

# **Entwicklung, Etablierung und Anwendung molekularbiologischer Methoden zum Nachweis enterotoxinogener *Bacillus cereus***

**Esther Wehrle**

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

---

**Entwicklung, Etablierung und Anwendung molekularbiologischer  
Methoden zum Nachweis enterotoxinogener *Bacillus cereus***

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

von  
**Esther Wehrle**  
aus Kehl am Rhein

München 2010

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

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Braun

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Dr. h.c. Märtlbauer

Korreferenten:  
Univ.-Prof. Dr. Straubinger  
Univ.-Prof. Dr. Kienzle  
Priv.-Doz. Dr. Rinder  
Univ.-Prof. Dr. Kaspers

Tag der Promotion: 13. Februar 2010

*Für meine Eltern*

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Schrifttum</b>	<b>3</b>
<b>2.1</b>	<b>Allgemeines</b>	<b>3</b>
2.1.1	Historischer Überblick	3
2.1.2	Taxonomische Einordnung	3
2.1.3	Gastrointestinale Krankheitsbilder	4
<b>2.2</b>	<b><i>Bacillus cereus</i> Toxine</b>	<b>5</b>
2.2.1	Hämolysin BL (Hbl)	5
2.2.2	Non-hemolytic Enterotoxin (Nhe)	7
2.2.3	Cytotoxin K (CytK)	8
2.2.4	Cereulid	9
<b>2.3</b>	<b>Regulation der Toxin-Expression</b>	<b>11</b>
<b>2.4</b>	<b>Nachweisverfahren</b>	<b>12</b>
2.4.1	Kulturelle Methoden	12
2.4.2	Tiermodelle	12
2.4.3	<i>In vitro</i> Bioassays	12
2.4.4	Immunochemische Methoden	13
2.4.5	Molekularbiologische Methoden	14
2.4.5.1	Konventionelle PCR	14
2.4.5.2	Real-time PCR	15
<b>3</b>	<b>Eigene Untersuchungen</b>	<b>18</b>
<b>3.1</b>	<b>Materialien</b>	<b>18</b>
3.1.1	Chemikalien und Biochemika	18
3.1.2	Bakterien Stämme und Isolate	20

3.1.3	Zellen und Zelllinien	20
3.1.4	PCR-Primer	20
3.1.5	Nährmedien	21
3.1.6	Lösungen und Puffer	22
3.1.7	Immunreagenzien	23
3.1.8	Verbrauchsmaterialien	23
3.1.9	Geräte	24
3.1.10	Software	25
<b>3.2</b>	<b>Allgemeine Methodik</b>	<b>26</b>
3.2.1	Anzucht von <i>B. cereus</i> in Hirn-Herz-Bouillon (BHI)	26
3.2.2	Anzucht von <i>B. cereus</i> in Caseinhydrolysat-Glukose-Hefe-Bouillon (CGY)	26
3.2.3	Anzucht von <i>B. cereus</i> in Magermilch (SMM)	26
3.2.4	Stärkehydrolyse-Test	27
3.2.5	DNA-Extraktion	27
3.2.6	Bestimmung der DNA-Konzentration und -Reinheit	27
3.2.7	PCR-Primer	28
3.2.8	Interne Amplifikationskontrolle (IAC)	28
3.2.9	PCR	28
3.2.9.1	Konventionelle multiplex PCRs	29
3.2.9.2	Agarose-Gelelektrophorese	30
3.2.9.3	Klonierung und Sequenzierung von PCR-Produkten	30
3.2.9.4	Multiplex real-time PCR	32
3.2.9.4.1	Sensitivität und PCR-Effizienz	33
3.2.9.4.2	Statistische Datenauswertung	33
3.2.9.5	Spezifität	33
3.2.10	Enzymimmuntest (EIA)	34
3.2.10.1	Indirekter Enzymimmuntest	34
3.2.10.2	Sandwich-Enzymimmuntest	34
3.2.11	Zytotoxizitätstest	35
3.2.11.1	Zytotoxizitätstest mit Vero Zellen	35
3.2.11.2	Zytotoxizitätstest mit HEp-2 Zellen	37

<b>3.3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>38</b>
3.3.1	PCR	38
3.3.1.1	Konventionelle multiplex PCRs	38
3.3.1.1.1	Spezifität der konventionellen PCR	39
3.3.1.1.2	Sequenzanalyse von PCR-Produkten nach den konventionellen PCRs	40
3.3.1.1.3	Toxin-Genprofile der <i>B. cereus</i> Stämme und Isolate nach Untersuchung mit konventioneller multiplex PCR	41
3.3.1.2	Multiplex real-time PCR	43
3.3.1.2.1	Sensitivität und Effizienz der real-time PCR	44
3.3.1.2.2	Vergleichsuntersuchung singleplex und multiplex real-time PCR	47
3.3.1.2.3	Reproduzierbarkeit der real-time PCR	48
3.3.1.2.4	Untersuchung mit der multiplex real-time PCR im LC 2.0	48
3.3.1.2.5	Vergleichsuntersuchung LC 2.0 und LC 480	51
3.3.1.3	Vergleich: Konventionelle multiplex PCRs – Real-time multiplex PCR	51
3.3.2	Stärkehydrolyse-Test	53
3.3.3	Enterotoxin-Expression und Zytotoxizität von 359 enterotoxinogenen Stämmen und Isolaten	53
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>56</b>
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b> <b>Summary</b>	<b>65</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>69</b>
<b>7</b>	<b>Anhang</b>	<b>98</b>

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1	Aufbau des <i>hbl</i> Operons nach GRANUM (2001)	6
Abbildung 2	Aufbau des <i>nhe</i> Operons nach GRANUM (2001)	7
Abbildung 3	Chemische Struktur von Cereulid (AGATA et al., 1994; MAKARASEN et al., 2009)	9
Abbildung 4	PCR-Amplifikate von <i>B. cereus</i> Stämmen mit unterschiedlichen Toxinprofilen nach PCR 1 – 4 unter Verwendung von IACs	39
Abbildung 5	Toxin-Genprofile (I-VIII) der untersuchten <i>B. cereus</i> Stämme und Isolate nach PCR 1 – 4	41
Abbildung 6	Verteilung toxinogener <i>B. cereus</i> Stämme und Isolate auf die Genprofile I-VIII	42
Abbildung 7	PCR-Produkte der <i>B. cereus</i> Referenzstämme nach multiplex real-time PCR und 2 % Gelelektrophorese	43
Abbildung 8	Schmelzkurven der <i>B. cereus</i> Referenzstämme mit eindeutigen Schmelzpunkten für die entsprechenden Enterotoxin-Gene nach Durchführung der multiplex real-time PCR	44
Abbildung 9	Amplifikationskurven einer DNA-Verdünnungsreihe des <i>B. cereus</i> Stammes NVH 391/98 und einer Negativkontrolle in der multiplex real-time PCR	45
Abbildung 10	Serielle DNA-Verdünnungen der <i>B. cereus</i> Referenzstämme in singleplex und multiplex real-time PCRs	46
Abbildung 11	Multiple sequence alignment	104

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	Speziesdifferenzierung innerhalb der <i>Cereus</i> -Gruppe nach GRANUM (2001)	4
Tabelle 2	<i>B. cereus</i> Toxine	5
Tabelle 3	Publizierte PCR-Protokolle für die <i>B. cereus</i> Toxin-Gene <i>hblCDA</i> , <i>nheABC</i> , <i>cytKI</i> und <i>ces</i>	15
Tabelle 4	Charakteristika der verwendeten PCR-Primer	31
Tabelle 5	Enzymimmuntests mit entsprechenden monoklonalen Antikörpern (mAk)/Antiseren	36
Tabelle 6	Homologie (%) von partiellen Toxin-Gensequenzen der <i>B. cereus</i> Referenzstämme, anderen <i>Cereus</i> -Gruppen Stämmen und Sequenzen aus GenBank (multiple sequence alignments im Anhang)	40
Tabelle 7	Effizienz-Bestimmung der singleplex und multiplex real-time PCRs	46
Tabelle 8	$C_t$ - und $T_m$ -Mittelwerte in singleplex und multiplex real-time PCRs für ausgewählte Stämme und Isolate	47
Tabelle 9	Reproduzierbarkeit der multiplex real-time PCR im Light Cyclers 2.0	49
Tabelle 10	Ergebnisse der Stämme (n = 168) und Isolate (n = 208) im Light Cyclers 2.0	50
Tabelle 11	Multiplex PCR-Ergebnisse von 113 Stämmen und Isolaten im Light Cyclers 2.0 und Light Cyclers 480	52
Tabelle 12	Toxin-Genprofile, Toxin-Expression und Zytotoxizität der untersuchten Stämme und Isolate	55
Tabelle 13	Mastermix PCR 1	98

Tabelle 14	Amplifikationsbedingungen PCR 1	98
Tabelle 15	Mastermix PCR 2	99
Tabelle 16	Amplifikationsbedingungen PCR 2	99
Tabelle 17	Mastermix PCR 3	100
Tabelle 18	Amplifikationsbedingungen PCR 3	100
Tabelle 19	Mastermix PCR 4	101
Tabelle 20	Amplifikationsbedingungen PCR 4	101
Tabelle 21	Mastermix LC 2.0	102
Tabelle 22	Amplifikationsbedingungen LC 2.0	102
Tabelle 23	Mastermix LC 480	103
Tabelle 24	Amplifikationsbedingungen LC 480	103
Tabelle 25	Charakteristika der untersuchten Stämme (n = 168) und Isolate (n = 208)	109

## Abkürzungsverzeichnis

Å	Angström
A. (bi)dest.	Aqua (bi)destillata, (zweifach) destilliertes Wasser
ATCC	American Type Culture Collection, Amerikanische Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
<i>B.</i>	<i>Bacillus</i>
BFR	Bundesinstitut für Risikobewertung
BHI	Brain Heart Infusion, Hirn-Herz-Bouillon
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool, Programm zur Analyse biologischer Sequenzdaten
bp	Basenpaare
CaCo-2	Zelllinie aus Colonadenokarzinom Zellen
CDC	Centers for Disease Control and Prevention
<i>ces</i>	Gene der Peptidsynthase Ces
CGY	Caseinhydrolysate-glucose-yeast, Caseinhydrolysat-Glukose-Hefe
CHO	Zelllinie aus Ovarienzellen chinesischer Hamster
CO <sub>2</sub>	Kohlendioxid
C <sub>t</sub>	Threshold cycle, Schwellenwert-Zyklus
CytK	Cytotoxin K
<i>cytK1</i>	Gen des Cytotoxin K1
DGE	Deutsche Gesellschaft für Ernährung
DGHM	Deutsche Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie
DNA	Desoxyribonucleic acid, Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
ds	double stranded, doppelsträngig
DSM/DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
E	Effizienz
<i>E.</i>	<i>Escherichia</i>
EDTA	Ethylen-Diamin-Tetra-Acetat
EIA	Enzyme immunoassay, Enzymimmuntest
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay, Enzym-gekoppelter Immunadsorptionstest
FCS	Fetal calf serum, fetales Kälberserum

FRET	Fluoreszenz-Resonanzenergietransfer
<i>g</i>	Erdschwerebeschleunigung
GP	Geringe Toxinproduktion
H	Hände
Hbl	Hämolysin BL
<i>hbl</i>	Gene des Hämolysin BL
HE	Humane Exkrememente
HEp-2	Zelllinie aus humanen Larynxkarzinomzellen
HCl	Chlorwasserstoff (Salzsäure)
HlyE	Hämolysin E
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
HRP	Horse radish peroxidase, Meerrettichperoxidase
HSA	Humanes Serumalbumin
IAC	Internal amplification control, Interne Amplifikationskontrolle
IU	International Unit, Internationale Einheit
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
KEG	Kommission der Europäischen Gemeinschaften
LC	Light Cycler
LI	Lebensmittelisolat
LV	Lebensmittelvergiftung
mAk	Monoklonaler Antikörper
Mb	Megabasen
MEM	Minimal essential medium, Erhaltungsmedium
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
MHI	Stammsammlung, Lehrstuhl für Hygiene und Technologie der Milch
MLT	Mouse lethality test, Mäuse-Lethalitätstest
mRNA	messenger ribonucleic acid, Boten-Ribonukleinsäure
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
MYP	Mannitol-egg-yolk-polymyxine, Mannitol-Eigelb-Polymyxin
NCBI	National Center for Biotechnology Information
Nhe	Non-hemolytic Enterotoxin
<i>nhe</i>	Gene des Non-hemolytic Enterotoxin
NVH	Norwegian School of Veterinary Science, Norwegische Sammlung

	von Mikroorganismen
O	Oberfläche
OD	Optical density, optische Dichte
PBS	Phosphate buffered saline, phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PCR	Polymerase chain reaction, Polymerase-Kettenreaktion
Ped-2E9	Zelllinie aus murinen Lymphozyten
PEMBA	Polymyxin-Pyruvat-Eigelb-Mannitol-Bromthymolblau-Agar
<i>p</i>	<i>p</i> -Wert
pH	pondus Hydrogenii
PlcR	Phospholipase C Regulator
PS	Psychrotroph
R <sup>2</sup>	Korrelation
RIL	Rabbit ileal loop-test, Darmschlingenligationstest beim Kaninchen
rpm	revolutions per minute, Umdrehungen pro Minute
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
RTP	Real-time PCR
SD	Standard deviation, Standardabweichung
SMM	Skim milk medium, Magermilch-Medium
spp.	species pluralis
SYBR	2-{2-[(3-Dimethylamino-propyl)-propylamino]-1-phenyl-1 <i>H</i> -chinolin-4-ylidenmethyl}-3-methyl-benzothiazol-3-ium-Kation
TMB	Tetramethylbenzidin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Unit, Einheit der Enzymaktivität
UG	Umgebung
UV	Ultraviolett
Vero	Zelllinie aus Affennierenzellen
VPR	Vascular permeability reaction, vaskuläre Permeabilitätsreaktion
WHO	World health organization
WST	Water-soluble tetrazolium salt, wasserlösliches Tetrazoliumsalz
ZT	Zellkulturtest

Abkürzungen nach dem Internationalen Einheitssystem (SI-Einheiten) sind nicht aufgeführt.

# 1 Einleitung

Das in der Umwelt weit verbreitete Bakterium *Bacillus cereus* besitzt als Sporenbildner eine hohe Widerstandsfähigkeit gegenüber diversen Umgebungseinflüssen (Feuchtigkeit, pH-Wert, Temperatur; KOTIRANTA et al., 2000; FAILLE et al., 2002). Insbesondere die Bildung von Biofilmen schützt *B. cereus* vor Inaktivierung durch gängige Reinigungs- und Desinfektionsmittel und erleichtert die passive Verbreitung der hochgradig adhärennten Sporen (RYU & BEUCHAT, 2005; FAILLE et al., 2007; WIJMAN et al., 2007).

*B. cereus* wird beim Menschen in Zusammenhang mit verschiedenen nicht-gastrointestinalen Erkrankungen gebracht, wobei sowohl systemische Infektionen (z. B. Pneumonien, Septikämien) als auch Erkrankungen mit lokaler Manifestation (z. B. Keratitiden, Periodontitiden, Wundinfektionen) beschrieben sind (DROBNIEWSKI, 1993; KOTIRANTA et al., 2000; BECKER & BECKER, 2005). Bei Tieren gilt *B. cereus* als Verursacher von Dermatitiden und Mastitiden (TERPLAN, 1957; FRÖHLICH, 1991; AJUWAPE et al., 2005).

Im Lebensmittelsektor spielt *B. cereus* in zweifacher Hinsicht eine bedeutende Rolle. Aufgrund ausgeprägter lipo- und proteolytischer Eigenschaften wird *B. cereus* zu den wichtigsten Verderbserregern gezählt (z. B. Süßgerinnung von Milchprodukten; HEYNDRICKX & SCHELDAMAN, 2002; BECKER & BECKER, 2005). Daneben kann *B. cereus* durch die Produktion verschiedener extrazellulärer Toxine Lebensmittelvergiftungen verursachen, wobei eine Diarrhö-Form und eine emetische Form unterschieden werden (GRANUM, 2001; SCHOENI & WONG, 2005). Ursächlich beteiligt sind bei der von Diarrhö dominierten Form neben einem Einzelprotein (CytK1) zwei aus je drei Komponenten bestehende Protein-Komplexe (Hbl, Nhe) bzw. bei der emetischen Form ein zyklisches Peptid (Cereulid).

In den letzten Jahren wurde eine deutliche Zunahme lebensmittelassoziierter Erkrankungen im Zusammenhang mit enteropathogenen *B. cereus* beobachtet (DGE, 2004, 2008), wodurch eine steigende Nachfrage nach zuverlässigen Nachweismethoden resultierte. Für die bakterielle Routinediagnostik sind schnell und einfach durchzuführende immunologische Tests und molekularbiologische Methoden basierend auf der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) geeignet (LAURI & MARIANI, 2009; WEILE & KNABBE, 2009). Insbesondere multiplex PCRs ermöglichen durch einen simultanen Nachweis mehrerer Toxin-Gensequenzen eine Rationalisierung des Arbeitsaufwandes und der eingesetzten Materialien

(SETTANNI & CORSETTI, 2007). Bis dato sind für *B. cereus* mehrere multiplex PCRs für konventionelle Systeme beschrieben, wohingegen für real-time Applikationen bisher lediglich zwei singleplex Protokolle zum Nachweis von *nheB* und *ces* publiziert wurden (FRICKER et al. 2007; YANG et al., 2007). Bei gleichzeitiger Anwendung von kommerziell erhältlichen immunologischen Testkits für *B. cereus* Toxine (BDE VIA<sup>TM</sup>, TECRA; OXOID RPLA) und den publizierten konventionellen multiplex PCR-Protokollen zur Detektion der zugrunde liegenden Toxin-Gene, traten jedoch Diskrepanzen zwischen den mit beiden Methoden erhaltenen Ergebnissen auf (OUOBA et al., 2008; ANKOLEKAR et al., 2009).

Real-time Systeme mit der Möglichkeit einer digitalen Datenauswertung erfordern im Gegensatz zu konventionellen Systemen keine weiteren Bearbeitungsschritte, gehören jedoch in der Routinediagnostik nicht zur Standardlaborausstattung. Ziel dieser Studie war daher die Entwicklung von zuverlässigen konventionellen und real-time multiplex Assays zum simultanen Nachweis mehrerer *B. cereus* Toxin-Gene. In einem ersten Schritt sollten Screening-Methoden zur Detektion von *hbl*, *nhe*, *ces* und *cytK1* und Methoden zur Feintypisierung der jeweils drei Gene der Enterotoxin-Komplexe Hbl und Nhe zur Anwendung in konventionellen Systemen realisiert werden. Nach erfolgreicher Etablierung dieser Assays sollte eine weitere Screening-Methode für real-time Applikationen entwickelt werden.

Alle Methoden wurden an zuvor bereits immunologisch, zell- und molekularbiologisch charakterisierten *B. cereus* Stämmen (n = 146) etabliert und im Anschluss zur Charakterisierung von *B. cereus* Isolaten (n = 208) aus Lebensmittel- und Hygienestatuskontrollen der Bundeswehr eingesetzt. Eine Überprüfung der PCR-Ergebnisse erfolgte mit validierten, auf monoklonalen Antikörpern basierenden Enzymimmuntests und Zytotoxizitätstests.

---

Diese Arbeit entstand im Rahmen des Forschungsvorhabens M/SAB1/6/A012 für den Sanitätsdienst der Bundeswehr. Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht: WEHRLE et al., 2009. Comparison of multiplex PCR, enzyme immunoassay and cell culture methods for the detection of enterotoxinogenic *Bacillus cereus*. *Journal of Microbiological Methods* 78, 265 – 270.

## 2 Schrifttum

### 2.1 Allgemeines

#### 2.1.1 Historischer Überblick

Erste Anhaltspunkte für einen ursächlichen Zusammenhang zwischen *B. cereus* und gastrointestinalen Erkrankungen sind in einer von LUBENAU durchgeführten Studie über einen Lebensmittelvergiftungsfall aus dem Jahr 1906 zu finden. Das Eigenschaftsspektrum eines im Rahmen dieser Studie isolierten Bakteriums (Koloniemorphologie, Hämolyse, Sporenbildung, Eiweißabbau in Milch), deutet darauf hin, dass es sich um den heutzutage als *Bacillus cereus* bezeichneten Mikroorganismus handelte (EVANS & BRACHMAN, 1998; ADAMS & MOSS, 2000; BECKER & BECKER, 2005). Die erste wissenschaftlich abgesicherte Beschreibung einer durch *B. cereus* hervorgerufenen von Durchfall dominierten gastrointestinalen Erkrankung wurde 1955 von HAUGE publiziert. Im Gegensatz zu diesem als Diarrhö-Form bezeichneten Krankheitsbild, wurden zu Beginn der 70er Jahre durch *B. cereus* verursachte Vergiftungsfälle mit dem Leitsymptom Erbrechen (emetische Form) dokumentiert (PUBLIC HEALTH LABORATORY SERVICE, 1972, 1973; MORTIMER & MC CANN, 1974). Nach der Diskussion unterschiedlicher zugrunde liegender Pathogenitätsfaktoren (z. B. Cereolysin O und Phospholipase C; KREFT et al., 1983; KUPPE et al., 1989), gelang ab Mitte der 90er Jahre eine präzise Charakterisierung einzelner *B. cereus* Toxine und Toxin-Komplexe (AGATA et al., 1995b; BEECHER et al., 1995; LUND & GRANUM, 1996; LUND et al., 2000).

#### 2.1.2 Taxonomische Einordnung

Das ubiquitäre, stäbchenförmige, fakultativ anaerobe Bakterium *B. cereus* gehört zum Genus *Bacillus* (SMITH et al., 1946, 1952; GORDON et al., 1973; GIBSON & GORDON, 1974), welches mit weiteren Genera (u. a. *Clostridium* spp.) die Gruppe der Gram-positiven Endosporen produzierenden Bakterien bildet (HOLT et al., 1994). Innerhalb des Genus *Bacillus* wird *B. cereus* der morphologischen Gruppe 1A zugerechnet und bildet hier mit fünf weiteren Spezies (*B. anthracis*, *B. thuringiensis*, *B. mycoides*, *B. pseudomycoides*, *B.*

*weihenstephanensis*) die sogenannte „*Cereus*-Gruppe“. Nach GRANUM (2001) können die Spezies dieser genetisch höchst homogenen Gruppe anhand der in Tabelle 1 aufgeführten Kriterien differenziert werden.

**Tabelle 1. Speziesdifferenzierung innerhalb der *Cereus*-Gruppe nach GRANUM (2001)**

Spezies	Kolonie-Morphologie	Hämolyse	Beweglichkeit	Penicillin-Empfindlichkeit	Parasporale Kristalle
<i>B. cereus</i>	weiß	+	+	-	-
<i>B. anthracis</i>	weiß	-	-	+	-
<i>B. thuringiensis</i>	weiß/grau	-	+	-	+
<i>B. mycoides</i>	rhizoid	(+)	-	-	-
<i>B. weihenstephanensis</i>	Abgrenzung zu <i>B. cereus</i> : Wachstum bei < 7 °C, nicht bei 43 °C; Identifizierung mit PCR (rRNA, Cold-shock-Protein-A-Gen- <i>cspA</i> ; LECHNER et al., 1998)				
<i>B. pseudomycoides</i>	Abgrenzung zu <i>B. mycoides</i> nur anhand des Fettsäuremusters und der 16S rRNA-Sequenz				

### 2.1.3 Gastrointestinale Krankheitsbilder

*B. cereus* verursacht im Regelfall mild verlaufende gastrointestinale Erkrankungen, wobei einzelne Lebensmittelvergiftungsfälle mit letalem Ausgang beschrieben wurden (MAHLER et al., 1997; LUND et al., 2000; DIERICK et al., 2005). Anhand des im Vordergrund stehenden Hauptsymptoms werden zwei Krankheitsformen unterschieden: Die Diarrhö-Form mit profusem Durchfall, Abdominalkrämpfen und weniger häufig Erbrechen ist eine Lebensmittelinfektion mit einer Inkubationszeit von 8 – 16 h und einer Erkrankungsdauer von 12 – 14 h, die in ihrer Symptomatik Lebensmittelvergiftungen mit *Clostridium perfringens* ähnelt. Bei der emetischen Form mit den beiden vorwiegend auftretenden Symptomen Vomitus und Nausea handelt es sich um eine klassische Lebensmittelintoxikation mit einer Inkubationszeit von 0,5 – 5 h und einer Erkrankungsdauer von 6 – 24 h, deren Verlauf *Staphylococcus aureus* Enterotoxin-Vergiftungen gleicht.

## 2.2 *Bacillus cereus* Toxine

Die beiden Krankheitsbilder Diarrhö und Emesis können durch mehrere Toxine und Toxin-Komplexe verursacht werden (SCHOENI & WONG, 2005; STENFORS ARNESEN et al., 2008; Tabelle 2). Die Diarrhö-Form wird nach derzeitigem Kenntnisstand durch die aus jeweils drei Proteinen bestehenden Enterotoxin-Komplexe Hbl (BEECHER et al., 1995) und Nhe (LUND & GRANUM, 1996) sowie durch ein Einzelprotein Cytotoxin K (LUND et al., 2000) und die emetische Form durch ein zyklisches Peptid, Cereulid (AGATA et al., 1995b; EHLING-SCHULZ et al., 2004a) ausgelöst. Eine Beteiligung weiterer als Enterotoxine beschriebener Proteine, Enterotoxin T (AGATA et al., 1995a) und Enterotoxin FM (ASANO et al., 1997), kann nach dem aktuellen Wissensstand nicht bestätigt werden (LUND et al., 2000; CHOMA & GRANUM, 2002).

**Tabelle 2. *B. cereus* Toxine**

Toxin bzw. Toxin-Komplex	Referenz	Molekulargewicht (kDa) <sup>1</sup>	Biol. Aktivität <sup>2</sup>
Hbl (B, L <sub>1</sub> , L <sub>2</sub> ) <sup>2</sup>	THOMPSON et al. (1984)	38,0; 39,5; 43,0	RIL, VPR, MLT, ZT
	BEECHER et al. (1995)	37,8; 38,5; 43,2	
	BEECHER & WONG (2000)	38,1; 39,5; 44,8	
Nhe (A, B, C) <sup>2</sup>	LUND & GRANUM (1996)	45,0; 39,0; 105,0	ZT
	GRANUM et al. (1999)	41,0; 39,8; 36,5	
Cytotoxin K	LUND et al. (2000)	34,0	ZT
Cereulid	AGATA et al. (1994)	1,2	ZT

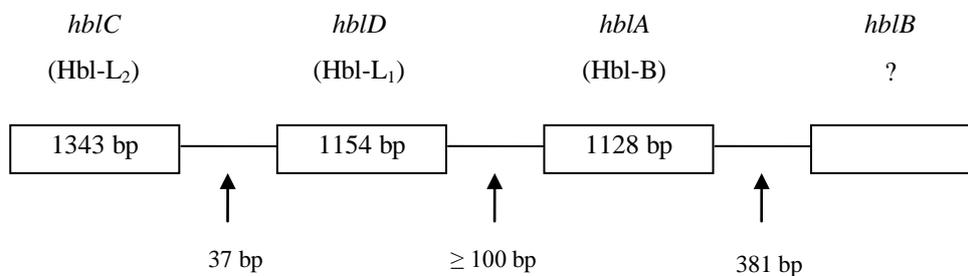
<sup>1</sup>Die Molekulargewichtsangaben in den Publikationen von BEECHER & WONG (2000) und GRANUM et al. (1999) repräsentieren den aktuellen Forschungsstand.

<sup>2</sup>RIL, rabbit ileal loop test; VPR, vascular permeability reaction; MLT, mouse lethality test; ZT, Zytotoxizitätstest.

### 2.2.1 Hämolyisin BL (Hbl)

Die drei Protein-Komponenten Hbl-L<sub>2</sub> (44,8 kD), Hbl-L<sub>1</sub> (39,5 kDa) und Hbl-B (38,1 kDa) des erstmals 1984 von THOMPSON et al. beschriebenen Enterotoxin-Komplexes Hbl werden

durch die Gene *hblC*, *hblD* bzw. *hblA* kodiert, welche auf einem Operon liegen und in eine mRNA transkribiert werden (HEINRICHS et al., 1993; RYAN et al., 1997; LINDBÄCK et al., 1999; Abbildung 1). Die Hbl-Komponenten verschiedener Stämme zeigen einen hohen Grad an Heterogenität und es konnte gezeigt werden, dass zwei unterschiedliche Varianten des *hbl* Operons vorkommen können (*hblCDA*, *hblCDAB*; STENFORS ARNESEN et al., 2008). Bei der häufiger auftretenden Form befindet sich unterhalb *hblCDA* ein weiteres Gen (*hblB*), welches eine große Sequenzhomologie mit *hblA* aufweist, jedoch wahrscheinlich ein Pseudogen darstellt, da es nicht in nachweisbarer Menge transkribiert wird (HEINRICHS et al., 1993; GRANUM & LUND, 1997; RYAN et al., 1997; STENFORS ARNESEN et al., 2008).



**Abbildung 1.** Aufbau des *hbl* Operons nach GRANUM (2001)

Zur Erklärung des zellulären Wirkungsmechanismus von Hbl sind zwei unterschiedliche Modelle beschrieben: Nach BEECHER & MACMILLAN (1991) bindet die B-Komponente an die Zelloberfläche, woraufhin es zur Einschleusung der beiden L-Komponenten kommt, welche eine Störung der metabolischen Aktivität der Zelle bewirken. Im Gegensatz hierzu wurde von BEECHER & WONG (1994a, 1997) ein Modell vorgeschlagen bei dem sich die drei Komponenten unabhängig voneinander an die Zielzelle binden, einen sogenannten „membrane attack complex“ bilden, durch dessen Aktivität die Durchlässigkeit der Zellmembran erhöht wird und es schließlich auf Grund kolloidosmotischer Mechanismen zum Austritt von Zellmaterial durch die entstandenen Poren und somit zum Zelltod kommt. Von MADEGOWDA et al. (2008) wurde nach Röntgenstrukturanalyse von Hbl-B auf eine Wirkungsweise der Bindungsdomäne analog zu anderen Poren-bildenden Proteinen (z. B. HlyE von *E. coli*) geschlossen.

Zur Erzielung maximaler biologischer Aktivität ist das gleichzeitige Vorhandensein der Komponenten B, L<sub>1</sub> und L<sub>2</sub> notwendig (BEECHER & MACMILLAN, 1991; BEECHER et al., 1995). Ein phänotypisches Merkmal Hbl-produzierender Stämme, die ringförmige diskontinuierliche Hämolyse auf Blutagar, scheint in Zusammenhang mit zwei durch *B. cereus* gebildeten Enzymen (Sphingomyelinase und Phospholipase C) zu stehen, tritt jedoch nicht bei allen mit PCR und ELISA *hbl*- bzw. Hbl-positiv getesteten Stämmen auf (BEECHER & MACMILLAN, 1990, 1991; BEECHER & WONG, 1994a, 1994b; IN'T VELD et al., 2001).

In molekularbiologischen Studien konnte bei 43 – 83 % der untersuchten *B. cereus* Stämme das komplette *hbl* Operon nachgewiesen werden (HANSEN & HENDRIKSEN, 2001; IN'T VELD et al., 2001; GUINEBRETIERE et al., 2002; THAENTHANEY et al., 2005; YANG et al., 2005; EHLING-SCHULZ et al., 2006; NGAMWONGSATIT et al., 2008b; OUOBA et al., 2008).

## 2.2.2 Non-hemolytic Enterotoxin (Nhe)

Der 1996 von LUND & GRANUM isolierte Enterotoxin-Komplex Nhe besteht aus den drei Proteinen NheA (41,0 kDa), NheB (39,8 kDa) und NheC (36,5 kDa), deren Kodierung durch die auf einem Operon liegenden Gene *nheA*, *nheB* und *nheC* erfolgt (GRANUM et al., 1999; Abbildung 2).

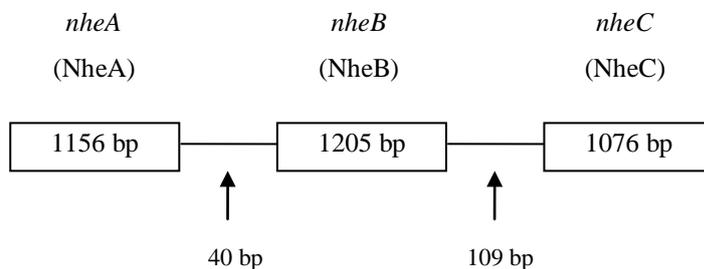


Abbildung 2. Aufbau des *nhe* Operons nach GRANUM (2001)

Ähnlichkeiten der Aminosäuresequenzen konnten von LUND & GRANUM (1997) sowohl zwischen NheB und Hbl-L<sub>1</sub> als auch zwischen NheC und Hbl-B aufgezeigt werden. Bezüglich des zellulären Wirkungsmechanismus wurde NheB als eine Bindungskomponente identifiziert (LINBÄCK et al., 2004). Nach FAGERLUND et al. (2008) ist Nhe ein Poren-bildendes Toxin, das strukturelle und funktionale Ähnlichkeiten mit Hämolytinen Gram-negativer Bakterien (z. B. HlyE) aufweist und eine osmotische Lyse von Epithelien bewirkt. Auf bovinem Blutagar konnte für Nhe im Gegensatz zu Hbl keine Hämolyse beobachtet werden (LUND & GRANUM, 1996), wohingegen in Suspensions-Assays eine hämolytische Aktivität gegenüber Erythrozyten mehrerer Säugetierspezies festgestellt wurde (FAGERLUND et al., 2008). Die Ergebnisse auf bovinem Blutagar sind möglicherweise auf eine niedrigere hämolytische Wirkung von Nhe im Vergleich zu Hbl zurückzuführen (STENFORS ARNESEN et al., 2008). Zur Erzielung der maximalen Zytotoxizität werden wie auch bei Hbl alle drei Komponenten benötigt, wobei ein optimales molares Massenverhältnis NheA : NheB : NheC von 10 : 10 : 1 ermittelt wurde (LINDBÄCK et al., 2004).

Molekularbiologische Studien zeigten bei untersuchten *B. cereus* Stämmen eine Prävalenz der Gene *nheA*, *nheB* und *nheC* von 90 – 100 % (IN'T VELD et al., 2001; YANG et al., 2005; EHLING-SCHULZ et al., 2006; NGAMWONGSATIT et al., 2008b; OUOBA et al., 2008).

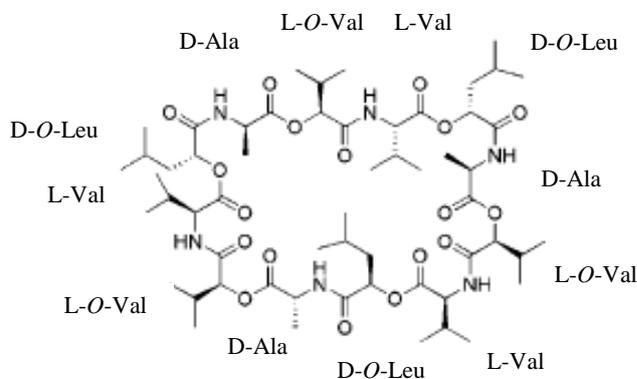
### 2.2.3 Cytotoxin K (CytK)

Das im Jahr 2000 von LUND et al. isolierte und sequenzierte Einzelprotein CytK (34 kD), stammt aus einem *B. cereus* Stamm, der trotz fehlender Hbl- und Nhe-Produktion ursächlich für einen schweren Lebensmittelvergiftungsfall in Frankreich verantwortlich war. Auf Proteinebene weist es Sequenzhomologien mit mehreren Poren-bildenden Toxinen auf, darunter *B. cereus* Hämolytin II (BAIDA et al., 1999),  $\alpha$ - und  $\gamma$ -Hämolytine von *Staphylococcus aureus* und das  $\beta$ -Toxin von *Clostridium perfringens* (LUND et al., 2000). Von HARDY et al. (2001) wurde gezeigt, dass CytK an Doppellipidschichten innerhalb kurzer Zeit Kanäle bildet und zytotoxisch gegenüber intestinalen Epithelien ist. STENFORS & GRANUM (2001) und STENFORS et al. (2002) fanden in Hbl- und Nhe-produzierenden *B. cereus* Stämmen eine CytK-Variante (CytK2), die eine hohe Übereinstimmung (89 %) mit der Aminosäuresequenz des originären CytK (CytK1) aufweist, jedoch eine 80 % geringere Zytotoxizität gegenüber Vero Zellen und humanen intestinalen Caco2 Zellen besitzt

(FAGERLUND et al., 2004). Bis heute konnte das Gen *cytK1* nur in drei *B. cereus* Stämmen nachgewiesen werden und vor kurzem wurde gezeigt, dass alle drei Stämme, anders als zuvor angenommen, zusätzlich eine modifizierte Variante des *nhe* Operons besitzen. Auf Proteinebene zeigt dieses veränderte Nhe eine Übereinstimmung mit der Originalsequenz von 80 %, wobei ein Nachweis der zytotoxischen Aktivität jedoch noch aussteht (FAGERLUND et al., 2007).

## 2.2.4 Cereulid

Das hydrophobe zyklische Dodekadepeptid Cereulid (1,191 kD) besitzt hitze-, säure- und proteolyseresistente Eigenschaften und zeigt große strukturelle Ähnlichkeiten mit dem Antibiotikum Valinomycin, einem Kalium-Ionophor (AGATA et al., 1994; EHLING-SCHULZ et al., 2004a; Abbildung 3). Es wird durch eine nichtribosomale Peptidsynthase produziert. Die Kodierung dieses Enzyms erfolgt durch ein 24 kb Gencluster (*ces* Gene; EHLING-SCHULZ et al., 2005a; MAGARVEY et al., 2006).



**Abbildung 3.** Chemische Struktur von Cereulid (AGATA et al., 1994; MAKARASEN et al., 2009)

Sowohl Cereulid als auch Valinomycin besitzen *in vivo* eine über 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptoren und Vagusstimulation vermittelte emetische Wirkung. Bedingt durch eine unterschiedliche Rezeptoraffinität sind zur Auslösung von Erbrechen im Tiermodell *Suncus murinus* für Cereulid im Vergleich zu Valinomycin um den Faktor 10<sup>2</sup> niedrigere Konzentrationen ausreichend (AGATA et al., 1995b). Als selektives Kalium-Ionophor beeinflusst Cereulid das

mitochondriale Membranpotential (MIKKOLA et al., 1999) und führt zur Entkopplung der oxidativen Phosphorylierung (TEPLOVA et al., 2006). *In vitro* konnte nach Cereulid-Exposition ein Anschwellen von Mitochondrien in HEp-2 Zellen sowie ein Rückgang der Insulinproduktion in porcinen pankreatischen Langerhans-Inseln beobachtet werden (SAKURAI et al., 1994; SHINAGAWA et al., 1995; TEPLOVA et al., 2006; VIRTANEN et al., 2008). *In vivo* wurden bei Mäusen nach intraperitonealer Injektion eines synthetischen Cereulids massive aber reversible histopathologische Leberschäden gefunden (YOKOYAMA et al. 1999). Des Weiteren ist für Cereulid eine immunsuppressive Wirkung durch Inhibierung humaner natürlicher Killerzellen beschrieben (PAANANEN et al., 2002).

Im Gegensatz zu den genetisch polymorphen Diarrhö-Stämmen repräsentieren die emetischen Stämme eine homogene evolutionäre Einheit nah verwandter Stämme mit nur geringen Sequenzunterschieden ihrer auf einem Megaplasmid lokalisierten *ces* Gene (EHLING-SCHULZ et al., 2005a, 2005b, 2006). Nach der Identifizierung eines neuen phänotypischen Clusters Cereulid-produzierender *B. cereus* Stämme wurde von VASSILEVA et al. (2007) ein lateraler Gentransfer als Ursache einer möglichen progressiven Diversifikation der emetischen *B. cereus* vermutet.

Bei molekularbiologischen Untersuchungen betrug der Anteil *ces* tragender Stämme 0 – 8 % (YANG et al., 2005; EHLING-SCHULZ et al., 2006; OUOBA et al., 2008; ANKOLEKAR et al., 2009).

### 2.3 Regulation der Toxin-Expression

Die Produktion der Diarrhö-Toxine (Hbl, Nhe, CytK) und des emetischen Toxins (Cereulid) wird umgebungs- und wachstumszyklusabhängig durch verschiedene interagierende Regulatoren gesteuert (GOHAR et al., 2008; LÜCKING et al., 2009).

Die Transkription der Toxin-Gene *hbl*, *nhe* und *cytK* unterliegt der Kontrolle des *Cereus*-Gruppen spezifischen pleiotropen Regulators PlcR (Phospholipase C Regulator), der zu Beginn der stationären Phase maximal exprimiert wird und an spezifische oberhalb der kontrollierten Gene liegende DNA-Sequenzen (PlcR-Boxen) bindet. PlcR ist Teil eines Quorum-Sensing-Systems, welches *B. cereus* ermöglicht die Transkription von Virulenz-Genen in Abhängigkeit von der Zelldichte zu kontrollieren, wobei die *plcR*-Transkription selbst positiv autoinduziert ist und durch den *Bacillus* spp. Sporulationsfaktor Spo0A unterdrückt wird (LERECLUS et al., 1996, 2000; AGAISSE et al., 1999; GOHAR et al., 2002, 2008).

Im Gegensatz hierzu erfolgt die Cereulid-Produktion unabhängig von PlcR, setzt die Aktivität des Sporulationsfaktors Spo0A voraus und wird durch einen weiteren Transkriptionsfaktor (AbrB) unterdrückt. Die genauen Mechanismen der zugrunde liegenden Signalwege sind jedoch noch nicht bekannt (LÜCKING et al., 2009).

Die Höhe der Toxin-Expression wird außerdem durch verschiedene Umgebungsparameter (z. B. Temperatur, pH-Wert, Sauerstoff- und CO<sub>2</sub>-Konzentrationen, Nährstoffangebot) beeinflusst (SUTHERLAND & LIMOND, 1993; AGATA et al., 1999; FINLAY et al., 2000; EHLING-SCHULZ et al., 2004a; JÄÄSKELÄINEN et al., 2004; GAILLARD et al., 2005; APETROAIE-CONSTANTIN et al., 2008).

## 2.4 Nachweisverfahren

### 2.4.1 Kulturelle Methoden

Bereits 1955 setzte HAUGE Blutagar ein, um *B. cereus* anhand der typischen Koloniemorphologie nachzuweisen. Aufgrund auftretender Identifikationsschwierigkeiten bei Anwesenheit umfangreicher Begleitfloren wurden verschiedene feste Selektivmedien (z. B. MYP und PEMBA) entwickelt, die zur Darstellung der für *B. cereus* charakteristischen Lecithinaseaktivität (Eigelbfaktor, Phospholipase) als Indikator Eigelb enthalten. Als weiteres Differenzierungskriterium dient in diesen Nährmedien Mannit, das von *B. cereus* nicht metabolisiert werden kann.

### 2.4.2 Tiermodelle

SPIRA & GOEPFERT verwendeten 1972 als experimentelles Modell den RIL-Test, bei dem zur Pathogenitätsbeurteilung eine durch *B. cereus* Kulturüberstände induzierte Flüssigkeitsakkumulation in zuvor ligierten Krummdarmschlingen von Kaninchen herangezogen wird. Später wurden zur Detektion von Diarrhö-Stämmen weitere *in vivo* Verfahren entwickelt, u. a. ein Mäuseletalitätstest (MLT; GLATZ & GOEPFERT, 1973), ein Hautreaktionstest bei Meerschweinchen (GLATZ & GOEPFERT, 1973), die vaskuläre Permeabilitätsreaktion bei Kaninchen (VPR; GLATZ et al., 1974) und ein Darmschlingenligationstest bei Ratten (TING & BANWART, 1985). Zum Nachweis emetischer Stämme wurde ein Fütterungstest bei Affen beschrieben (MELLING et al., 1976). Mittlerweile wurden diese *in vivo* Verfahren größtenteils durch *in vitro* Bioassays abgelöst und werden nur noch zur Klärung spezifischer Fragestellungen eingesetzt.

### 2.4.3 *In vitro* Bioassays

Für den Nachweis emetischer Stämme wurden verschiedene Bioassays publiziert, die auf einer Cereulid-induzierten Zerstörung von Mitochondrien beruhen, z. B. ein Eberspermatest mit resultierender Bewegungshemmung der Spermatozoen (ANDERSSON et al., 1998b, 2004; RAJKOVIC et al., 2007), ein Assay zur Erfassung mitochondrientoxischer Substanzen

(HOORNSTRA et al., 2003) und eine quantitative Detektionsmethode basierend auf Rattenlebermitochondrien (KAWAMURA-SATO et al., 2005). Des Weiteren wurden für den Nachweis emetischer *B. cereus* auf HEp-2 Zellen basierende Zellkulturtests beschrieben (HUGHES et al., 1988; SCHULZ, 2004; EHLING-SCHULZ et al., 2005b). Zur Ermittlung der zytotoxischen Aktivität von Diarrhö-Stämmen wurden MTT- und WST-Zellkulturtests unter Verwendung verschiedener Zelllinien entwickelt, z. B. McCoy, CHO, Vero, Caco-2 und Ped-2E9 (JACKSON, 1993; BUCHANAN & SCHULTZ, 1994; SEIDEL et al., 1996; DIETRICH et al., 1997; GRAY et al., 2005; NGAMWONGSATIT et al., 2008a). In Vergleichsstudien haben sich HEp-2 und Vero Zellen als besonders geeignet für die Untersuchung emetischer bzw. Diarrhö-Stämme herausgestellt (WONG et al., 1988; SZABO et al., 1991; SAKURAI et al., 1994).

Mit diesen biologischen Verfahren ist allerdings nur eine Beurteilung der Gesamtoxizität möglich, da sie nicht spezifisch für *B. cereus* Toxine sind.

#### **2.4.4 Immunochemische Methoden**

Zur Detektion der *B. cereus* Enterotoxine gibt es derzeit zwei kommerziell erhältliche immunochemische Testkits, die auf polyklonalen Antikörpern basieren (BDE VIA<sup>TM</sup>, TECRA; OXOID RPLA). Mit dem BDE-VIA, einem Sandwich-Enzymimmuntest, kann die 41 kDa Komponente NheA des Nhe-Komplexes nachgewiesen werden und der OXOID-RPLA, ein reverser Latexagglutinationstest detektiert die L<sub>2</sub>-Komponente (45 kDa) von Hbl (BEECHER & WONG, 1994b; LUND & GRANUM, 1996). Beide Tests weisen jedoch nur eine begrenzte Spezifität auf, da die verwendeten polyklonalen Antikörper auch noch mit weiteren Exoproteinen von *B. cereus* reagieren (BEECHER & WONG, 1994b; LUND & GRANUM, 1996). Seit der Markteinführung 2008 steht mit dem Duopath<sup>®</sup>-System (Merck) der erste auf monoklonalen Antikörpern basierende Schnelltest für *B. cereus* zum simultanen Nachweis jeweils einer Komponente der beiden Enterotoxin-Komplexe Hbl (Hbl-L<sub>2</sub>) und Nhe (NheB) zur Verfügung. Neben den beiden hier eingesetzten Antikörpern wurden von DIETRICH et al. (1999, 2005) und MORAVEK et al. (2004, 2006) weitere monoklonale Antikörper gegen Hbl-L<sub>1</sub>, Hbl-B und NheA sowie ein polyklonales Antiserum gegen NheC entwickelt.

## 2.4.5 Molekularbiologische Methoden

Nach der Sequenzierung aller bekannten Enterotoxin-Gene von *B. cereus* (HEINRICHS et al., 1993; AGATA et al., 1995b; ASANO et al., 1997; RYAN et al., 1997; GRANUM et al., 1999; LUND et al., 2000; EHLING-SCHULZ et al., 2005a) konnten für die Routinediagnostik zunehmend genotypische Methoden basierend auf der Polymerasen-Kettenreaktion (PCR) entwickelt werden.

Die in mehreren Zyklen ablaufende PCR ermöglicht durch den Einsatz eines thermostabilen Enzyms, der DNA-Polymerase, die *in vitro* Amplifikation einer spezifischen durch Oligonukleotid-Primer flankierten DNA-Sequenz (MULLIS & FALOONA, 1987; SAIKI et al., 1988), wobei jeder Zyklus aus den drei Schritten Denaturierung (Trennen der doppelsträngigen DNA in Einzelstränge), Annealing (Anlagern der Primer) und Elongation (DNA-Synthese durch die Polymerase beginnend am 3'-Ende der Primer) besteht und unter optimalen Reaktionsbedingungen eine Verdopplung der zu amplifizierenden Sequenz bewirkt. Die während eines Zyklus entstandenen PCR-Produkte dienen im darauffolgenden Zyklus als Matrize zur erneuten DNA-Synthese, wodurch bei einer Gesamtzyklenzahl von ca. 20-35 eine exponentielle Vervielfältigung um den Faktor  $10^6 - 10^9$  der eingesetzten Anzahl an DNA-Kopien ermöglicht wird (ERLICH, 1989; GIBBS, 1990; AREZI et al., 2003; ALBERTS et al., 2008).

In multiplex PCRs wird durch die Verwendung mehrerer Primerpaare in einem Reaktionsgemisch ein simultaner Nachweis unterschiedlicher DNA-Sequenzen ermöglicht (CHAMBERLAIN et al., 1988; GIBBS et al., 1990; HIGUCHI et al., 1992; SETTANNI & CORSETTI, 2007).

### 2.4.5.1 Konventionelle PCR

Die Nukleinsäuren-Amplifikation wird bei der konventionellen PCR über mehrere Stunden in Thermocyclern durchgeführt, wobei zur Darstellung der entstandenen PCR-Produkte weitere Bearbeitungsschritte notwendig sind, wie z. B. Anfärben mit Ethidiumbromid, elektrophoretische Auftrennung und Visualisierung unter UV-Licht (HIGUCHI et al., 1992).

Bis dato wurden singleplex PCRs für alle bekannten *B. cereus* Enterotoxin-Gene entwickelt und es stehen mittlerweile auch mehrere multiplex PCRs zur simultanen Detektion mehrerer *B. cereus* Toxin-Gene zur Verfügung (Tabelle 3).

**Tabelle 3. Publierte PCR-Protokolle für die *B. cereus* Toxin-Gene *hblCDA*, *nheABC*, *cytK1* und *ces***

PCR-Zielgene								Referenz
<i>hblC</i>	<i>hblD</i>	<i>hblA</i>	<i>nheA</i>	<i>nheB</i>	<i>nheC</i>	<i>cytK1</i>	<i>ces</i>	
+	-	-	-	-	-	-	-	HANSEN & HENDRIKSEN, 2001
+	-	-	-	-	-	-	-	GUINEBRETIERE et al., 2002
+	-	-	-	-	-	-	-	MORAVEK et al., 2004
+	-	-	-	-	-	-	-	THAENTHANEES et al., 2005
-	+	-	-	-	-	-	-	HANSEN & HENDRIKSEN, 2001
-	+	-	-	-	-	-	-	GUINEBRETIERE et al., 2002
-	+	-	-	-	-	-	-	STENFORS et al., 2002
-	+	-	-	-	-	-	-	MORAVEK et al., 2004
-	+	-	-	-	-	-	-	THAENTHANEES et al., 2005
-	-	+	-	-	-	-	-	HANSEN & HENDRIKSEN, 2001
-	-	+	-	-	-	-	-	GUINEBRETIERE et al., 2002
-	-	+	-	-	-	-	-	MÄNTYNEN & LINDSTRÖM, 1998
-	-	+	-	-	-	-	-	THAENTHANEES et al., 2005
-	-	-	+	-	-	-	-	HANSEN & HENDRIKSEN, 2001
-	-	-	+	-	-	-	-	GUINEBRETIERE et al., 2002
-	-	-	+	-	-	-	-	STENFORS & GRANUM, 2001
-	-	-	+	-	-	-	-	MORAVEK et al., 2004
-	-	-	-	+	-	-	-	HANSEN & HENDRIKSEN, 2001
-	-	-	-	+	-	-	-	GUINEBRETIERE et al., 2002
-	-	-	-	+	-	-	-	MORAVEK et al., 2004
-	-	-	-	+	-	-	-	OLTUSZAK-WALCZAK et al., 2006
-	-	-	-	-	+	-	-	HANSEN & HENDRIKSEN, 2001
-	-	-	-	-	+	-	-	GUINEBRETIERE et al., 2002
-	-	-	-	-	-	+	-	LUND et al., 2000
-	-	-	-	-	-	+	-	GUINEBRETIERE et al., 2006
-	-	-	-	-	-	-	+	EHLING-SCHULZ et al., 2004b, 2005a
+	+	+	+	+	+	+ <sup>1</sup>	+	YANG et al., 2005
-	+	+	+	+	-	-	+	EHLING-SCHULZ et al., 2006
+	+	+	+	+	+	-	-	NGAMWONGSATIT et al., 2008b

<sup>1</sup> Enthält auch Primer für *cytK2* mit gleicher Produktgröße, dadurch keine Unterscheidung von *cytK1* und *cytK2* möglich.

#### 2.4.5.2 Real-time PCR

Bei der real-time PCR wird durch parallel zur DNA-Amplifikation durchgeführte Fluoreszenzmessungen eine Detektion der PCR-Produkte in Echtzeit ermöglicht, wobei eine Abhängigkeit von Fluoreszenzintensität und eingesetzter DNA-Menge besteht und die

Akkumulation entstehender PCR-Produkte unter optimalen Bedingungen einen proportionalen Anstieg der gemessenen Intensität bewirkt (HIGUCHI et al., 1992, 1993; HEID et al., 1996). Die Fluoreszenz kann entweder durch in ds-DNA interkalierende Farbstoffe oder durch sequenz-spezifische Hybridisierungssonden erzeugt werden (WITTWER et al., 2001).

Die Verwendung DNA-bindender Farbstoffe (z. B. Ethidiumbromid, YO-PRO-1, SYBR Green) ermöglicht eine sequenz-unabhängige Detektion der entstandenen PCR-Produkte (HIGUCHI et al., 1993; ISHIGURO et al., 1995; WITTWER et al., 1997). In real-time Applikationen wird meist der Cyanin-Farbstoff SYBR Green I eingesetzt, der in ungebundenem Zustand keine Fluoreszenz zeigt und erst durch Interkalation in die doppelsträngige (ds) DNA stark fluoreszierend wirkt (MORRISON et al., 1998; MALORNY et al., 2009).

Mit Fluoreszenz-Farbstoffen markierte Oligonukleotide, sogenannte fluorogene Sonden, binden spezifisch an eine durch Primer flankierte DNA-Sequenz und lösen durch unterschiedliche auf Fluoreszenz-Resonanzenergietransfer (FRET) basierende Mechanismen eine detektierbare Fluoreszenzemission aus (FÖRSTER, 1948; CARDULLO et al., 1988). FRET ist ein spektroskopischer Prozess, bei dem Energie strahlungsfrei durch Dipol-Dipol-Wechselwirkungen zwischen Molekülen mit überlappenden Emissions- und Absorptionsspektren über einen Bereich von 10 – 100 Å übertragen wird (STRYER & HAUGLAND, 1967). Zu den bekanntesten Varianten von Real-time-Detektionssystemen, die FRET zur Generierung sequenzspezifischer Fluoreszenzsignale nutzen, zählen Hybridisierungssonden, Hydrolysesonden (Taqman), Molecular Beacons, Sunrise und Scorpion Primer (HOLLAND et al., 1991; TYAGI & KRAMER, 1996; WITTWER et al., 1997; WHITCOMBE et al., 1998).

Eine Entwicklung von multiplex Assays ist sowohl bei sequenz-spezifischer als auch bei sequenz-unspezifischer Detektion der PCR-Produkte realisierbar:

“Multiplexing by colour” ist ein häufig bei Oligonukleotid-Sonden angewandtes Verfahren. Zur Markierung der Sonden werden unterschiedliche Fluoreszenzfarbstoffe mit klar

differenzierbaren Emissionsspektren verwendet, wodurch eine eindeutige Identifikation mehrerer PCR-Produkte in einer Reaktion ermöglicht wird.

“Multiplexing by melting temperature” kann sowohl bei auf Sonden basierenden Assays als auch bei der Verwendung von unspezifisch mit ds-DNA interkalierenden Farbstoffen durchgeführt werden: Die Schmelztemperatur ( $T_m$ ) von PCR-Produkten ist abhängig von Sequenz, Länge und dem Verhältnis GC/AT. Die Analyse von Schmelzkurven (Darstellung der Fluoreszenz als Funktion der Temperatur) ermöglicht somit eine Identifikation und Differenzierung mehrerer PCR-Produkte (RIRIE et al., 1997; WITTEWERT et al., 2001).

Bis dato sind in der Literatur nur singleplex real-time PCR-Protokolle für die *B. cereus* Enterotoxin-Gene *nheB* (SYBR Green) und *ces* (SYBR Green und TaqMan Sonden) beschrieben (YANG et al., 2007; FRICKER et al., 2007).

## **3 Eigene Untersuchungen**

### **3.1 Materialien**

#### **3.1.1 Chemikalien und Biochemika**

50 bp-Leiter 0,1 – 1 kbp äquimolar (peqlab, 25-2300)  
100 bp-Leiter 0,1 – 1 kbp äquimolar (peqlab, 25-2010)  
Aceton (Riedel de Haën, 32201)  
Agarose (ABgene, AG-0300/B)  
Alkalische Phosphatase (Chemicon, AP 308A)  
Ammoniumchlorid (Sigma-Aldrich GmbH, A9434)  
Ammoniumsulfat (Riedel de Haën, 31119)  
Ampicillin (Sigma-Aldrich GmbH, A-9518)  
Casein (Sigma-Aldrich GmbH, C-8654)  
Caseinhydrolysat (Oxoid Ltd., L41)  
Chloramin T Trihydrat (Merck, 8.18705.5000)  
Cell Proliferation Reagent WST-1 (Roche Diagnostics GmbH, 11 644 807 001)  
Citronensäure-Monohydrat (Merck, 1.00244.5000)  
D(+)-Glukose-Monohydrat (Riedel de Haën, 16301)  
Di-Kaliumhydrogenphosphat (Riedel de Haën, 04248)  
Di-Natriumhydrogenphosphat (Riedel de Haën, 30427)  
DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen, 69506)  
dNTP Set hochkonzentriert, 100 µmol/dNTP (ABgene, AB-0315)  
EDTA (Sigma-Aldrich GmbH, E1644)  
Ethanol, absolut (Riedel de Haën, 32205)  
Ethanol, vergällt (Merck, 1.00974)  
Ethidiumbromidlösung 1 % (Serva, 21251)  
Fetales Kälberserum (FCS; Biochrom KG, S 0115)  
Gel Loading Solution (Sigma-Aldrich GmbH, G2526-5ML)  
Hefeextrakt (Oxoid Ltd., L21)  
High Pure Plasmid Isolation Kit (Roche Diagnostics GmbH, 1175477001)  
Humanes Serumalbumin (HSA; Sigma-Aldrich GmbH, A-1653)  
Kalilauge (Riedel de Haën, 35113)

Kaliumdihydrogenphosphat (Riedel de Haën, 30407)  
L-Glutamin (Sigma-Aldrich GmbH, G 5763)  
Light Cycler Fast Start DNA Master<sup>PLUS</sup> SYBR Green I (Roche Diagnostics GmbH, 03515885001)  
Light Cycler 480 SYBR Green I Master (Roche Diagnostics GmbH, 04707516001)  
Lugol'sche Lösung (Merck, 9261)  
Lysozym (Merck, 1.05281.0001)  
Magermilchpulver (Oxoid Ltd., LP0031)  
Magnesiumchlorid (Sigma-Aldrich GmbH, M8266-100G)  
Magnesiumsulfat (Fluka, 63138)  
MEM-EARLE Zellkulturmedium (Biochrom AG, FG 0325)  
Methanol (Fluka, 65541)  
Natriumchlorid (Riedel de Haën, 31434)  
Natriumcitratdihydrat (Merck, 1.06448))  
Natriumcarbonat (Riedel de Haën, 31432)  
Natriumhydrogencarbonat (Merck, 06329)  
Natriumpyruvat-Lösung, 100 mmol/l (Biochrom AG, L 0473)  
Penicillin/Streptomycin, 10 000 IU/ml (Biochrom AG, A 2212)  
Proteinase K (Qiagen, 19131)  
Salzsäure (Merck, 1.07881)  
Schwefelsäure (Fluka, 65541)  
Standard I Nähragar (Merck, 107881)  
Standard II Nähragar (Merck, 7883)  
Stärke, reinst (Merck, 1252)  
Tetramethylbenzidin (Sigma-Aldrich GmbH, T-2885-5G)  
Thermoprime Plus DNA Polymerase mit 10 x Puffer und MgCl<sub>2</sub> (ABgene, AB-0301/B)  
TOPO TA Cloning<sup>®</sup> Kit, pCR<sup>®</sup>2.1-Topo<sup>®</sup> Vector (Invitrogen, K450641)  
TOPO TA Cloning<sup>®</sup> Kit, pCR<sup>®</sup> II-TOPO<sup>®</sup> Vector (Invitrogen, K465001)  
Tri-Natriumcitrat-Dihydrat (Merck, 1.06448)  
TRIZMA (Sigma-Aldrich GmbH, T3924)  
Trypsin-EDTA-Lösung (Sigma-Aldrich-GmbH, T3924)  
Trypton (Fluka, 95039)  
Tween 20 (Riedel de Haën, 63158)  
Wasserstoffperoxid 30 % (Merck, 1.08597)

### 3.1.2 Bakterien Stämme und Isolate

*Bacillus cereus* Referenzstämme: DSM 4384 (Hbl), DSM 4312 (Cereulid), NVH 0075/95 (Nhe), NVH 391/98 (CytK1);

Stämme (n = 168) aus der Stammsammlung des Lehrstuhls für Hygiene und Technologie der Milch, darunter 146 *B. cereus*, 3 *B. licheniformis*, 1 *B. mycoides*, 3 *B. subtilis*, 2 *B. thuringiensis*, 3 *B. weihenstephanensis*, 1 *Citrobacter freundii*, 1 *Enterobacter sakazakii*, 1 *Enterococcus faecium*, 1 *Escherichia coli*, 1 *Listeria monocytogenes*, 1 *Proteus mirabilis*, 1 *Pseudomonas aeruginosa*, 1 *Salmonella infantis*, 1 *Staphylococcus aureus*, 1 *Yersinia enterocolitica*;

*B. cereus* Isolate (n = 208) aus Lebensmittel- und Hygienestatuskontrollen der Bundeswehr (Charakteristika der Stämme und Isolate siehe Anhang, Tabelle 25).

### 3.1.3 Zellen und Zelllinien

*E. coli*: One Shot<sup>®</sup> TOP10 Chemically competent *E. coli* (Invitrogen, C4040-10)

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

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

### 3.1.4 PCR-Primer

Die in dieser Arbeit verwendeten Primer wurden von der Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen synthetisiert. Die Sequenzen mit den entsprechenden Referenzen sind in Tabelle 4 aufgeführt.

### 3.1.5 Nährmedien

#### Flüssige Medien

Caseinhydrolysat-Bouillon mit 1 % Glukosezusatz (CGY) modifiziert nach BEECHER & WONG (1994a): 2 % Caseinhydrolysat, 0,6 % Hefeextrakt, 0,2 % Ammoniumsulfat, 1,4 % Di-Kaliumhydrogensulfat, 0,6 % Kaliumhydrogensulfat, 0,1 % Natriumcitrat, 0,2 % Magnesiumsulfat sowie 1 % Glukose nach dem Autoklavieren; alle Angaben in g/v.

Hirn-Herz-Bouillon (BHI; Merck, 10493)

Magermilch (SMM; Oxoid, LP0031)

RM-Medium mit 0,2 % Glukosezusatz: 2 % Caseinhydrolysat in A. dest. lösen, nach dem Autoklavieren Zusatz von: 1 mM Magnesiumchlorid, 0,2 % Glucose, 6 % Di-Natriumhydrogenphosphat, 3 % Kaliumdihydrogenphosphat, 0,5 % Natriumchlorid, 1 % Ammoniumchlorid; alle Angaben in g/v.

#### Feste Medien

Columbia Agar mit Schafblut (Oxoid, PB 5039 A)

Luria-Bertani (LB)-Platten mit Zusatz von 0,1 % Ampicillin: 1 % Trypton, 0,5 % Hefeextrakt, 1 % Natriumchlorid, 1,5 % Standard I Nähragar sowie 0,1 % Ampicillin nach dem Autoklavieren; alle Angaben in g/v.

PEMBA, *Bacillus cereus* selective medium (Oxoid, PO 5048 A)

Stärke-Agar: Standard II Nähragar mit Zusatz von 1 % (g/v) Stärke

### 3.1.6 Lösungen und Puffer

2 % ige HSA/PBS-Lösung (g/v)

3 % ige Casein/PBS-Lösung (g/v)

Bicarbonatpuffer (5 mol/l, pH 9,6)

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

Elutionspuffer: Tris/HCl-Puffer (10 mM, pH 9,0) mit Zusatz von EDTA (0,5 mM)

Lyse-Puffer: Tris/HCl-Puffer (20 mmol/l) mit Zusatz von EDTA (2 mmol/l), Triton X (1,2 %) und Lysozym (20 mg/ml)

MEM-EARLE (1x) Zellkulturmedium mit Zusatz von 1 % fetalem Kälberserum (FCS), 1 % Natriumpyruvat-Lösung (100 mmol/l), 0,4 % Penicillin/Streptomycin (10000 U/ml)

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

Substrat/Chromogenlösung nach GALLATI & PRACHT (1985): 20 Teile Citratpuffer und 1 Teil Tetramethylbenzidinlösung

Tetramethylbenzidinlösung (1 mmol/l): 3, 3', 5, 5'- Tetramethylbenzidin in 45 ml Methanol und 5 ml Aceton

Tris-Acetat-Puffer (0,04 mol/l, pH 8,2) mit Zusatz von 1 mmol/l EDTA

Tris/HCl-Puffer (2 mol/l, pH 8)

Tris/HCl-Puffer (0,1 mol/l, pH 7,5)

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

Wasser:

Für PCR-Reaktionen wurde autoklaviertes und aliquotiertes Reinstwasser (Milli-Q<sup>®</sup> Biocel System, Millipore Corporation) eingesetzt. Für die real-time PCR wurde reinstes, zweifach destilliertes, deionisiertes und autoklaviertes Nuklease-freies Wasser (Roche, Mannheim) verwendet.

### **3.1.7 Immunreagenzien**

#### Polyklonale Antiseren

Kaninchen-Anti-Maus-Immunglobuline-HRP (Dako, P 0161)

NheC-Antiserum (am Lehrstuhl entwickelt)

Schwein-Anti-Kaninchen-Immunglobuline-HRP (Dako, P 0217)

#### Monoklonale Antikörper (mAk)

Die für diese Arbeit verwendeten mAks wurden am Lehrstuhl entwickelt.

(Details in Tabelle 5)

### **3.1.8 Verbrauchsmaterialien**

Cellstar PP-test tube, steril, 15 ml, 50 ml (Greiner bio-one, 88271, 227261)

Cryo-Tube Vial, 1,8 ml (Nunc GmbH, 363401)

Einmalspritze, Injekt 10 ml, 20 ml (Braun, 4606108V, 4606205V)

Eppendorf Reaktionsgefäß 1,5 ml (Eppendorf, 3810)

Kunststoff-Petrischale mit Nocken, steril (Greiner bio-one GmbH, 633102)

Light Cycler<sup>®</sup> Capillaries, 20 µl (Roche Diagnostics GmbH, 04929292001)

Light Cycler<sup>®</sup> 480 Multiwell Plate 96 (Roche Diagnostics GmbH, 04729692001)

Mikrotiterplatte 96 Loch, steril, Flachboden (Nunc GmbH, 167008)

Mikrotiterplatte, 96 Loch (Nunc GmbH, 439454)

Millex syringe driven filter unit (Millipore, SLGVO33RS)

Pasteur-Pipette, Glas 150 mm, 230 mm (Brand, 747715, 747720)

Pasteur-Pipette, Plastik, steril, 153 mm (Greiner bio-one, 700361)  
Pipettenspitzen 0,5 – 20 µl, 2 – 200 µl, 50 – 1000 µl (Brand, 702565, 702556, 702561)  
Pipettenspitzen 0,5 – 10 µl, 10 – 100 µl, 100 – 1000 µl (peqLab, 81-1011, 81-1030, 81-1050)  
Reaktionsgefäße, flacher Deckel, DNase frei, 0,2 ml (peqLab, 82-620-A)  
Reaktionsgefäße, gewölbter Deckel, DNase frei, 0,2 ml (peqLab, 82-0337-A)  
Reaktionsgefäße, flacher Deckel, DNase frei, 0,5 ml (peqLab, 82-0350-A)  
Safe Lock Tubes PCR clean, 2,0 ml (Eppendorf, 0030123.344)  
Zellkulturflaschen aus Kunststoff, 80 cm<sup>2</sup> (Nunc GmbH, 156502)

### 3.1.9 Geräte

Accu-Jet, Pipettierhilfe (Brand)  
Brutschrank, 32 °C, 37 °C (Memmert)  
Biofuge pico (Heraeus)  
BioPhotometer 8,5 mm (Eppendorf)  
Electrophoresis Power Supply, EPS 200 (Pharmacia Biotech)  
Elektromodul mc6 (Waldner)  
Elektrophoresekammer (Biometra)  
Elektrophoresekammer (peqLab)  
Flockeneisbereiter (AF 80, Scotsman)  
Heizplatte MR 3001 (Heidolph)  
HeraSafe, Sterilbench (Heraeus)  
Laminar-Flow Gelaire BSB 4A (Flow Laboratories)  
LC Carousel Centrifuge 2.0 (Roche)  
Light Cycler 2.0 (Roche)  
Light Cycler 480 (Roche)  
Mikrotiterplatten-Lesegerät Sunrise Remote Control (Tecan)  
Milli-Q<sup>®</sup> Biocel System (Millipore Corporation)  
Multifuge 1 S-R (Heraeus)  
pH-Messgerät 537 (Indolab)  
Schüttelwasserbad 1083 (GFL)  
Taumelgerät, Polymax 1040 (Heidolph)  
ThermoCycler, PCR Express (Hybaid)

ThermoCycler, PCR Sprint (ThermoElectron Corporation)  
Thermomixer comfort (Eppendorf)  
UV-Transilluminator (biostep GmbH)  
Variable Pipetten 0,5 – 10 µl, 10 – 100 µl, 100 – 1000 µl (Eppendorf)  
Variable Zwölfkanalpipette (Eppendorf)  
Varifuge 3.0 R (Heraeus)  
Varioklav Dampfsterilisator (H + P Labortechnik GmbH)  
Vortex-2 Genie (Scientific Industries)  
Waage (Sartorius)  
Zählkammer nach Neubauer

### **3.1.10 Software**

Argus X1, Bio-Imaging-Control-Software (biostep GmbH Jahnsdorf)  
NCBI/BLAST (National Center for Biotechnology Information)  
ClustalW2 (European Bioinformatics Institute, EBI)  
Ridasoft Win (r-Biopharm AG)  
Light Cycler Probe design software 2.0 (Roche Diagnostics GmbH)  
Light Cycler 2.0 software (Roche Diagnostics GmbH)  
Light Cycler 480 software (Roche Diagnostics GmbH)  
Molecular toolkit (Colorado State University)

## **3.2 Allgemeine Methodik**

Die Stämme und Isolate (Tupferproben) wurden auf Columbia-Agar mit Schafblut (Oxoid, Wesel, Deutschland) über eine Zeitspanne von 24 h bei 32 °C angezüchtet und die gewachsenen Kolonien optisch auf Reinheit überprüft.

### **3.2.1 Anzucht von *B. cereus* in Hirn-Herz-Bouillon (BHI)**

Eine Kolonie der auf Blutplatte gewachsenen Stämme und Isolate wurde in 5 ml BHI überimpft und 24 h bei 32 °C inkubiert.

### **3.2.2 Anzucht von *B. cereus* in Caseinhydrolysat-Glukose-Hefe-Bouillon (CGY)**

Zur Stimulation der Diarrhö-Enterotoxin-Produktion wurde eine Voranreicherung durchgeführt. Hierfür wurden 20 ml CGY-Medium mit einer Kolonie beimpft. Nach einer Inkubationsdauer von 17 h bei 32 °C im Schüttelwasserbad, wurden 200 µl der Voranreicherung in 20 ml CGY-Bouillon überführt und für 6 h bei 32 °C im Schüttelwasserbad inkubiert. Anschließend wurde das Keimmaterial für 20 min bei 3000 rpm und 4 °C zentrifugiert, sterilfiltriert und nach Zusatz von EDTA (1 mmol/l) portioniert bei -20 °C eingefroren.

### **3.2.3 Anzucht von *B. cereus* in Magermilch (SMM)**

Potentiell emetische Stämme und Isolate (PCR: *ces*-positiv) wurden in Magermilch angezüchtet. Hierfür wurden 2 g Magermilchpulver in 20 ml sterilem destilliertem Wasser gelöst und mit einer Öse Isolat beimpft. Die Ansätze wurden 18 h bei 32 °C im Schüttelwasserbad inkubiert und danach 15 min bei 121 °C autoklaviert.

### **3.2.4 Stärkehydrolyse-Test**

Zu einer ersten Charakterisierung wurden die Stämme und Isolate auf Standard II Nähragar (mit Zusatz von 1 % Stärke) ausgestrichen und 24 h bei 32 °C inkubiert. Anschließend wurde 1 : 5 verdünnte Lugol'sche Lösung auf Einzelkolonien gegeben. In früheren Studien wurde gezeigt, dass Stärke-positive Stämme kein emetisches Toxin produzieren können (SHINAGAWA et al., 1985; NISHIKAWA, 1996; AGATA et al., 1996; PIRTTIJÄRVI et al., 1999).

### **3.2.5 DNA-Extraktion**

Die DNA der Stämme und Isolate wurde unter Verwendung des DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) entsprechend dem Herstellerprotokoll für Gram-positive bzw. Gram-negative Bakterien aus BHI-Übernachtskulturen (200 µl) extrahiert. Die Proben wurden zunächst mittels Proteinase K aufgeschlossen. Anschließend wurde die im Lysat enthaltene DNA an eine Silika-Membran absorbiert. Kontaminanten und Enzyminhibitoren wurden durch zwei Waschschrte entfernt und die DNA in Tris/HCl-Puffer (pH 9; 0,5 mM EDTA) eluiert. In die multiplex PCRs wurden ca. 30 ng DNA/Stamm bzw. Isolat eingesetzt. Zur Gewinnung höher konzentrierter DNA der Referenzstämmen für die Sensitivitätsuntersuchungen wurde die Extraktion mit 1000 µl der BHI-Übernachtskulturen durchgeführt.

### **3.2.6 Bestimmung der DNA-Konzentration und -Reinheit**

Die DNA-Konzentrationen wurden photometrisch bei 260 nm (BioPhotometer Eppendorf, Hamburg, Deutschland) bestimmt. Die Reinheit der DNA wurde durch eine zweite Messung bei 280 nm und anschließender Kalkulation des Verhältnisses (OD 260/OD 280) bewertet. Für DNA-Lösungen, die keine Proteinverunreinigungen aufweisen, liegt der Normbereich zwischen 1,8 und 1,9.

### 3.2.7 PCR-Primer

Die Primer für die konventionellen multiplex PCRs und die SYBR Green I PCR wurden nach den folgenden Kriterien entworfen und ausgewählt:

- (1) GC-Anteil: 30 – 80%
- (2) Schmelzpunkt : ca. 60 °C
- (3) Primerlänge: 20 – 30 Basen
- (4) Terminal nicht mehr als zwei Guanin und/oder Cytosin Basen
- (5) Vermeidung von Sekundärstrukturen innerhalb eines Primers
- (6) Vermeidung von Basenwiederholungen (insbesondere Guanin)
- (7) Amplikonlänge für die real-time PCR: < 400 bp

Alle in dieser Studie verwendeten Primer wurden von der Sigma-Aldrich Chemie AG, Taufkirchen, Deutschland synthetisiert. Primersequenzen sowie die Größe der entsprechenden Amplifikationsprodukte und Referenzen sind in Tabelle 4 aufgeführt.

### 3.2.8 Interne Amplifikationskontrolle (IAC)

Der kommerziell erhältliche pCR<sup>®</sup>II-TOPO<sup>®</sup> Vector (Invitrogen, Carlsbad, USA) wurde in allen konventionellen PCRs als IAC verwendet. Die Amplifikation wurde mit dem von FRICKER et al. (2007) publizierten Primerpaar IAC\_for/IAC\_rev durchgeführt (Tabelle 4).

### 3.2.9 PCR

Nach Spezifitätsüberprüfung der Primerpaare mit NCBI/BLAST wurden ausgewählte Primer in singleplex PCRs eingesetzt. Konnten nach Gelelektrophorese und UV-Belichtung klare Banden der richtigen Größe dargestellt werden, wurden kompatible Primer für multiplex Anwendungen ausgewählt. Die Primerauswahl für die real-time multiplex PCR erfolgte mit Hilfe der Light Cycler Probe design software 2.0 (Roche). Diese erlaubte eine Vorabbeurteilung möglicher Primerinteraktionen mit der potentiellen Entstehung von Primerdimeren. Ferner berechnet die Software die zu erwartende Schmelztemperatur der Amplifikate. Durch die Kombination dieser Auswahlkriterien und einer anschließenden

gezielten Optimierung der Reaktionsgemische und -bedingungen konnten multiplex PCRs mit spezifischer Detektion der Zielsequenzen realisiert werden.

### 3.2.9.1 Konventionelle multiplex PCRs

Zur Entwicklung der konventionellen multiplex PCR-Systeme wurden am Lehrstuhl entwickelte und in der Literatur veröffentlichte Primer mit kompatiblen Amplifikatgrößen ausgewählt. Anschließend erfolgte eine systematische Optimierung der Reaktionszusammensetzungen und -bedingungen. Dies beinhaltete das separate Testen verschiedener Primer-, MgCl<sub>2</sub>- und Polymerasekonzentrationen sowie unterschiedlicher Annealing-Temperaturen, um für alle Genamplifikate deutliche Banden gleicher Intensität zu erhalten. Es konnten vier multiplex PCR Systeme realisiert werden. Hierbei dienen PCR 1 und PCR 2 dem gleichzeitigen Nachweis der Gene *hblC*, *nheA* und *ces* (PCR 1) bzw. *hblC*, *nheA*, *ces* und *cytK1* (PCR 2). Mit PCR 3 und 4 wird die spezifische Detektion der Gene *hblC*, *hblD* und *hblA* bzw. *nheA*, *nheB* und *nheC* ermöglicht.

Die optimierten Reaktionsgemische (50 µl) für PCR 1, 2 und 4 bestehen aus 0,2 mM von jedem dNTP, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,5 µM Vorwärts- und Rückwärtsprimer, +/- 0,5 µM IAC\_for und IAC\_rev, 1,5 U Thermoprime Plus DNA-Polymerase (Thermo Scientific, Epsom, UK), 5 µl 10 x Reaktionspuffer (ABgene, Epsom, UK), 2 µl Proben-DNA, +/- 1 µl pCR<sup>®</sup>II-TOPO<sup>®</sup> Vector. Das Reaktionsgemisch für PCR 3 beinhaltet 0,2 mM von jedem dNTP, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,3 µM der Oligonukleotid-Primer L1aF, L1aR, HA-F1 und HA-R2, +/- 0,3 µM IAC\_for und IAC\_rev, 0,6 µM L2aF und L2aR, 3,5 U Thermoprime Plus DNA-Polymerase, 5 µl 10 x Polymerasepuffer, 2 µl Proben-DNA, +/- 1 µl pCR<sup>®</sup>II-TOPO<sup>®</sup> Vector. Eine Negativkontrolle ohne Proben-DNA wurde in jedem PCR-Durchgang mitgeführt (detaillierte Protokolle im Anhang: Tabellen 13, 15, 17 und 19).

Die Amplifikation wurde in einem Thermocycler durchgeführt (PCR Sprint Thermal Cycler, Thermo Electron Corporation, Milford, USA) beginnend mit einem Denaturierungsschritt bei 94 °C für 5 min, gefolgt von 30 Zyklen, die jeweils 1 min Denaturierung bei 94 °C, 1 min Annealing bei 49 °C (PCR 1, 2 und 4) bzw. 55 °C (PCR 3) und Elongation bei 72 °C beinhalteten und mit einer finalen Inkubation für 10 min bei 72 °C abgeschlossen wurde (detaillierte Protokolle im Anhang: Tabellen 14, 16, 18 und 20).

### 3.2.9.2 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese kam zum einen zur Detektion der PCR-Produkte aus den konventionellen multiplex PCRs zum Einsatz, zum anderen diente sie in der Etablierungsphase der real-time multiplex PCR zur zusätzlichen Qualitätskontrolle der Amplikons.

Zu jeder Probe wurde das entsprechende Volumen des vierfach konzentrierten Gel-Ladungspuffers (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) zugegeben. Anschließend wurden 7 µl der erhaltenen Lösung in ein 2 % Agarose-Gel pipettiert und nach Elektrophorese während 45 min bei 125 V in 1 x Tris-Acetat-EDTA Puffer sowie nachfolgender Ethidiumbromid-Färbung die PCR-Amplifikate mit UV-Transillumination sichtbar gemacht.

### 3.2.9.3 Klonierung und Sequenzierung von PCR-Produkten

PCR-Produkte ausgewählter Stämme (4 *B. cereus* Referenzstämme, 1 *B. mycoides*, 2 *B. thuringiensis*, 1 *B. weihenstephanensis*) wurden mit dem 2.1-Topo®Vector ligiert und in *E. coli* transformiert. Nach Extraktion der Plasmid-DNA und Durchführung einer Kontroll-PCR wurden die Plasmide mittels universeller Primer sequenziert (Eurofins MWG Operon, Ebersberg). Die erhaltenen Sequenzen wurden mit Nukleinsäuresequenzen in GenBank (National Center for Biotechnology Information, NCBI) verglichen und unter Verwendung der Software Clustal W2 (LARKIN et al., 2007) wurde ein Abgleich (multiple alignments) der sequenzierten Produkte und *B. cereus* Enterotoxin-Gensequenzen aus Datenbanken durchgeführt.

**Tabelle 4. Charakteristika der verwendeten PCR-Primer**

Ziel-gen	Primer	Primersequenz (5' → 3')	Amplifikat-größe (bp)	Eingesetzt in PCR 1-4, RTP <sup>a</sup>	Referenz
<i>hblC</i>	L2aF	CGA AAA TTA GGT GCG CAA TC	411	1, 2, 3	MORAVEK et al., 2004
	L2aR	TAA TAT GCC TTG CGC AGT TG			
<i>hblD</i>	L1aF	AGG TCA ACA GGC AAC GAT TC	205	3	MORAVEK et al., 2004
	L1aR	CGA GAG TCC ACC AAC AAC AG	148	RTP	Diese Studie
	mp3L1R1for mp3L1R1rev	AGT TAT TGC AGC TAT TGG AGG GTC CAT ATG CTT AGA TGC TGT GA			
<i>hblA</i>	HA-F1	ATT AAT ACA GGG GAT GGA GAA ACT T	237	3	YANG et al., 2005
	HA-R1	TGATCC TAA TAC TTC TTC TAG ACG CTT			
<i>nheA</i>	45c1	GAG GGG CAA ACA GAA GTG AA	186	1, 2, 4	MORAVEK et al., 2004
	45c2	TGC GAA CTT TTG ATG ATT CG			
	mp3AR2for mp3AR2rev	TTC AAA TTC AAA AGA ATG TTG AAG AAG G GAT TTG TTT GCT TAT TCA TTT CAT CAC	111	RTP	Diese Studie
<i>nheB</i>	39b1	CCG CTT CTG CAA AAT CAA AT	281	4	MORAVEK et al., 2004
	39b2	TGC GCA GTT GTA ACT TGT CC			
<i>nheC</i>	FNheC	ACA TCC TTT TGC AGC AGA AC	618	4	NGAMWONGSATIT et al., 2008b
	R2NheC	CCA CCA GCA ATG ACC ATA TC			
<i>ces</i>	CesF1	GGT GAC ACA TTA TCA TAT AAG GTG	1271	1, 2	EHLING-SCHULZ et al., 2006
	CesR2	GTA AGC GAA CCT GTC TGT AAC AAC A			
	ces_SYBR_F ces_SYBR_R	CAC GCC GAAT GAT TAT ACC AA CAC GAT AAA ACC ACT GAG ATA GTG	176	RTP	FRICKER et al., 2007
<i>cytK1</i>	F2	AAC AGA TAT CGG TCA AAA TGC	623	2	LUND et al., 2000
	R7	CGT GCA TCT GTT TCA TGA GG			
	mp4CytKfor mp4CytKrev	AGC CTC TGT AAC ACC AAG C GCT TTG TAT AAG CAA CTT GGA TAG	389	RTP	Diese Studie
<i>IAC</i>	IAC_for	GCA GCC ACT GGT AAC AGG AT	118	1, 2, 3, 4	FRICKER et al., 2007
	IAC_rev	GCA GAG CGC AGA TAC CAA AT			

<sup>a</sup> PCR, Polymerase-Kettenreaktion; RTP, real-time PCR.

### 3.2.9.4 Multiplex real-time PCR

Durch die in 3.2.7 beschriebene Auswahl von Primern für *hbl*, *nhe*, *ces* und *cytK1* mit unterschiedlichen Längen und GC-Gehalten der PCR-Produkte, gelang ein simultaner Einsatz in einem multiplex real-time Assay basierend auf Amplifikatdifferenzierung durch Schmelztemperatur ( $T_m$ )-Analyse. Das Reaktionsgemisch (20  $\mu$ l) enthielt nach Optimierung der Primer-Konzentrationen 4  $\mu$ l Light Cycler Fast Start DNA Master<sup>Plus</sup> SYBR Green I (Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland), 2  $\mu$ l Proben-DNA, 0,125  $\mu$ M der Vorwärts- und Rückwärtsprimer mp3L1R1for/rev und ces\_SYBR\_F/R, 0,5  $\mu$ M der Primer mp4CytKfor/rev und 1  $\mu$ M der Oligonukleotid-Primer mp3AR2for/rev (detailliertes Protokoll im Anhang in Tabelle 21).

Die Amplifikation wurde in einem Light Cycler 2.0 (LC 2.0; Roche) unter Verwendung des folgenden Protokolls durchgeführt: ein Zyklus bei 95 °C für 10 min, 35 Zyklen mit 95 °C für 10 s, 60 °C für 10 s und 72 °C für 10 s (Tabelle 22). Nach jedem Extensionsschritt erfolgte eine Fluoreszenzmessung. Zur Generierung von Schmelzkurven wurden anschließend die PCR-Produkte für 1 s auf 95 °C erhitzt, auf 60 °C gekühlt und erneut langsam (0,05 °C/s) auf 95 °C erhitzt, wobei eine kontinuierliche Messung der Fluoreszenz stattfand. Die richtige Größe der PCR-Produkte wurde durch Gelelektrophorese mit nachfolgender Ethidiumbromid-Färbung und UV-Belichtung verifiziert (Tabelle 22).

Eine Teilmenge (16 *Bacillus* Stämme: 4 *B. cereus*, 1 *B. mycoides*, 2 *B. thuringiensis*, 3 *B. weihenstephanensis*, 3 *B. licheniformis*, 3 *B. subtilis* und 97 *B. cereus* Isolate) wurde zusätzlich mit dem besonders auf die Bearbeitung großer Untersuchungsmengen ausgelegten Light Cycler 480 (LC 480; Roche) getestet unter Verwendung der folgenden Amplifikationsbedingungen: ein Zyklus bei 95 °C für 10 min, 35 Zyklen mit 95 °C für 15 s, 60 °C für 10 s und 72 °C für 10 s. Danach wurden die PCR-Produkte auf 95 °C für 20 s erhitzt, auf 60 °C gekühlt und mit 0,11 °C/s erneut auf 95 °C erhitzt. Das Reaktionsgemisch (20  $\mu$ l) enthielt 10  $\mu$ l LightCycler 480<sup>®</sup> SYBR Green I Master, alle weiteren Komponenten und Konzentrationen waren identisch zum LC 2.0 Mastermix (Tabellen 23 und 24).

#### 3.2.9.4.1 Sensitivität und PCR-Effizienz

Zur Ermittlung der Sensitivität wurden DNA-Verdünnungsreihen der vier Referenzstämme in singleplex und in multiplex PCRs eingesetzt.

Die Effizienz wurde sowohl für die vier singleplex real-time PCRs als auch für die multiplex real-time PCR berechnet. DNA-Verdünnungsreihen der vier Referenzstämme wurden in singleplex und in multiplex PCRs eingesetzt. Mit Hilfe der für die einzelnen Verdünnungsstufen gemessenen  $C_t$ -Werte konnten für jeden der vier Referenzstämme Standardkurven generiert werden. In der halblogarithmischen Darstellung wurde die Effizienz (E) anhand der Steigung der erhaltenen Geraden nach der folgenden Formel berechnet:

$$E = 10^{-1/\text{Steigung der Geraden}}$$

#### 3.2.9.4.2 Statistische Datenauswertung

Der Schwellenwert-Zyklus ( $C_t$ ) wurde mit der im LC 2.0 und LC 480 implementierten Software berechnet. Arithmetische Mittelwerte und Standardabweichungen (SD) der  $C_t$ - und  $T_m$ -Werte wurden sowohl für multiplex als auch für singleplex Assays ermittelt. Für die multiplex PCR wurden die Schmelztemperaturunterschiede der vier PCR-Produkte auf Signifikanz überprüft. Die Reproduzierbarkeit des Assays wurde durch die Bestimmung der intra- und inter-assay Variation von  $C_t$ - und  $T_m$ -Werten kontrolliert. Der Varianzkoeffizient ( $CV = SD/\text{arithmetisches Mittel von } C_t\text{- oder } T_m\text{-Werten}$ ) wurde für drei Replikate in einem Lauf (intra-assay) und für Replikate in drei separaten Läufen berechnet (inter-assay).

#### 3.2.9.5 Spezifität

Zur Überprüfung der Spezifität der multiplex PCRs wurden Stämme der *Cereus*-Gruppe (*B. thuringiensis*, *B. mycoides*, *B. weihenstephanensis*), andere *Bacillus* Stämme (*B. subtilis*, *B. licheniformis*) sowie zehn weitere Bakterien-Spezies (*Citrobacter freundii*, *Enterobacter sakazakii*, *Enterococcus faecium*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella infantis*, *Staphylococcus aureus*, *Yersinia enterocolitica*) verwendet.

### **3.2.10 Enzymimmuntest (EIA)**

Zur Untersuchung der Protein-Komponenten von Hbl und Nhe in zellfreien Kulturüberständen konnten komponentenspezifische Antikörper eingesetzt werden (Tabelle 5; DIETRICH et al., 1999, 2005; MORAVEK et al., 2006; WEHRLE et al., 2009). Bei den verwendeten Enzymimmuntest-Varianten (indirekter EIA und Sandwich-EIA) ist das im Mikrotiterplatten-Lesegerät erhaltene Messsignal direkt proportional zur Toxin-Konzentration in der Probe. Zur Berechnung des in der Probe nachweisbaren Antigentiters wurde die Verdünnungsstufe herangezogen, deren Extinktion im Bereich von 1,0 lag. Der Titer wurde definiert als Produkt dieser Extinktion und der entsprechenden reziproken Verdünnung.

#### **3.2.10.1 Indirekter Enzymimmuntest**

Indirekte EIAs wurden zur Detektion der Toxine Hbl-L<sub>1</sub>, Hbl-B, NheA und NheC verwendet. Mikrotiterplatten wurden mit seriellen Verdünnungsreihen (Ausgangsverdünnung 1 : 5) beschichtet (100 µl/Kavität) und über Nacht bei Raumtemperatur (RT) in einer feuchten Kammer inkubiert. Freie Bindungsstellen wurden danach mit 3 % Casein/PBS blockiert (150 µl/Kavität; 45 min, RT, feuchte Kammer), gefolgt von einem Waschschriff und der Zugabe der in PBS verdünnten Antikörper (100 µl/Kavität; 1 h, RT, feuchte Kammer). Nach einem weiteren Waschschriff wurde das in 1 % Casein/PBS verdünnte Konjugat aufgetragen (1 h, RT, feuchte Kammer), wieder gewaschen, die Substrat/Chromogenlösung (500 µl TMB/10 ml H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) dazugegeben (100 µl/Kavität; 20 min, RT) und die Reaktion danach mit 1 molarer Schwefelsäure gestoppt. Die photometrische Messung der Extinktion erfolgte im Mikrotiterplatten-Lesegerät bei einer Wellenlänge von 450 nm.

#### **3.2.10.2 Sandwich-Enzymimmuntest**

Zum Nachweis von Hbl-L<sub>2</sub> und NheB standen Sandwich-EIAs zur Verfügung, wobei ein spezifischer in Bicarbonatpuffer bzw. PBS verdünnter monoklonaler Antikörper im Überschuss an eine feste Phase gebunden wurde (100 µl/Kavität; 24 h, RT, feuchte Kammer). Nach Absättigung mit 3 % Casein/PBS (150 µl/Kavität; 45 min, RT, feuchte Kammer) und Zugabe serieller Verdünnungsreihen des Kulturüberstands mit einer Ausgangsverdünnung

von 1 : 5 in 0,5 Tween/PBS (100 µl/Kavität; 1 h, RT, feuchte Kammer), wurde der entstandene Antigen-Antikörperkomplex mit Enzym-markiertem Nachweis-Antikörper überschichtet (1 h, RT, feuchte Kammer), Substrat hinzugegeben (20 min, RT), mit Schwefelsäure abgestoppt und das Ergebnis im Mikrotiterplatten-Lesegerät photometrisch bestimmt.

### **3.2.11 Zytotoxizitätstest**

Steril filtrierte Kulturüberstände aller Stämme wurden mit einem auf Vero Zellen basierenden Zytotoxizitätstest untersucht (DIETRICH et al., 1999). HEp-2 Zellen wurden zur Beurteilung des zytotoxischen Potentials emetischer Stämme verwendet (SCHULZ, 2004; EHLING-SCHULZ et al., 2005b).

Vero Zellen bzw. Hep-2 Zellen wurden in 40 ml MEM-Medium unter Zusatz von 1 % (v/v) fetalem Kälberserum, 1 % (v/v) Natriumpyruvat (100 mmol/l) und 0,2 % Penicillin/Streptomycin-Lösung (10000 IU/ml) bei 37 °C in 7 % CO<sub>2</sub>-Atmosphäre kultiviert. Nach Ausbildung eines dichten Zellrasens wurde das Medium verworfen, die Zellen mit PBS gewaschen und während 10 min bei 37 °C in 7 % CO<sub>2</sub>-Atmosphäre mit Trypsin abgelöst. Die Reaktion wurde mit MEM-Medium inhibiert und die Zellsuspension bei 135 x g für 7 min zentrifugiert. Zur Berechnung des benötigten Suspensionsvolumens wurde das erhaltene Pellet in 5 ml MEM-Medium resuspendiert und die Zellzahl mikroskopisch mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer bestimmt.

#### **3.2.11.1 Zytotoxizitätstest mit Vero Zellen**

In einer 96-Well Zellkulturplatte wurde eine log-2 Verdünnungsreihe mit sterilfiltriertem *B. cereus* Kulturüberstand und MEM-EARLE Medium angelegt. Nach Beschichtung der Mikrotiterplatte mit Medium (100 µl/Kavität) unter Freilassen der äußeren Reihen A und H zur Vermeidung von Randeffekten, wurden die Proben (Ausgangsverdünnung 1 : 10) im Doppelansatz aufgetragen. In die Reihen 11 und 12 wurde keine Probe gegeben, wodurch sie als Zellkontrolle verwendet werden konnten. Nach Zugabe der Zellsuspension (10<sup>4</sup>

**Tabelle 5. Enzymimmuntests mit entsprechenden monoklonalen Antikörpern (mAk)/Antiseren**

Spezifität	Primärer Antikörper/ Antiserum	Verdünnungs- medium	Konzentration	Sekundärer Antikörper/ Konjugat	Verdünnungs- medium	Konzentration	Referenz
Hbl-L <sub>2</sub>	mAk 1A12	Bicarbonatpuffer	10 µg/ml	8B12-HRP	1 % Casein/PBS	1 : 1000	DIETRICH et al., 1999
Hbl-L <sub>1</sub>	mAk 1E9	PBS	2 µg/ml	Kaninchen-anti-Maus-HRP	1 % Casein/PBS	1 : 3000	WEHRLE et al., 2009
Hbl-B	mAk 1B8	PBS	2 µg/ml	Kaninchen-anti-Maus-HRP	1 % Casein/PBS	1 : 3000	WEHRLE et al., 2009
NheA	mAk 1A8	PBS	1 µg/ml	Kaninchen-anti-Maus-HRP	1 % Casein/PBS	1 : 3000	DIETRICH et al., 2005
NheB	mAk 2B11	Bicarbonatpuffer	5 µg/ml	1E11-HRP	1 % Casein/PBS	1 : 4000	DIETRICH et al., 2005
NheC	Kaninchen Antiserum	PBS	1 µl/ml	Schwein-anti-Kaninchen-HRP	1 % Casein/PBS	1 : 2000	DIETRICH et al., 2005

HRP, horse radish peroxidase, Meerrettich-Peroxidase; PBS, phosphate buffered saline, phosphatgepufferte Kochsalzlösung.

Verzellen /100 µl/Kavität; 24 h, 37 °C, 7 % CO<sub>2</sub>-Atmosphäre) wurden 100 µl Medium pro Kavität abgehoben und das Testreagenz WST-1 zugegeben (10 µl/Kavität; 1 h, 37 °C, 7 %, CO<sub>2</sub>-Atmosphäre). Tetrazoliumsalz (WST) wird durch mitochondriale Enzyme stoffwechsellaktiver Zellen zu Formazan reduziert, was durch einen Farbumschlag von rosa nach orange sichtbar wird. Die Messung der Farbintensität erfolgte photometrisch bei 450 nm. Als Zytotoxizitätstiter wurde die Verdünnungsstufe der Kulturüberstände definiert, die im Vergleich zur Zellkontrolle zu einer Reduktion der mitochondrialen Dehydrogenaseaktivität um 50 % führte.

### **3.2.11.2 Zytotoxizitätstest mit HEp-2 Zellen**

In einer 96-Well Zellkulturplatte wurde eine log-2 Verdünnungsreihe mit autoklaviertem SMM-Material der Stämme bzw. Isolate und MEM-EARLE Medium (2 % Ethanol) angelegt. Nach Beschichtung der Mikrotiterplatte mit Medium (50 µl/Kavität) unter Freilassen der äußeren Reihen A und H, wurden die Proben im Doppelansatz bei einer Ausgangsverdünnung von 1 : 10 aufgetragen. In die Reihen 11 und 12 wurde keine Probe gegeben, wodurch sie als Zellkontrolle verwendet werden konnten. Nach Zugabe der Zellsuspension (10<sup>5</sup> HEp-2 Zellen/150 µl/Kavität; 48 h, 37 °C, 7 % CO<sub>2</sub>-Atmosphäre) wurden 100 µl Medium pro Kavität abgehoben und das Testreagenz WST-1 (10 µl) zugegeben (30 min, 37 °C, 7 % CO<sub>2</sub>-Atmosphäre). Die Messung und Auswertung erfolgte photometrisch im Mikrotiterplattenlesegerät (siehe 3.2.11.1).

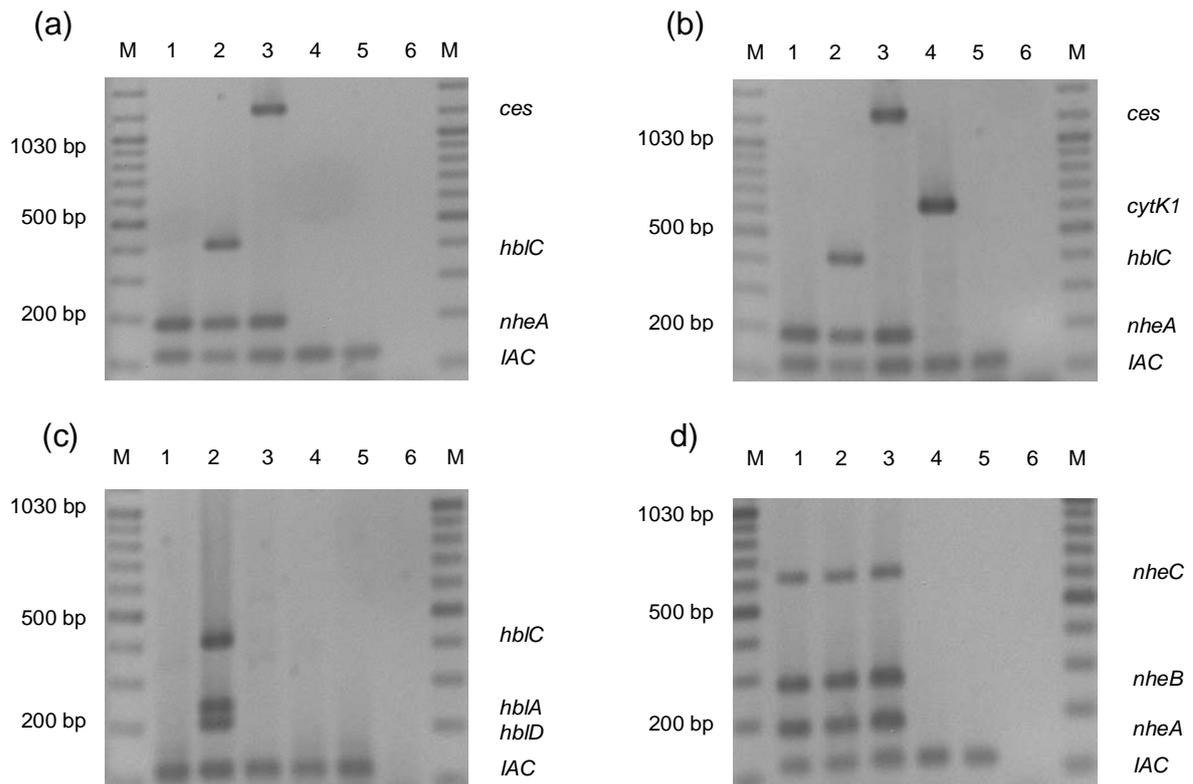
### 3.3 Ergebnisse

#### 3.3.1 PCR

Durch Auswahl von kompatiblen Primerpaaren nach den in 3.2.7 und 3.2.9 beschriebenen Kriterien konnten vier multiplex PCRs zur Anwendung in konventionellen Systemen sowie ein multiplex Assay für real-time Applikationen realisiert werden (detaillierte Protokolle im Anhang: Tabellen 13 – 24).

##### 3.3.1.1 Konventionelle multiplex PCRs

Alle Stämme und Isolate wurden in einem ersten Schritt mit den beiden Screening-Methoden PCR 1 zur simultanen Detektion von *hblC*, *nheA*, *ces* und PCR 2 (*hblC*, *nheA*, *ces*, *cytK1*) untersucht und die entstandenen PCR-Produkte mit Gelelektrophorese und UV-Transillumination dargestellt. Bei beiden multiplex PCRs zeigten die Amplifikate die erwarteten Größen von 411 bp (*hblC*), 186 bp (*nheA*), 1271 bp (*ces*) und in PCR 2 zusätzlich von 623 bp (*cytK1*). Im Anschluss konnte mit PCR 3 und PCR 4 eine Feintypisierung der jeweils drei Gene der Enterotoxin-Komplexe Hbl und Nhe durchgeführt werden, wobei alle detektierten PCR-Produkte die entsprechenden Größen von 411 bp, 205 bp und 237 bp für *hblC*, *hblD* und *hblA* bzw. 186 bp, 281 bp und 618 bp für *nheA*, *nheB* und *nheC* aufwiesen. In allen entwickelten multiplex PCRs wurde der pCRII<sup>®</sup>-TOPO<sup>®</sup> Vector als interne Amplifikationskontrolle eingesetzt, dessen PCR-Produkt mit einer Größe von 118 bp eindeutig von den übrigen Zielsequenzen differenziert werden konnte (Abbildung 4).



**Abbildung 4.** PCR-Amplifikate von Stämmen mit unterschiedlichen Toxin-Profilen nach PCR 1 - 4 (a - d) unter Verwendung von IACs. Spalte M, 100-bp DNA-Leiter; Spalte 1, Stamm NVH 0075/95 (Referenzstamm, produziert Nhe); Spalte 2, Stamm DSM 4384 (Referenzstamm, produziert Nhe und Hbl); Spalte 3, Stamm DSM 4312 (Referenzstamm, produziert Nhe und emetisches Toxin); Spalte 4, Stamm NVH 391/98 (Referenzstamm, produziert Cytotoxin K); Spalte 5, IAC; Spalte 6, steriles Wasser.

### 3.3.1.1.1 Spezifität der konventionellen PCR

Da *B. cereus* Toxin-Gene auch bei anderen *Bacillus* spp. beschrieben sind (BEATTIE & WILLIAMS, 1999; PHELPS & MCKILLIP, 2002; THORSEN et al., 2006), wurden zur Überprüfung der Spezifität neben nicht-*Bacillus* Spezies auch Stämme der *Cereus*-Gruppe und weitere *Bacillus* spp. eingesetzt. Die *Cereus*-Gruppen Stämme zeigten Banden für *hbl* und *nhe* (*B. weihenstephanensis* MHI 180, *B. mycoides* DSM 2048, *B. thuringiensis* ATCC 10792 und DSM 6029), *ces* und *nhe* (*B. weihenstephanensis* MHI 184) und *nhe* (*B. weihenstephanensis* MHI 188), wohingegen bei den sechs anderen *Bacillus* Stämmen und bei den zehn getesteten nicht-*Bacillus* Spezies keine spezifischen Amplifikate erhalten wurden (Tabelle 25 im Anhang).

### 3.3.1.1.2 Sequenzanalyse von PCR-Produkten nach den konventionellen PCRs

Zur Überprüfung der mit den konventionellen PCRs nachgewiesenen partiellen Toxin-Gene wurden PCR-Produkte der vier Referenzstämmen und von vier *Cereus*-Gruppen Stämmen kloniert und sequenziert. Durch Abgleich mit bekannten Sequenzen gelang eine eindeutige Identifizierung der gesuchten partiellen Toxin-Gene. Zwischen den in dieser Studie sequenzierten *Cereus*-Gruppen Stämmen und den Referenzstämmen konnten Sequenzübereinstimmungen von 95 – 99 % für *hblC*, 92 – 100 % für *nheA* und 99 % für *ces* gezeigt werden. Auch der Abgleich mit publizierten Toxin-Gensequenzen ergab einen hohen Grad an Homologie (92 – 100 %; Tabelle 6, Abbildung 11, multiple sequence alignments).

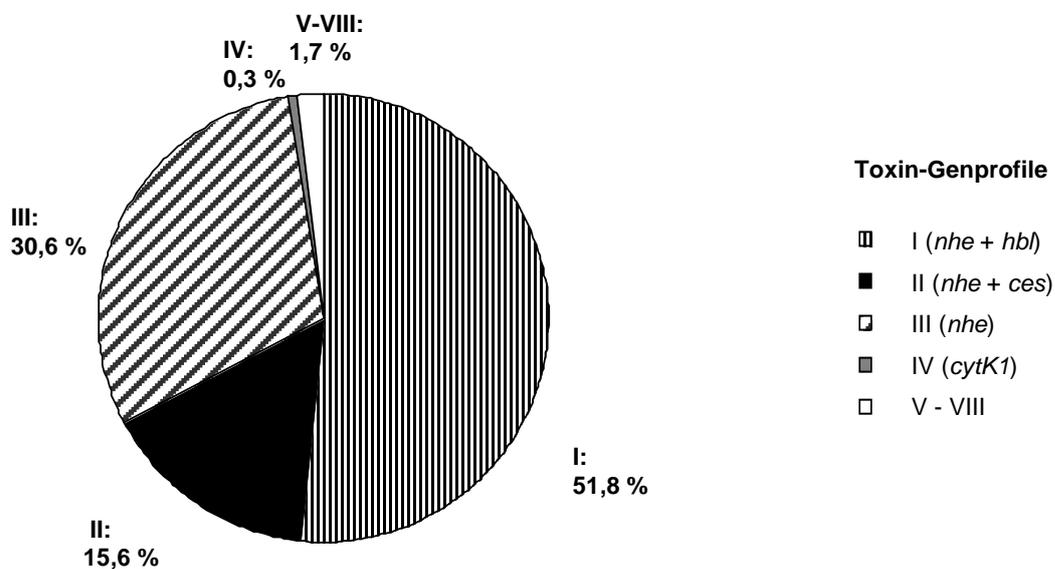
**Tabelle 6. Homologie (%) von partiellen Toxin-Gensequenzen der *B. cereus* Referenzstämmen, anderen *Cereus*-Gruppen Stämmen und Sequenzen aus GenBank (multiple sequence alignments im Anhang)**

Toxin-Gen	<i>B. cereus</i> Referenzstämmen und andere <i>Cereus</i> -Gruppen Stämme (partielle Toxin-Gene wurden in dieser Studie sequenziert)	Sequenzhomologie (%) mit in dieser Studie sequenzierten Stämmen und mit <i>B. cereus</i> Sequenzen aus GenBank (Zugangsnummer)
<i>hblC</i>	<i>B. c.</i> DSM 4384	<i>B.m.</i> DSM 2048 (95 %); <i>B.t.</i> ATCC 10792 (99 %); <i>B.t.</i> DSM 6029 (99 %); U63928 (98 %)
	<i>B. m.</i> DSM 2048	<i>B.t.</i> ATCC 10792 (95 %); <i>B.t.</i> DSM 6029 (95 %); U63928 (97 %)
	<i>B. t.</i> ATCC 10792	<i>B.t.</i> DSM 6029 (100 %); U63928 (98 %)
	<i>B. t.</i> DSM 6029	U63928 (98 %)
<i>hblD</i>	<i>B. c.</i> DSM 4384	U63928 (99 %)
<i>hblA</i>	<i>B. c.</i> DSM 4384	AJ237785 (100 %)
<i>nheA</i>	<i>B. c.</i> NVH 0075/95	<i>B.m.</i> DSM 2048 (92 %); <i>B.t.</i> ATCC 10792 (94 %); <i>B.t.</i> DSM 6029 (94 %); Y19005 (94 %)
	<i>B. m.</i> DSM 2048	<i>B.t.</i> ATCC 10792 (92 %); <i>B.t.</i> DSM 6029 (92 %); Y19005 (92 %)
	<i>B. t.</i> ATCC 10792	<i>B.t.</i> DSM 6029 (100 %); Y19005 (100 %)
	<i>B. t.</i> DSM 6029	Y19005 (100 %)
<i>nheB</i>	<i>B. c.</i> NVH 0075/95	Y19005 (96 %)
<i>nheC</i>	<i>B. c.</i> NVH 0075/95	Y19005 (94 %)
<i>ces</i>	<i>B. c.</i> DSM 4312	<i>B.w.</i> MHI 184 (99 %); DQ360825 (100 %)
	<i>B. w.</i> MHI 184	DQ360825 (99 %)
<i>cytKI</i>	<i>B. c.</i> NVH 391/98	AJ277962 (100 %)

*B. c.*, *Bacillus cereus*; *B. m.*, *Bacillus mycoides*; *B. t.*, *Bacillus thuringiensis*; *B. w.*, *Bacillus weihenstephanensis*.

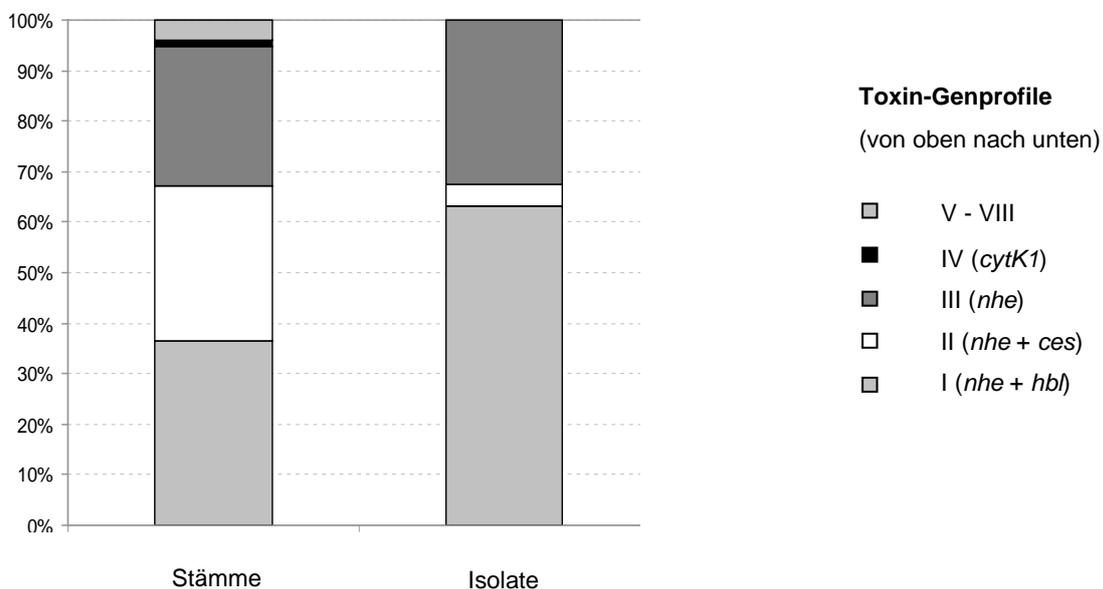
### 3.3.1.1.3 Toxin-Genprofile der *B. cereus* Stämme und Isolate nach Untersuchung mit konventioneller multiplex PCR

Nach Durchführung der vier konventionellen multiplex PCRs konnten 99,7 % der untersuchten *B. cereus* Stämme und Isolate (n = 354) anhand der detektierten Gensequenzen acht Toxin-Genprofilen (I – VIII) zugeordnet werden. Bei den 183 *B. cereus* Stämmen und Isolaten in Profil I konnten alle Gene der Hbl- und Nhe-Proteine detektiert werden. Weitere 55 bzw. 108 Stämme und Isolate zeigten PCR-Produkte für *nhe* und *ces* (II) bzw. für die drei *nhe*-Gene (III). Nur der Referenzstamm NVH 391/98 war positiv für *cytK1* (IV). Bei den sechs in den Profilen V – VIII enthaltenen Stämmen konnten nur einzelne der jeweils drei *nhe*- und *hbl*-Gene nachgewiesen werden. Hierbei zeigten die in den Gruppen V (n = 1) und VI (n = 3) enthaltenen Stämme alle Gene des *nhe* Operons und zwei bzw. ein Gen(e) des *hbl* Operons. Bei den beiden Stämmen mit den Toxin-Genprofilen VII und VIII konnten nur zwei bzw. ein Gen(e) des Nhe-Komplexes detektiert werden (Abbildungen 5 und 6, Tabelle 12).



**Abbildung 5.** Toxin-Genprofile (I – VIII) der untersuchten *B. cereus* Stämme und Isolate nach PCR 1 – 4. Es wurden alle *B. cereus* Stämme und Isolate (n = 353) mit einem positiven PCR-Ergebnis berücksichtigt.

Die im Rahmen dieser Studie von Einrichtungen der Bundeswehr erhaltenen *B. cereus* Isolate repräsentieren im Gegensatz zu den preselektierten *B. cereus* Stämmen der Stammsammlung des Instituts eine zufällig zusammengestellte Probenmenge mit natürlichen Prävalenzen der einzelnen Toxin-Gene. Daher wurden in einem zweiten Schritt die PCR-Ergebnisse der enterotoxinogenen *B. cereus* Stämme (n = 146) und Isolate (n = 207) getrennt betrachtet, wobei sich für die Profile I – III relative Häufigkeiten von 35,6 % (I), 31,5 % (II) und 28,1 % (III) bei den Stämmen bzw. 63,3 % (I), 4,3 % (II) und 32,4 % (III) bei den Isolaten ergaben. Somit konnten 95,2 % der *B. cereus* Stämme und 100 % der *B. cereus* Isolate den ersten drei Profilen zugeordnet werden (Abbildung 6).

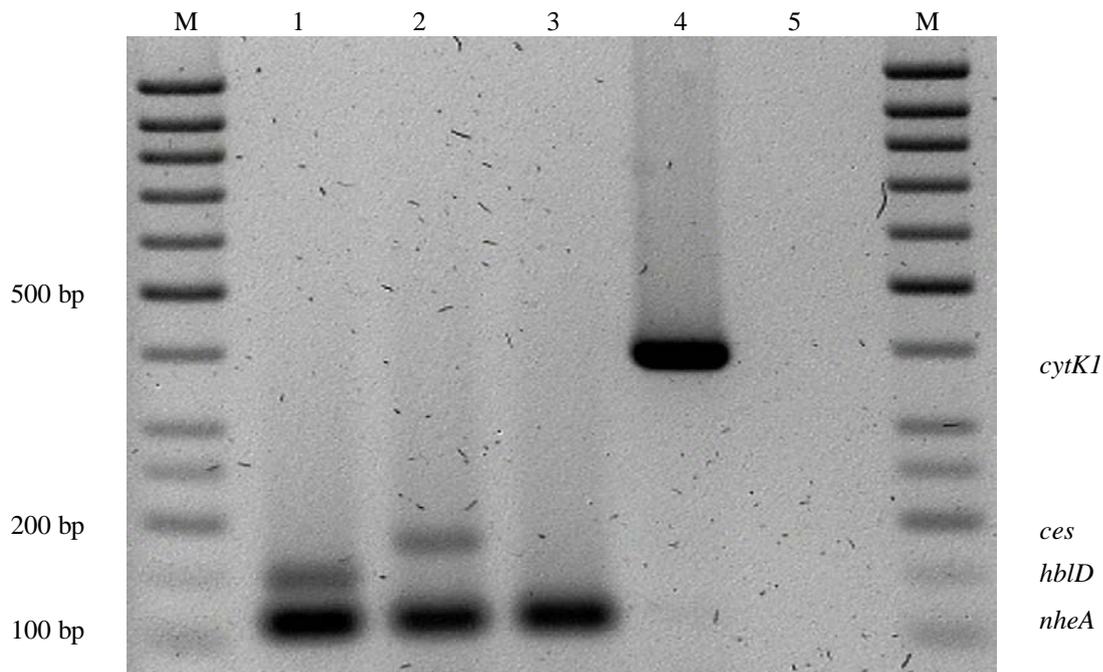


**Abbildung 6.** Verteilung toxinogener *B. cereus* Stämme und Isolate auf die Genprofile I – VIII.

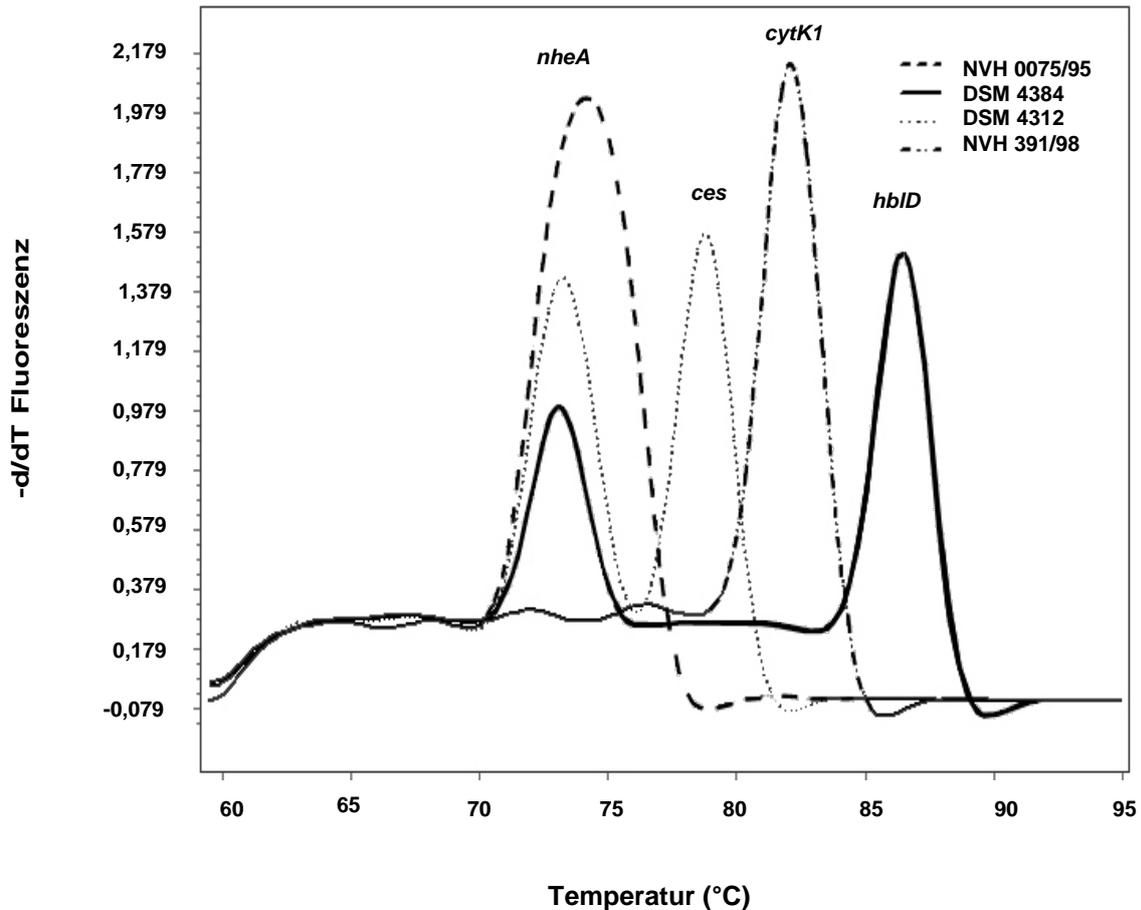
Bei den 146 untersuchten *B. cereus* Stämmen wurden Prävalenzen von 38,4 % für *hbl*, 99,3 % für *nhe*, 31,5 % für *ces* und 0,7 % für *cytK1* ermittelt. Von den *B. cereus* Isolaten (n = 208) zeigten 207 PCR-Produkte für Toxin-Gene (*nhe + hbl*; *nhe + ces*; *nheA*) mit Prävalenzen von 62,9 % (*hbl*), 99,5 % (*nhe*) und 4,3 % (*ces*). Keines der Isolate wurde positiv für *cytK1* getestet.

### 3.3.1.2 Multiplex real-time PCR

Ergänzend zu den beschriebenen Methoden wurde eine weitere multiplex PCR zur Anwendung in real-time Systemen entwickelt, um kürzere Durchlaufzeiten und größere Probenmengen zu ermöglichen. Durch die Auswahl von Primern für *hblD*, *nheA*, *ces* und *cytKI* mit unterschiedlichen Sequenzen, Längen und GC-Gehalten der PCR-Produkte, konnte ein multiplex Assay basierend auf SYBR Green I realisiert werden. Nach Gelelektrophorese konnten vier klar zu differenzierende PCR-Produkte mit den erwarteten Größen von 148 bp (*hblD*), 111 bp (*nheA*), 176 bp (*ces*) und 389 bp (*cytKI*) dargestellt werden (Abbildung 7). Eine durchgeführte Schmelzkurven-Analyse zeigte für die vier Zielsequenzen bei den eingesetzten Referenzstämmen eindeutig differenzierbare Schmelzpunkte ( $p < 0,001$ ) mit  $T_m$ -Mittelwerten von 86,57 °C, 73,62 °C, 78,81 °C und 82,19 °C für *hblD*, *nheA*, *ces* bzw. *cytKI* (Abbildung 8).



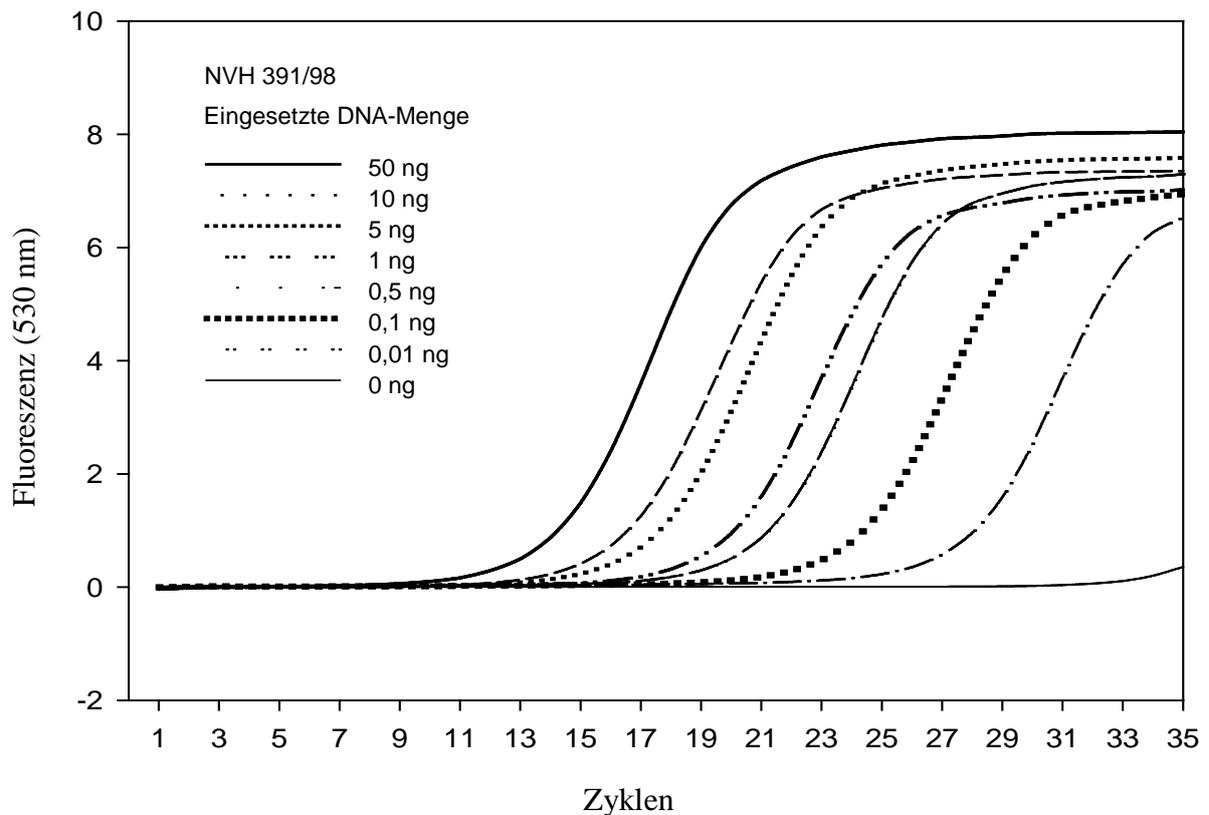
**Abbildung 7.** PCR-Produkte der *B. cereus* Referenzstämmen nach multiplex real-time PCR und 2 % Gelelektrophorese. Spalte M, 50 bp-DNA-Leiter; Spalte 1, Stamm DSM 4384; Spalte 2, Stamm DSM 4312; Spalte 3, Stamm NVH 0075/95; Spalte 4, Stamm NVH 391/98; Spalte 5, steriles Wasser.



**Abbildung 8.** Schmelzkurven der *B. cereus* Referenzstämmen mit eindeutigen Schmelzpunkten für die entsprechenden Enterotoxin-Gene nach Durchführung der multiplex real-time PCR. Die untersuchten Stämme zeigten die folgenden Toxin-Profile: Stamm NVH 0075/95 (*nheA*), Stamm DSM 4384 (*nheA* + *hblD*), Stamm DSM 4312 (*nheA* + *ces*), Stamm NVH 391/98 (*cytK1*). Für die vier Zielsequenzen wurden signifikant unterschiedliche  $T_m$ -Werte ( $^{\circ}\text{C}$ ;  $p < 0,001$ ) berechnet: *nheA* (74,3; 73,19; 73,36), *ces* (78,81), *cytK1* (82,19), *hblD* (86,57).

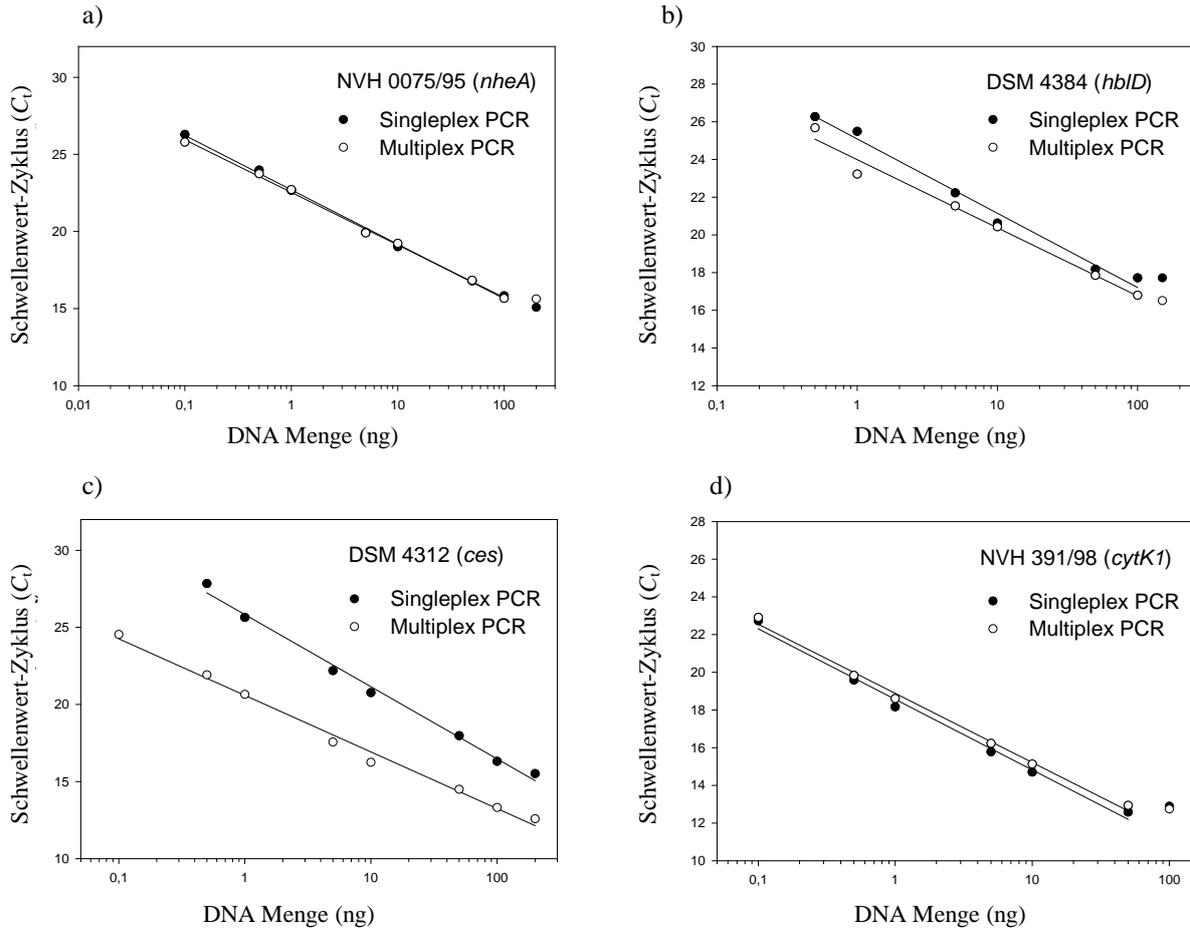
### 3.3.1.2.1 Sensitivität und Effizienz der real-time PCR

Zur Ermittlung der Sensitivität und Effizienz der real-time Assays wurden serielle DNA-Verdünnungsreihen der Referenzstämmen angelegt und sowohl mit den singleplex PCRs als auch mit der multiplex PCR untersucht unter Verwendung der in 3.2.9.4 angegebenen Primerkonzentrationen. In Abbildung 9 sind exemplarisch die Kurven einer Verdünnungsreihe des Stammes NVH 391/98 nach der multiplex real-time PCR dargestellt.



**Abbildung 9.** Amplifikationskurven einer DNA-Verdünnungsreihe des *B. cereus* Stammes NVH 391/98 und einer Negativkontrolle in der multiplex real-time PCR. Die eingesetzten DNA-Mengen betragen 50 ng, 10 ng, 5 ng, 1 ng, 0,5 ng, 0,1 ng und 0,01 ng. Die Negativkontrolle enthielt keine DNA.

Es wurde für alle Referenzstämme in singleplex und multiplex Assays ein lineares Verhältnis über drei Größenordnungen für die eingesetzte DNA-Menge und die erhaltenen  $C_t$ -Werte festgestellt: Stamm NVH 0075/95 (0,1 – 100 ng), Stamm DSM 4384 (0,5 – 50 ng), Stamm DSM 4312 (0,5 – 100 ng), Stamm NVH 391/98 (0,1 – 50 ng; Abbildung 10). Somit konnte für jeden Stamm jeweils eine Standardkurve für die singleplex und multiplex PCR generiert werden. Durch logarithmische Darstellung der eingesetzten DNA-Mengen konnten acht Geraden gewonnen werden, deren Steigung zur Berechnung der PCR-Effizienz (E) verwendet wurde:  $E = 10^{-1/\text{Steigung der Geraden}}$  (Tabelle 7).



**Abbildung 10.** Serielle DNA-Verdünnungen der *B. cereus* Referenzstämme in singleplex und multiplex real-time PCRs. Datenpunkte zeigen das Verhältnis von eingesetzter DNA-Menge (ng) und Schwellenwert-Zyklus ( $C_t$ ). Ergebnisse multipler Regressions-Analysen sind durch Linien dargestellt. Daten von Verdünnungsstufen mit  $C_t < 30$  und positivem  $T_m$ -Wert wurden in der Abbildung berücksichtigt.

**Tabelle 7. Effizienz-Bestimmung der singleplex und multiplex real-time PCRs**

Stamm	Singleplex PCR			Multiplex PCR		
	Geraden-Gleichung	$R^2$	E	Geraden-Gleichung	$R^2$	E
NVH 0075/95	$f(x) = -3,2688 x + 22,1663$	0,9999	2,0	$f(x) = -3,3040 x + 22,3563$	0,9945	2,0
DSM 4384	$f(x) = -3,4751 x + 24,3697$	0,9759	1,94	$f(x) = -3,6540 x + 24,0810$	0,9999	1,88
DSM 4312	$f(x) = -4,1363 x + 25,0650$	0,9956	1,75	$f(x) = -3,2426 x + 19,5169$	0,9930	2,0
NVH 391/98	$f(x) = -3,4740 x + 18,3075$	0,9958	1,94	$f(x) = -3,4415 x + 18,6716$	0,9985	1,95

E, Effizienz;  $R^2$ , Korrelation.

### 3.3.1.2.2 Vergleichsuntersuchung singleplex und multiplex real-time PCR

Zur Erkennung möglicher Detektionsunterschiede oder Schmelztemperaturverschiebungen bei der multiplex PCR im Vergleich zur singleplex PCR, wurden jeweils zehn Stämme und Isolate mit beiden Systemen auf *nheA*, *hblD* bzw. *ces* untersucht. Zum Vergleich des Nachweises von *cytKI* mit singleplex und multiplex Assays wurde der Stamm NVH 391/98 verwendet. Die Auswertung der Ergebnisse ergab  $C_t$ -Mittelwerte von 15,04 in den singleplex PCRs und 15,68 in der multiplex PCR. Die durchschnittlichen  $T_m$ -Werte (°C) betragen 74,64 und 73,94 für *nheA*, 87,55 und 87,33 für *hblD*, 78,49 und 78,69 für *ces* und 82,37 bzw 82,19 für *cytKI* (Tabelle 8).

**Tabelle 8.  $C_t$ - und  $T_m$ - Mittelwerte in singleplex und multiplex real-time PCRs für ausgewählte Stämme und Isolate**

Gen	<i>B. cereus</i> Stämme und Isolate	Singleplex PCR		Multiplex PCR	
		Mittelwert $C_t$ (SD)	Mittelwert $T_m$ (SD)	Mittelwert $C_t$ (SD)	Mittelwert $T_m$ (SD)
<i>nheA</i>	DSM 4384, DSM 4312, NVH 0075/95, MHI 1550, MHI 1566, MHI 2523, MHI 2540, MHI 2566, MHI 1602, MHI 2611	15,92 (0,58)	74,64 (0,23)	15,77 (0,57)	73,94 (0,63)
<i>hblD</i>	DSM 4384, MHI 1490, MHI 1502, MHI 1518, MHI 1561, MHI 2383, MHI 2539, MHI 2540, MHI 2598, MHI 2602	14,66 (0,88)	87,55 (0,69)	15,35 (0,42)	87,33 (0,53)
<i>ces</i>	DSM 4312, MHI 1488, MHI 1535, MHI 1538, MHI 1550, MHI 1566, MHI 1567, MHI 2577, MHI 2580, MHI 2594	14,50 (0,50)	78,49 (0,19)	15,83 (0,68)	78,69 (0,13)
<i>cytKI</i>	NVH 391/98	15,56	82,37	16,57	82,19

$C_t$ , Schwellenwert-Zyklus;  $T_m$ , Schmelztemperatur; SD, Standardabweichung.

### 3.3.1.2.3 Reproduzierbarkeit der real-time PCR

Die Reproduzierbarkeit des entwickelten Assays wurde durch die Ermittlung von Intra-Assay- und Inter-Assay-Variationen (CV) kontrolliert. Hierzu wurden drei Replikate von insgesamt zehn Stämmen in einem Lauf bzw. in drei getrennten Läufen untersucht, wobei sich CV-Werte für  $T_m$  von 0,03 % und 0,06 % und für  $C_t$  von 0,78 % und 1,70 % ergaben (Tabelle 9).

### 3.3.1.2.4 Untersuchung mit der multiplex real-time PCR im LC 2.0

Bei 359 Stämmen und Isolaten (146 *B. cereus* Stämme, 6 *Cereus*-Gruppen Stämme, 207 *B. cereus* Isolate) wurden mit der entwickelten real-time multiplex PCR ein oder mehrere Toxin-Gene nachgewiesen. Die spezifischen PCR-Produkte für *nheA*, *hblD* und *ces* konnten in 358, 187 bzw. 56 der untersuchten Stämme und Isolaten detektiert werden. Das PCR-Amplifikat für *cytKI* bzw. die entsprechende Schmelztemperatur zeigte nur der eingesetzte Referenzstamm NVH 391/98. Für die vier Zielgene ergaben sich  $T_m$ -Mittelwerte von 73,90 °C (*nheA*), 87,02 °C (*hblD*), 78,66 °C (*ces*) und 82,19 °C (*cytKI*) bei einem durchschnittlichen  $C_t$ -Wert von 17,13. Eine getrennte Betrachtung der Stämme und Isolate zeigte ähnliche Schmelztemperaturen und Schwellenwert-Zyklen. Die durchschnittlichen  $C_t$ -Werte berechneten sich auf 17,27 für die Stämme und 17,03 für die Isolate mit Standardabweichungen von 2,52 bzw. 2,43. Auch die durchschnittlichen  $T_m$ -Werte zeigten nur minimale Unterschiede von 0,07 °C für *nheA*, 0,02 °C für *hblD* und 0,09 °C für *ces*. Insgesamt konnte mit der entwickelten multiplex real-time PCR bei 353 der untersuchten *B. cereus* Stämme und Isolate und bei den sechs *Cereus*-Gruppen Stämmen zumindest ein Toxin-Gen nachgewiesen werden. Nur ein *B. cereus* Isolat zeigte keine spezifischen Schmelzpunkte. Die sechs untersuchten *B. subtilis* und *B. licheniformis* Stämme sowie die zehn nicht-*Bacillus* Spezies hatten keine spezifischen  $T_m$ -Werte. Die Auswertung der PCR-Ergebnisse aller Stämme und Isolate ergab signifikante Schmelztemperatur-Unterschiede der vier Zielsequenzen ( $p < 0,001$ ; Tabelle 10).

**Tabelle 9. Reproduzierbarkeit der multiplex real-time PCR im Light Cycler 2.0**

<i>Bacillus cereus</i> Stämme und Isolate	Intra-assay CV (%) <sup>a</sup>					Inter-assay CV (%) <sup>a</sup>				
	$C_t$	$T_m$ <sup>b</sup>				$C_t$	$T_m$ <sup>b</sup>			
		<i>nheA</i>	<i>ces</i>	<i>cytK1</i>	<i>hblD</i>		<i>nheA</i>	<i>ces</i>	<i>cytK1</i>	<i>hblD</i>
DSM 4384 ( <i>nhe</i> + <i>hbl</i> ), DSM 4312 ( <i>nhe</i> + <i>ces</i> ), NVH 0075/95 ( <i>nhe</i> ), NVH 391/98 ( <i>cytK</i> ), MHI 1550 ( <i>nhe</i> + <i>ces</i> ), MHI 1566 ( <i>nhe</i> + <i>ces</i> ), MHI 2523 ( <i>nhe</i> ), MHI 2540 ( <i>nhe</i> + <i>hbl</i> ), MHI 2602 ( <i>nhe</i> + <i>hbl</i> ), MHI 2611 ( <i>nhe</i> )	0,78	0,04	0,03	0,03	0,02	1,70	0,07	0,07	0,07	0,04

<sup>a</sup> Der Variationskoeffizient (CV) repräsentiert den Quotienten aus Standardabweichung und dem Mittelwert der Schwellenwert-Zyklen ( $C_t$ ) bzw.

Schmelztemperaturen ( $T_m$ ).

<sup>b</sup> Zur CV-Berechnung wurden drei Replikate der für das entsprechende Gen positiv getesteten Stämme und Isolate herangezogen.

**Tabelle 10. Ergebnisse der Stämme (n = 168) und Isolate (n = 208) im Light Cycler 2.0**

Spezies	Anzahl der Stämme und Isolate	Anzahl der Stämme und Isolate mit entsprechendem Gen				Mittelwert $C_t$ (SD)	Mittelwert $T_m$ (SD)			
		<i>nheA</i>	<i>hblD</i>	<i>ces</i>	<i>cytK1</i>		<i>nheA</i>	<i>hblD</i>	<i>ces</i>	<i>cytK1</i>
<i>B. cereus</i>	354	352	183	55	1	17,14 (2,48)	73,90 (0,73)	87,04 (0,67)	78,67 (0,19)	82,19
Stämme	146	145	52	46	1	17,29 (2,56)	73,95 (0,78)	87,05 (0,55)	78,68 (0,19)	82,19
Isolate	208	207	131	9	-	17,03 (2,43)	73,87 (0,69)	87,03 (0,71)	78,59 (0,13)	-
<i>Cereus</i> -Gruppen Stämme	6	6	4	1	-	16,78 (1,64)	73,77 (0,41)	86,48 (0,74)	78,44	-
<i>B. weihenstephanensis</i>	3	3	1	1	-	17,22 (0,69)	73,53 (0,49)	86,95	78,44	-
<i>B. mycoides</i>	1	1	1	-	-	19,06	74,06	85,38	-	-
<i>B. thuringiensis</i>	2	2	2	-	-	14,98 (0,54)	73,97 (0,13)	86,79 (0,09)	-	-
Weitere <i>Bacillus</i> spp. Stämme	6	-	-	-	-	> 30	-	-	-	-
<i>B. subtilis</i>	3	-	-	-	-	> 30	-	-	-	-
<i>B. licheniformis</i>	3	-	-	-	-	> 30	-	-	-	-
Nicht- <i>Bacillus</i> Spezies	10	-	-	-	-	> 30	-	-	-	-
Gesamt	376	358	187	56	1	17,13 <sup>a</sup> (2,47)	73,90 (0,73)	87,02 (0,67)	78,66 (0,19)	82,19
Stämme	168	151	56	47	1	17,27 <sup>a</sup> (2,52)	73,94 (0,77)	87,01 (0,58)	78,68 (0,19)	82,19
Isolate	208	207	131	9	0	17,03 <sup>a</sup> (2,43)	73,87 (0,69)	87,03 (0,71)	78,59 (0,13)	-

$C_t$ , Schwellenwert-Zyklus;  $T_m$ , Schmelztemperatur; SD, Standardabweichung.

<sup>a</sup> nur Stämme und Isolate mit  $C_t < 30$  und positivem  $T_m$  wurden berücksichtigt.

### 3.3.1.2.5 Vergleichsuntersuchung LC 2.0 und LC 480

Zur Bearbeitung großer Untersuchungsmengen in der Routinediagnostik eignet sich insbesondere der für hohe Durchsatzraten konfigurierte Light Cycler 480 (Roche). Daher wurde eine Teilmenge (n = 113: 101 *B. cereus*, 6 *Cereus*-Gruppen Stämme, 6 andere *Bacillus* spp.) der bereits im LC 2.0 untersuchten Stämme und Isolate zusätzlich im LC 480 getestet. Die Auswertung der mit beiden Systemen erhaltenen Ergebnisse ergab für die *B. cereus* Stämme und Isolate  $C_t$ -Mittelwerte (SD) von 16,54 (1,22) im LC 2.0 und 18,08 (1,25) im LC 480. Für die erhaltenen  $T_m$ -Werte (°C) der *B. cereus* Stämme und Isolate konnten Mittelwerte (SD) von 86,96 (0,81) und 86,93 (0,81) für *hblD*, 73,87 (0,66) und 74,05 (0,54) für *nheA*, 78,65 (0,15) und 78,44 (0,14) für *ces* und 82,19 und 82,09 für *cytKI* berechnet werden. Die sechs *Cereus*-Gruppen Stämme zeigten  $T_m$ -Werte für *hblD* von 86,48 °C (0,74) und 86,33 °C (0,68), für *nheA* von 73,77 °C (0,41) und 74,13 °C (0,45), für *ces* von 78,44 °C und 78,38 °C mit  $C_t$ -Werten von 16,78 (1,64) und 18,67 (2,06) wohingegen für die sechs anderen *Bacillus* Stämme kein spezifischer  $T_m$ -Wert erhalten werden konnte (Tabelle 11).

### 3.3.1.3 Vergleich: Konventionelle multiplex PCRs – Real-time multiplex PCR

Für 97,3 % der *B. cereus* Stämme (n = 146) und 100 % der *B. cereus* Isolate (n = 208) stimmten nach Durchführung der konventionellen PCRs und der real-time multiplex PCR die erhaltenen Ergebnisse überein. Bei vier *B. cereus* Stämmen wurden in den konventionellen PCRs nur zwei bzw. ein Gen des *hbl*-Operons (*hblC*, *hblA*) nachgewiesen (Genprofile V und VI). In der real-time PCR konnte für diese Stämme kein  $T_m$ -Wert für *hblD* erhalten werden. Für alle zur Spezifitätsuntersuchung eingesetzten *Cereus*-Gruppen Stämme konnten mit den konventionellen PCRs und der real-time PCR übereinstimmende Ergebnisse erzielt werden.

**Tabelle 11. Multiplex PCR-Ergebnisse von 113 Stämmen und Isolaten im Light Cyclus 2.0 und Light Cyclus 480**

Spezies	Anzahl der Stämme und Isolate	Anzahl der Stämme und Isolate mit entsprechendem Gen				Mittelwert $C_t$ (SD)	Mittelwert $T_m$ (SD)			
		<i>nheA</i>	<i>hblD</i>	<i>ces</i>	<i>cytKI</i>		<i>nheA</i>	<i>hblD</i>	<i>ces</i>	<i>cytKI</i>
<i>B. cereus</i>										
LC 2.0	101	100	57	7	1	16,54 (1,22)	73,87 (0,66)	86,96 (0,81)	78,65 (0,15)	82,19
LC 480	101	100	57	7	1	18,08 (1,25)	74,05 (0,54)	86,93 (0,81)	78,44 (0,14)	82,09
<i>B. weihenstephanensis</i> <sup>a</sup>										
LC 2.0	3	3	1	1	-	17,22 (0,69)	73,53 (0,49)	86,95	78,44	-
LC 480	3	3	1	1	-	19,21 (0,97)	73,83 (0,44)	86,89	78,38	-
<i>B. mycooides</i> <sup>a</sup>										
LC 2.0	1	1	1	-	-	19,06	74,06	85,38	-	-
LC 480	1	1	1	-	-	21,55	74,64	85,35	-	-
<i>B. thuringiensis</i> <sup>a</sup>										
LC 2.0	2	2	2	-	-	14,98 (0,54)	73,97 (0,13)	86,79 (0,09)	-	-
LC 480	2	2	2	-	-	16,43 (0,48)	74,33 (0,06)	86,54 (0,08)	-	-
<i>B. subtilis</i>										
LC 2.0	3	-	-	-	-	> 30	-	-	-	-
LC 480	3	-	-	-	-	> 30	-	-	-	-
<i>B. licheniformis</i>										
LC 2.0	3	-	-	-	-	> 30	-	-	-	-
LC 480	3	-	-	-	-	> 30	-	-	-	-
Gesamt										
LC 2.0	113	106	61	8	1	16,56 (1,24) <sup>b</sup>	73,86 (0,65)	86,93 (0,81)	78,62 (0,15)	82,19
LC 480	113	106	61	8	1	18,10 (1,25) <sup>b</sup>	74,05 (0,53)	86,89 (0,81)	78,43 (0,13)	82,09

$C_t$ , Schwellenwert-Zyklus;  $T_m$ , Schmelztemperatur; SD, Standardabweichung.

<sup>a</sup> *Cereus*-Gruppen Stämme,  $T_m$ - und  $C_t$ -Mittelwerte siehe 3.3.1.2.5.

<sup>b</sup> nur Stämme mit  $C_t < 30$  und positivem  $T_m$  wurden berücksichtigt.

### 3.3.2 Stärkehydrolyse-Test

Stärkeabbau wurde bei 76 (52,05 %) bzw. 146 (70,19 %) der untersuchten *B. cereus* Stämme (n = 146) und *B. cereus* Isolate (n = 208) beobachtet. Alle *ces* positiven *B. cereus* Stämme (n = 46) und Isolate (n = 9) zeigten keine Stärkehydrolyse (Tabelle 25 im Anhang).

### 3.3.3 Enterotoxin-Expression und Zytotoxizität von 359 enterotoxinogenen Stämmen und Isolaten

Die Hbl- und Nhe-Expression der Stämme und Isolate wurde mit am Lehrstuhl etablierten Enzymimmuntests überprüft. Hierbei standen zum Nachweis der drei Hbl-Proteine sowie der zwei Nhe-Komponenten NheA und NheB monoklonale Antikörper zur Verfügung. Zur Detektion der dritten Nhe-Komponente (NheC) wurde ein polyklonales Antiserum verwendet.

Bei 99,4 % der *nhe*-positiven Stämme und Isolate (n = 358) konnte eine Expression von zumindest einer der drei Nhe-Komponenten nachgewiesen werden. Des Weiteren konnte bei 93,7 % der *hbl*-positiven Stämme und Isolate zusätzlich mindestens eine Komponente von Hbl immunologisch detektiert werden. Ein Stamm oder Isolat mit alleiniger Hbl-Produktion wurde nicht beobachtet.

Betrachtet man die Ergebnisse der Hbl- bzw. Nhe-Expression getrennt nach Stämmen und Isolaten ergibt sich folgendes Bild:

Alle 149 Stämme mit komplettem *nhe* Operon (Genprofile I – III, V, VI) exprimierten die drei Toxine NheA, NheB und NheC, wobei jedoch sieben dieser Stämme psychrotrophes Wachstum zeigten und erst nach Reduktion der Inkubationstemperatur von 32 °C auf 25 °C (CGY-Anzucht, Details siehe 3.2.2) ein positives Ergebnis im EIA erhalten wurde. Bei zwei Stämmen mit partieller Detektion der *nhe*-Gene in den durchgeführten PCRs (Genprofile VII, VIII), wurde nur in den entsprechenden EIAs ein positives Resultat erhalten, wohingegen die Tests für die andere(n) Nhe-Komponente(n) negativ ausfielen. Bei 98,2 % der Stämme mit komplettem *hbl* Operon (n = 56; Genprofil I) konnten in den durchgeführten Enzymimmuntests die drei Toxin-Komponenten Hbl-L<sub>1</sub>, Hbl-L<sub>2</sub> und Hbl-B nachgewiesen

werden. Von den vier Stämmen der Profile V und VI mit nur partiell nachgewiesenen *hbl*-Genen produzierte nur ein Stamm nachweisbare Mengen der entsprechenden Proteine.

Für 98,1 % der *nhe*-positiven Isolate (n = 207) konnten in den Enzymimmuntests die drei Nhe-Komponenten nachgewiesen werden. Zwei weitere Isolate (Profil I) mit positivem PCR-Ergebnis für *nhe* produzierten nur zwei (NheB und NheC) bzw. eines (NheC) der drei Toxine. Bei den *hbl*-positiven Isolaten (n = 131) exprimierten 93,9 % die drei Komponenten des Hbl-Komplexes, wohingegen für die übrigen Isolate negative Ergebnisse in den drei für Hbl-L<sub>1</sub>, Hbl-L<sub>2</sub> und Hbl-B eingesetzten EIAs erhalten wurden.

Ingesamt waren 97,5 % der enterotoxinogenen Stämme und Isolate (n = 359) zytotoxisch gegenüber Vero Zellen. Für alle *ces*-positiven Stämme und Isolate (n = 56) konnten zytotoxische Effekte gegenüber HEp-2 Zellen aufgezeigt werden.

Bei alleiniger Betrachtung der untersuchten enterotoxinogenen Stämme (n = 152) wurde für 96,7 % eine zytotoxische Aktivität gegenüber Vero Zellen gezeigt. Nur drei Stämme (Profile II, III und V) mit positivem Ergebnis für die drei Nhe-Komponenten zeigten keine Zelltoxizität. Für den ebenfalls mit diesem Zelltest untersuchten *cytK1*-positiven Stamm NVH 391/98 (Profil IV) konnten zytotoxische Effekte gezeigt werden.

Von den 207 enterotoxinogenen Isolaten waren 98,1 % toxisch gegenüber Vero Zellen. Nur vier Isolate (Profil I) mit unvollständig bzw. nicht detektierter Expression der Nhe-Komponenten zeigten keine zytotoxischen Effekte in diesem Zelltest. (Tabelle 12; eine detaillierte Auflistung der Untersuchungsergebnisse befindet sich im Anhang in Tabelle 25).

Tabelle 12. Toxin-Genprofile, Toxin-Expression and Zytotoxizität der untersuchten Stämme und Isolate

Toxin-Genprofil	Detektierte Toxin-Gene in konventionellen multiplex PCRs (1 – 4) und in der multiplex real-time PCR (RTP)															Stämme und Isolate mit positivem Ergebnis in Enzymimmuntests		Stämme und Isolate mit positivem Ergebnis in Zytotoxizitätstests	
	n <sup>a</sup>	1 + 2				3			4			RTP				Hbl <sup>b</sup>	Nhe <sup>b</sup>	Vero	Hep-2
		<i>hblC</i>	<i>nheA</i>	<i>ces</i>	<i>cytKI</i>	<i>hblC</i>	<i>hblD</i>	<i>hblA</i>	<i>nheA</i>	<i>nheB</i>	<i>nheC</i>	<i>hblD</i>	<i>nheA</i>	<i>ces</i>	<i>cytKI</i>				
I	187	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	178	185 <sup>c</sup>	183	0
Stämme	56	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	55	56	56	0
Isolate	131	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	123	129 <sup>c</sup>	127	0
II	56	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	-	0	56 <sup>d</sup>	55	56
Stämme	47	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	-	0	47 <sup>d</sup>	46	47
Isolate	9	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	-	0	9	9	9
III	109	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	0	109 <sup>e</sup>	108	0
Stämme	42	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	0	42 <sup>e</sup>	41	0
Isolate	67	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	0	67	67	0
IV																			
Stämme	1	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	0	0	1	0
V																			
Stämme	1	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	-	+	-	-	1 <sup>f</sup> (L <sub>2</sub> + B)	1 <sup>f</sup>	0	0
VI																			
Stämme	3	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-	-	0	3	3	0
VII																			
Stämme	1	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-	0	1 (A + C)	0	0
VIII																			
Stämme	1	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	0	1 (A)	0	0

<sup>a</sup> Anzahl der Stämme und Isolate mit dem entsprechenden Toxin-Genprofil in PCR 1 – 4 und in der real-time PCR.

<sup>b</sup> alle drei Komponenten detektiert soweit nicht anders indiziert.

<sup>c</sup> darunter 2 Isolate mit Produktion von NheB + NheC bzw. NheC.

<sup>d</sup> darunter 2 psychrotrophe Stämme.

<sup>e</sup> darunter 5 psychrotrophe Stämme.

<sup>f</sup> Stamm mit geringer Toxin-Produktion.

## 4 Diskussion

In den letzten Jahren hat die Bedeutung sporenbildender Mikroorganismen als Verursacher von lebensmittelassozierten Erkrankungen deutlich zugenommen. Das ubiquitäre Vorkommen, eine hohe Widerstandsfähigkeit gegenüber Umwelteinflüssen sowie ausgeprägte lipo- und proteolytische Eigenschaften machen insbesondere das sporenbildende Bakterium *B. cereus* zu einem der wichtigsten Problemkeime in der Lebensmitteltechnologie und -hygiene (BFR, 2008). In verschiedenen nationalen Statistiken aus den Jahren 1998 – 2000 (WHO, 1998; CDC, 2000; DGE, 2000; WHO, 2000) wurde den durch *B. cereus* verursachten Lebensmittelinfektionen und -intoxikationen noch eine untergeordnete Rolle beigemessen, wohingegen aktuellere Publikationen die durch *B. cereus* hervorgerufenen Lebensmittelvergiftungen zu den wichtigsten lebensmittelassozierten Krankheiten zählen (BFR, 2008; WHO, 2008). Kontaminationen mit *B. cereus* konnten in verschiedenen Nahrungsmitteln festgestellt werden, wobei besonders häufig stärkehaltige Produkte, auf Trockenmilch basierende Produkte für Kleinkinder und sog. Convenience Food, d. h. Produkte die vor dem Verzehr nicht oder nur geringgradig erhitzt werden müssen, betroffen waren (BECKER et al., 1994; ERBSLÖH, 2007). Innerhalb der Europäischen Union sind derzeit für *B. cereus* lediglich für Säuglingsanfangsnahrung rechtsverbindliche Grenzwerte festgelegt ( $n = 5$ ,  $c = 1$ ,  $m = 50$  KbE/g,  $M = 500$  KbE/g; KEG, 2007). Aufgrund fehlender Vorschriften zur mikrobiologischen Beurteilung weiterer Produkte, wurden von der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie (DGHM, 2007) lebensmittel-spezifische Richt- ( $10^2 - 10^3$  KbE/g) und Warnwerte ( $10^3 - 10^4$  KbE/g) publiziert. Eine exakte Datenerhebung zur Häufigkeit von Erkrankungen nach Verzehr kontaminierter Lebensmittel gestaltet sich jedoch schwierig, da nach dem Infektionsschutzgesetz (IfSG) für *B. cereus* keine Meldepflicht besteht und der überwiegend milde Krankheitsverlauf eine hohe Dunkelziffer vermuten lässt. Derzeit sind lediglich epidemiologische Daten aus Einrichtungen der Gemeinschaftsverpflegung innerhalb der Bundeswehr verfügbar, wobei der Anteil der durch *B. cereus* hervorgerufenen Erkrankungen hier ca. 50 % der insgesamt registrierten lebensmittelassozierten Krankheiten betrug (KLEER et al., 2001; KREUZBERGER et al., 2008).

Neben diesen rechtlichen Aspekten sind zu einer zuverlässigen Erfassung von *B. cereus* Kontaminationen in Lebensmittel- und Umfeldproben die eingesetzten Nachweisverfahren von großer Bedeutung. Insbesondere immunologische Testkits und molekularbiologische

Methoden basierend auf der PCR sind durch eine schnelle und einfache Durchführung gekennzeichnet und somit für die Routinediagnostik geeignet (LAURI & MARIANI, 2009; WEILE & KNABBE, 2009). Eine weitere Rationalisierung des Arbeitsaufwandes und der eingesetzten Materialien kann durch die Anwendung von multiplex Assays erreicht werden (SETTANNI & CORSETTI, 2007; ELIZAQUÍVEL & AZNAR, 2008). Nachweisverfahren für *B. cereus* sollten außerdem auf die Detektion der als enteropathogen geltenden Toxine bzw. der zugrunde liegenden Toxin-Gene (*hbl*, *nhe*, *ces*, *cytK1*) fokussiert sein (SCHOENI & WONG, 2005; STENFORS ARNESEN et al., 2008). Im Rahmen dieser Studie sollten daher in einem ersten Schritt die derzeit verfügbaren multiplex PCRs erfasst werden und im Hinblick auf eine Detektion der Toxin-Gene *hbl*, *nhe*, *ces* und *cytK1* beurteilt werden. Anschließend sollten modifizierte bzw. neue konventionelle und real-time multiplex PCRs zur spezifischen Detektion dieser *B. cereus* Toxin-Gene entwickelt werden.

In der Literatur sind mehrere Protokolle für konventionelle multiplex PCRs zur Untersuchung von *B. cereus* Enterotoxin-Genen beschrieben (YANG et al., 2005; EHLING-SCHULZ et al., 2006; NGAMWONGSATIT et al., 2008b). Bei zwei dieser Methoden erfolgt jedoch nur eine partielle Detektion der Gene *hbl*, *nhe*, *ces* und *cytK1*. So ermöglicht die von EHLING-SCHULZ et al. (2006) entwickelte multiplex PCR keine spezifische Detektion von *cytK1* und das von NGAMWONGSATIT et al. (2008b) veröffentlichte Protokoll enthält weder Primer zur Amplifikation von *ces* noch von *cytK1*. Bei der von YANG et al. (2005) publizierten Methode werden Primer für die Gene *hbl*, *nhe*, *ces* und *cytK1* eingesetzt. Jedoch ist in dieser PCR ein weiteres Primerpaar zur Detektion von *cytK2* enthalten, wobei keine Differenzierung zwischen *cytK1* und *cytK2* möglich ist, da die PCR-Produkte dieser beiden Gene die gleiche Größe besitzen. Des Weiteren kam es zum Teil beim Einsatz konventioneller multiplex PCRs zu falsch-negativen Ergebnissen und zu Diskrepanzen der Resultate zwischen mehreren eingesetzten Detektionsverfahren, wie PCRs und immunologischen Test-Kits (OUOBA et al., 2008; ANKOLEKAR et al., 2009). Zur Anwendung in real-time Systemen wurden bis dato keine multiplex PCRs zum Nachweis von *B. cereus* Enterotoxin-Genen veröffentlicht.

Im Gegensatz zu den beschriebenen Protokollen wurde daher in dieser Studie bei der PCR-Etablierung der Fokus auf die als enteropathogen geltenden Toxin-Gene *hbl*, *nhe*, *ces* und *cytK1* gelegt und zur Überprüfung der Expression auf monoklonalen Antikörpern basierende Enzymimmuntests eingesetzt. Somit konnten anders als bei den zuvor beschriebenen Methoden frühzeitig Diskrepanzen zwischen Toxin-Gennachweis und Toxin-Expression

erkannt und bei Bedarf noch während des Etablierungsprozesses Änderungen vorgenommen werden. Neben diesen Aspekten wurden bei der Detailplanung der multiplex PCRs zusätzlich bestehende Anforderungen von Seiten der Routinediagnostik und technische Limitationen berücksichtigt. Außer der Fokussierung auf die Detektion aller relevanten Enterotoxin-Gene (*hblCDA*, *nheABC*, *ces*, *cytKI*) ist hier eine schnelle und zuverlässige Diagnose gewünscht. Weiterhin ist zu beachten, dass die meisten Labore mit Thermocyclern für konventionelle Applikationen ausgestattet sind, jedoch nicht immer kostenintensivere real-time Systeme zur Verfügung stehen. Daher wurden im Rahmen dieser Studie PCR-Protokolle für beide Formate entwickelt. Aus technischer Sicht bestehen außerdem Limitationen hinsichtlich der entstehenden PCR-Produkte. In multiplex Assays müssen einerseits alle PCR-Amplifikate eine unterschiedliche Größe aufweisen, um nach einer Auftrennung mit Gelelektrophorese eine eindeutige Zuordnung der unter UV-Licht sichtbaren Banden gewährleisten zu können, andererseits kann jedoch eine verhältnismäßig schlechtere Amplifikationseffizienz der größeren Sequenzen auftreten. Unter Berücksichtigung früherer Studien, die bei untersuchten *B. cereus* Stämmen eine hohe Korrelation der jeweils drei Gene der Enterotoxin-Komplexe Hbl und Nhe fanden (MORAVEK et al., 2006; NGAMWONGSATIT et al., 2008b), wurden Screening-Methoden zur simultanen Detektion der Toxin-Gene *ces*, *cytKI* sowie jeweils eines Gens des Hbl- und Nhe-Komplexes sowohl für konventionelle als auch für real-time Systeme geplant. Die Feintypisierung der jeweils drei Gene des Hbl (*hblCDA*)- und Nhe (*nheABC*)-Komplexes steht in der Routinediagnostik meist nicht im Vordergrund und sollte daher in dieser Studie nur mit konventionellen Systemen realisiert werden.

Zur Anwendung in konventionellen Systemen wurden zwei Screening multiplex PCRs entwickelt, die dem gleichzeitigen Nachweis der Gene *hblC*, *nheA* und *ces* (PCR 1) bzw. *hblC*, *nheA*, *ces* und *cytKI* (PCR 2) dienen. Mit PCR 3 und 4 stehen zwei Methoden zur spezifischen Detektion der Gene *hblC*, *hblD* und *hblA* bzw. *nheA*, *nheB* und *nheC* bereit. Eine schrittweise Kombination von PCR 1/PCR 2 mit PCR 3 und/oder PCR 4 ermöglicht somit einen ökonomischen Einsatz von Ressourcen und bietet eine hohe Nachweis-Sensitivität.

Da die Verwendung von Internen Amplifikationskontrollen (IACs) in diagnostischen PCRs verbreiteter und zunehmend für die Veröffentlichung in Fachzeitschriften vorgeschrieben wird (ANONYMUS, 2002; HOORFAR et al., 2003; MALORNY et al., 2003), wurde der pCR® II-TOPO® Vector in PCR 1 – 4 eingesetzt. IACs sind Nicht-Ziel-DNA-Sequenzen, die mit der Zielsequenz koamplifiziert werden und das Vorhandensein von PCR-Inhibitoren oder

Störungen des PCR-Cyclers indizieren, wodurch falsch-negativen Ergebnissen vorgebeugt werden kann. Sowohl die beiden Screening PCRs (PCR 1 + 2) als auch die PCRs zur Feindifferenzierung (PCR 3 + 4) können wahlweise mit oder ohne IAC durchgeführt werden (Tabellen 13 – 20 im Anhang).

Zur Etablierung der vier konventionellen PCRs wurden 146 *B. cereus* Stämme der Stammsammlung des Lehrstuhls eingesetzt, wobei alle Stämme mindestens für ein Toxin-Gen positiv getestet wurden und insgesamt acht Toxin-Genprofile unterschieden werden konnten. Übereinstimmend mit anderen Studien (MORAVEK et al., 2006; NGAMWONGSATIT et al., 2008b) konnten bei der Mehrheit der Stämme mit einem positiven PCR-Ergebnis für *hbl* und *nhe* jeweils alle drei Gene des entsprechenden Operons nachgewiesen werden. Lediglich bei 4 % wurden nur einzelne Gene detektiert. Bei der anschließenden Untersuchung von Proben aus Lebensmittel- und Hygienestatuskontrollen der Bundeswehr zeigten alle *B. cereus* Isolate mit einem positiven PCR-Ergebnis die drei Amplifikate für *nheA*, *nheB* und *nheC*. Auch für die drei *hbl*-Gene konnte eine 100 % Korrelation gezeigt werden (Abbildungen 5 und 6, Tabelle 12). Im Gegensatz hierzu wurde in anderen Studien eine weitaus geringere Korrelation der Gene des *hbl*-Operons und des *nhe*-Operons beobachtet (HANSEN & HENDRIKSEN, 2001; SWIECICKA et al., 2006; AL-KHATIB et al., 2007). So wurden z. B. in einer von AL-KHATIB et al. (2007) durchgeführten Arbeit, Prävalenzen für *nheA*, *nheB* und *nheC* von 71 %, 84 % bzw. 90 % beschrieben. Dies verdeutlicht die Bedeutung der Primer-Konstruktion mit Auswahl möglichst konservierter DNA-Regionen, da aufgrund bekannter Gensequenz-Polymorphismen bei *hbl* und *nhe* Stämmen (GUINEBRETIERE et al., 2002) andernfalls falsch-negative Ergebnisse auftreten können.

Zur Überprüfung der Spezifität der konventionellen Methoden wurden *Cereus*-Gruppen Stämme, andere *Bacillus* spp. und nicht-*Bacillus* Spezies eingesetzt, wobei nur für die *Cereus*-Gruppen Stämme positive PCR-Ergebnisse erhalten wurden. Dies ist konform mit Ergebnissen früherer Studien. So konnten die Gene *nhe*, *hbl* und *ces* sowie die entsprechenden Toxine bei verschiedenen *Bacillus* spp. nachgewiesen werden (BEATTIE & WILLIAMS, 1999; PHELPS & MCKILLIP, 2002; THORSEN et al., 2006). Besonders häufig wurden übereinstimmend mit den Ergebnissen dieser Studie die fünf weiteren Spezies (*B. thuringiensis*, *B. mycoides*, *B. anthracis*, *B. weihenstephanensis*, *B. pseudomycoides*) der *Cereus*-Gruppe positiv getestet (STENFORS ARNESEN et al., 2008). Bis dato wurden in

keiner Studie *B. cereus* Enterotoxin-Gene bei Bakterien außerhalb der Gattung *Bacillus* nachgewiesen (EHLING-SCHULZ et al., 2005a, 2005b, 2006; YANG et al., 2005).

Zur Überprüfung der mit den konventionellen multiplex PCRs erhaltenen Amplifikate wurden PCR-Produkte von vier *B. cereus* Referenzstämmen und vier weiteren *Cereus*-Gruppen Stämmen sequenziert. Die Analyse der erhaltenen Sequenzen und der Abgleich mit Sequenzen aus GenBank ergaben einen hohen Grad an Homologie (92 – 100 %; Tabelle 6, Abbildung 11 im Anhang) und erlaubten die eindeutige Identifikation der gesuchten partiellen Toxin-Gene. In dieser Arbeit konnten somit wie bereits in früheren Studien (PRÜSS et al., 1999; JANG et al., 2006; SVENSSON et al., 2007) *B. cereus* Enterotoxin-Gene auch bei anderen Spezies (*B. mycoides*, *B. thuringiensis*, *B. weihenstephanensis*) der *Cereus*-Gruppe nachgewiesen und in den anschließend durchgeführten EIAs und Zelltests eine Produktion der entsprechenden Proteine sowie ein zytotoxischer Effekt festgestellt werden. Dies ist ein Hinweis auf die lebensmittelhygienische Relevanz weiterer Spezies aus der *Cereus*-Gruppe, z. B. des als Insektizid im Getreide-, Gemüse- und Teeanbau verwendeten *B. thuringiensis* (ZHOU et al., 2008), wie bereits postuliert wurde (JACKSON et al., 1995; MCINTYRE et al., 2008). Eine generelle Aussage zur Beteiligung bei lebensmittelassoziierten Erkrankungen kann jedoch derzeit nicht getroffen werden (STENFORS ARNESEN et al., 2008; ZHOU et al., 2008).

Real-time Instrumente ermöglichen im Vergleich zu konventionellen Systemen kürzere Durchlaufzeiten, höhere Durchsatzraten, eine digitale Auswertung der Ergebnisse, ein geringeres Kontaminationsrisiko durch Aufrechterhaltung eines geschlossenen Systems und erfordern keine nachfolgenden Bearbeitungsschritte (HERNÁNDEZ et al., 2003; YOSHITOMI et al., 2006; FAN et al., 2007). Vor Entwicklungsbeginn der geplanten multiplex real-time PCR wurden die Vor- und Nachteile der verschiedenen real-time Technologien analysiert: DNA-bindende Farbstoffe (z. B. Ethidiumbromid, YO-PRO-1, SYBR Green) ermöglichen eine sequenz-unabhängige Detektion von PCR-Produkten (HIGUCHI et al., 1993; ISHIGURO et al., 1995; WITTWER et al., 1997), wohingegen mit Fluoreszenz-Farbstoffen markierte Oligonukleotide, sogenannte fluorogene Sonden, spezifisch an eine durch Primer flankierte DNA-Sequenz binden (ARYA et al., 2005). Die erste Möglichkeit ist kostengünstiger, erfordert kein Sondendesign und durch die Analyse der Schmelztemperatur ( $T_m$ ) wird eine Differenzierung von PCR-Produkten in multiplex

Anwendungen ermöglicht. Daher wurde zur Realisierung der geplanten multiplex real-time PCR ein auf SYBR Green I basierendes System gewählt.

Zur Anwendung im Light Cycler 2.0 und Light Cycler 480 wurde ein PCR-Protokoll mit Amplifikatdifferenzierung durch  $T_m$ -Analyse entwickelt. Durch die Auswahl und Entwicklung von Primern für *hblD*, *nheA*, *ces* und *cytK1* mit unterschiedlichen Längen und GC-Gehalten der PCR-Produkte, gelang ein simultaner Einsatz in einem multiplex real-time Assay basierend auf SYBR Green I (Tabellen 21 – 24). Aufgrund der für *hbl* und *nhe* beschriebenen Polymorphismen (GUINEBRETIERE et al., 2002) konnte für die PCR-Produkte dieser beiden Gene mit stärkeren Varianzen der  $T_m$ -Werte gerechnet werden. Daher wurden die Primer so entwickelt, dass die PCR-Produkte für *hblD* und *nheA* die höchsten bzw. niedrigsten  $T_m$ -Werte der insgesamt vier Amplifikate zeigten.

Zur Kontrolle der entstandenen Produkte wurde bei der Methoden-Entwicklung neben der durchgeführten Schmelzkurven-Analyse auch die Größe der Amplifikate durch Gelelektrophorese und UV-Belichtung überprüft (Abbildungen 7 und 8). Eine hohe Reproduzierbarkeit, Sensitivität und Effizienz konnte für die entwickelte Methode durch Intra- und Inter-Assay-Tests mit Ermittlung der Variationskoeffizienten bzw. durch die Untersuchung serieller DNA-Verdünnungsreihen der Referenzstämme gezeigt werden (Tabellen 7 und 9; Abbildung 9). Ein Vergleich der multiplex PCR mit den vier singleplex PCRs ergab ähnliche Schmelztemperaturen der PCR-Produkte und akzeptable Schwellenwert-Zyklen (Tabelle 8). Sowohl die Analyse der Schmelzkurven als auch die Visualisierung der Produkte nach Gelelektrophorese ergaben keine Anzeichen für eine mögliche Bildung von unspezifischen PCR-Produkten oder Primer-Dimeren.

In der durchgeführten Vergleichsuntersuchung im LC 2.0 und LC 480 wurden für die 113 eingesetzten Stämme und Isolate ähnliche  $T_m$ -Mittelwerte und Standardabweichungen sowie akzeptable  $C_t$  -Werte berechnet (Tabelle 11). Des Weiteren konnten nach Auswertung der Ergebnisse für die untersuchten Stämme und Isolate im LC 2.0 ( $n = 376$ ) und LC 480 ( $n = 113$ ) signifikant unterschiedliche Schmelztemperaturen für die vier Ziel-Gene berechnet werden ( $p < 0,001$ ). Somit kann die neue Methode wahlweise in beiden Cyclern angewendet werden, wobei der Platten-basierte LC 480 im Gegensatz zum Kapillar-basierten LC 2.0 besonders für Untersuchungen mit hohen Durchsatzraten konfiguriert ist (WALTER et al., 2006).

Der Vergleich der multiplex real-time PCR mit den vier konventionellen multiplex Assays zeigte eine hohe Übereinstimmung der detektierten Toxin-Gene (Stämme: > 97 %; Isolate: 100 %). Alle Stämme und Isolate, die in den konventionellen PCRs das komplette *hbl* Operon bzw. *nhe* Operon aufwiesen, konnten auch mit der entwickelten multiplex real-time PCR erfasst werden. Lediglich bei vier Stämmen (Toxin-Genprofile V und VI) mit komplett nachgewiesenem *nhe* Operon bei nur partieller Detektion der Gene des Hbl-Komplexes in den konventionellen multiplex PCRs, konnte in der real-time PCR kein Amplifikat für das hier enthaltene *hbl*-Zielgen (*hblD*) visualisiert werden. Drei dieser Stämme zeigten in den entsprechenden EIAs keine nachweisbare Expression der Hbl-Proteine. Der vierte Stamm produzierte zwar Hbl-L<sub>2</sub> und Hbl-B sowie die drei Nhe-Proteine, war jedoch nicht zytotoxisch gegenüber Vero Zellen und wurde bereits in einer früheren Studie als Stamm mit niedriger Toxin-Produktion charakterisiert (MORAVEK et al., 2006).

Bei allen Stämmen und Isolaten mit positivem Ergebnis in Enzymimmuntests und Zelltests konnten die zugrunde liegenden Toxin-Gene detektiert werden und es konnte insgesamt eine hohe Übereinstimmung der mit diesen drei unabhängigen Methoden (PCR, EIA, Zelltest) erhaltenen Ergebnisse verzeichnet werden. Für 98 % bzw. 100 % der Stämme und 94 % bzw. 99 % der Isolate mit komplett detektiertem *hbl* bzw. *nhe* Operon wurde ein positives Ergebnis in den entsprechenden Enzymimmuntests erhalten und 98 % waren zytotoxisch gegenüber Vero Zellen. Alle *ces*-positiven Stämme und Isolate zeigten einen toxischen Effekt auf HEP-2 Zellen (Tabelle 12). Im Vergleich mit früheren Studien, in welchen bei 11 – 36 % der untersuchten Stämme mit Toxin-Expression die zugrunde liegenden Gene nicht detektiert wurden (HANSEN & HENDRIKSEN, 2001; GUINEBRETIERE et al., 2002), konnte somit ein großer Fortschritt im Hinblick auf die Zuverlässigkeit der molekularbiologischen Ergebnisse erzielt werden.

Die untersuchten *B. cereus* Stämme (n = 146) wurden zur Methodenetablierung aus der Stammsammlung des Lehrstuhls ausgewählt. Daher spiegeln die ermittelten Prävalenzen für *hbl*, *nhe*, *ces* und *cytKI* von 38,4 %, 99,3 %, 31,5 % und 0,7 % nicht das natürliche Vorkommen dieser Toxine wieder. Demgegenüber repräsentieren die im Rahmen dieser Studie von Einrichtungen der Bundeswehr erhaltenen *B. cereus* Isolate (n = 208) eine zufällig zusammengestellte Probenmenge und die berechneten Prävalenzen von 62,9 % für *hbl*, 99,5 % für *nhe* und 4,3 % für *ces* liegen innerhalb der in der Literatur für diese Gene bei *B. cereus* ermittelten Prävalenzbereiche. So konnten mit molekularbiologischen Methoden bei 43 – 83

% bzw. 90 – 100 % der untersuchten *B. cereus* Stämme die jeweils drei Gene der Enterotoxin-Komplexe Hbl und Nhe detektiert werden, wohingegen der Anteil emetischer Stämme in Mitteleuropa bei  $\leq 5$  % lag. (PRÜSS et al., 1999; HANSEN & HENDRIKSEN, 2001; IN'T VELD et al., 2001; GUINEBRETIERE et al., 2002; THAENTHANE et al., 2005; YANG et al., 2005; ALTAYAR & SUTHERLAND, 2006; MORAVEK et al., 2006; ERBSLÖH, 2007; NGAMWONGSATIT et al., 2008b; KREUZBERGER et al., 2008).

Bei der Interpretation der PCR-Ergebnisse ist zu beachten, dass nach dem aktuellen Wissensstand nur emetische Isolate als obligat pathogen gelten (STENFORS ARNESEN et al., 2008). Die Beurteilung anderer Isolate gestaltet sich schwieriger. Für die Diarrhö-Toxine Hbl, Nhe und CytK konnte zwar in Zelltests ein zytotoxischer Effekt gezeigt werden und Hbl war auch in Tierversuchen biologisch wirksam (SPIRA & GOEPFERT, 1972; GLATZ et al., 1974), jedoch ist die Frage wann ein Isolat enteropathogen ist nicht abschließend geklärt. In mehreren Studien wurden weitere Faktoren (z. B. Adaption von *B. cereus*, Adhärenz und Säurestabilität der Sporen, Umgebungsparameter) diskutiert, die neben den Enterotoxinen Hbl, Nhe und CytK1 ursächlich für die Pathogenität der Diarrhö-Stämme verantwortlich sein könnten (ANDERSSON et al., 1998a; ANDERSON BORGE et al., 2001; RAMARAO & LERECLUS, 2006; KRAUSE, 2007; STENFORS ARNESEN et al., 2008).

Trotz der aufgeführten Limitationen ist der Nachweis der Enterotoxine Hbl, Nhe und CytK1 bzw. der zugrunde liegenden Gene derzeit am besten zur Erfassung potentiell Diarrhö-verursachender *B. cereus* Isolate geeignet. Zur genaueren Charakterisierung von potentiellen Diarrhö-Stämmen wurde von MORAVEK et al. (2006) und FAGERLUND et al. (2007) eine Quantifizierung der Enterotoxin-Produktion durchgeführt. Die hierfür verwendeten monoklonalen Antikörper sind jedoch nicht kommerziell erhältlich. In der Routinediagnostik können zwei (Hbl-L<sub>2</sub>, NheB) der insgesamt sechs Komponenten der Enterotoxin-Komplexe Hbl und Nhe mit einem auf monoklonalen Antikörpern basierenden semiquantitativen immunologischen Testkit (Duopath<sup>®</sup>-System, Merck) detektiert werden. Für eine weitere Komponente (NheA) steht ein Schnelltest (BDE VIA<sup>TM</sup>, TECRA) zur Verfügung, wobei jedoch ein polyklonales Antiserum verwendet wird, das auch noch mit weiteren Exoproteinen von *B. cereus* reagieren kann (BEECHER & WONG, 1994b; LUND & GRANUM, 1996). Zum Nachweis der übrigen Komponenten der Enterotoxin-Komplexe (Hbl-L<sub>1</sub>, Hbl-B, NheC) stehen bisher in der Routinediagnostik keine immunologischen Detektionssysteme zur Verfügung. Bis dato konnten weder für CytK1 noch für Cereulid monoklonale Antikörper

entwickelt werden. Somit ist derzeit der Nachweis der zugrunde liegenden Gene die einzige in der Routinediagnostik praktikable Möglichkeit alle potentiell enteropathogenen *B. cereus* Isolate zu erfassen und anhand der jeweiligen Toxin-Genprofile genauer zu charakterisieren.

Die im Rahmen dieser Studie entwickelten molekularbiologischen Methoden zeichneten sich bei den untersuchten Stämmen und Isolaten durch eine hohe Übereinstimmung der Ergebnisse mit den Resultaten von Enzymimmuntests und Zytotoxizitätstests aus. Durch die Realisierung von vier konventionellen multiplex PCRs und der ersten real-time multiplex PCR zur Detektion von *B. cereus* Toxin-Genen (*hbl*, *nhe*, *ces*, *cytKI*) können somit unabhängig von der Laborausstattung die entsprechenden Protokolle eingesetzt werden. Des Weiteren ermöglicht die Bereitstellung von Screening- und Differenzierungsmethoden, eine den jeweiligen Erfordernissen angepasste Auswahl und Kombination der entwickelten Protokolle.

Nachdem diese Studie auf die Entwicklung und Etablierung von molekularbiologischen Methoden zum Nachweis von *B. cereus* Toxin-Genen fokussiert war, sollten in weiterführenden Arbeiten die der PCR vorangestellten Prozesse optimiert werden. Hierbei sollten insbesondere andere bzw. modifizierte DNA-Extraktionsmethoden angewendet werden mit dem Ziel *B. cereus*-DNA ohne Kultivierung und Voranreicherung direkt aus Lebensmitteln extrahieren zu können und somit die Gesamtuntersuchungszeit einer Probe wesentlich zu verkürzen. Die Optimierung der Extraktionsmethode sollte an den eingangs beschriebenen Richt- und Grenzwerten für *B. cereus* in Nahrungsmittel ausgerichtet sein, um eine Detektion aller im Hinblick auf Lebensmittelvergiftungen relevanten *B. cereus*-Kontaminationen gewährleisten zu können.

## 5 Zusammenfassung

*Bacillus cereus* ist als Sporenbildner mit ubiquitärem Vorkommen sowie ausgeprägten lipo- und proteolytischen Eigenschaften ein Problemkeim in der Lebensmitteltechnologie und -hygiene und verursacht Lebensmittelintoxikationen und -infektionen, die zu den wichtigsten lebensmittelassoziierten Krankheiten gezählt werden. Derzeit besteht in der Routinediagnostik ein Mangel an schnellen und zuverlässigen Methoden zur simultanen Detektion der für diese Erkrankungen kausalen *B. cereus* Toxine bzw. der zugrunde liegenden Toxin-Gene *hbl*, *nhe*, *ces* und *cytK1*.

Im Rahmen dieser Studie wurden deshalb konventionelle und real-time multiplex PCRs zum simultanen Nachweis der *B. cereus* Toxin-Gene (*hbl*, *nhe*, *ces* und *cytK1*) entwickelt und an zuvor bereits immunologisch, zell- und molekularbiologisch charakterisierten *B. cereus* Stämmen (n = 146) der Stammsammlung des Instituts etabliert:

Zur Anwendung in konventionellen Systemen konnten vier multiplex PCRs (PCR 1 – 4) realisiert werden, wobei PCR 1 und 2 dem gleichzeitigen Nachweis der Gene *hblC*, *nheA*, *ces* (PCR1) bzw. *hblC*, *nheA*, *ces* und *cytK1* (PCR 2) dienen und mit PCR 3 und 4 die spezifische Detektion der Gene *hblC*, *hblD* und *hblA* bzw. *nheA*, *nheB* und *nheC* ermöglicht wird. Sowohl in den beiden Screening PCRs als auch in den PCRs zur Feindifferenzierung wurde eine Interne Amplifikationskontrolle (IAC) eingesetzt.

Für die Applikation in real-time Systemen wurde eine auf SYBR Green I basierende multiplex PCR zur Detektion der *B. cereus* Toxin-Gene *hblD*, *nheA*, *ces* und *cytK1* entwickelt und erfolgreich in den Cyclern LC 2.0 und LC 480 eingesetzt. Die Schwellenwert-Zyklen der multiplex Reaktionen stimmten gut mit denen der singleplex Assays überein und es konnte kein relevanter Sensitivitätsverlust festgestellt werden. In beiden Cyclern wurden für die vier Amplifikate signifikante Unterschiede der Schmelztemperaturen berechnet ( $p < 0,001$ ).

Anschließend wurden die multiplex PCRs zur Charakterisierung von *Bacillus cereus* Isolaten (n = 208) aus Lebensmittel- und Hygienestatuskontrollen der Bundeswehr eingesetzt. Anhand der detektierten Toxin-Gene konnten die *B. cereus* Isolate in drei Profile eingeteilt werden (*nhe* + *hbl*; *nhe* + *ces*; *nhe*) mit Prävalenzen von 99,5 % für *nhe*, 62,9 % für *hbl* sowie 4,3 % für *ces*. In einem zweiten Schritt wurden die *B. cereus* Isolate mit validierten, auf

monoklonalen Antikörpern basierenden Enzymimmuntests und Zytotoxizitätstests untersucht, wobei eine hohe Übereinstimmung der mit den drei unabhängigen Methoden (PCR, EIA, Zelltest) erhaltenen Ergebnisse verzeichnet wurde. Im Vergleich zu früheren Studien konnte somit eine deutliche Verbesserung der Zuverlässigkeit der molekularbiologischen Ergebnisse erreicht werden.

## Summary

### **Development, establishment and implementation of molecular biological methods for the detection of enterotoxinogenic *Bacillus cereus***

Due to its spore-forming ability combined with ubiquitous occurrence and highly lipolytic and proteolytic properties *Bacillus cereus* represents a problematic microorganism in food technology and food hygiene and causes food intoxications and food infections, which are counted among the major food associated diseases. Currently, in routine diagnostics there is a lack of fast and reliable methods for simultaneous detection of the causative toxins and alternatively the underlying toxin genes *hbl*, *nhe*, *ces* and *cytK1*.

Therefore, this study deals with the development of conventional and real-time multiplex PCRs for the simultaneous detection of *B. cereus* toxin genes (*hbl*, *nhe*, *ces* and *cytK1*). All methods were established using well characterized *B. cereus* strains (n = 146) from the strain collection of the institute previously tested with immunological, cellular and molecular biological assays:

We developed a total of four conventional multiplex PCRs (PCR 1 – 4) enabling simultaneous detection of genes *hblC*, *nheA*, *ces* in PCR1 and *hblC*, *nheA*, *ces* and *cytK1* in PCR 2 as well as the specific analysis of genes *hblC*, *hblD*, *hblA* and *nheA*, *nheB*, *nheC* in PCR 3 and PCR 4, respectively. An internal amplification control (IAC) was implemented in both, the two screening PCRs and the PCRs for fine-typing.

For application in real-time systems a multiplex PCR based on SYBR Green I was developed for the detection of *B. cereus* toxin genes *hblD*, *nheA*, *ces* and *cytK1* and successfully applied to cyclers LC 2.0 and LC 480. The threshold cycles in the multiplex assay were in good accordance with the values obtained in the singleplex PCRs and no relevant reduction in sensitivity was observed. In both cyclers significant differences of melting temperatures were calculated for the four PCR products ( $p < 0.001$ ).

Subsequently, the multiplex PCRs were applied for characterization of *Bacillus cereus* isolates (n = 208) derived from food and hygiene status controls in facilities of the German Federal Armed Forces. The *B. cereus* isolates could be subdivided into three profiles

according to the detected toxin genes (*nhe* + *hbl*; *nhe* + *ces*; *nhe*) and prevalences of 99.5 % for *nhe*, 62.9 % for *hbl* and 4.3 % for *ces* were observed. Afterwards the *B. cereus* isolates were tested with validated enzyme immunoassays based on monoclonal antibodies and cytotoxicity tests. The results obtained with the three independent methods (PCR, EIA, cell test) were in good agreement. Thus, compared to previous studies a considerable improvement was achieved regarding the reliability of molecular biological results.

## 6 Literaturverzeichnis

ADAMS, M. R. & M. O. MOSS (2000):

Food Microbiology

Royal Society of Chemistry, Great Britain, 187

AGAISSE, H., M. GOMINET, O. A. OKSTAD, A. B. KOLSTO & D. LERECLUS (1999):

PlcR is a pleiotropic regulator of extracellular virulence factor gene expression in *Bacillus thuringiensis*

Mol. Microbiol. 32, 1043 – 1053

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., Y. ARAKAWA & M. MORI (1995a):

The *bceT* gene of *Bacillus cereus* encodes an enterotoxic protein

Microbiology 141, 983 – 988

AGATA, N., M. OHTA, M. MORI & M. ISOBE (1995b):

A novel dodecadepsipeptide, cereulide, is an emetic toxin of *Bacillus cereus*

FEMS Microbiol. Lett. 129, 17 – 20

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

AGATA, N., M. OHTA, M. MORI & K. SHIBAYAMA (1999):

Growth conditions of and emetic toxin production by *Bacillus cereus* in a defined medium with amino acids

Microbiol. Immunol. 43, 15 – 18

AJUWAPE, A., A. A. ROBERTS, O. O. SOLARIN & A. I. ADETOSOYE (2005):  
Bacteriological and haematological studies of clinical mastitis in goats in Ibadan, OYO State  
Nigeria  
Small Ruminant Res. 60, 307 – 310

ALBERTS, B., A. JOHNSON, J. LEWIS, M. RAFF, K. ROBERTS & P. WALTER (2008):  
Molecular biology of the cell, 5<sup>th</sup> ed  
Garland Science

AL-KHATIB, M. S., H. KHYAMI-HORANI, E. BADRAN & A. A. SHEHABI (2007):  
Incidence and characterization of diarrheal enterotoxins of fecal *Bacillus cereus* isolates  
associated with diarrhea  
Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 59, 383 – 387

ALTAYAR, M. & A. D. SUTHERLAND (2006):  
*Bacillus cereus* is common in the environment but emetic toxin producing isolates are rare  
J. Appl. Microbiol. 100, 7 – 14

ANDERSON BORGE, G. I., M. SKEIE, T. SORHAUG, 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., P. E. GRANUM & U. RONNER (1998a):  
The adhesion of *Bacillus cereus* spores to epithelial cells might be an additional virulence  
mechanism  
Int. J. Food Microbiol. 39, 93 – 99

ANDERSSON, M. A., R. MIKKOLA, J. HELIN, M. C. ANDERSSON & M. SALKINOJA-  
SALONEN (1998b):  
A novel sensitive bioassay for detection of *Bacillus cereus* emetic toxin and related  
depsipeptide ionophores  
Appl. Environ. Microbiol. 64, 1338 – 1343

ANDERSSON, M. A., E. L. JÄÄSKELÄINEN, R. SHAHEEN, T. PIRHONEN, L. M. WIJNANDS & M. S. SALKINOJA-SALONEN (2004):  
Sperm bioassay for rapid detection of cereulide-producing *Bacillus cereus* in food and related environments

Int. J. Food Microbiol. 94, 175 – 183

ANKOLEKAR, C., T. RAHMATI & R. G. LABBE (2009):  
Detection of toxinogenic *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* spores in U.S. rice

Int. J. Food Microbiol. 128, 460 – 466

ANONYMUS (2002):

Microbiology of Food and Animal Feeding Stuffs - Polymerase Chain Reaction (PCR) for the Detection of Foodborne Pathogens - General Methods Specific Requirements

International Standard ISO/DIS 22174. Berlin, Germany

APETROAIE-CONSTANTIN, C., R. SHAHEEN, L. ANDRUP, L. SMIDT, H. RITA & M. SALKINOJA-SALONEN (2008):

Environment driven cereulide production by emetic strains of *Bacillus cereus*

Int. J. Food Microbiol. 127, 60 – 67

AREZI, B., W. XING, J. A. SORGE & H. H. HOGREFE (2003):

Amplification efficiency of thermostable DNA polymerases

Anal. Biochem. 321, 226 – 235

ARYA, M., I. S. SHERGILL, M. WILLIAMSON, L. GOMMERSALL, N. ARYA & H. R. PATEL (2005):

Basic principles of real-time quantitative PCR

Expert Rev. Mol. Diagn. 5, 209 – 219

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

- BAIDA, G., Z. I. BUDARINA, N. P. KUZMIN & A. S. SOLONIN (1999):  
Complete nucleotide sequence and molecular characterization of hemolysin II gene from  
*Bacillus cereus*  
FEMS Microbiol. Lett. 180, 7 – 14
- BEATTIE, S. H. & A. G. WILLIAMS (1999):  
Detection of toxigenic strains of *Bacillus cereus* and other *Bacillus* spp. with an improved  
cytotoxicity assay  
Lett. Appl. Microbiol. 28, 221 – 225
- BECKER, H., G. SCHALLER, W. VON WIESE & G. TERPLAN (1994):  
*Bacillus cereus* in infant foods and dried milk products  
Int. J. Food. Microbiol. 23, 1 – 15
- BECKER, B. & H. BECKER (2005):  
*Bacillus cereus*  
Behr's Verlag
- BEECHER, D. J. & J. D. MACMILLAN (1990):  
A novel bicomponent hemolysin from *Bacillus cereus*  
Infect. Immun. 58, 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. WONG (1994a):  
Improved purification and characterization of hemolysin BL, a hemolytic dermonecrotic  
vascular permeability factor from *Bacillus cereus*  
Infect. Immun. 62, 980 – 986

BEECHER, D. J. & A. C. WONG (1994b):

Identification and analysis of the antigens detected by two commercial *Bacillus cereus* diarrheal enterotoxin immunoassay kits

Appl. Environ. Microbiol. 60, 4614 – 4616

BEECHER, D. J., J. L. SCHOENI & A. C. WONG (1995):

Enterotoxic activity of hemolysin BL from *Bacillus cereus*

Infect. Immun. 63, 4423 – 4428

BEECHER, D. J. & A. C. WONG (1997):

Tripartite hemolysin BL from *Bacillus cereus*. Hemolytic analysis of component interactions and a model for its characteristic paradoxical zone phenomenon

J. Biol. Chem. 272, 233 – 239

BEECHER, D. J. & A. C. WONG (2000):

Tripartite haemolysin BL: isolation and characterization of two distinct homologous sets of components from a single *Bacillus cereus* isolate

Microbiology 146, 1371 – 1380

BUCHANAN, R. L. & F. J. SCHULTZ (1994):

Comparison of the Tecra VIA kit, Oxoid BCET-RPLA kit and CHO cell culture assay for the detection of *Bacillus cereus* diarrhoeal enterotoxin

Lett. Appl. Microbiol. 19, 353 – 356

BUNDESINSTITUT FÜR RISIKOBEWERTUNG, BFR (2008):

Warmhaltetemperatur von Speisen sollte über 65 °C betragen

Stellungnahme Nr. 008/2008

CARDULLO, R. A., S. AGRAWAL, C. FLORES, P. C. ZAMECNIK & D. E. WOLF (1988):

Detection of nucleic acid hybridization by nonradiative fluorescence resonance energy transfer

Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 85, 8790 – 8794

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, CDC (2000):  
Surveillance summaries, surveillance for food borne disease outbreaks United State, 1993 -  
1997  
Morb. Mort. Weekly Rep. 49, 1 – 61

CHAMBERLAIN, J. S., R. A. GIBBS, J. E. RANIER, P. N. NGUYEN & C. T. CASKEY  
(1988):  
Deletion screening of the Duchenne muscular dystrophy locus via multiplex DNA  
amplification  
Nucleic Acids Res. 16, 11141 – 11156

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

DEUTSCHE GESELLSCHAFT FÜR ERNÄHRUNG, DGE (2000):  
Mikrobiologische Aspekte der Ernährung  
Ernährungsbericht 2000, Kapitel 7

DEUTSCHE GESELLSCHAFT FÜR ERNÄHRUNG, DGE (2004):  
Mikrobiologische Aspekte der Ernährung  
Ernährungsbericht 2004, Kapitel 3

DEUTSCHE GESELLSCHAFT FÜR ERNÄHRUNG, DGE (2008):  
Mikrobiologische Aspekte der Ernährung  
Ernährungsbericht 2008, Kapitel 5

DEUTSCHE GESELLSCHAFT FÜR HYGIENE UND MIKROBIOLOGIE, DGHM (2007):  
Veröffentlichte Richt- und Warnwerte zur Beurteilung von Lebensmitteln  
<http://www.lm-mibi.uni-bonn.de/DGHM.html>

DIERICK, K., E. VAN 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. Microbiol. 43, 4277 – 4279

DIETRICH, R., K. MAUERSBERGER & E. MÄRTLBAUER, E (1997):

Use of the MTT test for the detection of *B. cereus* enterotoxin

Arch. Lebensmittelhyg. 48, 77 – 81

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 *Bacillus 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., M. FRICKER & S. SCHERER (2004a):

*Bacillus cereus*, the causative agent of an emetic type of food-borne illness

Mol. Nutr. Food Res. 48, 479 – 487

EHLING-SCHULZ, M., M. FRICKER & S. SCHERER (2004b):

Identification of emetic toxin producing *Bacillus cereus* strains by a novel molecular assay

FEMS Microbiol. Lett. 232, 189 – 195

EHLING-SCHULZ, M., N. VUKOV, A. SCHULZ, R. SHAHEEN, M. ANDERSSON, E. MÄRTLBAUER & S. SCHERER (2005a):

Identification and partial characterization of the nonribosomal peptide synthetase gene responsible for cereulide production in emetic *Bacillus cereus*

Appl. Environ. Microbiol. 71, 105 – 113

EHLING-SCHULZ, M., B. SVENSSON, M. H. GUINEBRETIERE, T. LINDBÄCK, M. ANDERSSON, A. SCHULZ, M. FRICKER, A. CHRISTIANSSON, P. E. GRANUM, E. MÄRTLBAUER, C. NGUYEN-THE, M. SALKINOJA-SALONEN & S. SCHERER (2005b):

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. H. GUINEBRETIERE, A. MONTHAN, O. BERGE, M. FRICKER & B. SVENSSON (2006):

Toxin gene profiling of enterotoxic and emetic *Bacillus cereus*

FEMS Microbiol. Lett. 260, 232 – 240

ELIZQUIVEL, P. & R. AZNAR (2008):

A multiplex RTi-PCR reaction for simultaneous detection of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* spp. and *Staphylococcus aureus* on fresh, minimally processed vegetables

Food Microbiol. 25, 705 – 713

ERBSLÖH, I. (2007):

Vorkommen und Charakterisierung des Toxinbildungsvermögens von *Bacillus cereus*-Isolaten aus ausgewählten Lebensmitteln

Diss. med. vet., München

ERLICH, H. A. (1989):

Polymerase chain reaction

J. Clin. Immunol. 9, 437 – 447

EVANS, A. S. & P. S. BRACHMAN (1998):

Bacterial Infections of Humans: Epidemiology and Control

Springer, 117

FAGERLUND, A., O. WEEN, T. LUND, S. P. HARDY & P. E. GRANUM (2004):

Genetic and functional analysis of the *cytK* family of genes in *Bacillus cereus*

Microbiology 150, 2689 – 2697

FAGERLUND, A., J. BRILLARD, R. FÜRST, M. H. GUINEBRETIERE & P. E. GRANUM  
(2007):

Toxin production in a rare and genetically remote cluster of strains of the *Bacillus cereus*  
group

BMC Microbiol. 7, 43

FAGERLUND, A., T. LINDBÄCK, A. K. STORSET, P. E. GRANUM & S. P. HARDY  
(2008):

*Bacillus cereus* Nhe is a pore-forming toxin with structural and functional properties similar  
to the ClyA (HlyE, SheA) family of haemolysins, able to induce osmotic lysis in epithelia

Microbiology 154, 693 – 704

FAILLE, C., J. M. MEMBRE, M. KUBACZKA & F. GAVINI (2002):

Altered ability of *Bacillus cereus* spores to grow under unfavorable conditions (presence of  
nisin, low temperature, acidic pH, presence of NaCl) following heat treatment during  
sporulation

J. Food Prot. 65, 1930 – 1936

FAILLE, C., G. TAUVERON, C. LE GENTIL-LELIEVRE & C. SLOMIANNY (2007):

Occurrence of *Bacillus cereus* spores with a damaged exosporium: consequences on the spore  
adhesion on surfaces of food processing lines

J. Food Prot. 70, 2346 – 2353

FAN, W., T. HAMILTON, S. WEBSTER-SESAY, M. P. NIKOLICH & L. E. LINDLER (2007):

Multiplex real-time SYBR Green I PCR assay for detection of tetracycline efflux genes of Gram-negative bacteria

Mol. Cell. Probes 21, 245 – 256

FINLAY, W. J., N. A. LOGAN & A. D. SUTHERLAND (2000):

*Bacillus cereus* produces most emetic toxin at lower temperatures

Lett. Appl. Microbiol. 31, 385 – 389

FÖRSTER, V. T. (1948):

Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz

Anal. Phys. (Leipzig) 2, 55 – 75

FRICKER, M., U. MESSELHÄUSSER, U. BUSCH, S. SCHERER & M. EHLING-SCHULZ (2007):

Diagnostic real-time PCR assays for the detection of emetic *Bacillus cereus* strains in foods and recent food-borne outbreaks

Appl. Environ. Microbiol. 73, 1892 – 1898

FRÖHLICH, T. (1991):

Treatment of *Bacillus cereus* dermatitis in horses

Tierärztl. Umschau 46, 390 – 393

GAILLARD, S., I. LEGUERINEL, N. SAVY & P. MAFART (2005):

Quantifying the combined effects of the heating time, the temperature and the recovery medium pH on the regrowth lag time of *Bacillus cereus* spores after a heat treatment

Int. J. Food Microbiol. 105, 53 – 58

GALLATI, H. & I. PRACHT (1985):

Horseradish peroxidase: kinetic studies and optimization of peroxidase activity determination using the substrates H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine

J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 23, 453 – 460

GIBBS, R. A. (1990):

DNA amplification by the polymerase chain reaction

Anal. Chem. 62, 1202 – 1214

GIBBS, R. A., P. N. NGUYEN, A. EDWARDS, A. B. CIVITELLO & C. T. CASKEY  
(1990):

Multiplex DNA deletion detection and exon sequencing of the hypoxanthine  
phosphoribosyltransferase gene in Lesch-Nyhan families

Genomics 7, 235 – 244

GIBSON, T. & R. E. GORDON (1974):

*Bacillus*.

Bergey's manual of determinative bacteriology, 8th ed

Williams & Wilkins, Baltimore, 529 – 550

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 rabbits by culture filtrates of *Bacillus cereus* and related  
species

Infect. Immun. 10, 229 – 303

GOHAR, M., O. A. OKSTAD, N. GILOIS, V. SANCHIS, A. B. KOLSTO & D. LERECLUS  
(2002):

Two-dimensional electrophoresis analysis of the extracellular proteome of *Bacillus cereus*  
reveals the importance of the PlcR regulon

Proteomics 2, 784 – 791

GOHAR, M., K. FAEGRI, S. PERCHAT, S. RAVNUM, O. A. OKSTAD, M. GOMINET,  
A. B. KOLSTO & D. LERECLUS (2008):

The PlcR virulence regulon of *Bacillus cereus*  
PLoS ONE 3, e2793

GORDON, R. E., W. C. HAYNES & C. H. N. PANG (1973):

The genus *Bacillus*  
United States Department of Agriculture, Agric. Handb., 427

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-haemolytic enterotoxin operon from *Bacillus cereus*  
FEMS Microbiol. Lett. 177, 225 – 229

GRANUM, P. E. (2001):

*Bacillus cereus* Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers  
ASM Press, Washington DC, 373 – 381

GRAY, K. M., P. P. BANADA, E. O'NEAL & A. K. BHUNIA (2005):

Rapid Ped-2E9 cell-based cytotoxicity analysis and genotyping of *Bacillus* species  
J. Clin. Microbiol. 43, 5865 – 5872

GUINEBRETIERE, 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

GUINEBRETIERE, M. H., A. FAGERLUND, P. E. GRANUM & C. NGUYEN-THE (2006):

Rapid discrimination of *cytK-1* and *cytK-2* genes in *Bacillus cereus* strains by a novel duplex  
PCR system  
FEMS Microbiol. Lett. 259, 74 – 80

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

HARDY, S. P., T. LUND & P. E. GRANUM (2001):

CytK toxin of *Bacillus cereus* forms pores in planar lipid bilayers and is cytotoxic to intestinal epithelia

FEMS Microbiol. Lett. 197, 47 – 51

HAUGE, S. (1955):

Food poisoning caused by aerobic spore-forming *bacilli*

J. Appl. Bact. 18, 591 – 595

HEID, C. A., J. STEVENS, K. J. LIVAK & P. M. WILLIAMS (1996):

Real time quantitative PCR

Genome Res. 6, 986 – 994

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. Bacteriol. 175, 6760 – 6766

HERNÁNDEZ, M., D. RODRIGUEZ-LAZARO, T. ESTEVE, S. PRAT & M. PLA (2003):

Development of melting temperature-based SYBR Green I polymerase chain reaction methods for multiplex genetically modified organism detection

Anal. Biochem. 323, 164 – 170

HEYNDRICKX, M. & P. SCHELDEMAN (2002):

*Bacilli* associated with spoilage in dairy and other food products

In Applications and Systematics of *Bacillus* and Relatives, 6

R. H. M. L. N. a. D. V. P. Berkeley, ed. Blackwell Science, Oxford

HIGUCHI, R., G. DOLLINGER, P. S. WALSH & R. GRIFFITH (1992):

Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences

Biotechnology (N. Y.) 10, 413 – 417

HIGUCHI, R., C. FOCKLER, G. DOLLINGER, R. WATSON (1993):

Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions

Biotechnology (N. Y.) 11, 1026 – 1030

HOLLAND, P. M., R. D. ABRAMSON, R. WATSON & D. H. GELFAND (1991):

Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'----3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase

Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 88, 7276 – 7280

HOLT, J. G., N. R. KRIEG, P. H. A. SNEATH, J. T. STALEY & S. T. WILLIAMS (1994):

Bergey's manual of determinative bacteriology, 9th ed

Williams & Wilkins, Baltimore, 529 – 550

HOORFAR, J., N. COOK, B. MALORNY, M. WAGNER, D. DE MEDICI, A.

ABDULMAWJOOD & P. FACH (2003):

Making internal amplification control mandatory for diagnostic PCR

J. Clin. Microbiol. 41, 5835

HOORNSTRA, D., M. A. ANDERSSON, R. MIKKOLA & M. S. SALKINOJA-SALONEN (2003):

A new method for in vitro detection of microbially produced mitochondrial toxins

Toxicol. In Vitro 17, 745 – 751

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 – 11

INT' VELD, P. H., W. S. RITMEESTER, E. H. 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

ISHIGURO, T., J. SAITOH, H. YAWATA, H. YAMAGISHI, S. IWASAKI & Y. MITOMA (1995):

Homogeneous quantitative assay of hepatitis C virus RNA by polymerase chain reaction in the presence of a fluorescent intercalater

Anal. Biochem. 229, 207 – 213

JACKSON, S. G. (1993):

Rapid screening test for enterotoxin-producing *Bacillus cereus*

J. Clin. Microbiol. 31, 972 – 974

JACKSON, S. G., R. B. GOODBRAND, R. AHMED & S. KASATIYA (1995):

*Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* isolated in a gastroenteritis outbreak investigation

Lett. Appl. Microbiol. 21, 103 – 105

JÄÄSKELÄINEN, E. L., M. M. HAGGBLOM, M. A. ANDERSSON & M. S. SALKINOJA-SALONEN (2004):

Atmospheric oxygen and other conditions affecting the production of cereulide by *Bacillus cereus* in food

Int. J. Food Microbiol. 96, 75 – 83

JANG, J. H., N. A. LEE, G. J. WOO & J. H. PARK (2006):

Prevalence of *Bacillus cereus* group in rice and distribution of enterotoxin genes

Food Sci. Biotechnol. 15, 232 – 237

KAWAMURA-SATO, K., Y. HIRAMA, N. AGATA, H. ITO, K. TORII, A. TAKENO, T. HASEGAWA, Y. SHIMOMURA & M. OHTA (2005):

Quantitative analysis of cereulide, an emetic toxin of *Bacillus cereus*, by using rat liver mitochondria

Microbiol. Immunol. 49, 25 – 30

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

KOMMISSION DER EUROPÄISCHEN GEMEINSCHAFTEN, KEG (2007):

Über mikrobiologische Kriterien für Lebensmittel

Verordnung (EG) Nr. 1441/2007 zur Änderung der Verordnung 2073/2005

KOTIRANTA, A., K. LOUNATMAA & M. HAAPASALO (2000):

Epidemiology and pathogenesis of *Bacillus cereus* infections

Microbes Infect. 2, 189 – 198

KRAUSE, N. S. (2007):

Produktion von *Bacillus cereus* Enterotoxinen unter verschiedenen Wachstumsbedingungen

Diss. med. vet., München

KREFT, J., H. BERGER, M. HARTLEIN, B. MÜLLER, G. WEIDINGER & W. GOEBEL (1983):

Cloning and expression in *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis* of the hemolysin (cereolysin) determinant from *Bacillus cereus*

J. Bacteriol. 155, 681 – 689

KREUZBERGER, C., M. MORAVEK, R. DIETRICH, R. SCHEURER & E.

MÄRTLBAUER (2008):

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

Arch. Lebensmittelhyg. 59, 92 – 98

KUPPE, A., L. M. EVANS, D. A. MCMILLEN & O. H. GRIFFITH (1989):

Phosphatidylinositol-specific phospholipase C of *Bacillus cereus*: cloning, sequencing, and relationship to other phospholipases

J. Bacteriol. 171, 6077 – 6083

LARKIN, M. A., G. BLACKSHIELDS, N. P. BROWN, R. CHENNA, P. A.

MCGETTIGAN, H. MCWILLIAM, F. VALENTIN, I. M. WALLACE, A. WILM, R.

LOPEZ, J. D. THOMPSON, T. J. GIBSON & D. G. HIGGINS (2007):

ClustalW and ClustalX version 2

Bioinformatics 23, 2947 – 2948

LAURI, A. & P. O. MARIANI (2009):

Potentials and limitations of molecular diagnostic methods in food safety

Genes Nutr. 4, 1 – 12

LECHNER, S., R. MAYR, K. P. FRANCIS, P. M. PRÜSS, T. KAPLAN, E. WIESSNER-GUNKEL, G. S. A. B. STEWART & S. SCHERER (1998):

*Bacillus weihenstephanensis* sp. nov. is a new psychrotolerant species of the *Bacillus cereus* group

Int. J. Syst. Bact. 48, 1373 – 1382

LERECLUS, D., H. AGAISSE, M. GOMINET, S. SALAMITOU & V. SANCHIS (1996):

Identification of a *Bacillus thuringiensis* gene that positively regulates transcription of the phosphatidylinositol-specific phospholipase C gene at the onset of the stationary phase

J. Bacteriol. 178, 2749 – 2756

LERECLUS, D., H. AGAISSE, C. GRANDVALET, S. SALAMITOU & M. GOMINET  
(2000):

Regulation of toxin and virulence gene transcription in *Bacillus thuringiensis*  
Int. J. Med. Microbiol. 290, 295 – 299

LINDBÄCK, T., O. A. OKSTAD, A. L. RISHOVD & A. B. KOLSTO (1999):

Insertional inactivation of *hblC* encoding the L<sub>2</sub> component of *Bacillus cereus* ATCC 14579  
haemolysin BL strongly reduces enterotoxigenic activity, but not the haemolytic activity  
against human erythrocytes  
Microbiology 145, 3139 – 3146

LINDBÄCK, T., A. FAGERLUND, M. S. RODLAND & P. E. GRANUM (2004):

Characterization of the *Bacillus cereus* Nhe enterotoxin  
Microbiology 150, 3959 – 3967

LUBENAU (1906):

*Bacillus peptonificans* als Erreger einer Gastroenteritis-Epidemie  
Zbl. Bakt. I. Abt. Orig. 40, 433 – 437

LÜCKING, G., M. K. DOMMEL, S. SCHERER, A. FOUET & M. EHLING-SCHULZ  
(2009):

Cereulide synthesis in emetic *Bacillus cereus* is controlled by the transition state regulator  
AbrB, but not by the virulence regulator PlcR  
Microbiology 155, 922 – 931

LUND, T. & P. E. GRANUM (1996):

Characterisation of a non-haemolytic 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*  
Microbiology 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
- MADEGOWDA, M., S. ESWARAMOORTHY, S. K. BURLEY & S. SWAMINATHAN  
(2008):  
X-ray crystal structure of the B component of Hemolysin BL from *Bacillus cereus*  
Proteins 71, 534 – 540
- MÄNTYNEN, V. & K. LINDSTRÖM (1998):  
A rapid PCR-based DNA test for enterotoxic *Bacillus cereus*  
Appl. Environ. Microbiol. 64, 1634 – 1639
- MAGARVEY, N. A., M. EHLING-SCHULZ & C. T. WALSH (2006):  
Characterization of the cereulide NRPS alpha-hydroxy acid specifying modules: activation of  
alpha-keto acids and chiral reduction on the assembly line  
J. Am. Chem. Soc. 128, 10698 – 10699
- MAHLER, H., A. PASI, J. M. KRAMER, P. SCHULTE, A. C. SCOGING, W. BAR & S.  
KRAHENBUHL (1997):  
Fulminant liver failure in association with the emetic toxin of *Bacillus cereus*  
N. Engl. J. Med. 336, 1142 – 1148
- MAKARASEN, A., K. YOZA & M. ISOBE (2009):  
Higher structure of cereulide, an emetic toxin from *Bacillus cereus*, and special comparison  
with valinomycin, an antibiotic from *Streptomyces fulvissimus*  
Chem. Asian J. 4, 688 – 698
- MALORNY, B., J. HOORFAR, C. BUNGE & R. HELMUTH (2003):  
Multicenter validation of the analytical accuracy of *Salmonella* PCR: towards an international  
standard  
Appl. Environ. Microbiol. 69, 290 – 296

MALORNY, B., S. HUEHN, R. DIECKMANN, N. KRAMER & R. HELMUTH (2009):  
Polymerase Chain Reaction for the Rapid Detection and Serovar Identification of *Salmonella*  
in Food and Feeding Stuff  
Food Anal. Methods 2, 81 – 95

MCINTYRE, L., K. BERNARD, D. BENIAC, J. L. ISAAC-RENTON & D. C. NASEBY  
(2008):  
Identification of *Bacillus cereus* group species associated with food poisoning outbreaks in  
British Columbia, Canada  
Appl. Environ. Microbiol. 74, 7451 – 7453

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

MIKKOLA, R., N. E. SARIS, P. A. GRIGORIEV, M. A. ANDERSSON & M. S.  
SALKINOJA-SALONEN (1999):  
Ionophoretic properties and mitochondrial effects of cereulide: the emetic toxin of *B. cereus*  
Eur. J. Biochem. 263, 112 – 117

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. BÜRK, V. BROUSSOLLE, M. H. GUINEBRETIERE,  
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

- MORRISON, T. B., J. J. WEIS & C. T. WITTEWER (1998):  
Quantification of low-copy transcripts by continuous SYBR Green I monitoring during amplification  
*Biotechniques* 8, 954 – 958, 960, 962
- MORTIMER, P. R. & G. MC CANN (1974):  
Food-poisoning episodes associated with *Bacillus cereus* in fried rice  
*Lancet* 1, 1043 – 1045
- MULLIS, K. B. & F. A. FALOONA (1987):  
Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction  
*Methods Enzymol.* 155, 335 – 350
- NGAMWONGSATIT, P., P. P. BANADA, W. PANBANGRED & A. K. BHUNIA (2008a):  
WST-1-based cell cytotoxicity assay as a substitute for MTT-based assay for rapid detection of toxigenic *Bacillus* species using CHO cell line  
*J. Microbiol. Methods.* 73, 211 – 215
- NGAMWONGSATIT, P., W. BUASRI, P. PIANARIYANON, C. PULSRIKARN, M. OHBA, A. ASSAVANIG & W. PANBANGRED (2008b):  
Broad distribution of enterotoxin genes (*hblCDA*, *nheABC*, *cytK*, and *entFM*) among *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus cereus* as shown by novel primers  
*Int. J. Food Microbiol.* 121, 352 – 356
- NISHIKAWA, Y., J. M. KRAMER, M. HANAOKA & A. YASUKAWA (1996):  
Evaluation of serotyping, biotyping, plasmid banding pattern analysis, and HEp-2 vacuolation factor assay in the epidemiological investigation of *Bacillus cereus* emetic-syndrome food poisoning  
*Int. J. Food Microbiol.* 31, 149 – 159
- OLTUSZAK-WALCZAK, E., P. WALCZAK & R. MODRAK (2006):  
Detection of enterotoxic *Bacillus cereus* producing hemolytic and non hemolytic enterotoxins by PCR test  
*Pol. J. Microbiol.* 55, 113 – 118

OUOBA, L. I. I., C. PARKOUDA, B. DIAWARA, C. SCOTTI & A. H. VARNAM (2008):  
Identification of *Bacillus* spp. from Bikalga, fermented seeds of *Hibiscus sabdariffa*:  
phenotypic and genotypic characterization  
J. Appl. Microbiol. 104, 122 – 131

PAANANEN, A., R. MIKKOLA, T. SARENEVA, S. MATIKAINEN, M. HESS, M.  
ANDERSSON, I. JULKUNEN, M. S. SALKINOJA-SALONEN & T. TIMONEN (2002):  
Inhibition of human natural killer cell activity by cereulide, an emetic toxin from *Bacillus*  
*cereus*  
Clin. Exp. Immunol. 129, 420 – 428

PHELPS, R. J. & J. L. MCKILLIP (2002):  
Enterotoxin production in natural isolates of *Bacillaceae* outside the *Bacillus cereus* group  
Appl. Environ. Microbiol. 68, 3147 – 3151

PIRTTIJÄRVI, T. S., M. A. ANDERSSON, A. C. SCOGING & M. S. SALKINOJA-  
SALONEN (1999):  
Evaluation of methods for recognising strains of the *Bacillus cereus* group with food  
poisoning potential among industrial and environmental contaminants  
Syst. Appl. Microbiol. 22, 133 – 144

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

PUBLIC HEALTH LABORATORY SERVICE, PHLS (1972):  
Food poisoning associated with *Bacillus cereus*  
Br. Med. J. 1, 189

PUBLIC HEALTH LABORATORY SERVICE, PHLS (1973):  
*Bacillus cereus* food poisoning  
Br. Med. J. 3, 647

RAJKOVIC, A., M. UYTTENDAELE & J. DEBEVERE (2007):

Computer aided boar semen motility analysis for cereulide detection in different food matrices

Int. J. Food Microbiol. 114, 92 – 99

RAMARAO, N. & D. LERECLUS (2006):

Adhesion and cytotoxicity of *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* to epithelial cells are FlhA and PlcR dependent, respectively

Microbes Infect. 8, 1483 – 1491

RIRIE, K. M., R. P. RASMUSSEN & C. T. WITWER (1997):

Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction

Anal. Biochem. 245, 154 – 160

RYAN, P. A., J. D. MACMILLAN & B. A. ZILINSKAS (1997):

Molecular cloning and characterization of the genes encoding the L1 and L2 components of hemolysin BL from *Bacillus cereus*

J. Bacteriol. 179, 2551 – 2556

RYU, J. H. & L. R. BEUCHAT (2005):

Biofilm formation and sporulation by *Bacillus cereus* on a stainless steel surface and subsequent resistance of vegetative cells and spores to chlorine, chlorine dioxide, and a peroxyacetic acid-based sanitizer

J. Food Prot. 68, 2614 – 2622

SAIKI, R. K., D. H. GELFAND, S. STOFFEL, S. J. SCHARF, R. HIGUCHI, G. T. HORN, K. B. MULLIS & H. A. ERLICH (1988):

Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase  
Science 239, 487 – 491

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. WONG (2005):

*Bacillus cereus* food poisoning and its toxins

J. Food Prot. 68, 636 – 648

SCHULZ, A. (2004):

Zum Nachweis des emetischen Toxins von *Bacillus cereus*

Diss. med. vet., München

SEIDEL, K. E., C. PFISTERER, S. HORMANSDORFER & J. BAUER (1996):

The detection of toxinogenic *Bacillus cereus* strains

Zentralbl. Veterinärmed. B. 43, 421 – 428

SETTANNI, L. & A. CORSETTI (2007):

The use of multiplex PCR to detect and differentiate food- and beverage-associated microorganisms: A review

J. Microbiol. Meth. 69, 1 – 22

SHINAGAWA, K., N. MATSUSAKA, H. KONUMA & H. KURATA (1985):

The relationship between the diarrheal and other biological activities of *Bacillus cereus* involved in food poisoning outbreaks

JPN. J. Vet.Sci. 47, 557 – 565

SHINAGAWA, K., H. KONUMA, H. SEKITA & S. SUGII (1995):

Emesis of rhesus monkeys induced by intragastric administration with the HEp-2 vacuolation factor (cereulide) produced by *Bacillus cereus*

FEMS Microbiol. Lett. 130, 87 – 90

SMITH, N. R., R. E. GORDON & F. E. CLARK (1946):

Aerobic mesophilic sporeforming bacteria

United States Department of Agriculture, Misc. Pub., 559

SMITH, N. R., R. E. GORDON & F. E. CLARK (1952):

Aerobic sporeforming bacteria

United States Department of Agriculture, Agric. Monogr., 16

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 *Bacillus cereus* group are not necessarily *Bacillus weihenstephanensis*

FEMS Microbiol. Lett. 197, 223 – 228

STENFORS, L. P., R. MAYR, S. SCHERER & P. E. GRANUM (2002):

Pathogenic potential of fifty *Bacillus weihenstephanensis* strains

FEMS Microbiol. Lett. 215, 47 – 51

STENFORS ARNESEN, L.P., A. FAGERLUND & P. E. GRANUM (2008):

From soil to gut: *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins

FEMS Microbiol. Rev. 32, 579 – 606

STRYER, L. & R. P. HAUGLAND (1967):

Energy transfer: a spectroscopic ruler

Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 58, 719 – 726

SUTHERLAND, A. D. & A. M. LIMOND (1993):

Influence of pH and sugars on the growth and production of diarrhoeagenic toxin by *Bacillus cereus*

J. Dairy Res. 60, 575 – 580

SVENSSON, B., A. MONTHAN, M. H. GUINEBRETIERE, C. NGUYEN-THE & A. CHRISTIANSSON (2007):

Toxin production potential and the detection of toxin genes among strains of the *Bacillus cereus* group isolated along the dairy production chain

Int. Dairy J. 10, 1201 – 1208

SWIECICKA, I., G. A. VAN DER AUWERA & J. MAHILLON (2006):

Hemolytic and nonhemolytic enterotoxin genes are broadly distributed among *Bacillus thuringiensis* isolated from wild mammals

Microb. Ecol. 52, 544 – 551

SZABO, R. A., J. I. SPEIRS & M. AKHTAR (1991):

Cell culture detection and conditions for production of *Bacillus cereus* heat stable toxin

J. Food Prot. 54, 272 – 276

TEPLOVA, V. V., R. MIKKOLA, A. A. TONSHIN, N. E. SARIS & M. S. SALKINOJA-SALONEN (2006):

The higher toxicity of cereulide relative to valinomycin is due to its higher affinity for potassium at physiological plasma concentration

Toxicol. Appl. Pharmacol. 210, 39 – 46

TERPLAN, G. (1957):

Saprophyten als Mastitiserreger

Arch. Lebensmittelhyg. 8, 37 – 38

THAENTHANE, S., A. C. WONG & W. PANBANGRED (2005):

Phenotypic and genotypic comparisons reveal a broad distribution and heterogeneity of hemolysin BL genes among *Bacillus cereus* isolates

Int. J. Food Microbiol. 105, 203 – 212

THOMPSON, N. E., M. J. KETTERHAGEN, M. S. BERGDOLL & E. J. SCHANTZ (1984):

Isolation and some properties of an enterotoxin produced by *Bacillus cereus*

Infect. Immun. 43, 887 – 894

THORSEN, L., B. M. HANSEN, K. F. NIELSEN, N. B. HENDRIKSEN, R. K. PHIPPS & B. B. BUDDE (2006):

Characterization of emetic *Bacillus weihenstephanensis*, a new cereulide-producing bacterium  
Appl. Environ. Microbiol. 72, 5118 – 5121

TING, W. T. & G. BANWART (1985):

Detection of *Bacillus cereus* diarrheagenic toxin using a rat ligated intestinal loop assay  
J. Food Safety 7, 57 – 63

TYAGI, S. & F. R. KRAMER (1996):

Molecular beacons: probes that fluoresce upon hybridization  
Nat. Biotechnol. 14, 303 – 308

VASSILEVA, M., K. TORII, M. OSHIMOTO, A. OKAMOTO, N. AGATA, K. YAMADA, T. HASEGAWA & M. OHTA (2007):

A new phylogenetic cluster of cereulide-producing *Bacillus cereus* strains  
J. Clin. Microbiol. 45, 1274 – 1277

VIRTANEN, S. M., M. ROIVAINEN, M. A. ANDERSSON, P. YLIPAASTO, D.

HOORNSTRA, R. MIKKOLA & M. S. SALKINOJA-SALONEN (2008):

In vitro toxicity of cereulide on porcine pancreatic Langerhans islets  
Toxicol. 51, 1029 – 1037

WALTER, M., M. BONIN & P. BAUER (2006):

LightCycler 480 System: High-throughput Gene Expression and Genotyping Analysis - A Performance study  
Biochemica 2, 8 – 11

WEHRLE, E., M. MORAVEK, R. DIETRICH, C. BÜRK, A. DIDIER & E. MÄRTLBAUER (2009):

Comparison of multiplex PCR, enzyme immunoassay and cell culture methods for the detection of enterotoxinogenic *Bacillus cereus*  
J. Microbiol. Methods 78, 265 – 270

WEILE, J. & C. KNABBE (2009):

Current applications and future trends of molecular diagnostics in clinical bacteriology

Anal. Bioanal. Chem. 394, 731 – 742

WHITCOMBE, D., J. BROWNIE, H. L. GILLARD, D. MCKECHNIE, J. THEAKER, C. R. NEWTON & S. LITTLE (1998):

A homogeneous fluorescence assay for PCR amplicons: its application to real-time, single-tube genotyping

Clin. Chem. 44, 918 – 923

WIJMAN, J. G., P. P. DE LEEUW, R. MOEZELAAR, M. H. ZWIETERING & T. ABEE (2007):

Air-liquid interface biofilms of *Bacillus cereus*: formation, sporulation, and dispersion

Appl. Environ. Microbiol. 73, 1481 – 1488

WITTWER, C. T., M. G. HERRMANN, A. A. MOSS & R. P. RASMUSSEN (1997):

Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification

BioTechniques 22, 130 – 134

WITTWER, C. T., M. G. HERRMANN, C. N. GUNDRY & K. S. ELENITOBA-JOHNSON (2001):

Real-time multiplex PCR assays

Methods 25, 430 – 442

WONG, H. C., M. H. CHANG & J. Y. FAN (1988):

Incidence and characterization of *Bacillus cereus* isolates contaminating dairy products

Appl. Environ. Microbiol. 54, 699 – 702

WORLD HEALTH ORGANIZATION, WHO (1998):

WHO Surveillance Programme for Control of Foodborne Infections and Intoxications in Europe, 7th Report, Country Reports: GERMANY 1993 – 1998

<http://www.bfr.bund.de/internet/7threport/CRs/deu.pdf>

WORLD HEALTH ORGANIZATION, WHO (2000):

WHO Surveillance Programme for Control of Foodborne Infections and Intoxications in Europe 8th Report 1999 – 2000 Country Reports: Germany

<http://www.bfr.bund.de/internet/8threport/CRs/deu.pdf>

WORLD HEALTH ORGANIZATION, WHO (2008):

Foodborne disease outbreaks: Guidelines for investigation and control

<http://www.who.int/foodsafety/en/>

YANG, I. C., D. Y. SHIH, T. P. HUANG, Y. P. HUANG, J. Y. WANG & T. M. PAN (2005):

Establishment of a novel multiplex PCR assay and detection of toxigenic strains of the species in the *Bacillus cereus* group

J. Food Prot. 68, 2123 – 2130

YANG, I. C., D. Y. SHIH, J. Y. WANG & T. M. PANI (2007):

Development of rapid real-time PCR and most-probable-number real-time PCR assays to quantify enterotoxigenic strains of the species in the *Bacillus cereus* group

J. Food Prot. 70, 2774 – 2781

YOKOYAMA, K., M. ITO, N. AGATA, M. ISOBE, K. SHIBAYAMA, T. HORII & M. OHTA (1999):

Pathological effect of synthetic cereulide, an emetic toxin of *Bacillus cereus*, is reversible in mice

FEMS Immunol. Med. Microbiol. 24, 115 – 120

YOSHITOMI, K. J., K. C. JINNEMAN & S. D. WEAGANT (2006):

Detection of Shiga toxin genes stx1, stx2, and the +93 uidA mutation of *E. coli* O157:H7/H- using SYBR Green I in a real-time multiplex PCR

Mol. Cell. Probes 20, 31 – 41

ZHOU, G., J. YAN, Z. DASHENG, X. ZHOU & Z. YUAN (2008):

The residual occurrences of *Bacillus thuringiensis* biopesticides in food and beverages

Int. J. Food Microbiol. 127, 68 – 72

## 7 Anhang

### Konventionelle multiplex PCR-Protokolle

#### PCR 1 (*nheA*, *hblC*, *ces*)

**Tabelle 13. Mastermix PCR 1**

Reagenz	Menge [ $\mu$ l]
10 x Puffer	5,0
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	4,0
dNTPs (10 mM)	1,0
45c1 (10 $\mu$ M)	2,5
45c2 (10 $\mu$ M)	2,5
L2aF (10 $\mu$ M)	2,5
L2aR (10 $\mu$ M)	2,5
CesF1 (10 $\mu$ M)	2,5
CesR2 (10 $\mu$ M)	2,5
IAC_for (10 $\mu$ M)	2,5 <sup>a</sup>
IAC_rev (10 $\mu$ M)	2,5 <sup>a</sup>
Thermoprime Plus DNA-Polymerase (5 U/ $\mu$ l)	0,3
A. bidest.	16,7
pCRII-TOPO Vector	1,0 <sup>a</sup>
DNA	2,0
Gesamtvolumen	50,0

<sup>a</sup> Bei Durchführung ohne IAC wird die angegebene Menge [ $\mu$ l] durch A. bidest. ersetzt.

**Tabelle 14. Amplifikationsbedingungen PCR 1**

Reaktionsschritt	Temperatur ( $^{\circ}$ C)	Dauer (min)
1. Initiale Denaturierung	94	5
2. Amplifikation: 2.1 Denaturierung	94	1
2.2 Annealing	49	1
2.3 Elongation	72	1
Wiederholung: 30 x Schritte 2.1 – 2.3		
3. Stabilisierung	72	10
3. Kühlung	4	bis zur Entnahme

## PCR 2 (*nheA*, *hblC*, *ces*, *cytK1*)

**Tabelle 15. Mastermix PCR 2**

Reagenz	Menge [ $\mu$ l]
10 x Puffer	5,0
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	4,0
dNTPs (10 mM)	1,0
45c1 (10 $\mu$ M)	2,5
45c2 (10 $\mu$ M)	2,5
L2aF (10 $\mu$ M)	2,5
L2aR (10 $\mu$ M)	2,5
CesF1 (10 $\mu$ M)	2,5
CesR2 (10 $\mu$ M)	2,5
F2 (10 $\mu$ M)	2,5
R7 (10 $\mu$ M)	2,5
IAC_for (10 $\mu$ M)	2,5 <sup>a</sup>
IAC_rev (10 $\mu$ M)	2,5 <sup>a</sup>
Thermoprime Plus DNA-Polymerase (5 U/ $\mu$ l)	0,3
A. bidest.	11,7
pCRII-TOPO Vector	1,0 <sup>a</sup>
DNA	2,0
Gesamtvolumen	50,0

<sup>a</sup> Bei Durchführung ohne IAC wird die angegebene Menge [ $\mu$ l] durch A. bidest. ersetzt.

**Tabelle 16. Amplifikationsbedingungen PCR 2**

Reaktionsschritt	Temperatur ( $^{\circ}$ C)	Dauer (min)
1. Initiale Denaturierung	94	5
2. Amplifikation: 2.1 Denaturierung	94	1
2.2 Annealing	49	1
2.3 Elongation	72	1
Wiederholung: 30 x Schritte 2.1 – 2.3		
3. Stabilisierung	72	10
3. Kühlung	4	bis zur Entnahme

### PCR 3 (*hblC*, *hblD*, *hblA*)

**Tabelle 17. Mastermix PCR 3**

Reagenz	Menge [ $\mu$ l]
10 x Puffer	5,0
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	4,0
dNTPs (10 mM)	1,0
L2aF (10 $\mu$ M)	3,0
L2aR (10 $\mu$ M)	3,0
L1aF (10 $\mu$ M)	1,5
L1aR (10 $\mu$ M)	1,5
HA-F1(10 $\mu$ M)	1,5
HA-R2 (10 $\mu$ M)	1,5
IAC_for (10 $\mu$ M)	1,5 <sup>a</sup>
IAC_rev (10 $\mu$ M)	1,5 <sup>a</sup>
Thermoprime Plus DNA-Polymerase (5 U/ $\mu$ l)	0,7
A. bidest.	21,3
pCRII-TOPO Vector	1,0 <sup>a</sup>
DNA	2,0
Gesamtvolumen	50,0

<sup>a</sup> Bei Durchführung ohne IAC wird die angegebene Menge [ $\mu$ l] durch A. bidest. ersetzt.

**Tabelle 18. Amplifikationsbedingungen PCR 3**

Reaktionsschritt	Temperatur ( $^{\circ}$ C)	Dauer (min)
1. Initiale Denaturierung	94	5
2. Amplifikation: 2.1 Denaturierung	94	1
2.2 Annealing	55	1
2.3 Elongation	72	1
Wiederholung: 30 x Schritte 2.1 – 2.3		
3. Stabilisierung	72	10
3. Kühlung	4	bis zur Entnahme

## PCR 4 (*nheA*, *nheB*, *nheC*)

**Tabelle 19. Mastermix PCR 4**

Reagenz	Menge [ $\mu$ l]
10 x Puffer	5,0
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	4,0
dNTPs (10 mM)	1,0
45c1 (10 $\mu$ M)	2,5
45c2 (10 $\mu$ M)	2,5
39b1 (10 $\mu$ M)	2,5
39b2 (10 $\mu$ M)	2,5
FNheC (10 $\mu$ M)	2,5
R2NheC (10 $\mu$ M)	2,5
IAC_for (10 $\mu$ M)	2,5 <sup>a</sup>
IAC_rev (10 $\mu$ M)	2,5 <sup>a</sup>
Thermoprime Plus DNA-Polymerase (5 U/ $\mu$ l)	0,3
A. bidest.	16,7
pCRII-TOPO Vector	1,0 <sup>a</sup>
DNA	2,0
Gesamtvolumen	50,0

<sup>a</sup> Bei Durchführung ohne IAC wird die angegebene Menge [ $\mu$ l] durch A. bidest. ersetzt.

**Tabelle 20. Amplifikationsbedingungen PCR 4**

Reaktionsschritt	Temperatur ( $^{\circ}$ C)	Dauer (min)
1. Initiale Denaturierung	94	5
2.1 Denaturierung	94	1
2.2 Annealing	49	1
2.3 Elongation	72	1
Wiederholung: 30 x Schritte 2.1 – 2.3		
3. Stabilisierung	72	10
3. Kühlung	4	bis zur Entnahme

## Real-time multiplex PCR-Protokolle

### Light Cycler 2.0 (*nheA*, *hblD*, *ces*, *cytK1*)

**Tabelle 21. Mastermix LC 2.0**

Reagenz	Menge [ $\mu$ l]
Light Cycler Fast Start DNA Master <sup>PLUS</sup> SYBR Green I (Roche)	4,00
mp3AR2for (10 $\mu$ M)	2,00
mp3AR2rev (10 $\mu$ M)	2,00
mp3L1R1for (10 $\mu$ M)	0,25
mp3L1R1rev (10 $\mu$ M)	0,25
ces_SYBR_F (10 $\mu$ M)	0,25
ces_SYBR_R (10 $\mu$ M)	0,25
mp4CytKfor (10 $\mu$ M)	1,00
mp4CytKrev (10 $\mu$ M)	1,00
DNA	2,00
Wasser, PCR-grade (Roche)	7,00
Gesamtvolumen	20,0

**Tabelle 22. Amplifikationsbedingungen LC 2.0**

Reaktionsschritt	Temperatur ( $^{\circ}$ C)	Dauer (s)
1. Initiale Denaturierung	95	600
2. Amplifikation: 2.1 Denaturierung	95	10
2.2 Annealing	60	10
2.3 Elongation	72	10
Wiederholung: 35 x Schritte 2.1 – 2.3		

## Light Cycler 480 (*nheA*, *hblD*, *ces*, *cytKI*)

**Tabelle 23. Mastermix LC 480**

Reagenz	Menge [ $\mu$ l]
Light Cycler 480 SYBR Green I Master (Roche)	10,00
mp3AR2for (10 $\mu$ M)	2,00
mp3AR2rev (10 $\mu$ M)	2,00
mp3L1R1for (10 $\mu$ M)	0,25
mp3L1R1rev (10 $\mu$ M)	0,25
ces_SYBR_F (10 $\mu$ M)	0,25
ces_SYBR_R (10 $\mu$ M)	0,25
mp4CytKfor (10 $\mu$ M)	1,00
mp4CytKrev (10 $\mu$ M)	1,00
DNA	2,00
Wasser, PCR-grade (Roche)	1,00
Gesamtvolumen	20,0

**Tabelle 24. Amplifikationsbedingungen LC 480**

Reaktionsschritt	Temperatur ( $^{\circ}$ C)	Dauer (s)
1. Initiale Denaturierung	95	600
2. Amplifikation: 2.1 Denaturierung	95	15
2.2 Annealing	60	10
2.3 Elongation	72	10
Wiederholung: 35 x Schritte 2.1 – 2.3		

## Abbildung 11. Multiple sequence alignments

### hblC (partielle Sequenz)

**B. cereus DSM 4384** CGAAAATTAGGTGCGCAATCTAAATTAATCCAAACGTATATTGACCAATCTTAAATGAGTCCTAATGTACAGTTAGAGGAAGTCACAGCTTTAAATACAAATCAATTCCTAATCAAACAA 120  
**B. mycoides DSM 2048** CGAAAATTAGGTGCGCAATCTAAATTAATCCAAACGTATATTGATCAATCTTAAATGAGTCCTAATGTACAGCTAGAGGAAGTCCAGCTTTAAATACCAATCAATTCCTAATCAAACAA  
**B. thuring. ATCC 10792** CGAAAATTAGGTGCGCAATCTAAATTAATCCAAACGTATATTGATCAATCTTAAATGAGTCCTAATGTACAGTTAGAGGAAGTCACAGCTTTAAATACAAATCAATTCCTAATCAAACAA  
**B. thuring. DSM 6029** CGAAAATTAGGTGCGCAATCTAAATTAATCCAAACGTATATTGATCAATCTTAAATGAGTCCTAATGTACAGTTAGAGGAAGTCACAGCTTTAAATACAAATCAATTCCTAATCAAACAA  
**B. cereus F 837/76** CGAAAATTAGGTGCGCAATCTAAATTAATCCAAACGTATATTGATCAATCTTAAATGAGTCCTAATGTACAGCTAGAGGAAGTCCAGCTTTAAATACAAATCAATTCCTAATCAAACAA  
 \*\*\*\*\*

**B. cereus DSM 4384** GATATGAAGGAATGGTCATCGGAACCTCTATCCACAGTTAATTCTATTTAAATTCAAAAAGCAAAGGATTTGTAACAAAATTTAATAGCTATTACCCGACATTTAAATCGTTTGTAGACAAT 240  
**B. mycoides DSM 2048** GATATGAAGGAATGGTCATCAGAACTCTATCCACAGTTAATTCTATTTAAATTCAAAAAGTAAAGGATTTGTAACAAAATTTAATAGCTATTACCCGACATTTAAATCGTATGTAGACAAT  
**B. thuring. ATCC 10792** GATATGAAGGAATGGTCATCGGAACCTCTATCCACAGTTAATTCTATTTAAATTCAAAAAGTAAAGGATTTGTAACAAAATTTAATAGCTATTACCCGACATTTAAATCGTTTGTAGACAAT  
**B. thuring. DSM 6029** GATATGAAGGAATGGTCATCGGAACCTCTATCCACAGTTAATTCTATTTAAATTCAAAAAGTAAAGGATTTGTAACAAAATTTAATAGCTATTACCCGACATTTAAATCGTTTGTAGACAAT  
**B. cereus F 837/76** GATATGAAGGAATGGTCATCGGAACCTCTATCCACAGTTAATTCTATTTAAATTCAAAAAGTAAAGGATTTGTAACAAAATTTAATAGCTATTACCCGACATTTAAATCGTTTGTAGACAAT  
 \*\*\*\*\*

**B. cereus DSM 4384** AAAGAAGATAGAGAAGGGTTTTTCGGATAGACTTGAAGTACTTCAAGAAATGGCTATGACGAATCAAGAAAATACGCAACGGCAAATCAATGAATTAACAGATCTTAAATACAGCTTGAT 360  
**B. mycoides DSM 2048** AAAGAAGATAGTGAAGGGTTTTTCGGATAGACTTGAAGTACTTCAAGAAATGGCTATGACGAATCAAGAAAATGCGCAACGACAAATTAATGAATTAACAGAACTTAAATACAGCTTGAT  
**B. thuring. ATCC 10792** AAAGAAGATAGAGAAGGGTTTTTCGGATAGACTTGAAGTACTTCAAGAAATGGCTATGACGAATCAAGAAAATACGCAACGGCAAATCAATGAATTAACAGATCTTAAATACAGCTTGAT  
**B. thuring. DSM 6029** AAAGAAGATAGAGAAGGGTTTTTCGGATAGACTTGAAGTACTTCAAGAAATGGCTATGACGAATCAAGAAAATACGCAACGGCAAATCAATGAATTAACAGATCTTAAATACAGCTTGAT  
**B. cereus F 837/76** AAAGAAGATAGAGAAGGGTTTTTCGGATAGACTTGAAGTACTTCAAGAAATGGCTATGACGAATCAAGAAAATGCGCAACGACAAATCAATGAATTAACAGAACTTAAATACAGCTTGAT  
 \*\*\*\*\*

**B. cereus DSM 4384** AAAAAATTTAAAGATTTTGATACCAATGTGGCAACTGCGCAAGGCATATTA 411  
**B. mycoides DSM 2048** AAAAAATTTAAAGATTTTGATACTGATGTGGCAACTGCGCAAGGCATATTA  
**B. thuring. ATCC 10792** AAAAAATTTAAAGATTTTGATACCAATGTGGCAACTGCGCAAGGCATATTA  
**B. thuring. DSM 6029** AAAAAATTTAAAGATTTTGATACCAATGTGGCAACTGCGCAAGGCATATTA  
**B. cereus F 837/76** AAAAAATTTAAAGATTTTGATACTAATGTGGCAACTGCGCAAGGCATATTA  
 \*\*\*\*\*

### hblD (partielle Sequenz)

**B. cereus DSM 4384** AGGTCAACAGGCAACGATTCACAACCTCAAGCTGAAATTTAGCAACTTCGTTCTACTCAGAAAAACATTTTGATGATGTATTAGCATGGTCAATTGGTGGTGGATTGGGAGCAGCTAT 120  
**B. cereus F 837/76** AGGTCAACAGGCAACGATTCACAACCTCAAGCTGAAATTTAGCAACTTCGTTCTACTCAGAAAAACATTTTGATGATGTATTAGCATGGTCAATTGGTGGTGGATTGGGAGCAGCTAT  
 \*\*\*\*\*

**B. cereus DSM 4384** TTTAGTTATTGCAGCTATTGGAGGAGCGGTAGTTATTGTTGTAACCTGGCGGTACAGCAACACCGGCTGTTGTTGGTGGACTCTCG 205  
**B. cereus F 837/76** TTTAGTTATTGCAGCTATTGGAGGAGCGGTAGTTATTGTTGTAACCTGGCGGTACAGCAACACCGGCTGTTGTTGGTGGACTCTCG  
 \*\*\*\*\*





*B. cereus* DSM 4312 ACAC TTCATGTGTTTGAAGATGAAGATCAGATGAAAATATTCCTTTGAGTATAATACAGATTTATTTGATGAATCAACGATTATGCGTTGGCAGAATCATTTCGAAACGCTATTACAGGAA 600  
*B. weihensteph.* MHI 184 ACAC TTCATGTGTTTGAAGATGAAGATCAGATGAAAATATTCCTTTGAGTATAATACAGATTTATTTGATGAATCAACGATTATGCGTTGGCAGAATCATTTCGAAACGCTATTACAGGAA  
*B. cereus* F 4810/72 ACAC TTCATGTGTTTGAAGATGAAGATCAGATGAAAATATTCCTTTGAGTATAATACAGATTTATTTGATGAATCAACGATTATGCGTTGGCAGAATCATTTCGAAACGCTATTACAGGAA  
\*\*\*\*\*

*B. cereus* DSM 4312 ATTGTATCGAATCCGACAAAACGTATTTCCGGAATTGAATATACTTACAAATGAGGAGAAAATATGAAATCTAGAGATGAACAATAATTCACGGGAGTATCCTCAGCATGAATCTGTTGCG 720  
*B. weihensteph.* MHI 184 ATTGTATCGAATCCGACAAAACGTATTTCCGGAATTGAATATACTTACAAATGAGGAGAAAATATGAAATCTAGAGATGAACAATAATTCACGGGAGTATCCTCAGCATGAATCTGTTGCG  
*B. cereus* F 4810/72 ATTGTATCGAATCCGACAAAACGTATTTCCGGAATTGAATATACTTACAAATGAGGAGAAAATATGAAATCTAGAGATGAACAATAATTCACGGGAGTATCCTCAGCATGAATCTGTTGCG  
\*\*\*\*\*

*B. cereus* DSM 4312 GAGATTTTTAGAGAAAACGAAGATAAAGCATCAAGCAAACTAGCAATTACGTACAAAGATAGAAAAGTTAACGTATGCAGAGTTGAGTGAAAAAGCAAATGCGTTGGCGCATACTTGAAA 840  
*B. weihensteph.* MHI 184 GAGATTTTTAGAGAAAACGAAGATAAAGCATCAAGCAAACTAGCAATTACGTACAAAGATAGAAAAGTTAACGTATGCAGAGTTGAGTGAAAAAGCAAATGCGTTGGCGCATACTTGAAA  
*B. cereus* F 4810/72 GAGATTTTTAGAGAAAACGAAGATAAAGCATCAAGCAAACTAGCAATTACGTACAAAGATAGAAAAGTTAACGTATGCAGAGTTGAGTGAAAAAGCAAATGCGTTGGCGCATACTTGAAA  
\*\*\*\*\*

*B. cereus* DSM 4312 CGTCGAGGTGTTGCGCAGCATGATGTTGTTGGAATTGTCGCAGAGCGTTCGCCTGAAACAATTATTGGAATACTCGCAATCTTAAAAGTAGGAGCAATTTATTTGCCAATTGATCCAAAA 960  
*B. weihensteph.* MHI 184 CGTCGAGGTGTTGCGCAGCATGATGTTGTTGGAATTGTCGCAGAGCGTTCGCCTGAAACAATTATTGGAATACTCGCAATCTTAAAAGTAGGAGCAATTTATTTGCCAATTGATCCAAAA  
*B. cereus* F 4810/72 CGTCGAGGTGTTGCGCAGCATGATGTTGTTGGAATTGTCGCAGAGCGTTCGCCTGAAACAATTATTGGAATACTCGCAATCTTAAAAGTAGGAGCAATTTATTTGCCAATTGATCCAAAA  
\*\*\*\*\*

*B. cereus* DSM 4312 CTACC GCAATTAACACTGCAACACATTTGGCGAGATAGCGGTGCAAAAAGTCTCCTAGGGAAAAATGAAACAACCTGTAGAAGTTGGCAAGGAAGTTCCGTTTGTGGACATCGAAGGGGAT 1080  
*B. weihensteph.* MHI 184 CTACC GCAATTAACACTGCAACACATTTGGCGAGATAGCGGTGCAAAAAGTCTCCTAGGGAAAAATGAAACAACCTGTAGAAGTTGGCAAGGAAGTTCCGTTTGTGGACATCGAAGGGGAT  
*B. cereus* F 4810/72 CTACC GCAATTAACACTGCAACACATTTGGCGAGATAGCGGTGCAAAAAGTCTCCTAGGGAAAAATGAAACAACCTGTAGAAGTTGGCAAGGAAGTTCCGTTTGTGGACATCGAAGGGGAT  
\*\*\*\*\*

*B. cereus* DSM 4312 AAAGGGAAGCAAGAGGAGTTAGTGTGTCCAATTAGTCCAGAAGATACGGCATATATTTATGTATACGTACGGCAGTACTGGAAAACCAAAGGGGTTATGGTGACACATAGAAAATATTGTT 1200  
*B. weihensteph.* MHI 184 AAAGGGAAGCAAGAGGAGTTAGTGTGTCCAATTAGTCCAGAAGATACGGCATATATTTATGTATACGTACGGCAGTACTGGAAAACCAAAGGGGTTATGGTGACACATAGAAAATATTGTT  
*B. cereus* F 4810/72 AAAGGGAAGCAAGAGGAGTTAGTGTGTCCAATTAGTCCAGAAGATACGGCATATATTTATGTATACGTACGGCAGTACTGGAAAACCAAAGGGGTTATGGTGACACATAGAAAATATTGTT  
\*\*\*\*\*

*B. cereus* DSM 4312 CGTTTAGTAAAAAATACGAATTTTCGTTTCTTTGCAAGAGCAAGATGTGTTGTTACAGACAGGTTTCGCTTAC 1271  
*B. weihensteph.* MHI 184 CGTTTAGTAAAAAATACGAATTTTCGTTTCTTTGCAAGAGCAAGATGTGTTGTTACAGACAGGTTTCGCTTAC  
*B. cereus* F 4810/72 CGTTTAGTAAAAAATACGAATTTTCGTTTCTTTGCAAGAGCAAGATGTGTTGTTACAGACAGGTTTCGCTTAC  
\*\*\*\*\*

*cytK1* (partielle Sequenz)

*B. cereus* NVH 391/98 AACAGATATCGGTCAAAAATGCAAAAACACATACAAGCTACAATACATTTAATAATGAACAAGCAGATAATATGACAATGTCAATAAAAGTAACCTTCATTGATGATCCAAGTGCATGATAA 120  
AJ 277962 AACAGATATCGGTCAAAAATGCAAAAACACATACAAGCTACAATACATTTAATAATGAACAAGCAGATAATATGACAATGTCAATAAAAGTAACCTTCATTGATGATCCAAGTGCATGATAA  
\*\*\*\*\*

*B. cereus* NVH 391/98 GCAAATGCGGTTATTAATACAACAGGTAGCTTTATGAAAGCAAACCAACTCTTAGTGACGCACCTGTTGATGGATATCCAATCCAGGGGCAAGTGTACATTGCGCTATCCATCACA 240  
AJ 277962 GCAAATGCGGTTATTAATACAACAGGTAGCTTTATGAAAGCAAACCAACTCTTAGTGACGCACCTGTTGATGGATATCCAATCCAGGGGCAAGTGTACATTGCGCTATCCATCACA  
\*\*\*\*\*

**B. cereus NVH 391/98** ATATGATATTGCAATGAATTTACAAGATAATACGTCGCGATTCTTTCATGTAGCACCACAAATGCAGTGAAGAAACGACTGTCACATCAAGCGTTTCTTATCAACTTGGCGGCTCTAT 360  
 AJ 277962 ATATGATATTGCAATGAATTTACAAGATAATACGTCGCGATTCTTTCATGTAGCACCACAAATGCAGTGAAGAAACGACTGTCACATCAAGCGTTTCTTATCAACTTGGCGGCTCTAT  
 \*\*\*\*\*

**B. cereus NVH 391/98** CAAAGCCTCTGTAACACCAAGCGGTCTAGTGGCGAATCTGGAGCAACAGGTCAAGTAACTTGGTCTGATTCGGTCAGTTATAAACAAACAAGCTATAAAACAACTTAATTGATCAAAC 480  
 AJ 277962 CAAAGCCTCTGTAACACCAAGCGGTCTAGTGGCGAATCTGGAGCAACAGGTCAAGTAACTTGGTCTGATTCGGTCAGTTATAAACAAACAAGCTATAAAACAACTTAATTGATCAAAC  
 \*\*\*\*\*

**B. cereus NVH 391/98** AAATAAACATGTAATAATGGAACGTATTCTTTAATGGATATAATAATCAAACCTGGGGCATTTACACTCGCGATTCTTACCATGCTTTATATGGAACCAATTATTTATGTATTCTCGTAC 600  
 AJ 277962 AAATAAACATGTAATAATGGAACGTATTCTTTAATGGATATAATAATCAAACCTGGGGCATTTACACTCGCGATTCTTACCATGCTTTATATGGAACCAATTATTTATGTATTCTCGTAC  
 \*\*\*\*\*

**B. cereus NVH 391/98** GTATCCTCATGAAACAGATGCACG 623  
 AJ 277962 GTATCCTCATGAAACAGATGCACG  
 \*\*\*\*\*

Abgleich partieller Enterotoxin-Gensequenzen. PCR-Produkte ausgewählter Stämme wurden sequenziert und mit Sequenzen aus GenBank abgeglichen. Die Bezeichnungen der in dieser Studie sequenzierten Stämme sind fett gedruckt. Basen-Übereinstimmungen sind durch Sternchen gekennzeichnet, wohingegen Abstände Punktmutationen indizieren. Alle Primer-Bindungsstellen sind grau hinterlegt. Die Zugangsnummern für die Sequenzen aus GenBank (National Center for Biotechnology Information, NCBI) sind U63928 für *hblCD*, AJ237785 für *hblA*, Y19005 für *nheABC*, DQ360825 für *ces* und AJ277962 für *cytK1*.

**Tabelle 25.** Charakteristika der untersuchten Stämme (n = 168) und Isolate (n = 208)

Spezies	Stämme und Isolate <sup>a</sup>	Herkunft <sup>b</sup>	Stärke-Abbau	PCR									EIA		ZT	
				Genprofil	<i>hblC</i>	<i>hblD</i>	<i>hblA</i>	<i>nheA</i>	<i>nheB</i>	<i>nheC</i>	<i>ces</i>	<i>cytKI</i>	Hbl <sup>c</sup>	Nhe <sup>e</sup>	Vero	HEp-2
<i>B. cereus</i>	DSM 4384 <sup>d</sup>	LV, Ref. strain (Hbl)	+	I	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-
	DSM 4312 <sup>d</sup>	LV, Ref. strain (emetic)	-	II	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+
	NVH0075/95 <sup>d</sup>	LV, Ref. strain (Nhe)	-	III	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-
	NVH 391/98 <sup>d</sup>	LV, Ref. strain (CytK)	-	IV	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-
	MHI 1305	LV, Moravek et al., 2006	-	II	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+
	MHI 1326	LV, Moravek et al., 2006	-	II	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+
	MHI 1475	LI	+	III	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-
	MHI 1476	LI, Moravek et al., 2006	+	III	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-
	MHI 1477	LI	-	III	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-
	MHI 1478	LI	-	III	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-
	MHI 1479	LI	-	VI	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-
	MHI 1480	LI, GP, Moravek et al., 2006	+	V	+	-	+	+	+	+	-	-	L <sub>2</sub> +B	+	-	-
	MHI 1481	LI	+	III	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-
	MHI 1482	LI, PS	+	III	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-
	MHI 1483	LI	+	III	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-
	MHI 1484	U, Moravek et al., 2006	+	III	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-
	MHI 1485	LV, Moravek et al., 2006	-	II	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+
	MHI 1486	LV, Moravek et al., 2006	-	II	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+
	MHI 1487	LV	-	II	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+

Spezies	Stämme und Isolate <sup>a</sup>	Herkunft <sup>b</sup>	Stärkeabbau	PCR									EIA		ZT	
				Genprofil	<i>hblC</i>	<i>hblD</i>	<i>hblA</i>	<i>nheA</i>	<i>nheB</i>	<i>nheC</i>	<i>ces</i>	<i>cytK1</i>	Hbl <sup>c</sup>	Nhe <sup>c</sup>	Vero	HEp-2
<i>B. cereus</i>	MHI 1488	LI	-	II	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+
	MHI 1489	LI,GP, Moravek et al., 2006	+	III	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	-	-
	MHI 1490	LI	+	I	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-
	MHI 1491	LV, Moravek et al., 2006	-	III	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-
	MHI 1492	LV, Moravek et al., 2006	+	I	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-
	MHI 1493	LV, Moravek et al., 2006	+	III	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-
	MHI 1494	LV, Moravek et al., 2006	+	III	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-
	MHI 1495	LV, Moravek et al., 2006	+	I	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-
	MHI 1496	LV, Moravek et al., 2006	-	III	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-
	MHI 1497	LV, Moravek et al., 2006	+	I	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-
	MHI 1498	LV, Moravek et al., 2006	-	III	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-
	MHI 1499	LV, Moravek et al., 2006	+	I	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-
	MHI 1500	LI, Moravek et al., 2006	+	I	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-
	MHI 1501	LI	+	I	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-
	MHI 1502	LI, Moravek et al., 2006	+	I	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-
	MHI 1503	LI, Moravek et al., 2006	-	III	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-
	MHI 1504	LV, PS, Moravek et al., 2006	-	III	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-
	MHI 1505	LV, Moravek et al., 2006	+	I	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-
	MHI 1506	LV	+	I	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-

Spezies	Stämme und Isolate <sup>a</sup>	Herkunft <sup>b</sup>	Stärkeabbau	PCR									EIA		ZT	
				Genprofil	<i>hblC</i>	<i>hblD</i>	<i>hblA</i>	<i>nheA</i>	<i>nheB</i>	<i>nheC</i>	<i>ces</i>	<i>cytK1</i>	Hbl <sup>c</sup>	Nhe <sup>c</sup>	Vero	HEp-2
<i>B. cereus</i>	MHI 1507	LV, Moravek et al., 2006	-	III	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-
	MHI 1508	LI	+	VI	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-
	MHI 1509	LV	-	III	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-
	MHI 1510	LI, Moravek et al., 2006	+	VI	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-
	MHI 1511	LI	+	I	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-
	MHI 1512	LI	+	I	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-
	MHI 1513	LI, Moravek et al., 2006	+	I	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-
	MHI 1514	LI	+	I	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-
	MHI 1515	LI, Moravek et al., 2006	-	II	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+
	MHI 1516	LI	+	I	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-
	MHI 1517	LI	-	II	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+
	MHI 1518	LI	+	I	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-
	MHI 1519	LI	+	I	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-
	MHI 1520	LV, Moravek et al., 2006	+	I	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-
	MHI 1521	LI	+	I	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-
	MHI 1522	LV, Moravek et al., 2006	+	III	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-
	MHI 1523	LV	+	III	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-
	MHI 1524	LI	+	I	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-
	MHI 1525	LI	+	I	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-

Spezies	Stämme und Isolate <sup>a</sup>	Herkunft <sup>b</sup>	Stärke-Abbau	PCR									EIA		ZT	
				Genprofil	<i>hblC</i>	<i>hblD</i>	<i>hblA</i>	<i>nheA</i>	<i>nheB</i>	<i>nheC</i>	<i>ces</i>	<i>cytK1</i>	Hbl <sup>c</sup>	Nhe <sup>c</sup>	Vero	HEp-2
<i>B. cereus</i>	MHI 1526	LI	+	I	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-
	MHI 1527	LV	-	III	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-
	MHI 1528	LI	-	II	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+
	MHI 1529	LV, Moravek et al., 2006	+	I	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-
	MHI 1530	LV, Moravek et al., 2006	+	I	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-
	MHI 1531	LV	+	I	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-
	MHI 1532	LV, Moravek et al., 2006	+	I	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-
	MHI 1533	LI, GP	-	II	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	-	+
	MHI 1534	LI	-	II	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+
	MHI 1535	LI	-	II	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+
	MHI 1536	LV	+	I	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-
	MHI 1537	LV	+	I	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-
	MHI 1538	LV	-	II	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+
	MHI 1539	LV	-	III	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-
	MHI 1540	LV	+	III	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-
	MHI 1541	LI	+	III	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-
	MHI 1542	LI	-	II	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+
	MHI 1543	LI	-	III	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-
	MHI 1544	LV, Moravek et al., 2006	+	I	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-

Spezies	Stämme und Isolate <sup>a</sup>	Herkunft <sup>b</sup>	Stärke-Abbau	PCR									EIA		ZT	
				Genprofil	<i>hblC</i>	<i>hblD</i>	<i>hblA</i>	<i>nheA</i>	<i>nheB</i>	<i>nheC</i>	<i>ces</i>	<i>cytK1</i>	Hbl <sup>c</sup>	Nhe <sup>c</sup>	Vero	HEp-2
<i>B. cereus</i>	MHI 1545	LI	-	III	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-
	MHI 1546	LI	+	I	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-
	MHI 1547	LV, Moravek et al., 2006	+	I	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-
	MHI 1548	HE	-	II	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+
	MHI 1549	LI	-	II	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+
	MHI 1550	HE	-	II	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+
	MHI 1551	LI	+	I	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-
	MHI 1552	LV, Moravek et al., 2006	+	I	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-
	MHI 1553	LI	-	II	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+
	MHI 1554	LI	+	I	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-
	MHI 1555	LI, PS, Moravek et al., 2006	+	III	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-
	MHI 1556	LI, PS, Moravek et al., 2006	+	III	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-
	MHI 1557	LV, Moravek et al., 2006	+	I	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-
	MHI 1558	LV, PS, Moravek et al., 2006	-	II	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+
	MHI 1559	LI	-	II	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+
	MHI 1560	LI	+	I	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-
	MHI 1561	LI	+	I	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-
	MHI 1562	HE	-	II	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+
	MHI 1564	LI	-	II	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+

Spezies	Stämme und Isolate <sup>a</sup>	Herkunft <sup>b</sup>	Stärke-Abbau	PCR									EIA		ZT	
				Genprofil	<i>hblC</i>	<i>hblD</i>	<i>hblA</i>	<i>nheA</i>	<i>nheB</i>	<i>nheC</i>	<i>ces</i>	<i>cytK1</i>	Hbl <sup>c</sup>	Nhe <sup>c</sup>	Vero	HEp-2
<i>B. cereus</i>	MHI 1565	LI	-	II	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+
	MHI 1566	HE	-	II	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+
	MHI 1567	HE	-	II	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+
	MHI 1568	LV, PS, Moravek et al., 2006	-	II	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+
	MHI 1569	LV, Moravek et al., 2006	-	II	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+
	MHI 1570	HE	-	III	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-
	MHI 1571	HE	-	II	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+
	MHI 1572	LV, PS, Moravek et al., 2006	-	III	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-
	MHI 1573	HE	+	I	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-
	MHI 1574	UG, Moravek et al., 2006	-	I	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-
	MHI 1647	UG	-	VIII	-	-	-	+	-	-	-	-	-	A	-	-
	MHI 1650	UG, Moravek et al., 2006	+	I	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-
	MHI 1654	UG, Moravek et al., 2006	-	II	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+
	MHI 1658	UG, Moravek et al., 2006	+	I	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-
	MHI 1659	LI, Moravek et al., 2006	-	III	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-
	MHI 1664	LI, Moravek et al., 2006	-	II	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+
	MHI 1665	LI	-	II	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+
	MHI 1670	LI, PS, Moravek et al., 2006	-	II	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+
	MHI 1672	LI, Moravek et al., 2006	-	II	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+

Spezies	Stämme und Isolate <sup>a</sup>	Herkunft <sup>b</sup>	Stärkeabbau	PCR									EIA		ZT	
				Genprofil	<i>hblC</i>	<i>hblD</i>	<i>hblA</i>	<i>nheA</i>	<i>nheB</i>	<i>nheC</i>	<i>ces</i>	<i>cytKI</i>	Hbl <sup>c</sup>	Nhe <sup>c</sup>	Vero	HEp-2
<i>B. cereus</i>	MHI 1673	LI, Moravek et al., 2006	-	II	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+
	MHI 1679		+	III	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-
	MHI 1680	LV Moravek et al., 2006	-	II	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+
	MHI 1684	UG, Moravek et al., 2006	-	III	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-
	MHI 1687	LV, Moravek et al., 2006	+	I	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-
	MHI 1698	LI, Moravek et al., 2006	+	VII	-	-	-	+	-	+	-	-	-	A+C	-	-
	MHI 1699	LV, Moravek et al., 2006	-	II	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+
	MHI 1700	LV, Moravek et al., 2006	-	II	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+
	MHI 1701	LV, Moravek et al., 2006	-	II	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+
	MHI 2011	O, Kreuzberger et al., 2008	-	II	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+
	MHI 2017	H, Kreuzberger et al., 2008	+	I	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-
	MHI 2049	O, Kreuzberger et al., 2008	-	II	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+
	MHI 2058	H, Kreuzberger et al., 2008	-	II	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+
	MHI 2069	O, Kreuzberger et al., 2008	+	I	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-
	MHI 2104	H, Kreuzberger et al., 2008	+	III	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-
	MHI 2131	O, Kreuzberger et al., 2008	+	I	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-
	MHI 2155	LV, Kreuzberger et al., 2008	+	I	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-
	MHI 2182	O, Kreuzberger et al., 2008	-	III	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-
	MHI 2217	O, Kreuzberger et al., 2008	+	I	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-

Spezies	Stämme und Isolate <sup>a</sup>	Herkunft <sup>b</sup>	Stärke-abbau	PCR									EIA		ZT		
				Genprofil	<i>hblC</i>	<i>hblD</i>	<i>hblA</i>	<i>nheA</i>	<i>nheB</i>	<i>nheC</i>	<i>ces</i>	<i>cytK1</i>	Hbl <sup>c</sup>	Nhe <sup>c</sup>	Vero	HEp-2	
<i>B. cereus</i>	MHI 2233	H, Kreuzberger et al., 2008	+	I	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-
	MHI 2239	O, Kreuzberger et al., 2008	+	I	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-
	MHI 2273	O, Kreuzberger et al., 2008	-	III	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-
	MHI 2300	O, Kreuzberger et al., 2008	+	I	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-
	MHI 2309	O, Kreuzberger et al., 2008	+	I	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-
	MHI 2341		+	III	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	x
	MHI 2350	LI	-	II	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+
	MHI 2572		-	II	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+
	MHI 2573		-	II	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
	MHI 2574		+	III	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	x
	MHI 2575		+	III	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	x
	MHI 2576		+	III	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	x
	MHI 2577		-	II	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
	Bw-1/MHI 2364	LI	-	III	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	x
	Bw-2 / MHI 2365	LI	+	III	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	x
Bw-3 / MHI 2366	LI	+	I	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	x	
Bw-4 / MHI 2367	LI	+	I	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	x	
Bw-5 / MHI 2368	LI	+	I	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	

Spezies	Stämme und Isolate <sup>a</sup>	Herkunft <sup>b</sup>	Stärkeabbau	PCR									EIA		ZT	
				Genprofil	<i>hblC</i>	<i>hblD</i>	<i>hblA</i>	<i>nheA</i>	<i>nheB</i>	<i>nheC</i>	<i>ces</i>	<i>cytK1</i>	Hbl <sup>c</sup>	Nhe <sup>c</sup>	Vero	HEp-2
<i>B. cereus</i>	Bw-6 / MHI 2369	LI	-	III	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	x
	Bw-7 / MHI 2370	O	+	I	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	x
	Bw-8 / MHI 2371	O	+	I	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	x
	Bw-9 / MHI 2372	O	+	I	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	x
	Bw-10 / MHI 2373	O	+	III	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	x
	Bw-11 / MHI 2374	O	+	I	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	x
	Bw-12 / MHI 2375	O	+	I	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	x
	Bw-13 / MHI 2376	O	+	I	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	x
	Bw-14 / MHI 2377	O	-	III	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	x
	Bw-15 / MHI 2378	O	+	I	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	x
	Bw-16 / MHI 2379	O	-	III	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	x
	Bw-17 / MHI 2380	O	+	I	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	x
	Bw-18 / MHI 2381	O	+	III	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	x
	Bw-19 / MHI 2382	O	+	III	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	x
	Bw-20 / MHI 2383	O	+	I	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	x
	Bw-21 / MHI 2384	O	+	I	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	x
	Bw-22 / MHI 2385	O	+	I	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	x
	Bw-23 / MHI 2386		+	I	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	x
	Bw-24 / MHI 2395	O	+	I	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	x

Spezies	Stämme und Isolate <sup>a</sup>	Herkunft <sup>b</sup>	Stärkeabbau	PCR									EIA		ZT		
				Genprofil	<i>hblC</i>	<i>hblD</i>	<i>hblA</i>	<i>nheA</i>	<i>nheB</i>	<i>nheC</i>	<i>ces</i>	<i>cytK1</i>	Hbl <sup>c</sup>	Nhe <sup>c</sup>	Vero	HEp-2	
<i>B. cereus</i>	Bw-25 / MHI 2396	O	+	I	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	x
	Bw-26 / MHI 2397	O	+	I	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	x
	Bw-27 / MHI 2398	O	+	I	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	x
	Bw-28 / MHI 2399	O	+	I	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	x
	Bw-29 / MHI 2515	LI	+	I	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	x
	Bw-30 / MHI 2516	O	+	I	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	x
	Bw-31 / MHI 2517	LI	+	I	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	x
	Bw-32 / MHI 2518	O	+	I	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	x
	Bw-33 / MHI 2519	O	+	I	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	x
	Bw-34 / MHI 2520	LI	+	I	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	x
	Bw-35 / MHI 2521	LI	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	C	-	x
	Bw-36 / MHI 2522	O	-	III	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	x
	Bw-37 / MHI 2523	O	-	III	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	x
	Bw-38 / MHI 2524	UG	+	I	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	C	-	x
	Bw-39 / MHI 2525	UG	+	I	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	B+C	-	x
	Bw-40 / MHI 2526	UG	+	I	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	x
	Bw-41 / MHI 2527	UG	+	I	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	x
	Bw-42 / MHI 2528	UG	+	I	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	x
	Bw-43 / MHI 2529 <sup>d</sup>	UG	+	I	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	x

Spezies	Stämme und Isolate <sup>a</sup>	Herkunft <sup>b</sup>	Stärkeabbau	PCR									EIA		ZT	
				Genprofil	<i>hblC</i>	<i>hblD</i>	<i>hblA</i>	<i>nheA</i>	<i>nheB</i>	<i>nheC</i>	<i>ces</i>	<i>cytKI</i>	Hbl <sup>c</sup>	Nhe <sup>c</sup>	Vero	HEp-2
<i>B. cereus</i>	Bw-44 / MHI 2530	UG	+	I	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	x
	Bw-45 / MHI 2531	O	+	I	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	x
	Bw-46 / MHI 2532	UG	-	I	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	x
	Bw-47 / MHI 2533	UG	+	I	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	x
	Bw-48 / MHI 2534 <sup>d</sup>	O	-	I	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	x
	Bw-49 / MHI 2535 <sup>d</sup>	UG	+	I	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	x
	Bw-50 / MHI 2536 <sup>d</sup>	UG	+	I	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	x
	Bw-51 / MHI 2537 <sup>d</sup>	UG	+	I	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	x
	Bw-52 / MHI 2538 <sup>d</sup>	O	+	III	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	x
	Bw-53 / MHI 2539 <sup>d</sup>	O	+	I	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	x
	Bw-54 / MHI 2540 <sup>d</sup>	O	+	I	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	x
	Bw-55 / MHI 2541 <sup>d</sup>	O	-	III	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	x
	Bw-56 / MHI 2542 <sup>d</sup>	O	+	I	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	x
	Bw-57 / MHI 2543 <sup>d</sup>	O	-	III	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	x
	Bw-58 / MHI 2544 <sup>d</sup>	O	-	III	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	x
	Bw-59 / MHI 2545 <sup>d</sup>	O	-	III	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	x
	Bw-60 / MHI 2546 <sup>d</sup>	O	-	III	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	x
	Bw-61 / MHI 2556 <sup>d</sup>	O	+	I	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	x
	Bw-62 / MHI 2557 <sup>d</sup>	LI	+	I	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	x

Spezies	Stämme und Isolate <sup>a</sup>	Herkunft <sup>b</sup>	Stärke-Abbau	PCR									EIA		ZT		
				Genprofil	<i>hblC</i>	<i>hblD</i>	<i>hblA</i>	<i>nheA</i>	<i>nheB</i>	<i>nheC</i>	<i>ces</i>	<i>cytKI</i>	Hbl <sup>c</sup>	Nhe <sup>c</sup>	Vero	HEp-2	
<i>B. cereus</i>	Bw-63 / MHI 2558 <sup>d</sup>	O	+	I	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	x
	Bw-64 / MHI 2559 <sup>d</sup>	O	+	I	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	x
	Bw-65 / MHI 2560 <sup>d</sup>	O	+	I	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	x
	Bw-66 / MHI 2561 <sup>d</sup>	O	+	I	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	x
	Bw-67 / MHI 2562	O	+	I	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	x
	Bw-68 / MHI 2563 <sup>d</sup>	O	+	I	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	x
	Bw-69 / MHI 2564 <sup>d</sup>	O	+	I	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	x
	Bw-70 / MHI 2565 <sup>d</sup>	O	+	I	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	x
	Bw-71 / MHI 2566 <sup>d</sup>	O	+	III	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	x
	Bw-72 / MHI 2567 <sup>d</sup>	O	+	III	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	x
	Bw-73 / MHI 2568 <sup>d</sup>	O	-	I	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	x
	Bw-74 / MHI 2569 <sup>d</sup>	LI	+	I	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	x
	Bw-75 / MHI 2570 <sup>d</sup>	LI	+	I	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	x
	Bw-76 / MHI 2571 <sup>d</sup>	LI	+	I	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	x
	Bw-77 / MHI 2578 <sup>d</sup>	O	+	III	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	x
	Bw-78 / MHI 2579 <sup>d</sup>	LI	+	III	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	x
	Bw-79 / MHI 2580 <sup>d</sup>	O	+	II	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+
	Bw-80 / MHI 2581 <sup>d</sup>	LI	+	I	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	x
	Bw-81 / MHI 2582 <sup>d</sup>	O	-	III	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	x

Spezies	Stämme und Isolate <sup>a</sup>	Herkunft <sup>b</sup>	Stärke-Abbau	PCR									EIA		ZT	
				Genprofil	<i>hblC</i>	<i>hblD</i>	<i>hblA</i>	<i>nheA</i>	<i>nheB</i>	<i>nheC</i>	<i>ces</i>	<i>cytKI</i>	Hbl <sup>c</sup>	Nhe <sup>c</sup>	Vero	HEp-2
<i>B. cereus</i>	Bw-82 / MHI 2583 <sup>d</sup>	LI	+	III	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	x
	Bw-83 / MHI 2584 <sup>d</sup>	LI	+	I	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	x
	Bw-84 / MHI 2585 <sup>d</sup>	LI	+	I	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	x
	Bw-85 / MHI 2586 <sup>d</sup>	LI	+	I	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	x
	Bw-86 / MHI 2587 <sup>d</sup>	LI	+	I	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-
	Bw-87 / MHI 2588 <sup>d</sup>	O	+	I	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	x
	Bw-88 / MHI 2589 <sup>d</sup>	LI	+	I	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	x
	Bw-89 / MHI 2590 <sup>d</sup>	LI	-	I	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	x
	Bw-90 / MHI 2591 <sup>d</sup>	LI	+	I	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	x
	Bw-91 / MHI 2592 <sup>d</sup>	LI	+	I	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	x
	Bw-92 / MHI 2593 <sup>d</sup>	O	-	I	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	x
	Bw-93 / MHI 2594 <sup>d</sup>	O	-	II	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+
	Bw-94 / MHI 2595	LI	+	III	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	x
	Bw-95 / MHI 2596 <sup>d</sup>	LI	+	I	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	x
	Bw-96 / MHI 2597 <sup>d</sup>	LI	+	I	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	x
	Bw-97 / MHI 2598 <sup>d</sup>	O	-	I	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	x
	Bw-98 / MHI 2599 <sup>d</sup>	O	+	I	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	x
	Bw-99 / MHI 2600 <sup>d</sup>	O	+	III	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	x
	Bw-100 / MHI 2601 <sup>d</sup>	O	-	III	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	x

Spezies	Stämme und Isolate <sup>a</sup>	Herkunft <sup>b</sup>	Stärke-abbau	PCR									EIA		ZT	
				Genprofil	<i>hblC</i>	<i>hblD</i>	<i>hblA</i>	<i>nheA</i>	<i>nheB</i>	<i>nheC</i>	<i>ces</i>	<i>cytKI</i>	Hbl <sup>c</sup>	Nhe <sup>c</sup>	Vero	HEp-2
<i>B. cereus</i>	Bw-101 / MHI 2602 <sup>d</sup>	LI	-	I	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	x
	Bw-102 / MHI 2603 <sup>d</sup>	LI	-	III	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	x
	Bw-103 / MHI 2604 <sup>d</sup>	LI	+	I	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	x
	Bw-104 / MHI 2605 <sup>d</sup>	LI	+	I	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	x
	Bw-105 / MHI 2606 <sup>d</sup>	O	+	I	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	x
	Bw-106 / MHI 2607 <sup>d</sup>	O	+	III	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	x
	Bw-107 / MHI 2608 <sup>d</sup>	O	-	I	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	x
	Bw-108 / MHI 2609 <sup>d</sup>	LI	+	I	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	x
	Bw-109 / MHI 2610 <sup>d</sup>	LI	?	III	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	x
	Bw-110 / MHI 2611 <sup>d</sup>	LI	-	III	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	x
	Bw-111 / MHI 2612 <sup>d</sup>	LI	+	I	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	x
	Bw-112 / MHI 2613 <sup>d</sup>	LI	+	I	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	x
	Bw-113 / MHI 2614 <sup>d</sup>	O	-	III	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-
	Bw-114 / MHI 2615 <sup>d</sup>	LI	-	III	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	x
	Bw-115 / MHI 2616 <sup>d</sup>	LI	+	I	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	x
	Bw-116 / MHI 2617 <sup>d</sup>	LI	+	I	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	x
	Bw-117 / MHI 2618 <sup>d</sup>	LI	+	I	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	x
	Bw-118 / MHI 2619 <sup>d</sup>	LI	+	I	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	x
	Bw-119 / MHI 2620 <sup>d</sup>	LI	+	III	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	x

Spezies	Stämme und Isolate <sup>a</sup>	Herkunft <sup>b</sup>	Stärke-abbau	PCR									EIA		ZT		
				Genprofil	<i>hblC</i>	<i>hblD</i>	<i>hblA</i>	<i>nheA</i>	<i>nheB</i>	<i>nheC</i>	<i>ces</i>	<i>cytKI</i>	Hbl <sup>c</sup>	Nhe <sup>e</sup>	Vero	HEp-2	
<i>B. cereus</i>	Bw-120 / MHI 2621 <sup>d</sup>	LI	+	I	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	x
	Bw-121 / MHI 2622	LI	-	III	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	x
	Bw-122 / MHI 2623 <sup>d</sup>	LI	+	I	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	x
	Bw-123 / MHI 2624 <sup>d</sup>	LI	+	I	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	x
	Bw-124 / MHI 2625 <sup>d</sup>	LI	+	III	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	x
	Bw-125 / MHI 2626 <sup>d</sup>	LI	+	III	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	x
	Bw-126 / MHI 2627 <sup>d</sup>	LI	-	III	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	x
	Bw-127 / MHI 2628 <sup>d</sup>	LI	+	III	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	x
	Bw-128 / MHI 2629 <sup>d</sup>	LI	+	I	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	x
	Bw-129 / MHI 2630 <sup>d</sup>	LI	-	III	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	x
	Bw-130 / MHI 2631 <sup>d</sup>		-	III	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-
	Bw-131 / MHI 2632 <sup>d</sup>	LI	-	III	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	x
	Bw-132 / MHI 2633 <sup>d</sup>	LI	-	III	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	x
	Bw-133 / MHI 2634 <sup>d</sup>	LI	+	I	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	x
	Bw-134 / MHI 2635 <sup>d</sup>	LI	+	III	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	x
	Bw-135 / MHI 2636 <sup>d</sup>	O	+	I	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	x
	Bw-136 / MHI 2637 <sup>d</sup>	H	-	II	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+
	Bw-137 / MHI 2638	H	-	II	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+
	Bw-138 / MHI 2647 <sup>d</sup>	LI	-	III	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-

Spezies	Stämme und Isolate <sup>a</sup>	Herkunft <sup>b</sup>	Stärke-abbau	PCR										EIA		ZT	
				Genprofil	<i>hblC</i>	<i>hblD</i>	<i>hblA</i>	<i>nheA</i>	<i>nheB</i>	<i>nheC</i>	<i>ces</i>	<i>cytK1</i>	Hbl <sup>c</sup>	Nhe <sup>c</sup>	Vero	HEp-2	
<i>B. cereus</i>	Bw-139 / MHI 2640 <sup>d</sup>	H	+	I	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	x
	Bw-140 / MHI 2641 <sup>d</sup>	LI	+	III	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	x
	Bw-141 / MHI 2642	LI	-	III	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	x
	Bw-142 / MHI 2643	LI	-	III	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	x
	Bw-143 / MHI 2644 <sup>d</sup>	LI	+	I	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	x
	Bw-144 / MHI 2645	O	+	I	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	x
	Bw-145 / MHI 2646	O	+	I	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	x
	Bw-146 / MHI 2647	O	-	II	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+
	Bw-147 / MHI 2648	H	-	III	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	x
	Bw-148 / MHI 2649	LI	+	I	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	x
	Bw-149 / MHI 2650	LI	+	I	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	x
	Bw-150 / MHI 2651	LI	+	I	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	x
	Bw-151 / MHI 2652	LI	-	III	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	x
	Bw-152 / MHI 2653	O	-	III	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	x
	Bw-154 / MHI 2654	O	+	I	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	x
	Bw-155 / MHI 2655	O	-	II	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+
	Bw-156 / MHI 2656	O	+	I	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	x
	Bw-157 / MHI 2657	LI	-	III	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	x
	Bw-158 / MHI 2658	LI	+	I	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	x

Spezies	Stämme und Isolate <sup>a</sup>	Herkunft <sup>b</sup>	Stärke-abbau	PCR									EIA		ZT		
				Genprofil	<i>hblC</i>	<i>hblD</i>	<i>hblA</i>	<i>nheA</i>	<i>nheB</i>	<i>nheC</i>	<i>ces</i>	<i>cytKI</i>	Hbl <sup>c</sup>	Nhe <sup>e</sup>	Vero	HEp-2	
<i>B. cereus</i>	Bw-159 / MHI 2659	O	+	I	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	x
	Bw-161 / MHI 2660	H	+	I	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	x
	Bw-162 / MHI 2661	H	-	III	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	x
	Bw-163 / MHI 2662	O	-	I	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	x
	Bw-164 / MHI 2663	O	+	III	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	x
	Bw-165 / MHI 266	O	+	III	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	x
	Bw-166 / MHI 2665	O	+	I	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	x
	Bw-167 / MHI 2666	O	+	I	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	x
	Bw-168 / MHI 2667	O	+	I	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	x
	Bw-170 / MHI 2668	LI	-	III	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	x
	Bw-171 / MHI 2669	LI	+	I	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	x
	Bw-172 / MHI 2670	O	+	III	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	x
	Bw-173 / MHI 2671	H	-	III	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	x
	Bw-174 / MHI 2672	O	-	III	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	x
	Bw-175 / MHI 2673	H	-	III	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	x
	Bw-176 / MHI 2674	O	+	I	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	x
	Bw-177 / MHI 2675	O	+	I	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	x
	Bw-178 / MHI 2676	O	-	II	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+
	Bw-179 / MHI 2677	H	+	I	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	x

Spezies	Stämme und Isolate <sup>a</sup>	Herkunft <sup>b</sup>	Stärke-abbau	PCR										EIA		ZT	
				Genprofil	<i>hblC</i>	<i>hblD</i>	<i>hblA</i>	<i>nheA</i>	<i>nheB</i>	<i>nheC</i>	<i>ces</i>	<i>cytK1</i>	Hbl <sup>c</sup>	Nhe <sup>c</sup>	Vero	HEp-2	
<i>B. cereus</i>	Bw-180 / MHI 2678	O	+	I	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	x
	Bw-181 / MHI 2679	O	+	I	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	x
	Bw-182 / MHI 2680	O	+	I	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	x
	Bw-183 / MHI 2681	LI	+	I	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	x
	Bw-184 / MHI 2682	O	+	I	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	x
	Bw-185 / MHI 2683	O	+	I	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	x
	Bw-186 / MHI 2684	O	+	I	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	x
	Bw-187 / MHI 2685	O	+	I	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	x
	Bw-188 / MHI 2686 <sup>d</sup>	O	-	II	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+
	Bw-189 / MHI 2687	LI	+	I	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	x
	Bw-190 / MHI 2689	O	+	I	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	x
	Bw-191 / MHI 2690	O	+	I	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	x
	Bw-192 / MHI 2691	O	+	I	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	x
	Bw-193 / MHI 2692	O	+	I	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	x
	Bw-194 / MHI 2693	O	+	I	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	x
	Bw-195 / MHI 2694	O	+	I	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	x
	Bw-196 / MHI 2695	O	+	I	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	x
	Bw-197 / MHI 2696	O	+	III	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	x
	Bw-198 / MHI 2697	O	+	I	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	x

Spezies	Stämme und Isolate <sup>a</sup>	Herkunft <sup>b</sup>	Stärkeabbau	PCR									EIA		ZT			
				Genprofil	<i>hblC</i>	<i>hblD</i>	<i>hblA</i>	<i>nheA</i>	<i>nheB</i>	<i>nheC</i>	<i>ces</i>	<i>cytK1</i>	Hbl <sup>c</sup>	Nhe <sup>c</sup>	Vero	HEp-2		
<i>B. cereus</i>	Bw-199 / MHI 2698	O	+	I	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	x	
	Bw-200 / MHI 2699	O	+	III	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	x	
	Bw-201 / MHI 2700	O	+	III	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	x	
	Bw-202 / MHI 2701	O	+	III	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	x	
	Bw-203 / MHI 2702	UG	+	I	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	x	
	Bw-204 / MHI 2705 <sup>d</sup>		-	II	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	x
	Bw-205 / MHI 2706 <sup>d</sup>		+	I	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	x
	Bw-206 / MHI 2707		+	III	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	x
	Bw-207 / MHI 2708 <sup>d</sup>		+	I	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+
	Bw-208 / MHI 2709		+	III	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	x
	Bw-209 / MHI 2710		-	III	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	x
	Bw-210 / MHI 2711 <sup>d</sup>		+	III	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	x
	Bw-211 / MHI 2712 <sup>d</sup>		+	III	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	x
<i>B. mycooides</i>	DSM 2048	UG, Typstamm		I	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	
<i>B. thuringiensis</i>	ATCC 10792	UG, Typstamm		I	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	
	DSM6029	UG		I	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	

Spezies	Stämme und Isolate <sup>a</sup>	Herkunft <sup>b</sup>	Stärke-abbau	PCR									EIA		ZT	
				Genprofil	<i>hblC</i>	<i>hblD</i>	<i>hblA</i>	<i>nheA</i>	<i>nheB</i>	<i>nheC</i>	<i>ces</i>	<i>cytK1</i>	Hbl <sup>c</sup>	Nhe <sup>c</sup>	Vero	HEp-2
<i>B. weihenstephanensis</i>	MHI 180	LI, Typstamm	+	I	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-
	MHI 184	UG, Typstamm	-	II	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+
	MHI 188	LI, Typstamm	-	III	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-
<i>B. licheniformis</i>	DSM 13		x	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-
	MHI 250	LI	x	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	MHI 251		x	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>B. subtilis</i>	ATCC 6633		x	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	DSM 2109		x	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	MHI 254	UG	x	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Citrobacter freundii</i>	DSM 30039		x	-	-	-	-	-	-	-	-	-	x	x	x	x
<i>Enterobacter sakazakii</i>	DSM 4485		x	-	-	-	-	-	-	-	-	-	x	x	x	x
<i>Enterococcus faecium</i>	ATCC 27164		x	-	-	-	-	-	-	-	-	-	x	x	x	x
<i>Escherichia coli</i>	DSM 498		x	-	-	-	-	-	-	-	-	-	x	x	x	x
<i>Listeria monocytogenes</i>	MHI 1109		x	-	-	-	-	-	-	-	-	-	x	x	x	x
<i>Proteus mirabilis</i>	DSM 4479		x	-	-	-	-	-	-	-	-	-	x	x	x	x
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	DSM 939		x	-	-	-	-	-	-	-	-	-	x	x	x	x
<i>Salmonella infantis</i>	MHI 927		x	-	-	-	-	-	-	-	-	-	x	x	x	x
<i>Staphylococcus aureus</i>	DSM 20372		x	-	-	-	-	-	-	-	-	-	x	x	x	x
<i>Yersinia enterocolitica</i>	DSM 4780		x	-	-	-	-	-	-	-	-	-	x	x	x	x

PCR, polymerase chain reaction; EIA, Enzymimmunttest; ZT, Zytotoxizitätstest; +, positiv; -, negativ; x, nicht durchgeführt.

<sup>a</sup> ATTC, American Type Culture Collection; DSM, Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ); MHI, Stammsammlung des Lehrstuhls für Hygiene und Technologie der Milch, NVH, Norwegian Veterinary Hospital.

<sup>b</sup> GP, geringe Toxinproduktion; H, Hände; HE, humane Exkremente; LI, Lebensmittelisolat; LV, Lebensmittelvergiftung; O, Oberfläche; PS, psychrotroph; UG, Umgebung.

<sup>c</sup> +, alle drei Komponenten detektiert; L<sub>1</sub>, L<sub>2</sub>, B bzw. A, B, C; Einzelkomponente Hbl-L<sub>1</sub>, Hbl-L<sub>2</sub>, Hbl-B, NheA, NheB bzw. NheC detektiert.

<sup>d</sup> zusätzlich mit LC 480 untersucht.

## **Danksagung**

Herrn Prof. Dr. E. Märtlbauer danke ich herzlich für die Überlassung des Themas und die jederzeit gewährte freundliche Unterstützung bei der Anfertigung dieser Arbeit.

Für die Betreuung der Dissertation bedanke ich mich bei Herrn Dr. M. Moravek, sowie für die Einarbeitung in die eingesetzten molekularbiologischen Methoden bei Frau Dr. C. Bürk und Frau Dr. A. Didier.

Für die Unterstützung bei der Probenuntersuchung möchte ich Frau G. Acar, Frau D. Herrmann, Frau M. Lorbeer und Frau F. Witzko danken. Bei Herrn Dr. H. Becker bedanke ich mich für seine Hilfe bei rechtlichen und die Nomenklatur betreffenden Fragen. Herrn M. Casteel, Frau S. Gruber und ganz besonders Frau M. Becker und meiner Mutter danke ich für die sorgfältige Durchsicht der Arbeit.

Für die Finanzierung des Projektes im Rahmen des Forschungsvorhabens M/SAB1/6/A012 und die gute Zusammenarbeit danke ich dem Sanitätsdienst der Bundeswehr.

Ich danke allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Lehrstuhls für das angenehme Arbeitsklima. Bei Diana, Katja, Maria, Max, Carina, Tina und den beiden Steffis bedanke ich mich für die vielen schönen und lustigen Stunden innerhalb und außerhalb des Instituts.

Nicht zuletzt möchte ich meinen Eltern danken, dass sie mir diesen Weg ermöglicht haben.

# Lebenslauf

Esther Wehrle

geboren am 17.11.1980 in Kehl am Rhein

<b>Eltern</b>	Erika Wehrle, geb. Rösch Peter Wehrle
<b>Schulbildung</b>	1987 – 1988      Grundschule Auenheim 1988 – 1991      Falkenhausenschule Kehl 1991 – 2000      Einstein-Gymnasium Kehl
<b>Studium</b>	2000 – 2006      Tiermedizin, Ludwig-Maximilians-Universität München seit 2007          Medizintechnik, Technische Universität München
<b>Staatsexamen</b>	29.03.2006
<b>Approbation</b>	09.05.2006
<b>Berufliche Tätigkeit</b>	2006 – 2007      Praktische Tierärztin, Dick White Referrals Six Mile Bottom, UK 2007 – 2008      Wissenschaftliche Hilfskraft, Lehrstuhl für Hygiene und Technologie der Milch, LMU München 2008 – 2009      Wissenschaftliche Mitarbeiterin, Lehrstuhl für Hygiene und Technologie der Milch, LMU München seit 2009          Wissenschaftliche Hilfskraft, Labor für molekulare Gastroenterologie II. Medizinisches Department Klinikum rechts der Isar, TU München