oxoid CM 129

Typische Zusammensetzung (g/l Aqua demin.):

Caseinpepton	17,0
Sojamehlpepton	3,0
Natriumchlorid	5,0
Dikaliumhydrogenphosphat	2,5
Glucose	2,5

Anreicherungsmedium für B.cereus Diarrhoe-Toxin

Caseinhydrolysat-Bouillon mit 1 % Glucosezusatz (CGY) in Anlehnung an BEECHER & WONG (1994a):

Typische Zusammensetzung (g/100 ml Aqua demin.)

Caseinhydrolysat	2,0
Hefeextrakt	0,6
Ammoniumsulfat	0,2
di- Kaliumhydrogenphosphat	1,4
Kalium-*di*-hydrogenphosphat	0,6
Natriumcitrat	0,1
Magnesiumsulfat	0,2
nach dem Autoklavieren: Glucose	1,0

Medium für Stärkehydrolyse Test

Standard II Nähragar, 1.07883, Fa. Merck mit Zusatz von 1% (g/v) Stärke

Typische Zusammensetzung (g/l Aqua demin.)

Pepton aus Fleisch	3,45
Pepton aus Casein	3,45

Natriumchlorid	5,1
Agar-Agar	13,0
Stärke	10,0

Anreicherungsmedium für B. cereus emetisches Toxin

Magermilch gepulvert (SMM), L31, Oxoid

Typische Zusammensetzung (g/100 ml Aqua demin.)

Magermilch	10,0

Nährmedienträger

Folgende Nährmedienträger wurden bei den durchgeführten Untersuchungen verwendet:

RODAC-Platten mit Rasterfeld (Ø innen: 5,6 cm)

Greiner Labortechnik, Best.Nr. 629161

Petrischalen mit Nocken, 92x16 mm, Sarstedt, Best.Nr. 821473

zur Aufnahme von Blut- und Cereus-Selektiv-Nährmedium

Sterile Abstrichtupfer, Becton Dickinson verwendet,

bezogen über VWR-International, Best.Nr. 1158270

Sterile Gaze Wischtupfer

Enzymimmunoassays (EIA)

Bicarbonatpuffer (0,05 mol/l), pH 9,6)

Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (PBS): 0,01 mol/l, pH 7,3 mit Zusatz von 0,12 mol/NaCl

3% ige Casein/PBS-Lösung (w/v)

Waschlösung: 0,15 mol/l NaCl-Lösung mit Zusatz von 0,025 % Tween 20

Citratpuffer (0,21 mol/l, pH 3,95) mit Zusatz von 3,15 mmol/l Wasserstoffperoxid

Tetramethylbenzidinlösung:

1 mmol/l 3,3´,5,5´-Tetramethylbenzidin in 45 ml Methanol und 5 ml Aceton

Substrat/Chromogenlösung: 20 Teile Citratpuffer und 1 Teil Tetramethylbenzidinlösung

3.1.3 Mikroorganismen und Zellkultur

Bakterien Stämme bzw. Isolate

Referenzstämme aus Stammsammlungen

-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig:

DSM 4184 (MHI 163)- HBL Referenzstamm

-GRANUM et al. (1996): Norwegian Veterinary Highschool

NVH 0075/95 (MHI 241)- Nhe Referenzstamm

B.cereus Isolate

- Isolate die bei epidemiologischen Untersuchungen im Rahmen von Hygienestatuskontrollen in Verpflegungseinrichtungen (Truppenküchen) der Bundeswehr innerhalb des Wehrbereich II (Hessen, Rheinland-Pfalz, Saarland, Nordrhein-Westfalen) isoliert worden waren.
(n = 235)

Zelllinien

HEp-2 Zellen: Humane Larynxkarzinomzellen (Bio Whittaker, Katalognr.71-136B)

Vero-Zellen: African green monkey kidney cells (Bio Whittaker, Katalognr. 76-108B)

3.1.4 Immunreagenzien

Kaninchen-Anti-Maus-IgG-HRP (Dako, P0161)

monoklonale Antikörper (mAk) gegen *B. cereus* Exoproteine:

mAk:	Testsystem:	Exoprotein:	Referenz:
1A12/8A12	I	L_2 (HBL-Komplex)	DIETRICH et al. (1997)
1E11/2B11	II	NheB (Nhe-Komplex)	DIETRICH et al. (2005)

3.1.5 Sonstige Materialien

Sterivex- GV, 0,22 µl (Millipore, SVGV01015)
Sterilfilter Millex-GV (Millipore, SVGV 025 LS)
Mikrotiterplatten (Nunc, Immuno Plate MaxiSorp, 439454)
Variable Zwölfkanalpipette 30-300 µl (Eppendorf,Hamburg)
Cryo Tubes 1,8 ml (Nunc, 363401)
Eppendorf- Reaktionsgefäß, 1,5 ml (Eppendorf, 3810)
Mikrotiterplatten, 96 Loch, Flachboden, steril, (Nunc, 16708)
Zählkammer nach Neubauer
Zellkulturflaschen aus Kunststoff, 175 cm^2 (Nunc, 156502)

3.1.6 Geräte

Akku-Pipettierhilfe (Eppendorf)
Autoklav (H +P Labortechnik GmbH)
Brutschrank (Memmert)
Brutschrank, CO_2-Atmosphäre, 37 °C (Hereaus, Osterode)
Dispenser mit 1,5 ml- Spritzen (LKB Instrument GmbH, Bromma, Schweden)
Kühlzentrifuge Suprafuge 22 (Heraeus, Osterode)
Kühlzentrifuge Multifuge 1 (Heraeus, Osterode)
Laminar-Flow (Heraeus, Osterode)
Mikroskop (Fa. Zeiss, IM)
Mikrotiterplattenlesegerät: SLT-ATC (SLT Labinstruments)
Schüttelwasserbad GFL 1083 (Ges. f. Labortechnik, Burgwedel)
Taumelgerät (Heidorf GmbH)
Titertek Plus (12-Kanal-Pipette) 50-200 µl
Varioklav, Dampfsterilisator (H+P Labortechnik GmbH)
Variable Pipetten 0,5-10 µl, 10-100 µl, 100-1000 µl (Eppendorf)
Variable Pipetten: 0.5-10 µl, 10-100 µl, 50-250 µl, 100-1000 µl (Eppendorf)
Variable Zwölfkanalpipette 50-250 µl (Titertek)
Vortex (Snijders, press-to-mix, 34524)
Waage (Sartorius Excellence)

3.2 Methodik

3.2.1 Probengewinnung

Im Wehrbereich II (Hessen, Saarland, Rheinland-Pfalz, Nordrhein-Westfalen) wurden in 21 Verpflegungseinrichtungen der Bundeswehr verschiedene Oberflächen auf das Vorkommen von *B. cereus* untersucht. Die Oberflächenuntersuchung wurde mittels nicht destruktiver Verfahren (Abklatsch, Abstrich) durchgeführt. So wurden im Zeitraum 2003 bis 2005 insgesamt 1470 Proben von optisch sauberen, trockenen und intakten Oberflächen aus verschiedenen Arbeitsbereichen gezogen. Zur genaueren Probendifferenzierung wurden Proben nach Arbeits- und Materialschwerpunkten gewonnen. Aus fünf verschiedenen Arbeitsbereichen wurden 1260 Oberflächenmaterialien (Polyethylen, V_2A- Stahl, Keramik, Gummi) von Bedarfsgegenständen in fünf verschiedenen Arbeitsbereichen und 210 Oberflächen, der Hände des Personals, beprobt.

Bei abklatschgeeigneten Küchengerätschaften sowie bei Arbeitsflächen (V2A-Stahl Tische, Polypropylen Schneidbretter) wurde mittels RODAC-Platten (Blutagar, Cereus-Selektivagar nach MOSSEL) das jeweilige Oberflächenmaterial beprobt. Die Probenahme erfolgte mit Nährmedien, die mit mäßigem Druck (optimal 200 g/Platte) etwa fünf Sekunden auf die Oberfläche gedrückt wurden. Nach Verschluss der Platten durch einen Deckel wurden diese ins Labor transportiert.

Bei nicht abklatschgeeigneten Gegenständen und Gerätschaften wurde mittels Stieltupfer in der vereinfachten Nass- Tupfertechnik (LOUWERS & KLEIN, 1994a; LOWERS et al. 1997) unter Verwendung eines angefeuchteten Tupfers die Oberfläche beprobt. Zur Probenahme wurde der Stieltupfer von trockenen Oberflächen kurz in das Transportmedium (TSB-Bouillon) getaucht, am Gefäßinnenrand abgestreift und unter Drehen die zu beprobende Fläche abgestrichen. Anschließend wurde der Tupfer im Transportmedium versenkt und durch sterile Metallkappen verschlossen. Nach Verschluss der sterilen Transportmediumgefäße wurden diese in Kühlboxen ins Labor transportiert.

Die Hände des Personals wurden mittels Wischtupferabnahme beprobt. Nach Reinigung und Desinfektion der Hände wurden ca. 5 ml steriles Peptonwasser aufgetragen und mittels steriler Gaze-Streifen, durch reiben zwischen den Handflächen, beprobt und anschließend in 250 ml Schraubgläser mit sterilem Peptonwasser überführt.

3.2.1.1 Probenahmeplan

Grundsätzlich wurde jede Truppenküche nach nachfolgendem Plan beprobt:

Aufteilung der Küche in Arbeitsbereiche:

- Gemüsevorbereitung
- Fleischvorbereitung
- Kühlung
- Garküche
- Ausgabe

Pro Arbeitsbereich wurden jeweils 12 Proben mit nachfolgender Verteilung auf unterschiedlichen Oberflächenmaterialien gezogen:

- 3x V2A-Stahl
- 3x Polypropylen (PE)
- 3x Gummi
- 3x Keramik

Insgesamt wurden pro Küche 70 Proben gezogen. Die Proben verteilten sich auf 60 Oberflächenproben aus fünf verschiedenen Arbeitsbereichen und zehn Wischtupferproben von Händen des Personals. Die jeweilige Probenahmestelle ergab sich innerhalb des Arbeitsbereiches anhand des zu beprobenden Materials. Alle erhoben Daten wurden jeweils in einem Probenahmeprotokoll (siehe Anhang II) festgehalten.

3.2.2 Identifizierung der *Bacillus cereus* Isolate

Das gewonnene Probenmaterial wurde entsprechend dem jeweiligen Ausgangsmaterial im Brutschrank inkubiert und weiterbearbeitet.

Inkubation und Weiterbearbeitung:

- Blut-RODAC-Platten: bei 37 °C über 48 ± 2 h.	Mossel
- Mossel-RODAC-Platten: bei 30 °C über 24 ± 2 h	Blut
- Stieltupfer: bei 37 °C über 24 ± 2 h	Blut/Mossel
- Wischtupfer: bei 37 °C über 24 ± 2 h	Blut/Mossel

Ausgehend vom Erstmedium (Abnahmemedium) wurden zur Bestätigung verdächtiger Kolonien die jeweils ausstehenden Ansätze so angelegt, dass alle verdächtigen Kolonien kulturmorphologisch mittels Cereus-Selektivagar nach MOSSEL und Hämolyse auf Blutagar bestätigt wurden.
Abschließend wurden alle kulturmorphologisch identifizierten *B. cereus* Isolate zusätzlich mikroskopisch anhand morphologischer Kriterien bestätigt.

3.2.3 Charakterisierung der *Bacillus cereus* Isolate

3.2.3.1 Stärkehydrolyse Test

Auf Standard II Nähragar (mit Zusatz von 1% Stärke) wurden *B. cereus* Isolate ausgestrichen und bei 32 °C, 24 h inkubiert. Anschließend wurde eine 1: 5 verdünnte Lugol`sche Lösung auf Einzelkolonien getropft. Bei nicht Stärke hydrolysierenden Kolonien färbte das Lugol`sche Reagenz den Nährboden (Stärke) bläulich und um die Kolonie ist kein farbloser Hof erkennbar. Bei Stärke hydrolysierenden Kolonien zeigt sich der Stärkeabbau anhand eines farblosen Hofes um die Kolonie.

3.2.3.2 Anzuchtbedingungen für *B. cereus* zur Toxinbildung

Die Probenaufbereitung der *B. cereus*- Isolate zur Stimulation der Diarrhoe Toxin-Bildung erfolgte in zwei Anzuchtschritten (Voranreicherung, Anreicherung) und einem Toxin-Gewinnungsschritt (Ernte). Für die Voranreicherung wurde eine Öse von einer *B. cereus* Reinkultur, vorgehalten auf Blutagar, in einen 250 ml Erlenmeyerkolben, beschickt mit 20 ml CGY- Medium, überführt. Dieser Ansatz wurde für 17 Stunden bei 32 °C im Schüttelwasserbad (84 Zyklen/min) inkubiert. Bei der Anreicherung wurden 200 µl der Voranreicherung wiederum in einen, unter sterilen Bedingungen, mit 20 ml CGY-Medium beschickten 250 ml Erlenmeyerkolben überführt. Dieser Ansatz wurde für 6 h bei 32 °C im Schüttelwasserbad inkubiert. Bei der Ernte wurde zunächst der gesamte Ansatz in sterile Zentrifugenröhrchen verbracht und bei 4000 U/min 15 Minuten zentrifugiert. Anschließend wurde mit einer sterilen Einmalspritze der Kulturüberstand abgenommen und das Zentrifugat verworfen. Der so gewonnene Kulturüberstand wurde mittels Sterilfilter in Kryogefäße, beschickt mit EDTA (1mmolar; zur Inaktivierung der von *B. cereus* gebildeten

Metalloproteasen), portioniert und bei –20 °C gelagert, bzw. mittels Enzymimmunoassays analysiert.

Zur Stimulation der emetischen Toxinbildung wurden *B. cereus* Isolate in flüssigem Magermilch-Medium (SMM) angereichert. Hierbei wurde in einer Voranreicherung ein Erlenmeyerkolben (50 ml), der 5 ml BHI-Bouillon enthielt, mit *B. cereus* Isolat mittels einer Öse beimpft und über Nacht bei 30 °C und 84 cpm im Schüttelwasserbad inkubiert. Anschließend wurden Erlenmeyerkolben (500 ml), in denen je 50 ml Magermilch vorgelegt waren, im Verhältnis 1: 100 mit der auf ca. 10^5 KbE/ml verdünnten Voranreicherung beimpft und für weitere 18 h unter den gleichen Bedingungen inkubiert. Danach wurden die Ansätze autoklaviert, präzipitiertes Material aufgeschüttelt und in einer log2-Verdünnungsreihe mittels Zellkulturtest untersucht.

3.2.3.3 Enzymimmunoassay (EIA)

Zur enzymimmunologischen Bestimmung der *B. cereus* Exoproteine kam ein Sandwich-EIA zur Anwendung. Die auf monoklonalen Antikörpern basierenden Tests wurden jeweils nach verifizierter Entwicklung des Lehrstuhls für Hygiene und Technologie der Milch, LMU München, durchgeführt.

Sandwich Enzymimmunoassay für die L_2- und NheB Komponenten

Die Sandwich Technik wurde zum Nachweis der L_2-Komponente des HBL-Komplexes, bzw. die NheB-Komponente des Nhe Komplexes angewendet. Ein spezifischer monoklonaler Antikörper (Fangantikörper 1A12 für HBL, 2B11 für Nhe) wurde im Überschuss an eine feste Phase gebunden. Nach Verbindung mit der L_2-Komponente, bzw. Nhe-Komponente (Ag) im Kulturüberstand wurde der Antigen-Antikörperkomplex mit Enzym markiertem Nachweis-Antikörper (8B12 für HBL, 1E11 für Nhe) überschichtet. Nach Zugabe eines Substrates und nachfolgender enzymatischer Umsetzung wurde das Produkt photometrisch bestimmt. Hierbei ist das gemessene Enzymreaktionsprodukt der Antigenkonzentration direkt proportional.
Durchführung: Monoklonaler Antikörper wurde in Bicarbonatpuffer suspendiert (10 µg/ml) und über Nacht bei Raumtemperatur an die freien Bindungsstellen einer Mikrotiter-Platte

gebunden. Hierzu wurden jeweils 100 µl pro Kavität vorgelegt. Nach Entfernen und Ausklopfen des Überstandes wurden vorhandene, freie Bindungsstellen mit 3 %iger Casein/PBS-Lösung (150 µl/Kavität) 45 Minuten lang abgesättigt. Nach gründlichem Waschen mit NaCl-Tween-Waschlösung wurde durch Vorlage von 160 µl einer 0,5 % Tween/PBS-Lösung mit Zugabe von 40 µl Ag in der ersten Kavität, überpipettieren von 100 µl sowie Vorlage von 100 µl Tween/PBS-Lsg. in alle übrigen Kavitäten eine 1:2 Verdünnungsreihe erstellt. Nach einstündiger Inkubation und erneuten Waschschritten wurden 100 µl/Kavität des entsprechenden Antikörper-Enzymkonjugats (mAk gekoppelt an HRP mittels Perjodat-Methode) zugegeben und wiederum 1 h inkubiert. Nach erneutem Waschen wurden 100 µl/Kavität Substratlösung dem Ansatz zugegeben und die Farbreaktion nach 20 min mit Schwefelsäure (1 mol/l, 100 µl/Kavität) gestoppt. Die photometrische Extinktion der Farbreaktion wurde bei 450 nm mittels Mikrotiterplatten-Lesegerät (Autoreader) bestimmt.

3.2.3.4 Zytotoxizitätstest

Anhand von Zytotoxizitätstests wurde die zelltoxische Wirkung von sterilfiltrierten Kulturüberständen von *B. cereus* auf permanente Zellkulturen überprüft. Die Auswertung erfolgte qualitativ durch mikroskopische Beurteilung der Zellmonolayer und quantitativ durch Messung stoffwechselphysiologischer Parameter.

3.2.3.4.1 Vero-Zellen Zytotoxizitätstest - zum Nachweis der Diarrhoe-Toxine

Zum Nachweis der Diarrhoe Toxine von *B. cereus* wurde nach Anzucht in CGY-Bouillon (modifiziert nach BEECHER & WONG, 1994) mit dem sterilfiltrierten, nicht erhitzten Kulturüberstand und MEM-EARLE Medium eine log- 2 Verdünnungsreihe in einer 96-Loch-Zellkulturplatte hergestellt. Dieser Ansatz wurde für mindestens 22 h bei 37 °C und 5 % CO_2 inkubiert. Nach mikroskopischer Bestätigung eines Zellmonolayers in der Zellkontrolle und deutlicher Schädigung der mit Toxin inkubierten Zellen, erfolgt die Zugabe des Testreagenz (WST; rosa) zum Nachweis des Anteils noch lebender Vero-Zellen. Das Tetrazoliumsalz (WST) wurde durch mitrochondriale Enzyme der noch stoffwechselaktiven Zellen zu Formazan (orange) reduziert. Die Transformationsrate und damit die Anzahl metabolisch

aktiver Zellen wurde nach Inkubation von 60 min bei 37 °C mittels Mikrotiterplatten-Lesegerät bei 450 nm gemessen.

3.2.3.4.2 HEp-Zellen Zytotoxizitätstest - zum Nachweis des emetischen Toxins

HEp-2 Zellen (10^5 Zellen per well) wurden simultan mit seriellen Verdünnungsreihen des autoklavierten SMM-Materials für 48 h bei 37 °C und 5 % CO_2 inkubiert. Zum Nachweis des Anteils noch lebender Zellen in den Kavitäten wurde WST zugegeben. Die Bestimmung der Extinktion des Reduktionsproduktes erfolgte bei 450 nm.

3.3 Ergebnisse

3.3.1 Prävalenz von *Bacillus cereus* Isolaten

Insgesamt wurden 1470 Proben in 21 Verpflegungseinrichtungen der Bundeswehr von Oberflächen und Bedarfsgegenständen in definierten Arbeitsbereichen sowie von Händen des Personals gezogen. Nach biochemischer und kulturmorphologischer Untersuchung der erhaltenen Bakterienkulturen konnten 235 *B. cereus* Isolate identifiziert werden. Dies entspricht einer Gesamtprävalenz von 16 % (Abb. 2). Von der Gesamtprobenzahl verteilte sich das Probenmaterial auf 1260 Proben von Oberflächen und Bedarfsgegenständen und auf 210 Proben der Oberfläche von Händen des Personals. Bezogen auf die jeweilige Gesamtzahl des betrachteten Probenpools, beträgt die Prävalenz von *B. cereus* Stämmen auf Oberflächen von Bedarfsgegenständen 12 % (n = 156; Abb. 3) während das Vorkommen auf den Händen des Personals mit 38 % (n = 79) bestimmt werden konnte (Abb. 4).

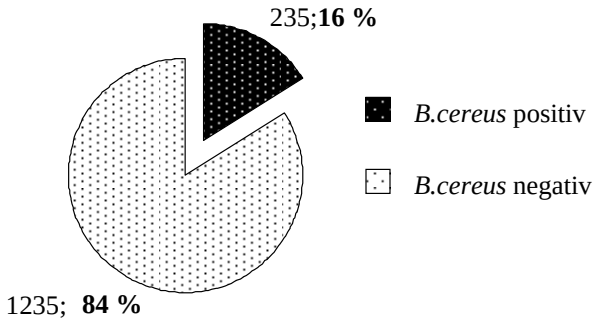


Abbildung 2: Anteil *B. cereus* positiver Proben an der Gesamtprobenzahl (n =1470)

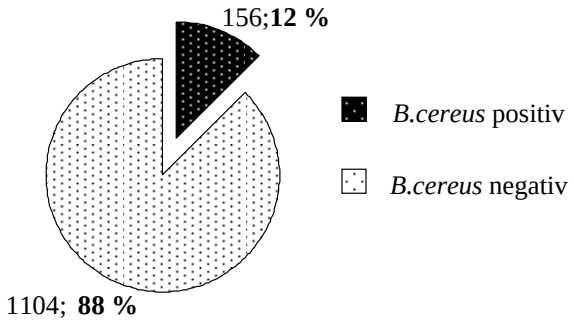


Abbildung 3: Anteil *B. cereus* positiver Isolate an der Gesamtzahl (n = 1260) von Oberflächen und Bedarfsgegenständen

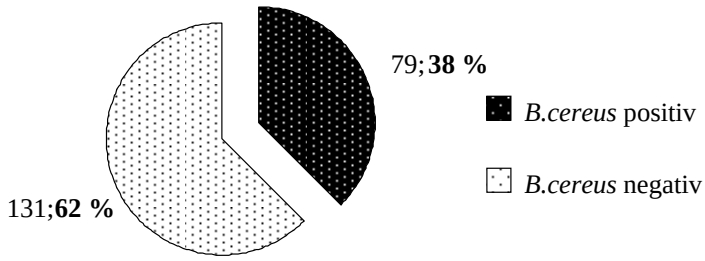


Abbildung 4: Anteil *B. cereus* positiver Isolate an der Gesamtzahl (n = 210) von Händen des Personals

3.3.2 Toxinprävalenz

Mit Hilfe der am Lehrstuhl entwickelten immunologischen und biologischen Methoden zur Charakterisierung der Toxinprofile von *B. cereus* wurden die Isolate untersucht. Mittels Sandwich-EIA (mAk 1E11/ 2B11) konnten bei 99,6 % der Isolate die NheB- Komponente des Nhe-Komplexes bestimmt werden (DIETRICH et al., 2005). Bei 59 % der *B. cereus* Isolate konnte im Sandwichverfahren (mAK 1A12/ 8B12) die L_2-Komponente des HBL-Komplexes nachgewiesen werden (DIETRICH et al., 1999). Des Weiteren konnten mittels PCR und Zellkulturtest 10 *B. cereus* Isolate als Cereulid Produzenten identifiziert werden, was einem Anteil von 4,3 % aller Isolate entspricht (Abb.5).

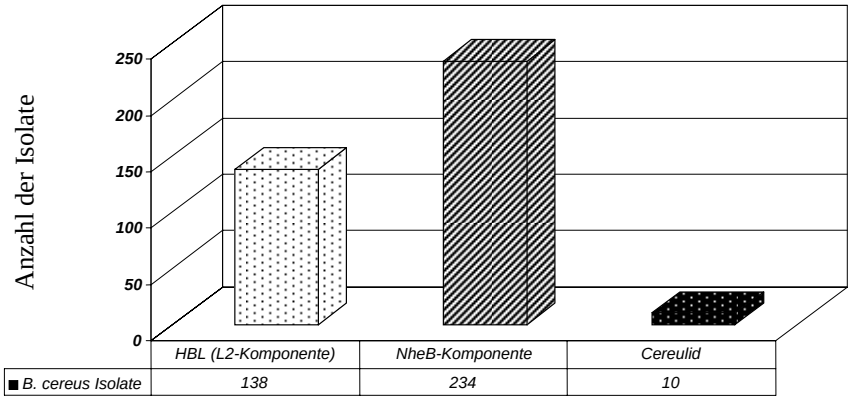


Abbildung 5: Anteil Toxin produzierender Isolate am Gesamtteil der 235 *B. cereus* Isolate

3.3.3 Prävalenz innerhalb der Arbeitsbereiche

Innerhalb der Verpflegungseinrichtungen verteilten sich die 156 isolierten *B. cereus* Stämme in den verschiedenen Arbeitsbereichen wie folgt: 24 Isolate wurden in der Lebensmittelausgabe (Ausgabe), 36 Isolate im Fleischvorbereitungsraum (Fleischvorbereitung), 42 Isolate im Gemüsevorbereitungsraum (Gemüsevorbereitung), 27 Isolate in Kühleinrichtungen (Kühlung) und 27 Isolate in der Garküche gefunden. Die prozentuale Verteilung, der *B. cereus* Isolate in den verschiedenen Arbeitsbereichen, anteilig an der Gesamtzahl auf Bedarfsgegenständen und Oberflächen (exklusiv Hände) ist in Abbildung 6 dargestellt. In Abbildung 6a wurde die prozentuale Verteilung der *B. cereus* Prävalenz im jeweiligen Arbeitsbereich bezogen auf die Gesamtzahl des jeweiligen Bereiches (n = 252) gegen die Gesamtprävalenz (12 %) dargestellt.

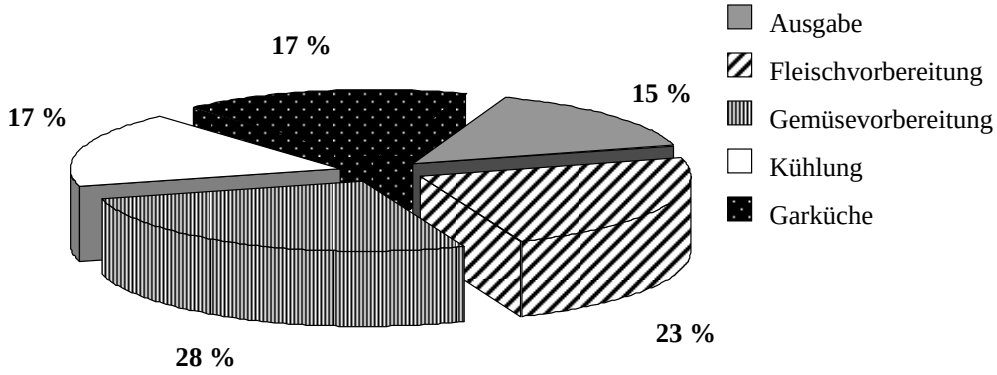


Abbildung 6: Prozentuale Verteilung der 156 *B. cereus* Isolate in den verschiedenen Arbeitsbereichen

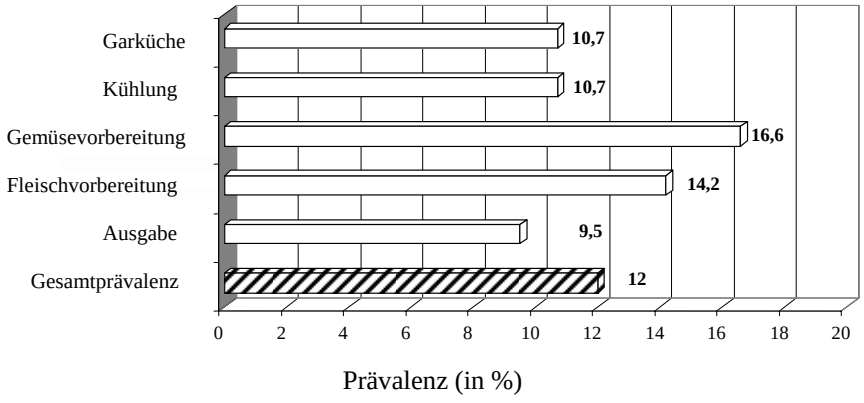


Abbildung 6a: Prozentuale Verteilung der *B. cereus* Prävalenz im jeweiligen Arbeitsbereich, im Vergleich zur Gesamtprävalenz

3.3.4 Prävalenz auf Oberflächen

Ebenfalls wurde die Verteilung der *B. cereus* Isolate (n = 235) auf verschiedenen Oberflächen sowie auf den Handoberflächen des Personals bestimmt. Es wurden 28 Isolate auf dem Oberflächenmaterial Keramik, 34 Isolate auf Polyethylen (PE), 28 Isolate auf V_2A-Stahl und 66 Isolate auf Gummioberflächen sowie 79 Isolate von Händen des Personals isoliert. Die prozentuale Verteilung, der *B. cereus* Isolate auf den verschiedenen Oberflächen gibt Abbildung 7 wieder, während in Abbildung 7a die Verteilung von *B. cereus* auf den verschiedenen Oberflächen, bezogen auf die Gesamtzahl pro Oberfläche, sowie die Gesamtprävalenz dargestellt ist.

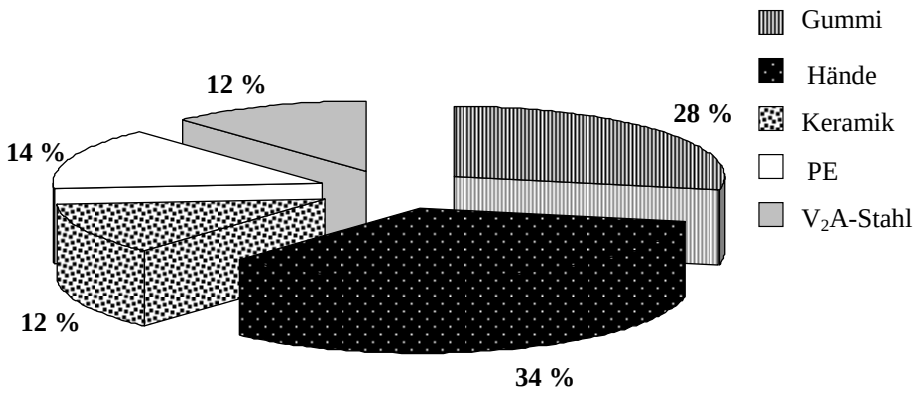


Abbildung 7: Prozentuale Verteilung der 235 *B. cereus* Isolate auf den verschiedenen Oberflächenmaterialien

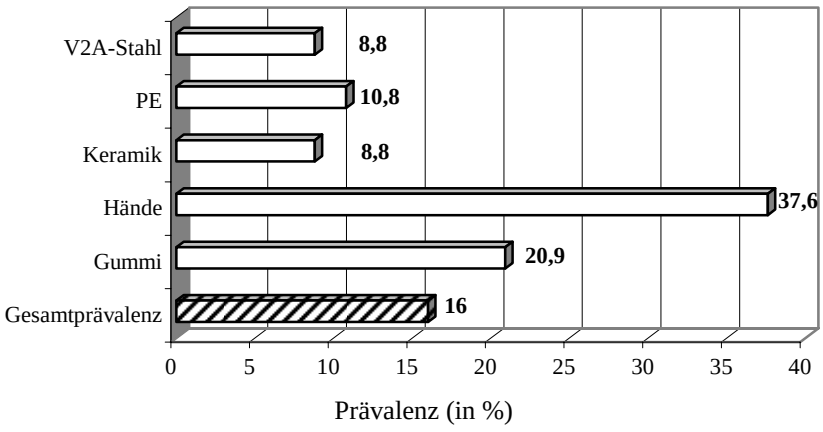


Abbildung 7a: Prozentuale Verteilung der *B. cereus* Isolate auf den verschiedenen Oberflächen bezogen auf die Gesamtzahl pro Oberfläche, im Vergleich zur Gesamtprävalenz

3.3.5 Toxinprofile innerhalb der Arbeitsbereiche

Die genauere Differenzierung der Toxin-bildenden *B. cereus* Isolate, innerhalb der verschiedenen Arbeitsbereiche, nach Toxinprofilen ergab nachfolgende Verteilung: Im Bereich der Kühlung wurden insgesamt 27 *B. cereus* Stämme isoliert, die sich mit drei Isolaten auf V_2A-Stahl-, sechs Isolaten auf Polyethylen-, drei Isolaten auf Keramik- und 15 Isolate auf Gummioberflächen verteilten. Von den isolierten Stämmen aus den Kühlbereichen wurden mittels Sandwich Enzymimmunoassay 27 Isolate mit Nhe Toxinbildungsvermögen und 15 Isolate mit HBL und Nhe Toxinbildungsvermögen (= HBL-Produzenten) detektiert (Abb. 8). Von den isolierten Stämmen waren 12 Isolate nur zur Bildung von Nhe befähigt (reine Nhe- Toxinbildner). Der prozentuale Anteil von Isolaten die HBL- Toxin produzieren, im Bezug auf die Gesamtzahl pro Oberflächen, lag zwischen 0 % und 73 %. Im Bereich der Kühlung wurde kein emetischer *B. cereus* (Cereulid Toxinbildner) Stamm isoliert.

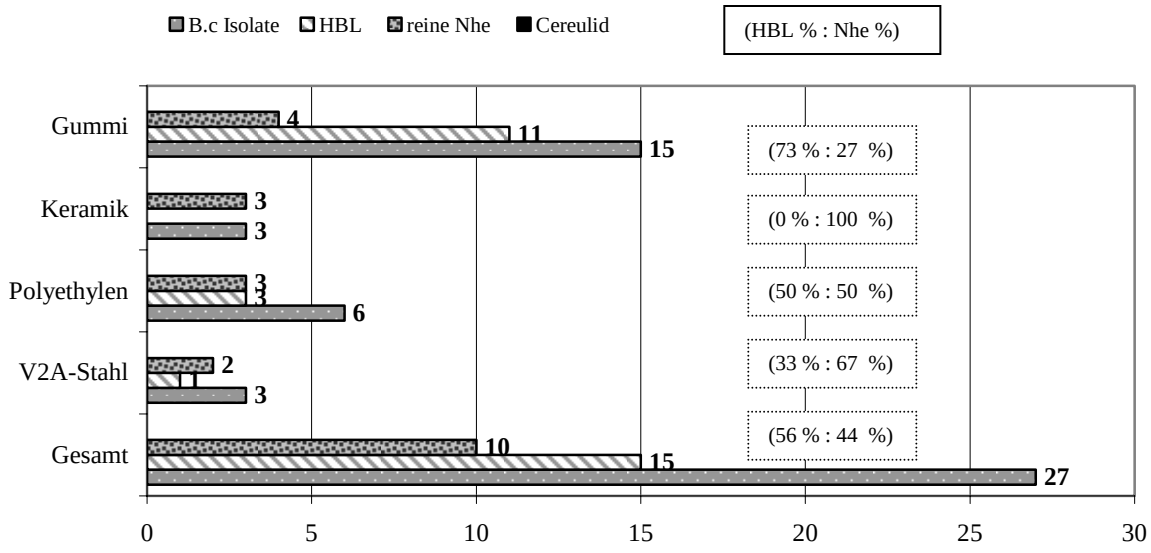


Abbildung 8: Gesamtzahl *B. cereus/* HBL und reine Nhe Toxin produzierende Isolate im Arbeitsbereich Kühlung

In der Gemüsevorbereitung wurden insgesamt 42 *B. cereus* Stämme isoliert. Die Toxinprofile der detektierten Isolate verteilten sich wie folgt: sechs Isolate wurden auf V_2A-Stahl-, zehn Isolate auf Polyethylen-, sieben Isolate auf Keramik- und 19 Isolate auf Gummioberflächen isoliert. Von den 42 Isolaten waren alle in der Lage Nhe Toxin und 30 HBL-Toxin zu

produzieren. Zehn Isolate waren reine Nhe Toxinproduzenten und zwei Isolate konnten das emetische Toxin Cereulid und Nhe Toxin produzieren. Prozentual lag der Anteil an HBL-Toxinproduzenten an der Gesamtzahl *B. cereus* Isolate pro Oberfläche zwischen 57 % und 73 % (Abb.9).

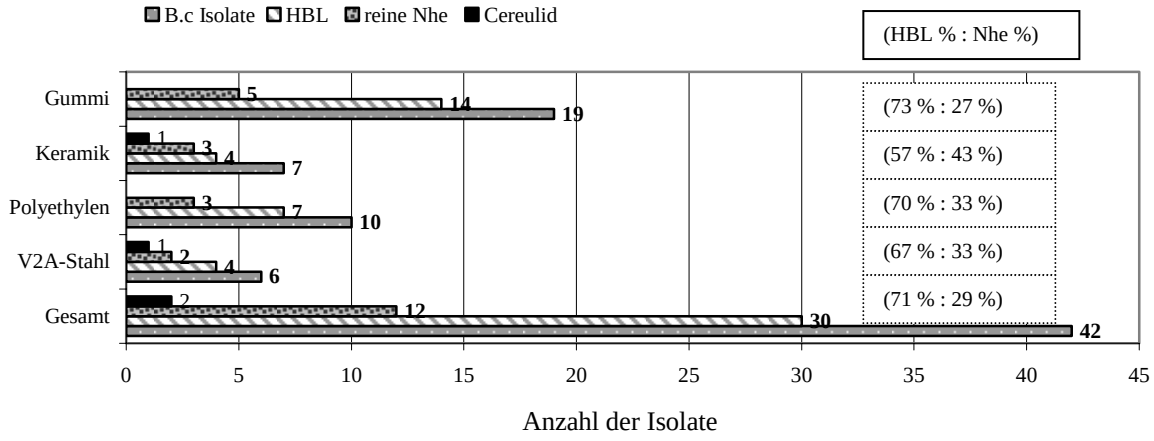


Abbildung 9: Gesamtzahl *B. cereus*/ HBL-/reine Nhe Toxin und Cereulid produzierende Isolate im Arbeitsbereich Gemüsevorbereitung

Für den Bereich der Fleischvorbereitung ergab sich nachfolgende Toxin-Verteilung für insgesamt 36 *B. cereus* Isolate: sieben Isolate wurden auf V_2A Stahl, acht Isolate auf Polyethylen, sieben auf Keramik und 14 auf Gummi isoliert. Von den 36 Isolaten waren 25 HBL-Toxinbildner, 11 reine Nhe-Toxinbildner und zwei Isolate konnten Cereulid/Nhe- Toxin produzieren (Abb. 10). Die prozentuale Verteilung der HBL-Toxin produzierenden Isolate bezogen auf die Oberfläche lag für diesen Arbeitsbereich zwischen 50 % - 85 %.

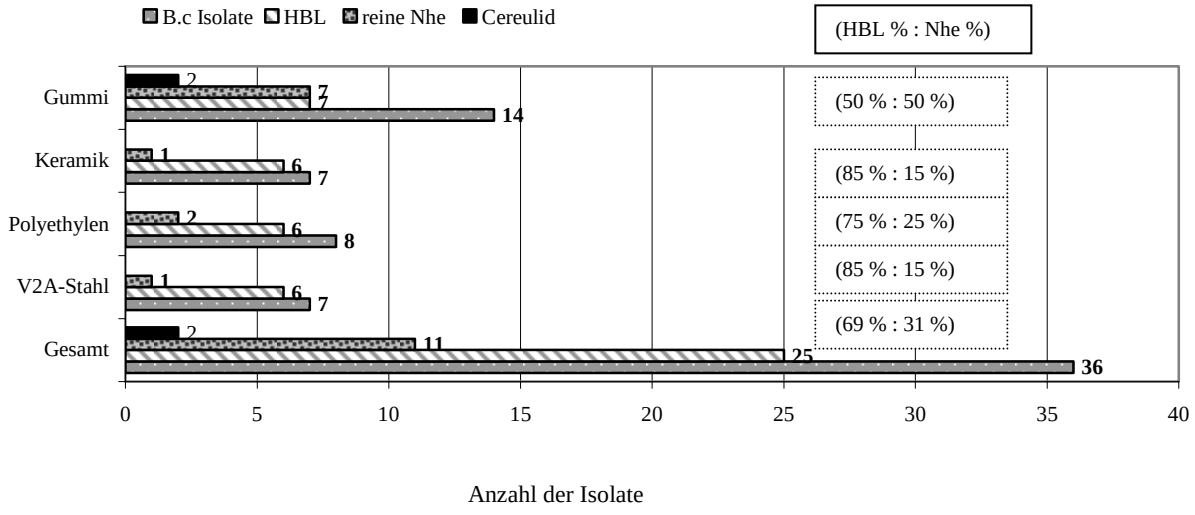


Abbildung 10: Gesamtzahl *B. cereus*/ HBL-/ reine Nhe- und Cereulid Toxin produzierende Isolate im Arbeitsbereich Fleischvorbereitung

Im Bereich der Lebensmittelausgabe ergab sich nachfolgendes Toxinprofil der insgesamt 24 nachgewiesenen *B. cereus* Isolate: Es wurden fünf Isolate auf V_2A-Stahl-, sieben auf Polyethylen-, vier auf Keramik- und acht auf Gummioberflächen isoliert. Von den 24 Isolaten waren zehn in der Lage HBL-Toxin zu produzieren und 14 Isolate hatten nur die Fähigkeit Nhe-Toxin zu bilden (Abb. 11). Ein Isolat war in der Lage Cereulid Toxin zu produzieren. Der prozentuale Anteil der HBL-/ Nhe produzierender Isolate pro Oberfläche lag zwischen 13 % - 75 %.

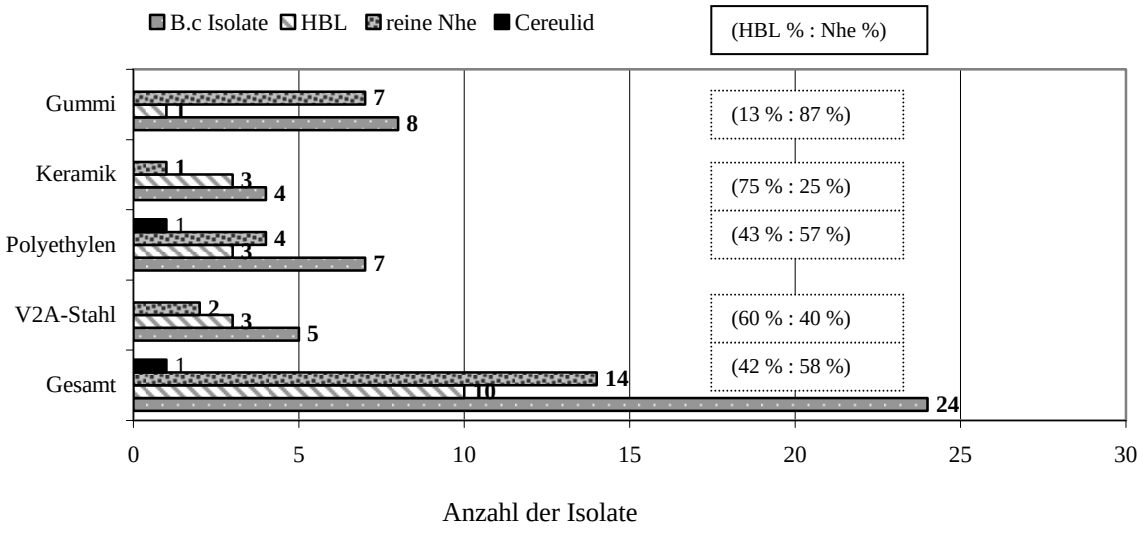


Abbildung 11: Gesamtzahl *B. cereus*/ HBL-/reine Nhe-/ Cereulid Toxin produzierende im Arbeitsbereich Lebensmittelausgabe

Im Bereich der Garküche wurden insgesamt 27 *B. cereus* Isolate nachgewiesen, wobei sich sieben Isolate auf V_2A-Stahl-, drei auf Polyethylen-, sieben auf Keramik- und zehn auf Gummioberflächen verteilten. Von den 27 Isolaten waren 18 in der Lage HBL-Toxin und neun nur Nhe-Toxin zu produzieren. Der prozentuale Anteil der HBL-Toxinproduzenten im Bezug auf die Gesamtzahl der Oberflächen lag zwischen 40 % - 100 %. In diesem Arbeitsbereich wurde kein Isolat gefunden, das Cereulid bilden konnte (Abb. 12).

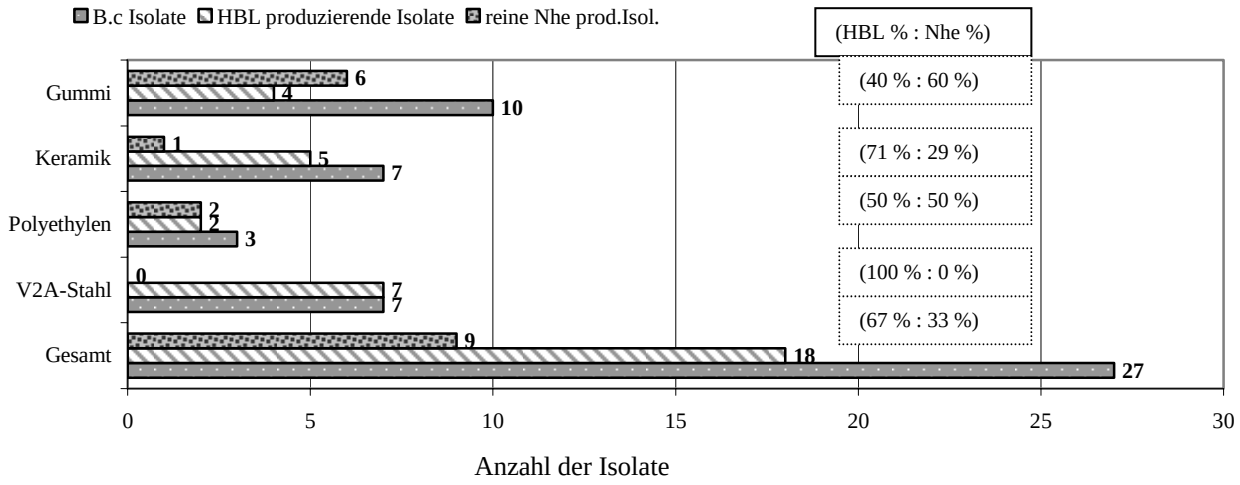
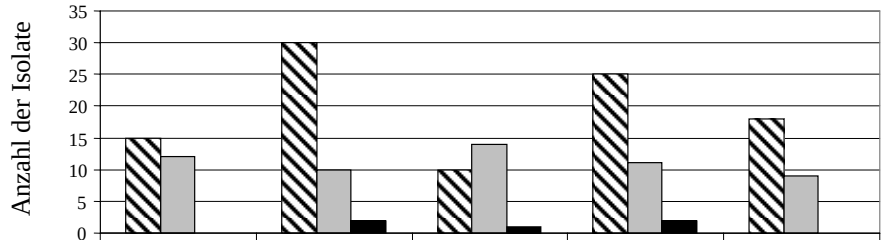


Abbildung 12: Gesamtzahl *B.cereus*/ HBL- / reine Nhe Toxin produzierende Isolate im Arbeitsbereich Garküche

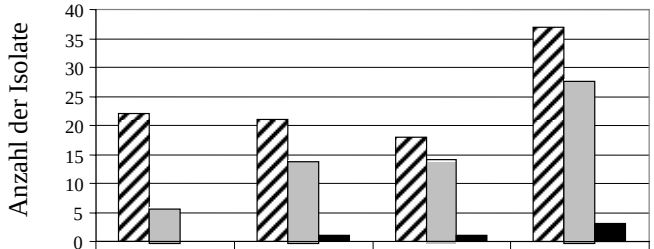
Zusammengefasst ergab sich in den Arbeitsbereichen die höchste Prävalenz von *B. cereus* Isolaten mit HBL-Toxinbildungvermögen in der Gemüsevorbereitung (30 Isolate) und die niedrigste im Bereich der Lebensmittelausgabe (10 Isolate). Für reine Nhe Toxinproduzenten wurde die höchste Prävalenz in der Ausgabe (14 Isolate) und die niedrigste in der Garküche (9 Isolate) bestimmt. Lediglich in den Arbeitsbereichen Gemüsevorbereitung, Ausgabe und Fleischvorbereitung wurden Isolate mit Toxinbildungsvermögen für das emetische Cereulid nachgewiesen, während insgesamt auf die 156 untersuchten *B. cereus* Isolate keine Cereulidbildner im Bereich der Kühlung und in der Garküche nachgewiesen werden konnten (Abb. 13).



	Kühlung	Gemüsevorbereitung	Ausgabe	Fleischvorbereitung	Garküche
HBL prod. Isolate	15	30	10	25	18
reine Nhe prod. Isolate	12	10	14	11	9
Cereulid prod. Isolate	0	2	1	2	0

Abbildung 13: Gesamtzahl Toxin bildender *B. cereus* Isolate pro Arbeitsbereich

Für die definierten Oberflächen ergab sich die höchste Prävalenz für *B. cereus* Isolate sowohl für HBL-Toxinbildner, reine Nhe-Toxinbildner und Cereulidproduzenten auf Gummi, während sich die niedrigste Prävalenz für HBL-Toxin produzierende Isolate auf Keramik, für reine Nhe Toxin sowie für Cereulid produzierende Isolate auf V_2A zeigte (Abb. 14).



	V2A-Stahl	Polyethylen	Keramik	Gummi
HBL produzierende Isolate	22	21	18	37
Nhe produzierende Isolate	6	14	14	28
Cereulid produzierende Isolate	0	1	1	3

Abbildung 14: Gesamtzahl der Toxin bildenden *B. cereus* Isolate pro Oberfläche

Für die Hände des Personals ergab sich eine Gesamtzahl von 79 *B. cereus* Isolaten. Ausgehend von dieser Gesamtzahl lag die Verteilung der Toxin bildenden Isolate für HBL-Produzenten (n = 40) mit 48 % und für reine Nhe Toxin bildenden Isolate (n = 39) mit 46 % ungefähr gleich, während Isolate mit emetischem Toxin Bildungsvermögen (n = 5) bei 6 % lagen (Abb.15).

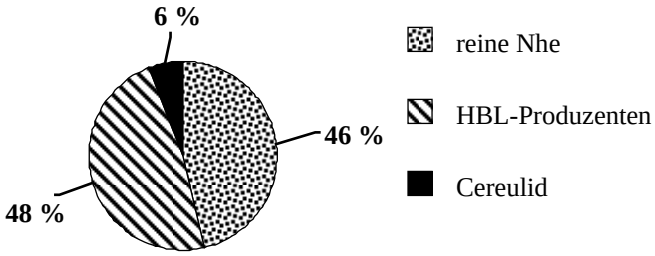


Abbildung 15: Prozentuale Verteilung der 79 Toxin bildenden *B. cereus* Isolate auf den Händen des Personals

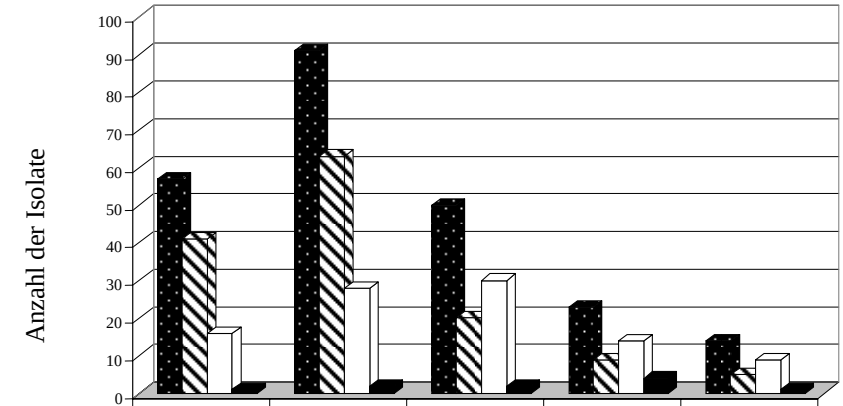
3.3.6 Nhe Toxinproduktivität

Da in der Arbeit von MORAVEK et al. (2006) gezeigt wurde, dass die Zytotoxizität eines *B. cereus* Isolates eng mit dem NheB-Titern korreliert, wurden in dieser Arbeit zur enteropathogenen Risikoabschätzung die NheB-Titer aller Isolate bestimmt. Anhand der Nhe

Toxintiterbestimmung wurden die 235 untersuchten Isolate Nhe Titerstufen zugeordnet. Die Skalierung der Titerstufen wurde in Anlehnung an einen gesicherten und von GRANUM et al. (1996) dokumentierten Vergiftungsfall und das Risikopotential von *B. cereus* Stämmen, für die Lebensmittelhygiene und den Endverbraucher, gewählt. Dieser Referenzstamm (NVH 0075/95) weist einen Toxintiter von ca. 2700 auf, wodurch für die hochpotenten Stämme, den so genannten „high producern" die Titerstufe > 2500 festgelegt wurde. Die weniger relevanten Stämme mit mittlerer Toxinproduktivität, so genannte „middle producer" und geringer Toxinproduktivität, so genannte „low producer" sind in den Titerstufen < 2500 - > 500 und 0 - < 500 zusammengefasst und werden in dieser Arbeit, aufgrund ihrer wahrscheinlich untergeordneten Bedeutung im Hinblick auf Lebensmittelvergiftungen, nicht weiter detailliert betrachtet.

Grundsätzlich lag die Toxinproduktivität bei den 235 untersuchten *B. cereus* Isolaten im Mittel mit einem Titer von 2571 bei den reinen Nhe Toxinproduzenten höher als bei den Nhe und HBL Toxinproduzenten mit einem Toxintitermittelwert von 1466.

Aufgrund der Titerstufenfestlegung sind 234 Nhe Toxinbildnern (von insgesamt 235 *B. cereus* Isolaten, wovon bei einem Isolat kein Nhe Toxin sowie HBL-Toxin Aktivität nachzuweisen war) 16 % (n = 37) „high producer", 60 % „middle producer (n = 141) und 24 % (n = 57) „low producer" für das Nhe Toxin. Die Gesamtzahl der Nhe Toxin „high producer" unterteilte sich in 14 HBL- und Nhe-Toxinproduzenten und 23 reine Nhe-Toxin produzierende Isolate. Für den mittleren Bereich wurden insgesamt 83 Isolate mit HBL und Nhe-Toxinbildungsvermögen und 58 reine Nhe Toxinproduzenten isoliert. Für den „low producer" Bereich konnten 41 Isolate HBL und Nhe und 16 Isolate nur Nhe-Toxin produzieren. Die Anzahl Cereulid produzierender *B. cereus* Isolate war im Bereich der Nhe Toxin „high producer" mit fünf Isolaten gleich der Anzahl der zusammen gefassten mittleren und unteren Toxinproduktivitätsbereich. Der höchste Cereulid Titer mit 1887 wurde bei dem Stamm nachgewiesen welcher keine Nhe und HBL Toxinaktivität zeigte (Abb. 16).



	0 - < 500	> 500 - < 1500	> 1500 - < 2500	> 2500 - < 3500	> 3500
■ *B.cereus* Isolate	57	91	50	23	14
▩ HBL	41	63	20	9	5
□ reine Nhe	16	28	30	14	9
■ Cereulid	1	2	2	4	1

Abbildung 16: Zuordnung der HBL-, reine Nhe- und Cereulid Toxinproduzenten zu Nhe-Titerstufen

3.3.7 Toxinproduktivität der *B. cereus* Stämme innerhalb der Arbeitsbereiche

Anhand der Nhe-Titerstufen wurden weitere Betrachtungen der 156 Isolate, von Oberflächen und Bedarfsgegenständen, vorgenommen. Die Verteilung der Isolate mit HBL-, Nhe- und Cereulid Toxinbildungsvermögen innerhalb der definierten Arbeitsbereiche, bezogen auf die festgelegten Produktivitätsbereiche, wurde in Abbildung 17 – 19 dargestellt. Für den „high producer“ Bereich zeigte sich die Anzahl der HBL- (n = 13) und reinen Nhe-Toxinproduzenten (n = 13) insgesamt ausgeglichen. Die Anzahl der Cereulid (n = 3) Produzenten war, bezogen auf die anderen Produktivitätsbereiche, im „high producer“ Bereich am höchsten. Innerhalb der Arbeitsbereiche zeigte sich, für hohe Toxinproduktivität, die Bereiche Gemüsevorbereitung und Fleischvorbereitung als sensibel sowohl für die Gesamtzahl an Toxinbildnern (n = 8), wie auch für eine höhere zytotoxische Aktivität, unter Hinzunahme der Cereulid und Nhe-Toxinbildnern zur Gesamtzahl der reinen Nhe-Bildnern (n = 16) (Abb. 17). Der höchste Anteil der Isolate lag im Bereich der „middle producer“ (n = 93), wobei die Prävalenz zugunsten der HBL-Produzenten (n = 52) verschoben war (Abb. 18). Dieser Trend setzte sich im „low producer“ Bereich weiter fort, wo 85 % der isolierten Stämme in der Lage waren HBL zu produzieren. 15 % der Isolate waren reine Nhe-Toxinproduzenten und innerhalb dieses Toxinproduktivitätsbereichs wurde kein Cereulid produzierender Stamm isoliert (Abb. 19).

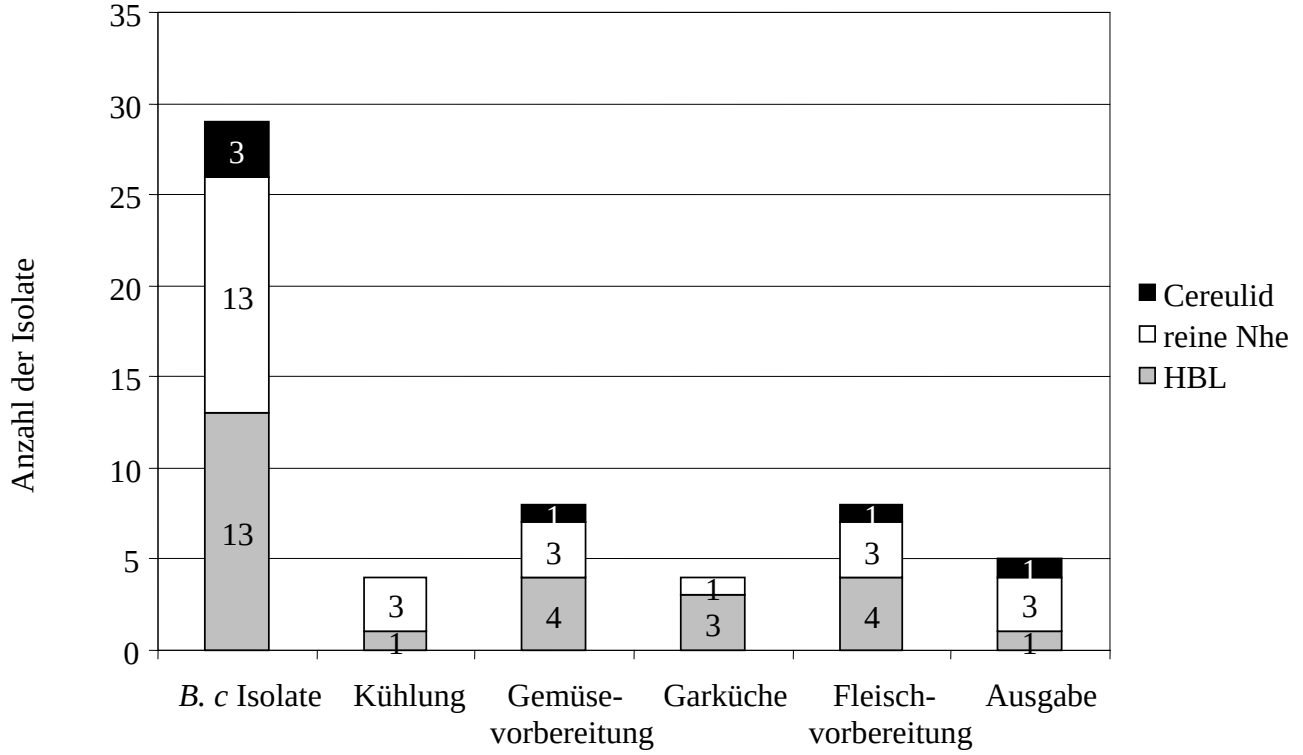


Abbildung 17: Anzahl und Verteilung der Toxinproduzenten in den jeweiligen Arbeitsbereichen im „high producer“ Titerbereich **NheB > 2500**

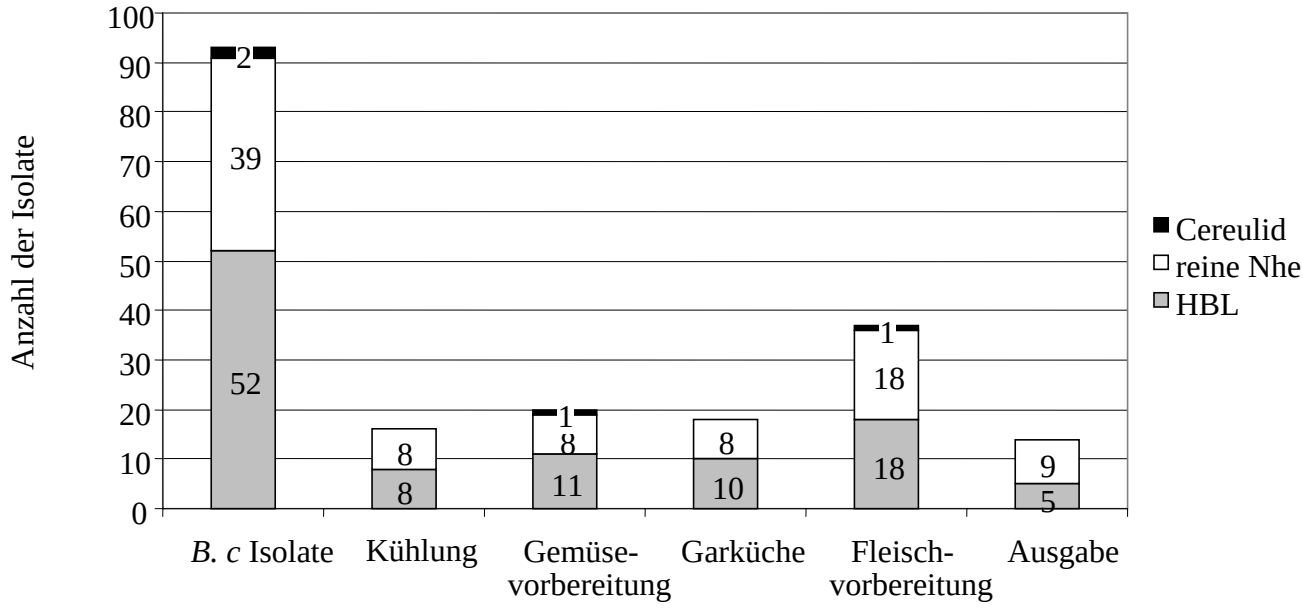


Abbildung 18: Anzahl und Verteilung der Toxinproduzenten in den jeweiligen Arbeitsbereichen im „middle producer“ Titerbereich **NheB > 500 - < 2500**

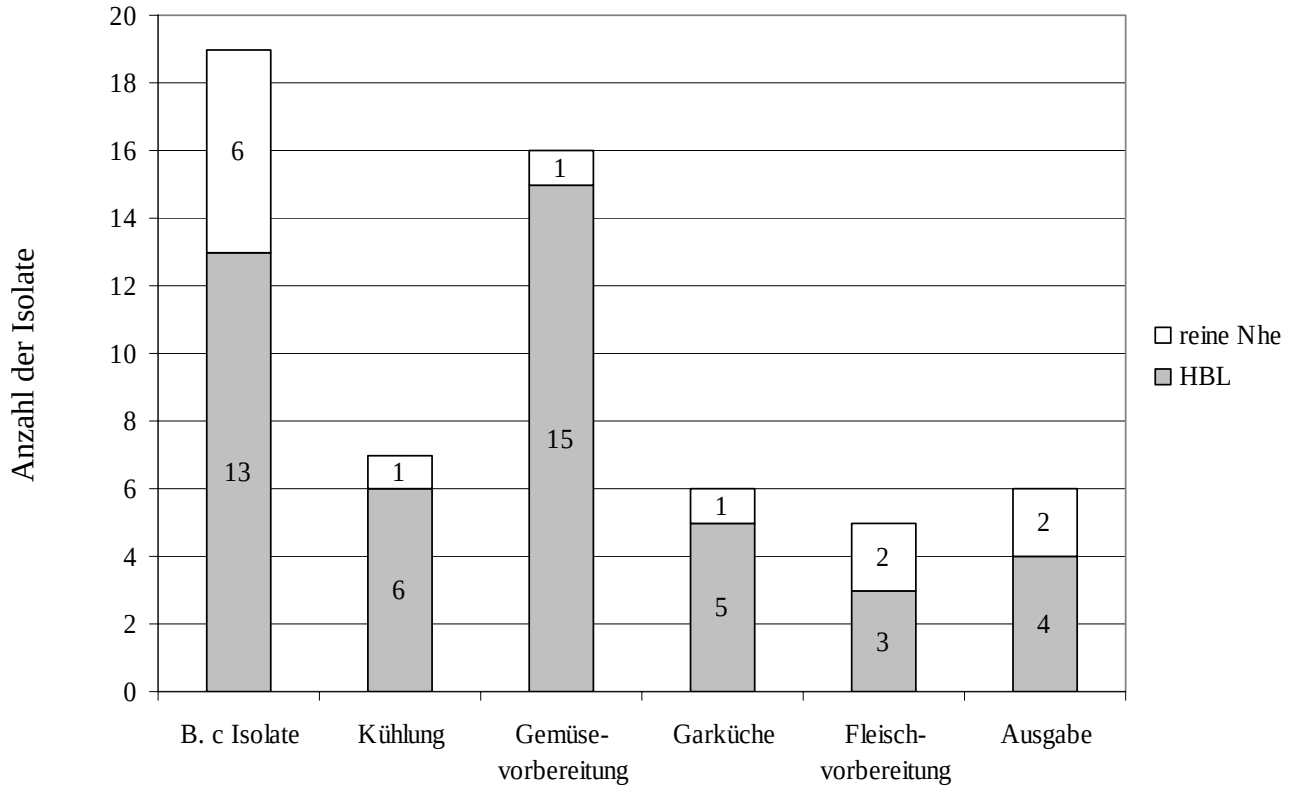


Abbildung 19: Anzahl und Verteilung der Toxinproduzenten in den jeweiligen Arbeitsbereichen im „low producer“ Titerbereich **NheB 0 - < 500**

3.3.8 Toxinproduktivität der *B. cereus* Stämme auf Oberflächen

Für die definierten Oberflächen Gummi und Hände wurde gegenüber den anderen Oberflächen eine deutlich höhere Gesamtzahl an *B. cereus* Isolaten bestimmt, was insbesondere für die Oberfläche Hände aufgrund der vor der Probenahme durchgeführten Reinigung und Desinfektion ein überraschendes Ergebnis darstellt. Wie aus der Toxingesamtverteilung (Abb. 16) zu erwarten war, überwogen die reinen Nhe-Produzenten im „high producer“ Bereich bei Händen, Keramik und Gummi sehr deutlich, während sich dieses Verhältnis bei V_2A-Stahl und Polyethylen nicht wieder finden ließ. Auffällig war der hohe Anteil an „high producern“ bei der Oberfläche Keramik, bezogen auf die Gesamtzahl der Isolate im Vergleich zu den übrigen Oberflächen „high producer“ Anteilen.
Bei der Analyse der Toxinprävalenz auf den verschiedenen Oberflächen fiel auf, dass die Prävalenz von HBL-Toxinproduzenten auf Stahl mit 78,6 % (n = 22) deutlich erhöht war, verglichen mit der Gesamtverteilung von HBL-Toxinproduzenten, welche mit 59 % (n = 138) bestimmt wurde. Die Verteilung der HBL-Toxinproduzenten orientierte sich bei den übrigen Oberflächen im Bereich der Gesamtverteilung zwischen 51 % - 63 % (Abb. 20 – 24).

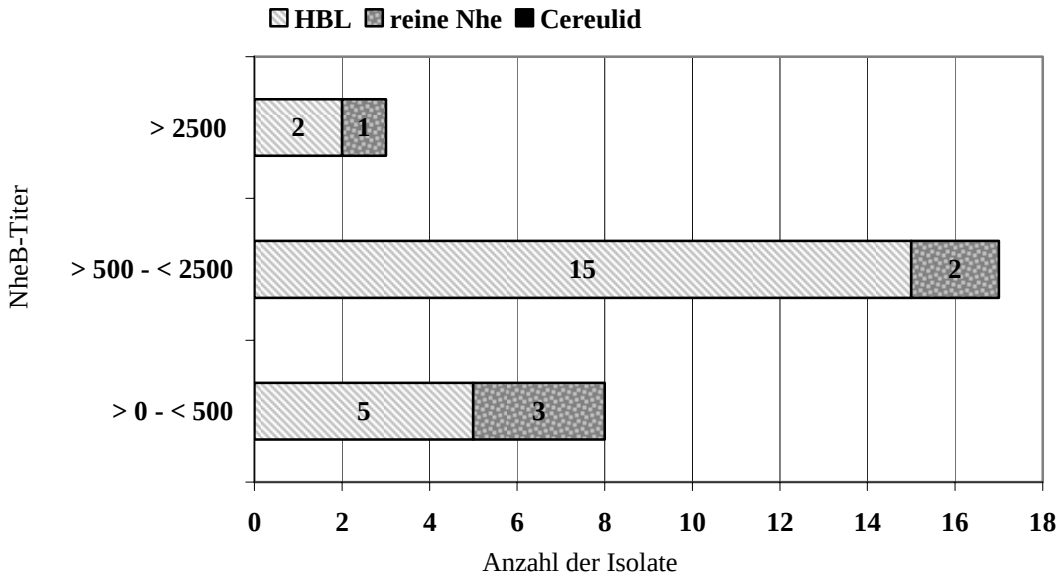


Abbildung 20: Anzahl und Verteilung der Toxinproduzenten (HBL 79 %; Nhe 21 %) auf der Oberfläche **V_2A-Stahl** bei verschiedenen NheB Titerstufen

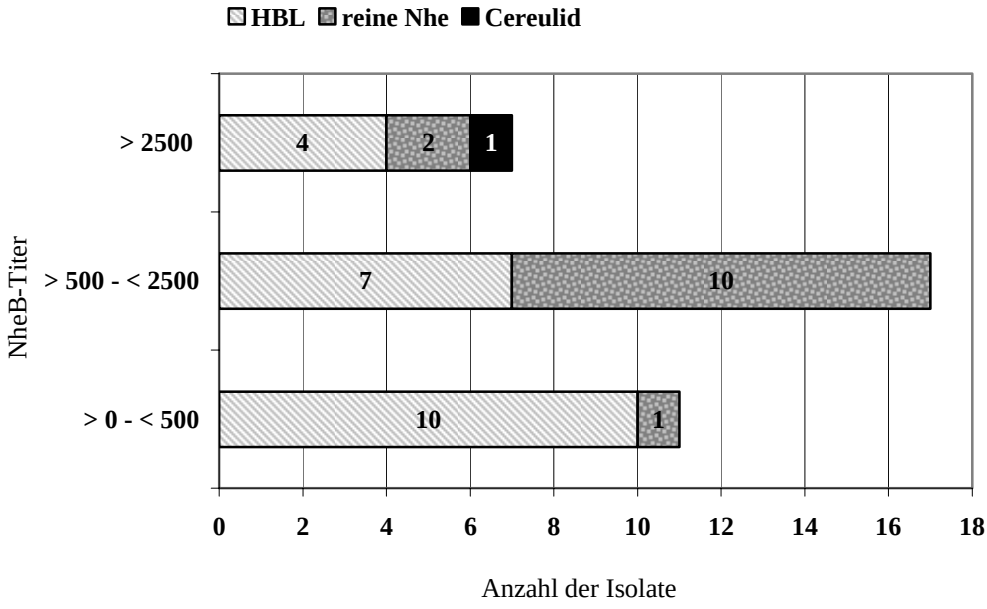


Abbildung 21: Anzahl und Verteilung der Toxinproduzenten (HBL 60 %; Nhe 37 %, Cereulid 2,8 %) auf der Oberfläche **Polyethylen** bei verschiedenen Titerstufen

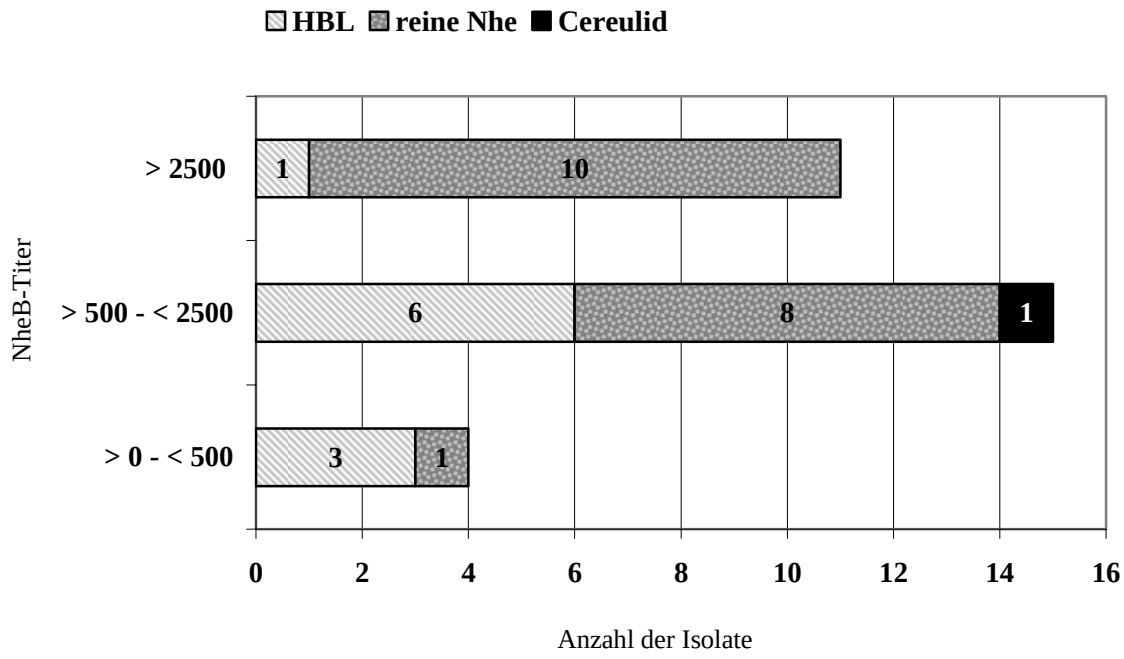


Abbildung 22: Anzahl und Verteilung der Toxinproduzenten (HBL 63 %; Nhe 33 %; Cereulid 4 %) auf der Oberfläche **Keramik** bei verschiedenen Titerstufen

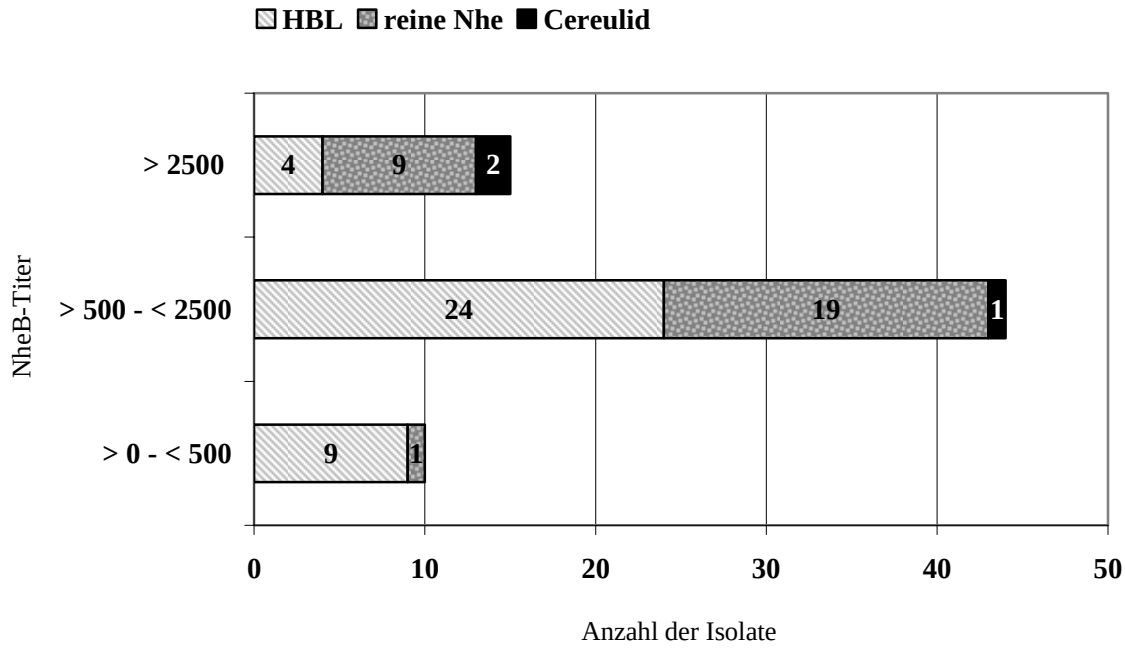


Abbildung 23: Anzahl und Verteilung der Toxinproduzenten (HBL 35 %; Nhe 61 %; Cereulid 4%) auf der Oberfläche **Gummi** bei verschiedenen Titerstufen

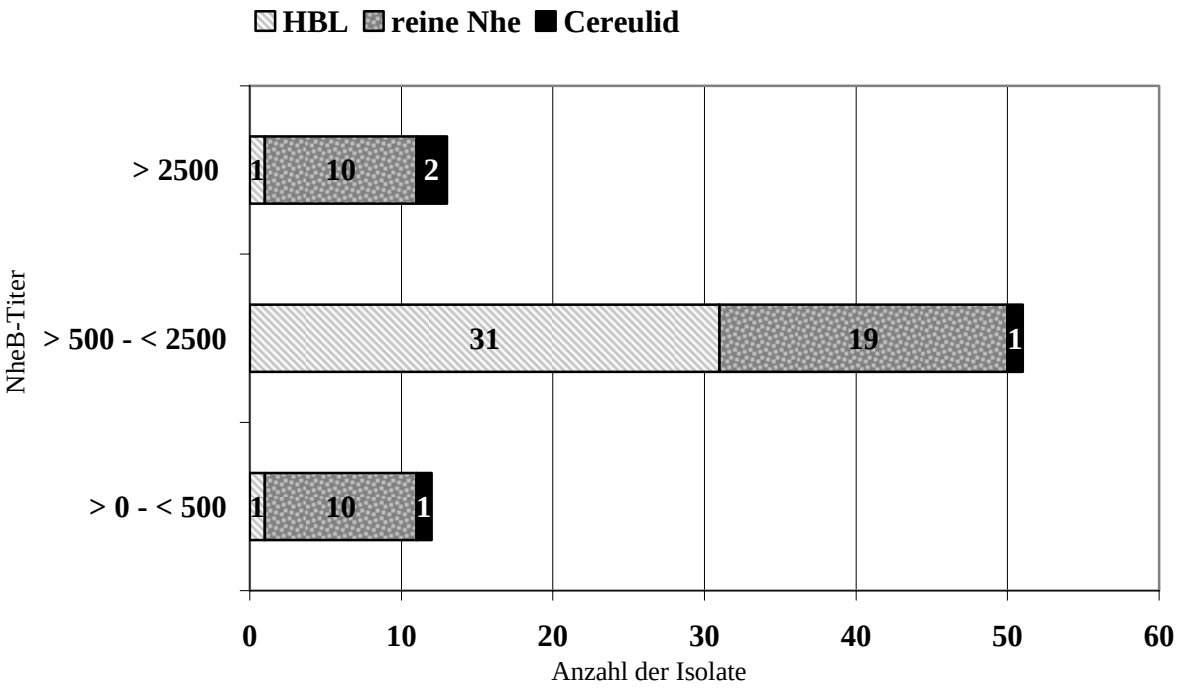


Abbildung 24: Anzahl und Verteilung der Toxinproduzenten (HBL 51 %; Nhe 44 %; Cereulid 5%) auf der Oberfläche **Hände** bei verschiedenen Titerstufen

3.3.9 Cereulid Produktivität

Das emetische Toxin konnte insgesamt bei 10 *B. cereus* Isolaten nachgewiesen werden, was einen Anteil von 4,2 % entspricht. Die Isolate sind alle nicht in der Lage Stärke zu hydrolysieren (Stärke negativ) und weisen sehr divergierende zytotoxische Aktivität gegenüber HEp-2 Zellen auf. Die Toxinproduktivität der Einzelisolate liegt zwischen sieben und 1800. Bei der prozentualen Verteilung wurden 50 % der Toxinbildner (n = 5) auf Händen des Personals isoliert, 30 % auf der Oberfläche Gummi (n = 3) und jeweils 10 % (n = 1) auf den Oberflächen Keramik und Polyethylen.

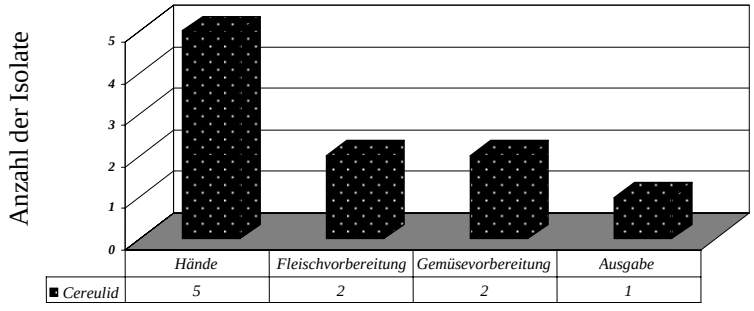


Abbildung 25: Verteilung der Cereulidproduzenten

Die höchste Toxinmenge wurde bei einem Hände Isolat ermittelt, welches weder in der Lage war Nhe-, noch HBL-Toxin zu produzieren (Tab. 1). Insgesamt wurden alle höheren Cereulid Titer auf Händen des Personals ermittelt und die niedrigen Titer auf den verschiedenen Oberflächen. Auch bei den verschiedenen Arbeitsbereichen dominieren die Hände (n = 5) gefolgt von den Bereichen Fleisch- und Gemüsevorbereitung (n = 2) sowie der Ausgabe in der lediglich ein Isolat nachgewiesen wurde (Abb. 25).

Tabelle 1: Cereulid-Titer Verteilung

	Isolat	**MHI**	**Stärke**	**Hep**	**NHE B -SW**	**L2-SW**	**Arbeitsbereich**	**Probenahmepunkt**	**Oberfläche**
1	*6960*	*2286*	*negativ*	*1887*	*0*	*0*	*Hände Personal*	*Hände*	*Hände*
2	*7406*	*2315*	*negativ*	*1389*	*2112*	*0*	*Hände Personal*	*Hände*	*Hände*
3	*2206*	*2014*	*negativ*	*201*	*2611*	*0*	*Hände Personal*	*Hände*	*Hände*
4	*2202*	*2013*	*negativ*	*147*	*3261*	*0*	*Hände Personal*	*Hände*	*Hände*
5	*6913*	*2278*	*negativ*	*144*	*2784*	*0*	*Fleischvorbereitung*	*Messerköcher*	*Gummi*
6	*2193*	*2011*	*negativ*	*37*	*2918*	*0*	*Ausgabe*	*Abdeckung*	*PE*
7	*3873*	*2058*	*negativ*	*37*	*946*	*0*	*Hände Personal*	*Hände*	*Hände*
8	*3827*	*2052*	*negativ*	*22*	*1453*	*0*	*Fleischvorbereitung*	*Bedienfeld-Küchenmaschine*	*Gummi*
9	*3817*	*2049*	*negativ*	*13*	*3622*	*0*	*Gemüsevorbereitung*	*Dichtung -Behälter*	*Gummi*
10	*2793*	*2038*	*negativ*	*7*	*2490*	*0*	*Gemüsevorbereitung*	*Wandfliese*	*Keramik*
11	Referenz Stamm	165	*negativ*	**1047**	**1637**	0	DSM 4312 ; Braunschweig (emetischer Referenzstamm)		

3.3.10 Prävalenz in Verpflegungseinrichtungen

Die Auswertung der Einzelküchen ergab im Mittel eine *B. cereus* Prävalenz von 11 Isolaten, wobei die minimale Belastung bei 3 Isolaten und die maximale Belastung bei 22 Isolaten lag. Bei 21 Verpflegungseinrichtungen ergab sich eine Gesamtprävalenz für *B. cereus* von 16 %. Bei der Einzelbetrachtung ergibt sich jedoch eine Prävalenz von *B. cereus* Isolaten von maximal 31 % (Küche O; n = 22) sowie eine minimale Belastung in einer Verpflegungseinrichtung von 4 % (Küche E; n = 3). Für Bedarfsgegenstände und Oberflächen liegt im Mittel eine *B. cereus* Gesamtbelastung von 12 % vor, wobei die maximale Prävalenz bei 27 % (Küche O; n = 16) lag und die minimale Prävalenz in einer Verpflegungseinrichtung bei 3 % (Küche E; n = 2). Für die Hände war die Abweichung der Belastungsgrenze vom Mittelwert noch deutlich höher. Im Mittel lag die *B. cereus* Belastung auf Händen des Personals, in 21 Verpflegungseinrichtungen der Bundeswehr, bei 37 %, während in einer

Verpflegungseinrichtung ein Maximalwert von 70 % (n = 7) vorlag und im Gegenzug in zwei Verpflegungseinrichtungen keinerlei Belastung von *B. cereus* auf Händen des Personals festgestellt wurde. Bei den Verpflegungseinrichtungen ohne Belastung auf Händen lag einmal eine niedrige Gesamtbelastung (Küche E; n = 3) und im anderen Fall eine hohe Gesamtbelastung vor (Küche R; n = 12), (Abb. 26 und 27).

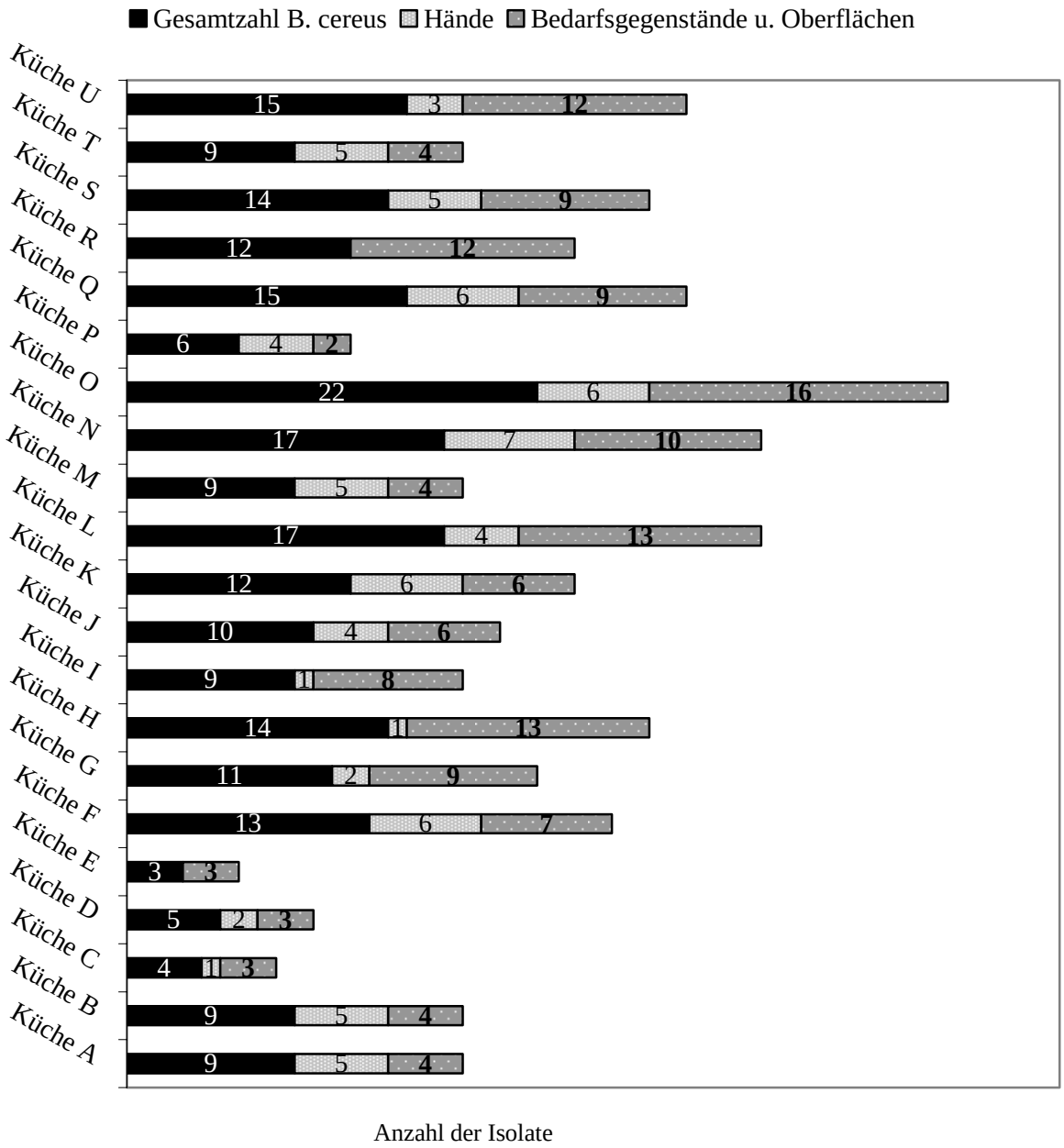


Abbildung 26: Anzahl *B. cereus* Isolate in 21 Verpflegungseinrichtungen der Bundeswehr

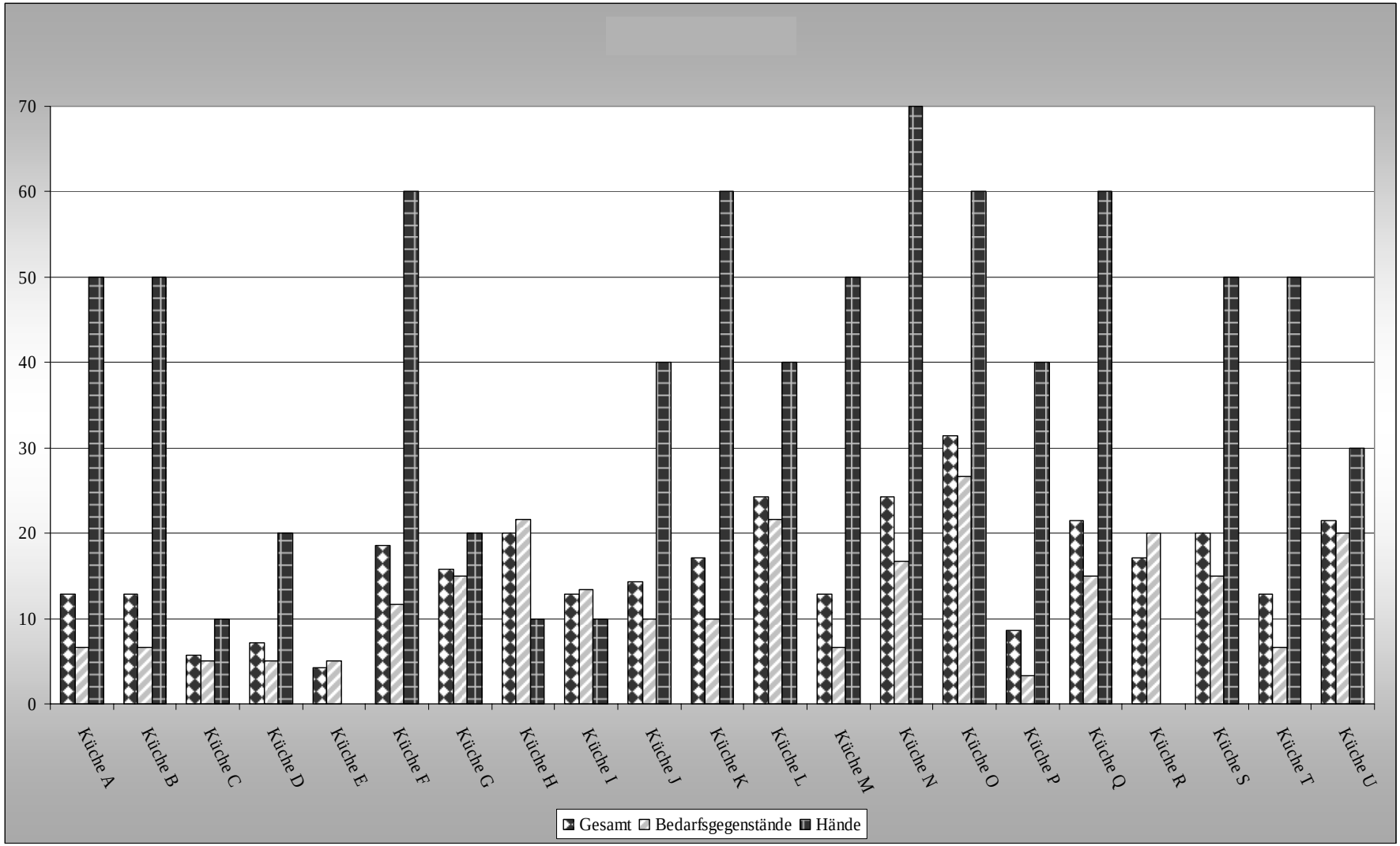


Abbildung 27: Gesamtprävalenz, Prävalenz auf Bedarfsgegenständen und Oberflächen und Händen von *B. cereus* pro Verpflegungseinrichtung

4 Diskussion

B. cereus gilt aufgrund seines Toxinbildungsvermögens als Problemkeim in der Lebensmitteltechnologie und –hygiene. Die Diskrepanz zwischen seinem ubiquitären Vorkommen in der Umwelt und in Lebensmitteln und der geringen Anzahl an bekannt gewordenen Krankheitsausbrüchen liegt in erster Linie an fehlenden, differenzierten und quantifizierten Daten. Eine exakte Datenerhebung über die Häufigkeit durch *B. cereus* - bedingter Erkrankungen ist nur unzureichend möglich, da diese nach dem Infektionsschutzgesetz (IfSG) nicht meldepflichtig sind und der überwiegend milde Krankheitsverlauf zu einer hohen Dunkelziffer führt. Für den Bereich der Bundeswehr sorgt die Pflicht zur Meldung von gehäuftem Auftreten einer Symptomatik (ab fünf erkrankten Soldaten), die umfangreiche Vorschriftenlage (ZDv) zur Überwachung sowie die alleinige Zuständigkeit eines Arztes für den überwiegenden Teil aller Verpflegungsteilnehmer für umfangreiches, epidemiologisches Datenmaterial. So zeigten Erhebungen (WHO, 1993-1998) für Europa stark variable Häufigkeiten von *B. cereus*-bedingten Ausbrüchen mit 0,3 % in Spanien und 18,2 % in Norwegen, während Daten von KLEER et al. (2001) für den Bereich der Bundeswehr einen Anteil von 52 % bei Lebensmittelinfektionen angeben. Angesichts der hohen Bedeutung von *B. cereus* in der Gemeinschaftsverpflegung und in Anlehnung an die Untersuchungen von ERNST (2003), die eine Prävalenz von *B. cereus* von 14 % auf Oberflächen innerhalb von Verpflegungseinrichtungen feststellte, wurde mit dieser Arbeit versucht eventuelle Oberflächen bzw. Arbeitsbereiche mit erhöhtem Vorkommen von *B. cereus* zu identifizieren und die Isolate im Hinblick auf das Toxinbildungsvermögen näher zu charakterisieren.

Untersuchungen zur Risikominimierung, im Hinblick auf den Eintrag ins Lebensmittel, basieren weitestgehend auf groben Prävalenzstudien und Keimzahlbestimmungen. Nach neuerem Kenntnisstand ist eine fundierte Aussage zum enterotoxischen Potential von *B. cereus* Isolaten, aufgrund stark divergierender Toxinproduktivität, nur mittels Quantifizierung der Toxinproduktion der Isolate möglich (MORAVEK et al., 2006). Für die Analyse von präsumtiv enterotoxischen Isolaten wurde ein definierter Probenpool aus verschiedenen Arbeitsbereichen, von Oberflächen und Bedarfsgegenständen bzw. von den Händen des Personals innerhalb der Verpflegungseinrichtungen, gezogen.

Die undifferenzierte Erhebung der Prävalenz von *B. cereus* im gesamten Probenpool (n = 1470) ergab 16 %. Die Auswertung des Datenmaterials hinsichtlich des Vorkommens von *B. cereus* auf Oberflächen und Bedarfsgegenständen mit 12 % entspricht etwa der von ERNST (2003) ermittelten Prävalenz von 14 % in Verpflegungseinrichtungen der Bundeswehr.

Wird der Anteil der *B. cereus* Isolate innerhalb der Arbeitsbereiche bezogen auf den Probenpool Bedarfgegenstände angegeben (n = 156), zeigt sich für die Gemüsevorbereitung mit 28 % und für die Fleischvorbereitung mit 23 % eine deutlich höhere Belastung, als für die Bereiche Ausgabe, Kühlung und Garküche (15 %, 17 % bzw. 17 %). Wird als Bezugsgröße das Vorkommen auf Bedarfsgegenständen betrachtet (12 %) zeigten sich ebenfalls für die Arbeitsbereiche Gemüse- und Fleischvorbereitung eine höhere Belastung (16,6 %, 14,2 %), während die Nachweishäufigkeit in Ausgabe, Kühlung und Garküche (9,5 %, 10,7 % bzw. 10,7) unter der durchschnittlichen Belastung liegen. Im Bereich Gemüsevorbereitung ist diese Erhöhung auf den Eintrag höher kontaminierter Ausgangsmaterialien (SINELL, 1992) zurückzuführen. Zur Ausgangskontamination von Fleisch sind bis jetzt nur wenige Studien veröffentlicht worden, die eine Kontaminationsrate von 2 % - 34 %, je nach Fleischbeschaffenheit, angeben (KRAMER & GILBERT, 1989; WONG et al., 2005). Allerdings weisen Studien (FAILLE et al., 2002; PENG et al., 2002) darauf hin, dass *B. cereus* auf hydrophoben Oberflächen stärkere Adhäsionseigenschaften und in Biofilmen stärkere Resistenzeigenschaften gegenüber Reinigungs- und Desinfektionsmaßnahmen entwickelt, was für eine bleibende bzw. grundsätzlich höhere Grundbelastung in der Fleischvorbereitung sprechen könnte. Die Studie von GÜVEN et al. (2005) ermittelt in rohem Fleisch eine Belastung mit *B. cereus* von 10^3 KbE/g, die in Fleischprodukten (Wurstprodukten) noch höher ausfällt. Die Erklärung des Autors, dass hoch belastete Zutaten (Gewürze etc.), der Herstellungsprozess selbst sowie die durch Fermentationsprozesse geförderte Sporenauskeimung für die ermittelte hohe Belastung bei Fleischprodukten durch *B. cereus* verantwortlich sind, kann aufgrund des hohen Anteils an verarbeiteten Fleischprodukten innerhalb der Fleischvorbereitung ebenfalls angenommen werden.

Des Weiteren wurden die Ergebnisse der unterschiedlichen Oberflächen (inklusive Hände) miteinander verglichen. Dabei übersteigt der Anteil positiver Proben von Händen (34 %) und Gummi (28 %), den der Gesamtzahl aller Proben (16 %) deutlich. Während für die Ergebnisse der Hände fehlende bzw. mangelhafte Personalhygiene verantwortlich zu machen ist, müssen für die Oberflächen Gummi verschiedenste Faktoren berücksichtigt werden. Zu dieser Gruppe

gehören überwiegend Dichtungen von Geräten und Bedarfsgegenständen sowie Gerätebedienfelder. Diese Probenahmepunkte sind meist fest mit der Gerätschaft verbunden (Kessel, Behälter), schwer zugänglich (Konvektomat, Kühleinheit) oder aufgrund der Nähe von Elektrik sensibel (Bedienfeldabdeckung). Diese verschiedenen Verwendungszwecke von Gummi in Großküchen unterliegen zusätzlich unterschiedlichen Reinigungs- und Desinfektionsmaßnahmen und Intervallen (nach Gebrauch, arbeitstäglich, monatlich oder Organisationsabhängig). Des Weiteren ist bekannt, dass Gummi durch den Verlust von Weichmachern im Verwendungsverlauf spröde wird, was zu einer Oberflächenzunahme nicht unerheblichen Maßes führt. Die Vergrößerung der Oberfläche im Zusammenhang mit fehlender oder mangelhafter Reinigung- und Desinfektion bzw. unterschiedlichen Intervallen könnte zu besseren Vermehrungsbedingungen für *B. cereus* und zu einer höheren Belastung führen. Die Probenahmepunkte von V_2A- Stahl (Arbeitstische, Behälter, Kessel, Messer etc.), Polyethylen (Schneidbretter, Behälter, Küchenwerkzeuge etc.) und Keramik (Fliesen, Geschirr) sind allesamt überwiegend leicht zu reinigen und desinfizieren sowie leicht zugänglich. Die Ergebnisse zeigen, dass die Maßnahmen nach ZDv 46/28 auf leicht zu reinigenden bzw. leicht zugänglichen Gegenständen durchaus greifen bzw. eine annähernd gleich bleibende Wirkung auf die Gesamtbelastung ausüben. Bei Berücksichtigung der Ergebnisse von ERNST (2003), die die unzureichende Wirkung gegenwärtig verwendeter Desinfektionsmittel (Amphotensiede) ohne sporozide Wirkung belegen, ließe sich die Keimreduktion für diese Bereiche, durch Verwendung geeigneter Mittel, noch deutlich steigern.

Auch das Datenmaterial der Einzelküchen liefert, je nach Betrachtungsmodus, sehr differente Informationen. Während im Durchschnitt 16 % positive Proben in Verpflegungseinrichtungen nachgewiesen werden konnten, zeigt die Einzelbetrachtung grundsätzlich andere Belastungswerte. Die Maximalbelastung in einer Küche lag bei 31 % und die Minimalbelastung bei 4 %, wobei die häufigste Belastung mit 13 % ermittelt wurde. Derartige Schwankungsbreiten zeigen die Schwierigkeit der Interpretation von Durchschnittsdaten zur Risikoeinschätzung auf. Diese Ergebnisse sind weder mit der fehlenden Wirksamkeit von Desinfektionsmitteln noch mit unzureichenden Hygienebestimmungen zu erklären und es lässt sich kein grundsätzliches Belastungsmuster erkennen. Des Weiteren kann für die Einzelbetrachtung der Küchen festgestellt werden, dass das Personal eine überproprotional hohe und gleichzeitig schwankende Einflussgröße für die *B. cereus* Belastung darstellt, was in der Gesamtdatenauswertung untergeht. Insgesamt wird deutlich, dass zur Risikoabschätzung

der verwendete Probenpool bzw. die zu betrachtende Bezugsgröße genau bestimmt werden muss, um aussagekräftige Zahlenwerte zu erhalten, an denen Rückschlüsse für eine Risikobewertung gezogen werden können.

Nach Charakterisierung der *B. cereus*-Isolate hinsichtlich ihres Potentials Diarrhoe-Toxine zu bilden, deckt sich die Toxinverteilung (HBL und Nhe) aller Isolate mit den Ergebnissen mehrerer Studien (MORAVEK et al., 2006; PRÜSS et al., 1999; HANSEN & HENDRIKSEN, 2001; IN`T VELD et al., 2001) insoweit, dass in der vorliegenden Arbeit 59 % der Isolate in der Lage waren HBL zu produzieren. Gleichfalls konnte bei fast allen Isolaten (99,6 %), wie in den oben genannten Studien, das Nhe Toxin nachgewiesen werden. Betrachtet man die Prävalenz von HBL- Produzenten in den einzelnen Arbeitsbereichen, ergibt sich ebenfalls ein ähnliches Verhältnis von HBL zu Nhe Produzenten wie in der Literatur angegeben. Bei genauerer Betrachtung der Oberflächen innerhalb der Arbeitsbereiche fallen jedoch stark divergierende Verhältnisse auf. So zeigte sich z.B. in der Garküche auf der Oberfläche V_2A-Stahl eine 100 %ige Belastung mit HBL-Produzenten. Generell erhöhte Vorkommen von HBL-Produzenten wurden in der Fleischvorbereitung, außer auf der Oberfläche Gummi, auf allen Oberflächen nachgewiesen. Ein hoher Anteil HBL-positiver Isolate wurde auch in der Gemüsevorbereitung mit 83 % auf V_2A- Stahl gefunden. Während in der Kühlung mit 0 % auf Keramik und in der Ausgabe mit 13 % auf dem Oberflächenmaterial Gummi sehr niedrige Werte nachgewiesen wurden. Aufgrund der Auffälligkeit dieser Abweichungen von in der Literatur mehrfach angegebenen Daten zum Toxinbildungsvermögen, kann angenommen werden, dass für deren Ausprägung Umweltfaktoren verantwortlich sind. Möglicherweise besitzen bestimmte *B. cereus*-Stämme durch ihre je nach Toxinprofil unterschiedlichen Enzymprofile einen Selektionsvorteil auf diversen Oberflächen. Als Beispiel für differierende Enzymexpression kann die unterschiedliche Fähigkeit zur Stärkehydrolyse je nach Toxinprofil angeführt werden.

Entgegen früherer Daten (LINDBÄCK et al., 1999; GRANUM et al., 1997), weisen die Ergebnisse in Zytotoxizitätstests von MORAVEK et al. (2006) darauf hin, dass für das enterotoxische Potential der Nhe-Toxinkomplex eine größere Rolle für die Zytotoxizität und damit auch für das Krankheitsgeschehen spielt als der HBL-Komplex. Anhand der Toxinmenge aus Kulturüberständen wurde festgestellt, dass im Zellkulturtest Isolate mit HBL- und Nhe-Produktivität niedrigere Titer und somit eine geringere Zytotoxizität aufwiesen als reine Nhe-Toxinproduzenten. Aufgrund dieser Ergebnisse wurden in dieser

Arbeit die Nhe-Titer aller Isolate bestimmt, um bei einem eventuell nachweisbaren „high producer“-Verteilungsmuster effizientere Aussagen für die Risikominimierung treffen zu können.

Nach MORAVEK et al. (2006) sind die produzierten Toxinmengen bei Umwelt- und Lebensmittelisolaten geringer als bei Stämmen, die mit Lebensmittelvergiftungen in Zusammenhang stehen, wobei als Ursache für die Pathogenität eines *B. cereus*-Isolates wahrscheinlich weitere Faktoren mit einzubeziehen sind. Der Autor führt hierzu kurze Generationszeiten, Säurestabilität bei der Magenpassage und Adhärenz-Eigenschaften der *B. cereus*-Sporen als mögliche Virulenzfaktoren an. Der überwiegende Teil der Isolate verteilt sich auf den „middle-“ und „low producer“-Bereich, lediglich 16 % der Isolate sind „high producer“. Dieses Ergebnis deckt sich mit der Arbeit von BORCHARD (2001). In den Arbeitsbereichen Gemüse- und Fleischvorbereitung ist die Anzahl der isolierten „high producer“ (n = 7 bzw. n = 9) am höchsten. Auffällig war, dass auf der Oberfläche V_2A- Stahl trotz hoher Gesamtbelastung, der Anteil (10 %) an „high producern“ eher gering ausfällt, während auf der Oberfläche Keramik bei hoher Gesamtbelastung auch der Anteil (36 %) an „high producern“ hoch ist. Der überwiegende Anteil der Probenahmepunkte bei Keramik waren Wandfliesen der Arbeitsbereiche. Keramik wird aufgrund seiner glatten Oberfläche sowie guten Reinigungs- und Desinfektionseigenschaften als Standardmaterial in Küchenbereichen verwendet, wobei sich die Reinigungs- und Desinfektionsmaßnahmen nach makroskopischen Kriterien ausrichten. Die Durchführung von Raumreinigungsmaßnahmen wird aufgrund des hohen Zeitaufwandes und aus Personalmangel selten im notwendigen Umfang durchgeführt, wobei das Material Keramik durch augenscheinliche Sauberkeit eine falsche Hygienesicherheit vermittelt. Die Ergebnisse zeigen jedoch, dass sich eine derart subjektive Annahme objektiv nicht halten lässt. Bei vermeintlich sauberen Küchenräumlichkeiten in Kombination mit den Ergebnissen der *B. cereus*-Belastung auf den Händen des Personals wird deutlich, dass ein nicht unerhebliches Risiko einer Belastung von Lebensmitteln durch Kreuzkontaminationen besteht.

B. cereus-Stämme mit emetischem Toxinbildungsvermögen sind obligat pathogene Keime deren Prävalenz in Lebensmitteln mit ca. 2 % (SCHULZ, 2004; ERBSLÖH, 2006; ALTAYAR & SUTHERLAND, 2005) angegeben wird. Der Anteil Cereulidbildner an allen *B. cereus*-Isolaten (n = 235), ist mit 4,3 % doppelt so hoch wie in den genannten Studien. Allerdings berichten AGATA et al. (1996) sowie BEATTIE & WILLIAMS (1999) von weitaus höheren Prävalenzen emetischer Toxinbildner (31 % bzw. 40 %). Die erstgenannten

Literaturangaben zu Cereulid-Bildnern in Lebensmitteln decken sich mit den Daten der Isolate aller Arbeitsbereiche (n = 156; 3,2 %) und aller Oberflächen (n = 235; 2,1 %) dieser Arbeit, während das Vorkommen auf Händen des Personals mit 6,3 % ermittelt wurde. Auffälligerweise wurden 50 % aller isolierten Cereulid-Bildner auf den Händen des Personals gefunden. Sowohl die hohe Gesamtprävalenz (38 %), als auch das Toxinprofilverteilungsmuster (Cereulid 6%) lässt sich anhand der häufigen Reinigung und Desinfektion der Hände in engen Zeitintervallen selbst bei Verwendung ungeeigneter Reinigungs- und Desinfektionsmittel nicht erklären, da es in allen Arbeitsbereichen und auf allen Oberflächen nach erfolgter Reinigung und Desinfektion zu einer Keimzahlreduktion kam. Bei Betrachtung der Cereulid-Produzenten im Hinblick auf die Einzelküchendaten fiel in einer Küche (G) das Vorkommen auf Händen des Personals sowie das Vorkommen in den Arbeitsbereichen Gemüse- und Fleischvorbereitung auf, wobei anhand ähnlicher Toxintiter aller Isolate von einem möglichen epidemiologischen Zusammenhang ausgegangen werden muss. Für die Prävention von Lebensmittelintoxikationen durch Cereulid ist die Kühlung der Ausgangsprodukte, bzw. eine möglichst kurze Lagerzeit im für die Vermehrung kritischen Temperaturbereich unbedingt einzuhalten. Die fatalen Folgen einer falschen Lebensmittelbehandlung bzw. falschen Lagerung verzehrsfertiger Produkte sind in zwei dokumentierten Fallbeispielen beschrieben (MAHLER et al., 1997; DIERICK et al., 2005).

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass nur genau definierte Daten zum Vorkommen und zum Toxinbildungsvermögen sich in reale Konsequenzen bzw. kritische Kontrollpunkte innerhalb der Lebensmittelhygiene umwandeln lassen und somit zur Minimierung des Kreuz- bzw. Rekontaminationsrisikos durch *B. cereus* beitragen können. Obwohl in Verpflegungseinrichtungen der Bundeswehr mittels zentraler Dienstvorschrift (ZDv 46/28) dem Risiko einer Lebensmittelvergiftung durch *B. cereus* umfangreich Rechnung getragen wird (z.B. Festlegung der Lebensmittelausgabetemperatur auf 65 °C, schnellstmögliche Durchschreitung kritischer Temperaturbereiche, umfangreiches Reinigungs- und Desinfektionsregime), konnten Schwachstellen innerhalb bestimmter Arbeitsbereiche und auf Oberflächen festgestellt werden (Fleischvorbereitung, Gummi, Keramik, Hände). Gerade das gehäufte Vorkommen von obligat pathogenen emetischen Toxinbildnern auf den Händen des Küchenpersonals in Kombination mit fehlerhaften Desinfektionsmitteln stellt ein großes Hygienerisiko dar, welches durch Personalschulungen und effektivere Reinigungs- und Desinfektionsmaßnahmen zu minimieren wäre.

5 Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit dem Vorkommen von *B. cereus* auf unterschiedlichen Oberflächenmaterialien innerhalb verschiedener Arbeitsbereiche in Verpflegungseinrichtungen der Bundeswehr. Dazu wurden 1470 Proben, die im Rahmen von Hygienestatuskontrollen der Truppenküchen gewonnen wurden, untersucht. Die daraus gewonnenen *B. cereus*-Isolate (n = 235) wurden mit zellbiologischen und immunologischen Tests weiter charakterisiert. Basierend auf diesen Ergebnissen wurde das Vorkommen toxinogener *B. cereus* in den Arbeitsbereichen bestimmt.

Es konnte ein Anteil von 16 % *B. cereus*-positiver Proben am Gesamtprobenpool festgestellt werden. Auf Oberflächen und Bedarfsgegenständen betrug der Anteil 12 %. Allerdings konnten bei einer detaillierteren Analyse der Ergebnisse einige Bereiche mit sehr hohen Belastungen identifiziert werden. Spitzenwerte bei dieser Betrachtung lieferten Gummioberflächen und die Hände des Personals mit 20,9 % bzw. 37,6 % Kontaminationsrate.

Nach Charakterisierung der Toxinprofile der *B. cereus* Isolate wurden Anteile von HBL-Toxinbildnern mit 59 % und Nhe-Toxinbildnern mit 99,6 % (reine Nhe-Bildner 41%) ermittelt. Die genauere Auswertung des Verhältnisses von HBL- zu reinen Nhe-Bildnern ergab allerdings stark divergierende Werte in den verschiedenen Arbeitsbereichen und Oberflächen. Diese reichten für HBL-Produzenten von 0 % auf Keramik in der Kühlung bis zu 100 % auf V_2A-Stahl in der Garküche.

Nach quantitativer Bestimmung der Enterotoxinproduktion mittels NheB-Titer der *B. cereus* Stämme konnten auf Oberflächen der verschiedenen Arbeitsbereiche 26 so genannte „high producer“ identifiziert werden, was einem Anteil von 16 % entspricht. Alle übrigen Isolate lagen im „middle producer“ (60 %) bzw. „low producer“ (24 %) Bereich.

Von allen Isolaten waren zehn in der Lage das emetische Toxin zu produzieren. Allein 50 % dieser Isolate wurden auf den Händen des Personals gefunden. Gerade das häufige Vorkommen dieser Gruppe von Toxinbildner auf den Händen des Küchenpersonals verdeutlicht die Erfordernis von effektiveren Reinigungs- und Desinfektionsmaßnahmen im Verbund mit intensivierter Personalhygiene bzw. –schulungsmaßnahmen.

Summary

Characterisation of the toxicity of *Bacillus cereus* isolates from food supply facilities of the German Federal Armed Forces.

This paper deals with the occurrence of *B. cereus* on different surface materials within different work areas in food supply facilities of the German Federal Armed Forces. For this purpose 1470 samples, collected within the framework of hygiene status controls of the unit messes, were examined. The *B. cereus* -isolates (n = 235) were characterised with cell biological and immunological tests. Based on these results the occurrence of toxigenic *B. cereus* in the work areas was determined.

A rate of 16 % *B. cereus* positive samples could be determined at the total sample pool (n = 1470). On surfaces and consumer articles the rate amounted to 12 %. However, with detailed analysis of the results some areas with very high contamination could be identified. Peak values were at rubber surfaces and the hands of the personnel with contamination levels of 20,9 % and 37,6 %, respectively.

After characterisation of the toxin profiles of the *B. cereus* isolates an occurrence of HBL-producers with 59 % and Nhe-producers with 99,6 % (pure Nhe-producers 41 %) were determined. The more exact evaluation of the ratio HBL to pure Nhe producers resulted in strongly divergent values in the different work areas and surfaces. The results ranged from 0% of HBL producers on ceramics in the cooling to 100 % on V_2A-steel in the cooking area.

According to quantitative determination of the enterotoxin production of the *B. cereus* strains by NheB-titers 26 "high producers" could be identified on surfaces of the different work areas, which corresponds to ratio of 16 %. The remaining isolates were in the range of "middle producer" (60 %) or "low producer" (24 %).

Ten isolates were able to produce the emetic toxin (cereulide). However 50 % of these strains were found on the hands of the personnel. This high prevalence of obligatorily pathogenic emetic strains on the hands of the kitchen personnel strengthen the demand of more effective cleaning and disinfection measures together with increased personnel hygiene and/or education.

6 Literaturverzeichnis

AGATA, N., M. MORI, M. OHTA, S. SUWAN, I. OHTANI & M. ISOBE (1994):
A novel dodecadepsipeptide, cereulide, isolated from *Bacillus cereus* causes vacuole formation in Hep-2 cells
FEMS Microbiol. Lett. 121, 31-34

AGATA, N., M. OHTA & M. MORI (1996):
Production of an emetic toxin, cereulide, is associated with a specific class of *Bacillus cereus*
Curr. Microbiol. 33, 67-69

ALTAYAR, M. & A. D. SUTHERLAND (2005):
Bacillus cereus is common in the environment but emetic toxin producing isolates are rare
J. Appl. Microbiol. 100, 7-14

ANDERSEN BORGE, G., M. SKEIE, T. SØRHAUG, T. LANGSRUD & P. E. GRANUM (2001):
Growth and toxin profiles of *Bacillus cereus* isolated from different food sources
Int. J. Food Microbiol. 69, 237-246

ANDERSSON, A., U. RONNER & P. E. GRANUM (1995):
What problems does the food industry have with the spore-forming pathogens *Bacillus cereus* and *Clostridium perfringens*?
Int. J. Food Microbiol. 28, 145-155

ANDERSSON, A., P. E. GRANUM & U. RÖNNER (1998):
The adhesion of *Bacillus cereus* spores to epithelial cells might be an additional virulence mechanism
Int. J. Food Microbiol. 63, 93-99

ANDERSSON, M. A., R. MIKKOLA, R. M. KROPPENSTEDT, F. A. RAINEY, J. PELTOLA, J. HELIN, K. SIVONEN & M. S. SALKINOJA-SALONEN (1998b):
The mitochondrial toxin produced by *Streptomyces griseus* strains isolated from an indoor environment is valinomycin
Appl. Environ. Microbiol. 64, 4767-4773

ASANO, S.- I., Y. NUKUMIZU, H. BANDO, T. IIZUKA & T. YAMAMOTO (1997):
Cloning of novel enterotoxin genes from *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis*
Appl. Environ. Microbiol. 63, 1054-1057

BACH, R. (1999):
Umsetzung der Lebensmittelhygiene-Verordnung (LMHV) in der Gastronomie Lebensmittelhygieneseminar des BbT
Würzburg: 05.10.1999, Hannover: 06.10.1999, Berlin: 07.10.1999

BEATTIE, S. H. & WILLIAMS, A. G. (1999):
Detection of toxigenic strains of *Bacillus cereus* and other Bacillus spp. with an improved cytotoxicity assay
Lett. Appl. Microbiol. 28, 221-225

BEECHER, D. J. & J. D.MACMILLAN (1990):
A novel bicomponent hemolysin from *Bacillus cereus*
Infect. Immun. 59, 2220-2227

BEECHER, D. J. & J. D. MACMILLAN (1991):
Characterization of the components of hemolysin BL from *Bacillus cereus*
Infect. Immun. 59, 1778-1784

BEECHER, D. J. & A. C. L. WONG (1994):
Improved purification and characterization of hemolysin BL, a hemolytic dermonecrotic vascular permeability factor from *Bacillus cereus*
Infect. Immun. 62, 980-986

BEECHER, D. J., J. L. SCHOENI & A. C. L. WONG (1995):
Enterotoxic activity of hemolysin BL from *Bacillus cereus*
Infect. Immun. 63, 4423-4428

BEUTLING, D. & C. BÖTTCHER (1998):
Bacillus cereus – ein Risikofaktor in Lebensmitteln
Arch. Lebensmittelhyg. 49, 90-96

BORCHARD, U. (2001):
Untersuchungen zur Enterotoxizität von *Bacillus cereus* Lebensmittelisolaten
Inaugural-Dissertation an der Ludwig-Maximilians-Universität München

BUCK, M., R. DIETRICH & E. MÄRTLBAUER (2002):
Molekularbiologische Charakterisierung Enterotoxin produzierender *Bacillus cereus*-Stämme
43. Arbeitstag. Arbeitsgebiet „Lebensmittelhygiene" der DVG, Garmisch-Partenkirchen, 25.-28.09.2001

BROCKMANN, H. & G. SCHMIDT-KASTNER (1955):
Valinomycin
Chem. Ber. 88, 57-61

CDC (2000):
Centers for Disease Control. Surveillance Summaries, Surveillance for food borne-disease outbreaks United States, 1993-1997
Morbidity and Mortality Weekly Report, 49, 1- 61

CHOMA, C. & P. E. GRANUM (2002):
The enterotoxin T (BceT) from *Bacillus cereus* can probably not contribute to food poisoning
FEMS Microbiol. Lett. 217, 115-119

DIERICK, K., E.V. COILLIE, I. SWIECICKA, G. MEYFROIDT, H. DEVLIEGER, A. MEULEMANS, G. HOEDEMAEKERS, L. FOURIE, M. HEYNDRICKX & J. MAHILLON (2005):
Fatal Family Outbreak of *Bacillus cereus*-Associated Food Poisoning
J. Clin. Microb. 43, 4277-4279

DIETRICH, R., K. MAUERSBERGER & E. MÄRTLBAUER (1997):
Zur Anwendbarkeit des MTT-Zytotoxizitätstest zum Nachweis von *Bacillus cereus*-Enterotoxin
Arch. Lebensmittelhygiene 48, 73-96

DIETRICH, R., C. FELLA, S. STRICH & E. MÄRTLBAUER (1999):
Production and characterization of monoclonal antibodies against the hemolysin BL enterotoxin complex produced by *Bacillus cereus*
Appl. Environ. Microbiol. 65, 4470-4474

DIETRICH, R., M. MORAVEK, C. BÜRK, P. E. GRANUM & E. MÄRTLBAUER (2005):
Production and characterization of antibodies against each of the three subunits of the *B. cereus* Nonhemolytic Enterotoxin Complex
Appl. Environ. Microbiol. 71, 8214-8220

DROBNIEWSKI, F.A. (1993):
Bacillus cereus and related species
Clin. Microbiol. Rev. 6, 324 – 338

EHLING-SCHULZ, M., B. SVENSSON, M.-H. GUINEBRETIERE, T. LINDBÄCK, M. ANDERSSON, A. SCHULZ, M. FRICKER, A. CHRSTIANSSON, P. E. GRANUM, E. MÄRTLBAUER, C. NGUYEN-THE, M. SALKINOJA-SALONEN & S. SCHERER (2004):
Emetic toxin formation of *Bacillus cereus* is restricted to a single evolutionary lineage of closely related strains
Microbiology 151, 183-197

EHLING-SCHULZ, M., M. FRICKER & S. SCHERER (2004):
Identification of emetic toxin producing *Bacillus cereus* strains by a novel molecular assay
FEMS Microbiol. Lett. 232, 189-195

ERBSLÖH, I. (2006):
Dissertation in Vorbereitung, München

ERNST, C. (2003):
Optimierung von Desinfektionsverfahren in Verpflegungs- und Betreuungseinrichtungen der Bundeswehr im Hinblick auf die *Bacillus cereus*- Belastung von Oberflächen und Lebensmitteln
Inaugural-Dissertation an der Freien Universität Berlin

FAILLE C., C. JULLIEN, F. FONTAINE, M. N. BELLON-FONTAINE, C. SLOMIANNY & T. BENEZECH (2002):
Adhesion of *Bacillus* spores and *Escherichia coli* cells to inert surfaces: role of surface hydrophobicity
Can. J. Microbiol. 48, 728-38

FINLAY, W. J. J., N. A. LOGAN & A. D. SUTHERLAND (1999):
Semiautomated metabolic staining assay for *Bacillus cereus* emetic toxin
Appl. Environ. Microbiol. 65, 1811-1812

GASALUK, P., K. YOKOYAMA, T. KIMURA & I. SUGIHARA (1996):
The occurrence of *Bacillus cereus* in local Thai traditional foods
J. Antibact. Antifungal Agents Jpn. 24, 349-356

GLATZ, B.A. & J. M. GOEPFERT (1973):
Extracellular factor synthesized by *Bacillus cereus* which evokes a dermal reaction in guinea pigs
Infect. Immun. 8, 25-29

GLATZ, B. A., W. M. SPIRA & J. M. GOEPFERT (1974):
Alteration of vascular permeability in rabbit by culture filtrates of *Bacillus cereus* and related species
Infect. Immun. 10, 229-303

GRÄFE, U. (1992):
Biochemie der Antibiotika. Struktur- Biosynthese- Wirkmechanismus
Spektrum Akademischer-Verlag, Heidelberg

GRANUM, P. E. (1994):
Bacillus cereus and its toxins
J. Appl. Bact. Symp. Suppl. 76, 61-66

GRANUM, P. E. (1997):
Bacillus cereus
In: BOYLE, M.P (Hrsg.): Food microbiology: Fundamentals and Frontiers. ASM Press, Washington D.C. 327-336

GRANUM, P.E. & T. LUND (1997):
Bacillus cereus and its food poisoning toxins
FEMS Microbiol. Lett. 157, 223-228

GRANUM, P.E., K. O`SULLIVAN & T. LUND (1999):
The sequence of the non- hemolytic enterotoxin operon from *Bacillus cereus*
FEMS Microbiol. Lett. 177, 225-229

GRANUM, P. E. (2001):
Bacillus cereus
In Food microbiology. Fundamentals and Frontiers, 2nd ed., 373-381
ASM Press, Washington, D.C.

GUINEBRETIÈRE, M. -H., V. BROUSSOLLE & C. NGUYEN-THE (2002):
Enterotoxigenic profiles of food-poisoning and food-borne Bacillus cereus strains
J. Clin. Microbiol. 40, 3053-3056

GÜVEN K., M. B. MUTLU & Ö. AVCI (2005):
Incidence and characterization of *Bacillus cereus* in meat and meat products consumed in Turkey
J. Food Safety 26, 30-40

HAGGBLOM, M. M., C. APETROAIE, M. A. ANDERSSON & M. S. SALKINOJA-SALONEN (2002):
Quantitative analysis of cereulide, the emetic toxin of *Bacillus cereus*, produced under various conditions
Appl. Environ. Microbiol. 68, 2479-2483

HANSEN, B.M. & N. B. HENDRIKSEN (2001):
Detection of enterotoxic *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* strains by PCR analysis
Appl. Environ. Microbiol. 67, 185-189

HEINRICHS, J. H., D. J. BEECHER, J. D. MACMILLAN & B. A. ZILINSKAS (1993):
Molecular cloning and characterization of the hblA gene encoding the B component of hemolysin BL from *Bacillus cereus*.
J. Bact. 175, 6760-6766

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

HOSTACKA, A., A. KOSIAROWA, V. MAJTAN & S. KOHUTOVA (1992):
Toxic properties of *Bacillus cereus* strains isolatet from different foodstuffs
Zbl. Bakt. 276, 303-312

HUGHES, S., B. BARTHOLOMEW, J. C. HARDY & J. M. KRAMER (1988):
Potential application of a Hep-2 cell assay in the investigation of *Bacillus cereus* emetic syndrome food poisoning
FEMS Microbiol. Lett. 52, 7-12

IN`T VELD, P. H., W. S. RITMEESTER, E. H. M. DELFGOU-VAN ASCH, J. B. DUFRENNE, K. WERNARS, E. SMIT & F. M. VAN LEUSDEN (2001):
Detection of genes encoding for enterotoxins and determination of the production of enterotoxins by HBL blood plates and immunoassays of psychrotrophic strains of *Bacillus cereus* isolated from pasteurised milk
Int. J. Food Microbiol. 64, 63-70

JÄÄSKELÄINEN, E.L., V. TEPLOVA, M. A. ANDERSSON, L. C. ANDERSSON, P. TAMMELA, M. C. ANDERSSON, T. I. PIRHONEN, N.- E. L. SARIS, P. VUORELA & M. S. SALKONOJA-SALONEN (2003a):
In vitro assay for human toxicity of cereulide, the emetic mitochondrial toxin produced by food poisoning *Bacillus cereus*
Toxicol. In Vitro 17, 737-744

JÄÄSKELÄINEN, E.L., M. M. HÄGGBLOM, M. A. ANDERSSON, L. VANNE & M. S. SALKINOJA-SALONEN (2003b):
Potential of *Bacillus cereus* for producing an emetic toxin, cereulide, in bakery products: Quantitative analysis by chemical and biological methods
J. Food Prot. 66, 1047-1054

KATSARAS & G. HILDEBRANDT (1979):
Ursachen bakterieller Lebensmittelvergiftungen: *Bacillus cereus* Toxine
Fleischwirtsch. 59, 668-676

KLEER, J., A. BARTHOLOMÄ, R. LEVETZOW, T. REICHE, H. J. SINELL & P. TEUFEL (2001):
Bakterielle Lebensmittelinfektionen und -intoxikationen in Einrichtungen zur Gemeinschaftsverpflegung 1985-2000
Arch. Lebensmittelhyg. 52, 76-79

KOTIRANTA, A., K. LOUNATMAA & M. HAAPASALO (2000):
Epidemiology and pathogenesis of *Bacillus cereus* infections
Microbes and Inf. 2, 189-198

KRAMER, J. M. (1984):
Bacillus cereus exotoxins: production, isolation, detection and properties
In: Montie T. C. & S. Kadis, Microbial toxins, bacterial protein toxins, pp. 385-386,
Academic Press, London

KRAMER, J. M. & R. J. GILBERT (1989):
Bacillus cereus and other *Bacillus species*
In: M. O. DOYLE (Hrsg.): Foodborne bacterial pathogens, pp. 22-70
Marcel Dekker Inc., New York

LINDBÄCK, T., O. A. ØKSTAD, A.- L. RISHOVD & A.- B. KOLSTØ (1999):
Insertional inactivation of *hblC* encoding the L_2 component of *Bacillus cereus* ATCC 14579 haemolysin BL strongly reduces enterotoxigenic activity, but not the haemolytic activity against human erythrocytes
Microbiol. 145, 3139-3146

LOUWERS, J. & G. KLEIN (1994a):
Eignung von Probenahmemethoden zur Umgebungsuntersuchung in Fleisch gewinnenden und – verarbeitenden Betrieben mit EU- Zulassung
Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 107, 367-373

LOUWERS, J., G. KLEIN & G. REUTER (1997):
Das Tupferverfahren nach DIN 10113-2 bei Hygienekontrollen gemäß § 11c (1) und (2) FlHV in Fleisch verarbeitenden Betrieben
38. Arbeitstag, Arbeitsgebiet „Lebensmittelhygiene“ der DVG, Garmisch- Partenkirchen, 29.-30.09.1995, 490-495

LUND, B. M. (1991):
Foodborne illness: Foodborne disease due to *Bacillus* and *Clostridium* species
The Lancet. 336, 982-986

LUND, T. & P. E. GRANUM (1996):
Characterisation of a non-hemolytic enterotoxin complex from *Bacillus cereus* isolated after a foodborne outbreak
FEMS Microbiol. Lett. 141, 151-156

LUND, T. & P. E. GRANUM (1997):
Comparison of biological effect of the two different enterotoxin complexes isolated from three different strains of *Bacillus cereus*
Microbiol. 143, 3329-3336

LUND, T., M.- L. DE BUYSER & P. E. GRANUM (2000):
A new cytotoxin from *Bacillus cereus* that may cause necrotic enteritis
Mol. Microbiol. 38, 254-261

MAHLER, H., A. PASI, J. M. SCHULTE, A. C. SCOGING, W. BAER & S. KRAEHENBUEHL (1997):
Fulminant liver failure in association with the emetic toxin of *Bacillus cereus*
N. Engl. J. Med. 336, 1143-1148

MAUERSBERGER, K. (1997):
Zur Anwendbarkeit des MTT-Zytotoxizitätstests zum Nachweis von *Bacillus cereus*
Inaugural-Dissertation an der Ludwig-Maximilians-Universität München

MELLING, J., B. J. CAPEL, P. C. B. TURNBULL & R. J. GILBERT (1976):
Identification of a novel enterotoxigenic activity associated with *Bacillus cereus*
J. Clin. Path. 29, 938-940

MENESTRINA, G., M. D. SERRA & G. PREVOST (2001):
Mode of action of the staphylococcal α-hemolysin family
Toxicon 39, 1661-1672

MINISTRY OF HEALTH AND WELFARE, Food Sanitation Division, Environmental Health Bureau, Tokyo, Japan (1998):
Statistics of Food Poisoning Japan 1987-1996

MORAVEK, M., M. WEGSCHEIDER, A. SCHULZ, R. DIETRICH, C. BÜRK & E. MÄRTLBAUER (2004):
Colony immunoblot assay for the detection of hemolysin BL enterotoxin producing *Bacillus cereus*
FEMS Microbiol. Lett. 238, 107-113

MORAVEK, M., R. DIETRICH, C. BUERK, V. BROUSSOLLE, M. H. GUINEBRETIÈRE, P.E. GRANUM, C. NGUYEN-THE & E. MÄRTLBAUER (2006):
Determination of the toxic potential of *Bacillus cereus* isolates by quantitative enterotoxin analyses
FEMS Microbiol. Lett 257, 293-298

PAN, T.-M., T.- K. WANG, C.- L. LEE, S.- W. CHIEN & C.- B. HORNG (1997):
Foodborne disease outbreaks due to bacteria in Taiwan, 1986 to 1995
J. Clin. Microbiol. 35, 1260-1262

PENG, J.-S., W.- C. TSAI & C.- C. CHOU (2002):
Inactivation and removal of *Bacillus cereus* by sanitizer and detergent
Intern. J. Food Microb. 77, 11-18

PRÜSS, B. M., R. DIETRICH, B. NIBLER, E. MÄRTLBAUER & S. SCHERER (1999):
The hemolytic enterotoxin HBL is broadly distributed among species of the *Bacillus cereus* group
Appl. Environ. Microbiol. 65, 5436-5442

REICHE, T. (1998):
Hygiene- und Qualitätskontrollen in Verpflegungseinrichtungen der Bundeswehr, Status quo und Ausblick auf die Umsetzung der Lebenmittelhygiene- Verordung
BbT-Veterinärkongress Staffelstein: 30.04.1998

RIVERA, A. M. G., P. E. GRANUM & F. G. PRIEST (2000):
Common occurrence of enterotoxin genes and enterotoxicity in *Bacillus thuringiensis*
FEMS Microbiol. Lett 180, 151-155

RYAN, P. A., J. D. MACMILLAN & B. A. ZILINSKAS (1997):
Molecular cloning and characterization of the genes encoding the L_1 and L_2 components of hemolysin BL from *Bacillus cereus*
J. Bact. 179, 2551-2556

SAKURAI, N., K. A. KOIKE, Y. IRIE & H. HAYASHI (1994):
The rice culture filtrate of *Bacillus cereus* isolated from emetic-Type food poisoning causes mitochondrial swelling in a Hep-2 cell
Microbiol. Immunol. 38, 337-343

SCHOENI, J. L. & A. C. L. WONG (2005):
Bacillus cereus food poisoning and its toxins
J. Food Prot. 68, 636-648

SHINAGAWA, K. (1993):
Serology and characterization of toxigenic *Bacillus cereus*
Neth. Milk Dairy J. 47, 89-103

SHINAGAWA, K. N., H. MATSUSAKA, H. KONUMA & H. KURATA (1985):
The relation between the diarrheal and other biological activities of *Bacillus cereus* involved in food poisoning outbreaks
Jpn. J. Vet. Sci. 47, 557-565

SCHULZ, A. (2004):
Zum Nachweis des emetischen Toxins von *Bacillus cereus*
Inaugural-Dissertation an der Ludwig-Maximilians-Universität München

SEIDEL, K. E., C. PFISTERER, S. HÖRMANSDORFER & J. BAUER (1996):
Zum Nachweis toxinogener *Bacillus cereus* Stämme
J. Vet. Med. 43, 421-428

SINELL, H. J. (1992):
Einführung in die Lebensmittelhygiene
Verlag Paul Parey – Berlin und Hamburg, 3. Aufl.

SPIRA, W. M. & J. M. GOEPFERT (1972):
Bacillus cereus- induced fluid accumulation in rabbit ileal loops
Appl. Microbiol. 24, 341-348

STENFORS, L. P. & P. E. GRANUM (2001):
Psychrotolerant species from the *B. cereus* group are not necessarily *B. weihenstephanensis*
FEMS Microbiol. Lett. 215, 47-51

STENFORS, L. P., R. MAYR, S. SCHERER & P. E. GRANUM (2002):
Pathogenic potential of fifty *B. weihenstephanensis* strains
FEMS Microbiol. Lett. 215, 47-51

SZABO, R. A., J. I. SPEIRS & M. AKHTAR (1991):
Cell culture detection and conditions for production of a *Bacillus cereus* heat-stable toxin
J. Food Prot. 54, 272-276

THOMPSON, N. E., M. M. KETTERHAGEN, M. S. BERGDOLL & E. J. SCHANTZ (1984):
Isolation and some properties of an enterotoxin produced by *Bacillus cereus*
Infect. Immun. 43, 887-894

WONG, T.L., G. B. CARAY-SMITH, L. HOLLIS & J. A. HUDSON (2005):
Microbiological survey of propackaged pâté and ham in New Zealand
Appl. Microbiol. 41, 106-111

YAKIMOV, M. M., K. N. TIMMIS, V. WRAY & H. L. FREDRICKSON (1995):
Characterization of a new lipopeptide surfactant produced by thermotolerant and halotolerant subsurface *Bacillus licheniformis* BAS50
Appl. Environ. Microbiol. 61, 1706-1713

7 Anhang

Anhang I:
B. cereus Isolate aus dem Jahr 2005, gezogen in 21 Verpflegungseinrichtungen des Wehrbereich II (Hessen, Rheinland-Pfalz, Nordrhein-Westfalen, Saarland) der Bundeswehr.

	Isolat	MHI	Stärke	Hep	NheB -SW	L2-SW	Arbeitsbereich	Probenahmepunkt	Oberfläche
1	1756	2000	positiv	0	1627	16	Fleischvorbereitung	Wandfliese	Keramik
2	1758	2001	positiv	0	1424	32	Fleischvorbereitung	Wandfliese	Keramik
3	1775	2002	positiv	0	1202	0	Kühlung	Behälter Fleischkühlhaus	PE
4	1777	2003	positiv	0	3786	101	Kühlung	Dichtung Gemüsekühlh.	Gummi
5	1811	2004	positiv	0	3373	0	Hände Personal	Hände	Hände
6	1813	2005	*negativ*	0	2352	0	Hände Personal	Hände	Hände
7	1814	2006	*negativ*	0	2918	0	Hände Personal	Hände	Hände
8	1815	2007	positiv	0	639	0	Hände Personal	Hände	Hände
9	1816	2008	*negativ*	0	2349	0	Hände Personal	Hände	Hände
10	2163	2009	positiv	0	4449	0	Fleischvorbereitung	Wandfliese	Keramik
11	2170	2010	positiv	0	2775	205	Kühlung	Arbeitsfläche	PE
12	2193	2011	*negativ*	37	5294	0	Ausgabe	Abdeckung	PE
13	2195	2012	positiv	0	4198	0	Ausgabe	Behälter	PE
14	2202	2013	*negativ*	147	5573	0	Hände Personal	Hände	Hände
15	2206	2014	*negativ*	201	5397	0	Hände Personal	Hände	Hände
16	2207	2015	*negativ*	0	4426	0	Hände Personal	Hände	Hände
17	2208	2016	*negativ*	0	4634	0	Hände Personal	Hände	Hände
18	2211	2017	positiv	0	2790	188	Hände Personal	Hände	Hände
19	2323	2018	positiv	0	492	46	Gemüsevorbereitung	Wandfliese	Keramik
20	2365	2019	positiv	0	485	139	Fleischvorbereitung	Fleischschneidebrett	PE
21	3259	2020	negativ	0	786	0	Kühlung	Kühlschrankboden	PE
22	3272	2021	positiv	0	495	121	Gemüsevorbereitung	Schneidbrett	PE
23	2344	2022	positiv	0	521	149	Garküche	Dichtung Behälter	Gummi
24	2377	2023	positiv	0	534	215	Hände Personal	Hände	Hände
25	3048	2024	positiv	0	444	133	Garküche	Teller	Keramik
26	3040	2025	positiv	0	489	144	Garküche	Arbeitsfläche	V2A
27	3307	2026	positiv	0	714	0	Hände Personal	Hände	Hände
28	3308	2027	negativ	0	840	0	Hände Personal	Hände	Hände
29	3304	2028	negativ	0	3155	0	Hände Personal	Hände	Hände
30	3305	2029	negativ	0	4768	0	Hände Personal	Hände	Hände
31	3303	2030	positiv	0	1864	759	Hände Personal	Hände	Hände
32	3292	2031	positiv	0	1962	196	Ausgabe	Besteck	V2A
33	3255	2032	negativ	0	6048	0	Kühlung	Behälter-Deckel	V2A
34	2862	2033	negativ	0	3798	0	Gemüsevorbereitung	Arbeitsfläche	V2A
35	2890	2034	positiv	0	2014	215	Hände Personal	Hände	Hände
36	2891	2035	negativ	0	5024	0	Hände Personal	Hände	Hände
37	3242	2036	positiv	0	3315	103	Fleischvorbereitung	Arbeitsfläche	V2A
38	3249	2037	positiv	0	3357	241	Fleischvorbereitung	Dichtung	Gummi
39	2793	2038	negativ	7	2979	0	Gemüsevorbereitung	Wandfliese	Keramik
40	3049	2039	negativ	0	1851	0	Garküche	Wandfliese	Keramik
41	3310	2040	negativ	0	2826	0	Hände Personal	Hände	Hände
42	2876	2041	negativ	0	1328	0	Ausgabe	Theke	V2A
43	3246	2042	negativ	0	1405	0	Fleischvorbereitung	Arbeitsfläche	PE
44	3812	2047	positiv	0	1662	433	Gemüsevorbereitung	Schneidbrett	PE
45	3816	2048	positiv	0	1221	258	Gemüsevorbereitung	Dichtung-Behälter	Gummi
46	3817	2049	*negativ*	13	2582	0	Gemüsevorbereitung	Dichtung-Behälter	Gummi
47	3828	2050	*negativ*	0	4666	0	Fleischvorbereitung	Dichtung-Küma	Gummi

48	3829	2051	positiv	0	1576	0	Fleischvorbereitung	Dichtung-Küma	Gummi
49	3827	2052	*negativ*	22	2490	0	Fleischvorbereitung	Bedienfeld-Küma	Gummi
50	3831	2053	positiv	0	1408	42	Fleischvorbereitung	Wandfliese	Keramik
51	3841	2054	positiv	0	1181	135	Kühlung	Dichtung-Gemüsekühlh.	Gummi
52	3875	2057	positiv	0	1890	182	Hände Personal	Hände	Hände
53	3873	2058	*negativ*	37	5651	0	Hände Personal	Hände	Hände
54	3896	2059	positiv	0	2138	78	Gemüsevorbereitung	Schneidbrett	PE
55	3897	2060	positiv	0	2768	312	Gemüsevorbereitung	Schneidbrett	PE
56	3910	2061	positiv	0	1635	171	Fleischvorbereitung	Behälter-Deckel	PE
57	3921	2062	*negativ*	0	5958	0	Kühlung	Kühlhaus-Griff	PE
58	3924	2063	positiv	0	2467	77	Kühlung	Dichtung-Milchkühlh.	Gummi
59	3926	2064	*negativ*	0	5446	0	Kühlung	Wandfliese	Keramik
60	3928	2065	positiv	0	5069	0	Kühlung	Wandfliese	Keramik
61	3901	2066	*negativ*	0	5894	0	Gemüsevorbereitung	Dichtung-Behälter	Gummi
62	3936	2067	positiv	0	3696	0	Garküche	Dichtung-Kessel	Gummi
63	3937	2068	positiv	0	8870	0	Garküche	Dichtung-Kessel	Gummi
64	3947	2069	positiv	0	3274	106	Ausgabe	Proberationsbehälter	V2A
65	3949	2070	*negativ*	0	4934	0	Ausgabe	Hustenschutz	PE
66	3958	2071	positiv	0	764	66	Ausgabe	Teller	Keramik
67	3965	2072	positiv	0	2062	161	Hände Personal	Hände	Hände
68	4147	2094	positiv	0	647	15	Kühlung	Dichtung-Kühlhaus	Gummi
69	4196	2095	positiv	0	642	74	Gemüsevorbereitung	Dichtung-Küma	Gummi
70	4198	2096	positiv	0	190	23	Gemüsevorbereitung	Wandfliese	Keramik
71	3864	2097	negativ	0	6573	0	Ausgabe	Schürze	Gummi
72	5038	2099	positiv	0	79	6	Kühlung	Kühlraumwand	PE
73	4221	2100	positiv	0	185	23	Kühlung	Dichtung-Gemüsekühlh.	Gummi
74	5029	2101	positiv	0	2493	0	Fleischvorbereitung	Rührscheide	Gummi
75	4253	2102	positiv	0	2323	0	Hände Personal	Hände	Hände
76	4185	2104	positiv	0	1048	0	Hände Personal	Hände	Hände
77	4183	2105	*negativ*	0	1901	101	Hände Personal	Hände	Hände
78	4227	2106	positiv	0	1194	82	Garküche	Gewürzregal	V2A
79	4481	2109	positiv	0	4189	0	Hände Personal	Hände	Hände
80	4479	2110	positiv	0	2691	130	Hände Personal	Hände	Hände
81	4471	2111	*negativ*	0	4723	0	Ausgabe	Bedienfeld	Gummi
82	4472	2112	positiv	0	5421	0	Ausgabe	Bedienfeld	Gummi
83	4486	2113	positiv	0	795	192	Hände Personal	Hände	Hände
84	4484	2114	positiv	0	1566	205	Hände Personal	Hände	Hände
85	4477	2116	*negativ*	0	4166	0	Hände Personal	Hände	Hände
86	4184	2117	*negativ*	0	2262	0	Hände Personal	Hände	Hände
87	4222	2119	positiv	0	1298	163	Kühlung	Dichtung-Fleischkühlhaus	Gummi
88	4232	2120	positiv	0	1716	185	Garküche	Dichtung-Thermophore	Gummi
89	4234	2121	positiv	0	4422	0	Garküche	Dichtung	Gummi
90	4449	2122	positiv	0	3329	0	Kühlung	Kühlschrank	Gummi
91	4483	2127	*negativ*	0	4269	0	Hände Personal	Hände	Hände
92	4133	2129	*negativ*	0	2038	0	Fleischvorbereitung	Behälter	PE
93	4124	2130	positiv	0	3264	92	Gemüsevorbereitung	Bedienfeld	Gummi
94	4140	2131	positiv	0	4205	221	Kühlung	Türblatt	V2A
95	4424	2133	*negativ*	0	7923	0	Gemüsevorbereitung	Dichtung-Behälter	Gummi
96	4423	2134	positiv	0	1294	64	Gemüsevorbereitung	Dichtung-Behälter	Gummi
97	4208	2136	positiv	0	1874	101	Fleischvorbereitung	Bedienfeld-Aufschnittma	Gummi
98	4435	2138	positiv	0	4864	112	Fleischvorbereitung	Dichtung-Behälter	Gummi
99	4153	2139	positiv	0	6195	65	Garküche	Schöpflöffel	V2A
100	4176	2140	*negativ*	0	9101	0	Hände Personal	Hände	Hände

101	4166	2141	*negativ*	0	2986	0	Ausgabe	Theke	V2A
102	5077	2142	*negativ*	0	3658	72	Hände Personal	Hände	Hände
103	5076	2143	positiv	0	4054	211	Hände Personal	Hände	Hände
104	5053	2145	positiv	0	4691	0	Garküche	Dichtung-Kessel	Gummi
105	5023	2146	positiv	0	3872	216	Fleischvorbereitung	Fleischwolf	V2A
106	5477	2147	positiv	0	6112	91	Hände Erkrankter	Hände	Hände
107	5013	2149	positiv	0	3440	42	Gemüsevorbereitung	Arbeitsfläche	PE
108	5479	2150	positiv	0	7514	49	Hände Erkrankter	Hände	Hände
109	5030	2151	positiv	0	4557	190	Fleischvorbereitung	Bedienfeld-Küma	Gummi
110	5443	2152	positiv	0	7642	0	Kühlung	Dichtung	Gummi
111	5017	2153	*negativ*	0	1028	9	Gemüsevorbereitung	Kabel	Gummi
112	5476	2155	positiv	0	1867	47	Hände Erkrankter	Hände	Hände
113	5442	2156	positiv	0	5184	135	Kühlung	Dichtung-Fleischkühlhaus	Gummi
114	5482	2157	*negativ*	0	15923	0	Hände Erkrankter	Hände	Hände
115	5471	2158	*negativ*	0	9370	0	Ausgabe	Teller	Keramik
116	5052	2159	positiv	0	8250	0	Garküche	Dichtung-Kessel	Gummi
117	5016	2161	positiv	0	3530	364	Gemüsevorbereitung	Dichtung-Küma	Gummi
118	5078	2162	positiv	0	4154	175	Hände Personal	Hände	Hände
119	5072	2164	positiv	0	2560	209	Hände Personal	Hände	Hände
120	5018	2166	positiv	0	4454	0	Gemüsevorbereitung	Aufhängung	PE
121	5056	2169	positiv	0	2723	424	Garküche	Wandfliese	Keramik
122	5028	2170	positiv	0	1538	41	Fleischvorbereitung	Dichtung-Küma	Gummi
123	5425	2171	positiv	0	1283	116	Fleischvorbereitung	Stephansmaschine	V2A
124	5478	2172	positiv	0	3462	0	Hände Erkrankter	Hände	Hände
125	5012	2173	positiv	0	635	74	Gemüsevorbereitung	Reibe-Küma	V2A
126	5549	2174	positiv	0	2022	175	Garküche	Schürze	PE
127	5569	2175	*negativ*	0	2662	0	Hände Personal	Hände	Hände
128	5574	2176	*negativ*	0	2528	0	Hände Personal	Hände	Hände
129	5575	2177	*negativ*	0	2618	0	Hände Personal	Hände	Hände
130	5563	2178	*negativ*	0	2979	0	Ausgabe	Dichtung Thermophore	Gummi
131	5577	2179	*negativ*	0	3014	0	Hände Personal	Hände	Hände
132	5576	2180	*negativ*	0	4851	0	Hände Personal	Hände	Hände
133	5568	2181	positiv	0	2784	223	Hände Personal	Hände	Hände
134	5521	2182	*negativ*	0	3440	0	Fleischvorbereitung	Fleischwolf	V2A
135	5531	2183	positiv	0	2232	125	Fleischvorbereitung	Wandfliese	Keramik
136	5560	2184	positiv	0	1031	80	Ausgabe	Hustenschutz	PE
137	5511	2185	positiv	0	930	135	Gemüsevorbereitung	Reibe-Küma	PE
138	5564	2186	*negativ*	0	1619	0	Ausgabe	Dichtung-Thermophore	Gummi
139	5573	2187	positiv	0	646	39	Hände Personal	Hände	Hände
140	5572	2188	positiv	0	1542	104	Hände Personal	Hände	Hände
141	5565	2189	positiv	0	577	55	Ausgabe	Wandfliese	Keramik
142	5536	2190	positiv	0	207	28	Kühlung	Griff-Gemüsekühlhaus	PE
143	6400	2213	*negativ*	0	2066	0	Kühlung	Dichtung-Vorkühlhaus	Gummi
144	6370	2214	positiv	0	1005	127	Gemüsevorbereitung	Behälter-Küma	V2A
145	6275	2215	*negativ*	0	2595	20	Gemüsevorbereitung	Bedienfeld-Salatschleuder	Gummi
146	6302	2216	positiv	0	1413	36	Kühlung	Dichtung-Gemüsekühlh.	Gummi
147	6414	2217	positiv	0	3456	316	Garküche	Wandfliese	Keramik
148	5886	2218	positiv	0	3370	117	Kühlung	Dichtung-Gemüsekühlh.	Gummi
149	5872	2219	positiv	0	2154	177	Fleischvorbereitung	Hustenschutz	PE
150	5871	2220	positiv	0	5754	178	Fleischvorbereitung	Schneidbrett	PE
151	5909	2221	*negativ*	0	3802	0	Ausgabe	Hustenschutz	PE
152	5868	2222	positiv	0	2595	207	Fleischvorbereitung	Arbeitsfläche	V2A
153	5859	2223	*negativ*	0	5299	0	Gemüsevorbereitung	Schneidbrett	PE

154	5891	2224	positiv	0	4035	0	Kühlung	Wandfliese	Keramik
155	6429	2225	positiv	0	3178	294	Hände Personal	Hände	Hände
156	6332	2226	positiv	0	1142	157	Hände Personal	Hände	Hände
157	6331	2227	positiv	0	1811	337	Hände Personal	Hände	Hände
158	6376	2228	positiv	0	1518	96	Gemüsevorbereitung	Dichtung-Salatschleuder	Gummi
159	6379	2229	positiv	0	728	12	Gemüsevorbereitung	Wandfliese	Keramik
160	6335	2230	positiv	0	1936	172	Hände Personal	Hände	Hände
161	6437	2231	positiv	0	4730	33	Hände Personal	Hände	Hände
162	6433	2232	positiv	0	4992	175	Hände Personal	Hände	Hände
163	5924	2233	positiv	0	7789	476	Hände Personal	Hände	Hände
164	5864	2235	positiv	0	12800	201	Gemüsevorbereitung	Bedienfeld-Küma	Gummi
165	5920	2236	*negativ*	0	10419	0	Hände Personal	Hände	Hände
166	6431	2237	positiv	0	3386	107	Hände Personal	Hände	Hände
167	5900	2238	*negativ*	0	5062	0	Garküche	Handschuh	Gummi
168	5912	2239	positiv	0	1798	79	Ausgabe	Dichtung-Thermophore	Gummi
169	5910	2240	*negativ*	0	4198	0	Ausgabe	Dichtung-Thermophore	Gummi
170	5923	2242	positiv	0	1334	189	Hände Personal	Hände	Hände
171	5922	2243	positiv	0	1459	157	Hände Personal	Hände	Hände
172	5863	2244	*negativ*	0	3770	0	Gemüsevorbereitung	Bedienfeld-Schälmaschine	Gummi
173	6333	2245	*negativ*	0	1035	96	Hände Personal	Hände	Hände
174	6436	2246	*negativ*	0	3728	0	Hände Personal	Hände	Hände
175	6425	2248	positiv	0	949	25	Ausgabe	Wandfliese	Keramik
176	6435	2249	positiv	0	2621	0	Hände Personal	Hände	Hände
177	5911	2250	*negativ*	0	3699	0	Ausgabe	Dichtung-Thermophore	Gummi
178	5916	2251	positiv	0	1986	95	Hände Personal	Hände	Hände
179	5874	2254	positiv	0	4029	177	Fleischvorbereitung	Dichtung	Gummi
180	5919	2255	positiv	0	1432	111	Hände Personal	Hände	Hände
181	5929	2256	positiv	0	1715	94	Ausgabe	Zapfhahn-Fruchtsaft	V2A
182	6377	2257	positiv	0	150	10	Gemüsevorbereitung	Wandfliese	Keramik
183	6415	2258	positiv	0	200	23	Garküche	Wandfliese	Keramik
184	6383	2259	positiv	0	881	86	Fleischvorbereitung	Schneidbrett	PE
185	5887	2260	positiv	0	1213	253	Kühlung	Dichtung-Milchkühlh.	Gummi
186	6714	2267	positiv	0	3046	0	Gemüsevorbereitung	Wandfliese	Keramik
187	6715	2268	*negativ*	0	2928	0	Gemüsevorbereitung	Wandfliese	Keramik
188	6717	2269	positiv	0	1494	104	Fleischvorbereitung	Arbeitsfläche	V2A
189	6723	2271	*negativ*	0	2288	0	Fleischvorbereitung	Dichtung-Küma	Gummi
190	6728	2272	positiv	0	2634	166	Fleischvorbereitung	Wandfliese	Keramik
191	6731	2273	*negativ*	0	6861	0	Kühlung	Regal-Wurst	V2A
192	6742	2274	(positiv)	0	205	13	Garküche	Regal-Gewürz	V2A
193	6745	2275	*negativ*	0	6426	0	Garküche	Schütte	PE
194	6897	2276	positiv	0	2275	30	Gemüsevorbereitung	Mengmulde	V2A
195	6910	2277	positiv	0	2211	133	Fleischvorbereitung	Stößel	PE
196	6913	2278	*negativ*	144	5043	0	Fleischvorbereitung	Messerköcher	Gummi
197	6914	2279	*negativ*	0	3699	0	Fleischvorbereitung	Dichtung-Thermophore	Gummi
198	6915	2280	positiv	0	1598	192	Fleischvorbereitung	Dichtung-Thermophore	Gummi
199	6926	2281	*negativ*	0	2970	275	Kühlung	Dichtung-Kühlhaus	Gummi
200	6931	2282	positiv	0	1330	106	Garküche	Regal	V2A
201	6941	2283	*negativ*	0	2883	127	Garküche	Dichtung-Konvectomat	Gummi
202	6942	2284	positiv	0	974	0	Garküche	Wandfliese	Keramik
203	6957	2285	positiv	0	2021	120	Hände Personal	Hände	Hände
204	6960	2286	*negativ*	1887	0	0	Hände Personal	Hände	Hände
205	6963	2287	positiv	0	319	383	Hände Personal	Hände	Hände
206	6964	2288	*negativ*	0	426	0	Hände Personal	Hände	Hände

207	6966	2289	*negativ*	0	52	0	Hände Personal	Hände	Hände
208	7534	2298	positiv	0	3085	705	Hände Personal	Hände	Hände
209	7384	2299	positiv	0	1434	105	Garküche	Regal	V2A
210	7468	2300	positiv	0	3949	403	Gemüsevorbereitung	Mengmulde	V2A
211	7521	2301	positiv	0	3914	251	Ausgabe	Getränkespender	PE
212	7472	2302	positiv	0	3277	254	Gemüsevorbereitung	Dichtung-Salatschleuder	Gummi
213	7414	2303	positiv	0	3821	0	Hände Personal	Hände	Hände
214	7350	2304	*negativ*	0	4275	0	Gemüsevorbereitung	Dichtung-Thermophore	Gummi
215	7518	2305	positiv	0	5062	165	Ausgabe	Becher	PE
216	7507	2306	positiv	0	5933	213	Garküche	Hustenschutz-Pfeffer	PE
217	7388	2307	positiv	0	2160	93	Garküche	Dichtung-Kessel	Gummi
218	7513	2308	positiv	0	3866	184	Garküche	Wandfliese	Keramik
219	7473	2309	positiv	0	6074	218	Gemüsevorbereitung	Dichtung-Salatschleuder	Gummi
220	7347	2310	*negativ*	0	5350	0	Gemüsevorbereitung	Stößel	PE
221	7479	2311	positiv	0	5926	213	Fleischvorbereitung	Messer-Küma	V2A
222	7411	2312	positiv	0	4230	181	Hände Personal	Hände	Hände
223	7412	2313	positiv	0	2362	386	Hände Personal	Hände	Hände
224	7532	2314	positiv	0	5408	187	Hände Personal	Hände	Hände
225	7406	2315	*negativ*	1389	5773	0	Hände Personal	Hände	Hände
226	7496	2316	positiv	0	4080	0	Kühlung	Dichtung-Milchkühlh.	Gummi
227	7488	2317	positiv	0	3494	218	Fleischvorbereitung	Wandfliese	Keramik
228	7413	2318	*negativ*	0	1456	0	Hände Personal	Hände	Hände
229	7474	2319	positiv	0	5389	174	Gemüsevorbereitung	Dichtung-Salatschleuder	Gummi
230	7504	2320	positiv	0	941	11	Garküche	Regal-Gewürz	V2A
231	7527	2321	positiv	0	230	26	Hände Personal	Hände	Hände
232	6706	2324	positiv	0	515	73	Gemüsevorbereitung	Arbeitsfläche	V2A
233	6710	2325	positiv	0	248	103	Gemüsevorbereitung	Rührscheide	PE
234	6711	2326	positiv	0	76	120	Gemüsevorbereitung	Dichtung-Küma	Gummi
235	6713	2327	negativ	0	310	213	Gemüsevorbereitung	Bedienfeld-Küma	Gummi

Anhang II: Probenahmeplan für Hygienestatuskontrollen in Verpflegungseinrichtungen der Bundeswehr

Mikrobiologische Hygienestatuskontrolle

ZInstSanBw KOBLENZ Lab.Abt.II

Probenahmeprotokoll **Datum: _29.08.05____**

Teilnehmer:_____SV Kreuzberger,

Fahrzeit:___4:10_____ _____

Abfahrt Mainz:___10.00_____ Ankunft Ziel:__11:45_____

Ankunft Mainz:____17:30_ Abfahrt Ziel:____14:55_____

Verpflegungseinrichtung:

Einheit:	
Kaserne: Liegenschaft:	
Straße:	
PLZ/Ort:	

Anzahl der Verpflegungsteilnehmer: tgl. ca. -500 Personen

Zeitpunkt der Untersuchung:	Datum: von Uhr bis Uhr
Teilnehmer von Seiten der Einheit:	1.DG Name Fkt. 2. Küchenmeister:
Tätigkeiten zum Entnahmezeitpunkt:	

Anzahl militärisches Küchenpersonal:11	Anzahl ziviles Küchenpersonal:14

Bemerkungen: Übergabe an StOV ab. 1.9.05 StOV Gerolstein
R= Flächen – Bionades, Ovical
D= Flächen – Tego
R= Hände - Estesol(Fa. Stockhausen)
D= Hände - Amphisept®

Mikrobiologische Hygienestatuskontrolle

ZInstSanBw KOBLENZ Lab.Abt.II

Probenahmeprotokoll

Kaserne:	
Ort:	
Datum:	29.08.05

Tabelle der Probennahme-Punkte je Arbeitsbereich

Gemüsevorbereitung				
Material	Medium	Beschreibung Probenahmepunkt	Status-Nr.	Reg-Nr. Inst
V2A	BR	Salatschleuder – Behälter	1	7466
V2A	MR	Behälter	2	7467
V2A	**BR**	**Mengmulde**	**3**	**7468 Tox pos**
Makrolon	MR	Schneidbrett	4	7469
Makrolon	BR	Schneidbrett	5	7470
Makrolon	MR	Salatschleuder- Deckel	6	7471
Gummi	**T**	**Dichtung- Salatschleuder**	**7**	**7472 Tox pos**
Gummi	**T**	**Bedienfeld- Salatschleuder**	**8**	**7473 Tox pos**
Gummi	**T**	**Dichtung- Salatschleuder**	**9**	**7474 Tox pos**
Keramik	BR	Wandfliese	10	7475
Keramik	MR	Wandfliese	11	7476
Keramik	BR	Wandfliesen	12	7477

Medien:
BR= Blut – Rodac
MR= Mossel – Rodac
T= Tupfer

Mikrobiologische Hygienestatuskontrolle

ZInstSanBw KOBLENZ Lab.Abt.II

Probenahmeprotokoll

Kaserne:	
Ort:	
Datum:	29.08.05

Tabelle der Probennahme-Punkte je Arbeitsbereich

Fleischvorbereitung / kalte Küche				
Material	Medium	Beschreibung Probenahmepunkt	Status-Nr.	Reg-Nr. Inst
V2A	MR	Stephansmaschine- Behälter	13	7478
V2A	**BR**	**Küchenmaschine- Messer**	**14**	**7479 Tox pos**
V2A	MR	Küchenmaschine- Einsatz	15	7480
Makrolon	BR	Rührscheide- Küchenmaschine	16	7481
Makrolon	MR	Einfüllstutzen	17	7482
Makrolon	BR	Schneidbrett	18	7483
Gummi	T	Dichtung Küchenmaschine	19	7484
Gummi	T	Bedienfeld Stephansmaschine	20	7485
Gummi	T	Bedienfeld Fleischwolf	21	7486
Keramik	MR	Wandfliesen	22	7487
Keramik	**BR**	**Wandfliesen**	**23**	**7488 Tox pos**
Keramik	MR	Wandfliesen	24	7489

Mikrobiologische Hygienestatuskontrolle

ZInstSanBw KOBLENZ Lab.Abt.II

Probenahmeprotokoll

Kaserne:	
Ort:	
Datum:	29.08.05

Tabelle der Probennahme-Punkte je Arbeitsbereich

Kühlung				
Material	Medium	Beschreibung Probenahmepunkt	Status-Nr.	Reg-Nr. Inst
V2A	BR	Türblatt- Molkereikühlhaus	25	7490
V2A	MR	Regal- Fertigproduktekühlhaus	26	7491
V2A	BR	Regal- Ferigproduktekühlhaus	27	7492
Makrolon	MR	Griff Fertigproduktekühlhaus	28	7493
Makrolon	BR	Wand- Fertigproduktekühlhaus	29	7494
Makrolon	MR	Tablett- Proberationskühlschrank	30	7495
Gummi	**T**	**Dichtung- Molkereikühlhaus**	**31**	**7496 Tox neg**
Gummi	T	Dichtung- Fertigproduktekühlhaus	32	7497
Gummi	T	Dichung- Fleischkühlhaus	33	7498
Keramik	BR	Wandfliese- Gemüsek.	34	7499
Keramik	MR	Wandfliesen-	35	7500
Keramik	BR	Wandfliesen	36	7501

Mikrobiologische Hygienestatuskontrolle

ZInstSanBw KOBLENZ Lab.Abt.II

Probenahmeprotokoll

Kaserne:	I
Ort:	I
Datum:	29.08.05

Tabelle der Probennahme-Punkte je Arbeitsbereich

Garküche				
Material	Medium	Beschreibung Probenahmepunkt	Status-Nr.	Reg-Nr. Inst
V2A	MR	Regal	37	7502
V2A	BR	Schöpflöffel	38	7503
V2A	**MR**	**Gewürzregal**	**39**	**7504 Tox pos**
Makrolon	BR	Makrolonrührer	40	7505
Makrolon	MR	Schneidbrett	41	7506
Makrolon	**BR**	**Hustenschutz Pfeffer**	**42**	**7507 Tox pos**
Gummi	T	Dichtung- Konvektomat	43	7508
Gummi	T	Dichtung- Konvektomat	44	7509
Gummi	T	Kabel auf Arbeitsfläche	45	7510
Keramik	MR	Wandfliesen	46	7511
Keramik	BR	Wandfliesen	47	7512
Keramik	**MR**	**Wandfliesen**	**48**	**7513 Tox pos**

Mikrobiologische Hygienestatuskontrolle

ZInstSanBw KOBLENZ Lab.Abt.II

Probenahmeprotokoll

Kaserne:	
Ort:	
Datum:	29.08.05

Tabelle der Probennahme-Punkte je Arbeitsbereich

Ausgabe / Bedarfgegenstände

Material	Medium	Beschreibung Probenahmepunkt	Status-Nr.	Reg-Nr. Inst
V2A	BR	Abdeckung Teller	49	7514
V2A	MR	Proberationsbehälter	50	7515
V2A	BR	Milchspender	51	7516
Makrolon	MR	Tablett	52	7517
Makrolon	**BR**	**Becher Plaste**	**53**	**7518 Tox pos**
Makrolon	**MR**	**Abdeckung Teller**	**54**	**7519 Tox pos**
Gummi	T	Getränkespender	55	7520
Gummi	**T**	**Getränkespender**	**56**	**7521 Tox pos**
Gummi	T	Getränkespender	57	7522
Keramik	MR	Schüssel	58	7523
Keramik	BR	Teller	59	7524
Keramik	MR	Tasse	60	7525

Mikrobiologische Hygienestatuskontrolle

ZInstSanBw KOBLENZ Lab.Abt.II

Kaserne:	
Ort:	
Datum:	29.08.05

Wischtupfer-Proben	Status – Nr.	Reg.- Nr. – Lab.	Status:
Hände Personal	61	7526	
Hände Personal	**62**	**7527 Tox pos**	
Hände Personal	63	7528	
Hände Personal	64	7529	
Hände Personal	65	7530	
Hände Personal	66	7531	
Hände Personal	**67**	**7532 Tox pos**	
Hände Personal	68	7533	
Hände Personal	**69**	**7534 Tox pos**	
Hände Personal	70	7535	

DANKSAGUNG

Mein besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr. E. Märtlbauer für die Überlassung des Themas und die stets freundliche und großzügige Unterstützung bei der Anfertigung dieser Arbeit.

Für die gewährten Arbeitsmöglichkeiten in der Laborabteilung II des Zentralen Institutes des Sanitätsdienstes der Bundeswehr Koblenz und die Unterstützung bei der Probengewinnung danke ich Herrn Oberfeldveterinär Dr. R. Scheurer.

Frau OSV Dr. C. Ernst danke ich für die Diskussionsansätze zu dieser Arbeit.

Für die Tatkräftige Unterstützung bei praktischen Aspekten danke ich den Mitarbeitern der Laborabteilung II des ZInstSanBw Koblenz und insbesondere Frau D. Geeb, OFw Heil, Herrn M. Pfaff, OSV G. Nagy.

Herrn Dr. M. Moravek kann ich gar nicht genug danken für die unermüdliche Geduld im Zusammenhang mit der Planung, Durchführung sowie der Erstellung dieser Arbeit. Und nicht genug für jegliche Unterstützung in allen Bereichen des Lebens im Umfeld dieser Arbeit. In diesem Rahmen danke ich auch insbesondere meiner Leidensgenossin Frau I. Erbslöh mit dem Bewusstsein „wir haben das Beste daraus gemacht“. Herzlichst danke ich Frau D. Hermann für ihr unermüdliches, praktisches Engagement sowie dem ganzen Team des Milchhygienelehrstuhls der LMU für die herzliche Integration.

Meinen Kameraden Herrn OFA Dr. S.- A. Gutcke danke ich für die Entwicklung und Festigung der Idee sowie Herrn OLT W. Wende für die moralische Unterstützung und den Blick für die Prioritäten. Meiner Freundin Frau OFA Dr. Y. Engelmann-Zorn für die Ruhe und Herzlichkeit und meinem besten Freund Herr OSA d.R. Dr. M. Kühn für die Leichtigkeit des Seins.

Den größten Dank schulde ich meiner Familie. Allen voran danke ich meinem Sohn für sein großes Vorbild und seine Liebe. Meiner Schwester für ihr großes Ohr und Verständnis. Meinen lieben Eltern danke ich für Alles.

Ronny, der leuchtende Gegenpol zu diesem Leben, dessen Selbstverständnis und Liebe das Durchhalten ermöglichten, danke ich von Herzen.

Abschließend danke ich, für die vielgestaltige Hilfe, Frau Dr. A. Didier, Herrn L. Albrecht, Frau Dr. C. Werner, Frau Y. Yuds und der Familie Luy.

Lebenslauf

Name:	Christine Kreuzberger
geboren:	22. April 1966 in Frankfurt a.M.
Eltern:	Vater: Herbert Kreuzberger Mutter: Anneliese Kreuzberger, geb. Nitzek
Familie	Sohn: Moritz Kreuzberger
Ausbildung/: Tätigkeiten	1982 - 85 Abitur, Karl Rehbein Gymnasium, Hanau 1987 - 89 Berufsausbildung zur MTA, Offenbach 1990 - 98 MTA im Notfalllabor, Stadtkrankenhaus Hanau 1990 - 96 Studium der Veterinärmedizin, JLU, Gießen 1998 - 04/2000 Veterinary Sales Representative, Fa. IAMS 04/00 - 04/01 Kleintierpraxen in Limburg, Kirchenlamitz Kleintier- und Pferdefahrpraxis, Kirchhain 04/01 - 09/01 Assistentin; Tierarztpraxis, Jünkerath 05/02 - 04/06 Stabsveterinär; SAZ bei der Bundeswehr 05/02- 11/05 Zentrales Institut des Sanitätsdienstes der BW, Koblenz 11/03 - 02/04 Auslandseinsatz, Bosnien 05/04 - 07/05 Auslandseinsatz, Kosovo, 11/05 - 04/06 Schule für Diensthundewesen der BW
Approbation:	05. Dezember 1996
Anfertigung dieser Arbeit:	praktischer Teil: von Nov 03 – August 05 schriftlicher Teil: von Mai 06 – Oktober 06