

**Optimierung von Nachweis und Differenzierung von
Salmonella enterica, *Cronobacter sakazakii* und *Bacillus cereus*
in Milch und Milcherzeugnissen durch den Einsatz von
Zellwand-bindenden Phagenproteinen**

Koordinierung:	Forschungskreis der Ernährungsindustrie e.V. (FEI), Bonn
Forschungsstelle I:	Universität Hohenheim Institut für Lebensmittelwissenschaft und Biotechnologie FG Lebensmittelmikrobiologie Prof. Dr. Herbert Schmidt/Dr. Agnes Weiß
Forschungsstelle II:	Eidgenössische Techn. Hochschule Zürich Institut für Lebensmittelwissenschaft, Ernährung und Gesundheit Labor für Lebensmittelmikrobiologie Prof. Dr. Martin Loessner/Dr. Jochen Klumpp
Industriegruppe:	Milchindustrie-Verband e. V., Berlin
	Projektkoordinator: Dipl.-Chem. Hans-Jörg Denzler, BIOLAC GmbH & Co. KG, Harbarnsen
Laufzeit:	2010 – 2013
Zuwendungssumme:	€ 201.300,-- (Förderung durch BMWi via AiF)

Ausgangssituation:

Kontaminationen von Lebensmitteln durch bakterielle Krankheitserreger sind weltweit für eine große Zahl von Erkrankungen verantwortlich. Lebensmittel unterliegen daher aus Gründen des Verbraucherschutzes höchsten hygienischen Qualitätsansprüchen. Dieses ist auch von hoher wirtschaftlicher Bedeutung, da das Auftreten von Krankheitserregern in Lebensmittelprodukten immer wieder zu teuren imageschädigenden Rückrufaktionen führt. Infektionen mit Erregern, wie *Salmonella* oder *Cronobacter*, werden ausschließlich durch kontaminierte Lebensmittel verursacht, besonders durch Milchprodukte und andere zum Rohverzehr gedachte Lebensmittel. Andere Keime, wie *Bacillus cereus*, sind sowohl als Verderber als auch als Erreger von Lebensmittelvergiftungen gefürchtet. Der Nachweis dieser Bakterien in Lebensmitteln mittels konventionellen kulturellen Untersuchungsmethoden dauerte bisher zwischen vier und zehn Tagen. Insbesondere für Produkte mit kurzer Haltbarkeit ist diese lange Zeitspanne problematisch, da diese bis zum Vorliegen eines Ergebnisses im

Betrieb gelagert werden müssen.

Milcherzeugnisse, wie Molke- oder Sahnepulver, werden in der Industrie häufig als Zutat für andere Lebensmittel verwendet. Es wird daher eine sichere und schnelle Identifizierung von pathogenen Mikroorganismen verlangt. Die amtlichen Methoden nach DIN EN ISO, LFGB oder Food and Drug Administration (FDA) wenden ein übliches Schema von Voranreicherung, selektiver Anreicherung, Nachweis und Bestätigung an. Dies dauert zwischen drei und sechs Tagen; eine Verkürzung der Methoden ist sowohl aus ökonomischen als auch aus Produktsicherheitsgründen anzustreben.

Ziel des Forschungsvorhabens war somit die Entwicklung und Validierung schneller molekularbiologischer bzw. biochemischer Verfahren zum Nachweis und zur Differenzierung von *Cronobacter sakazakii*, *Bacillus cereus* und *Salmonella enterica* in den Lebensmittelmatrices Weichkäse, Molkepulver, Sahnepulver und Säuglingsnahrung. Der Befund, ob die Probe den Erreger enthält oder nicht, soll nach ca. 24 h er-

folgen können.

Die beteiligten Forschungsstellen setzten dazu auf eine Kombination aus einer spezifischen Anreicherung des Zielkeims aus dem Lebensmittel mittels hochaffiner Zellwand-bindender Proteine von Bakteriophagen sowie einer nachgeschalteten TaqMan-Real-Time-PCR-Detektion der Pathogene. Die TaqMan-Real-Time-PCR soll in diesem Zusammenhang zur spezifischen Identifizierung der Zielorganismen dienen. Der Einsatz zellwandbindender Proteine von Bakteriophagen für die Diagnostik von pathogenen Mikroorganismen stellt bezüglich der Sensitivität, Spezifität und der Verkürzung des Nachweisverfahrens und somit für dessen Wirtschaftlichkeit einen enormen Zugewinn dar. Die hohen Bindekonstanten der CBD/TS lassen nach Koppelung an paramagnetische Beads einen robusten Einsatz als „Bakterienfänger“ zu. Die entwickelten Methoden sollen auch in der amtlichen Lebensmittelüberwachung Anwendung finden.

Forschungsergebnis:

An beiden Forschungsstellen wurden zuerst Stammsammlungen der drei Zielkeime *S. enterica*, *C. sakazakii* und *B. cereus* aufgebaut bzw. um relevante Lebensmittelkeime erweitert, sowie Stämme ausgetauscht und die Sammlungen angeglichen.

Die Validierung für den TaqMan-Real-Time-PCR-Assay erfolgte in einem 3-Schritte-Verfahren. Die Primerpaare wurden in einem ersten Schritt in einer konventionellen PCR mit anschließender Agarosegelelektrophorese auf ihre Spezifität untersucht. Ein zweiter Schritt war die Validierung in einem SYBR®-Green-Real-Time-PCR-Assay. Anhand dessen wurde die Annealing Temperatur der Primerpaare bestimmt und die Effizienz der Reaktion mit Hilfe einer Standardkurve ermittelt. Ein dritter Schritt war die Validierung eines TaqMan-Real-Time-PCR-Assays mit geeigneten Positiv- und Negativkontrollen.

Zur Etablierung der TaqMan-Real-Time-PCR für *B. cereus* wurde zunächst das Zielgen *groEL* ausgewählt sowie ein passendes Primerpaar mit TaqMan-Sonde und einer internen Amplifikationskontrolle konstruiert. Für die Validierung des Assays dienten 35 Lebensmittelisolate der Spezies *B. cereus* und 19 Typ- und Referenzstämme als Kontrollstämme. Somit konnte die Spezifität und Sensitivität des Verfahrens bestätigt werden. Für *Cronobacter spp.* wurde das Zielgen *ompA* gewählt. Die Validierung des Assays er-

folgte mit 6 *C. malonaticus*- und 34 *C. sakazakii*-Lebensmittelisolaten sowie einem Set aus 30 Typ- und Referenzstämmen. Die Sensitivität des Verfahrens für *Cronobacter* mit interner Amplifikationskontrolle wurde mittels einer Standardkurve ermittelt. Die Effizienz der Reaktion lag hierbei bei 98,1 % und somit in einem erwartenden Bereich zwischen 90 und 105 %. Als Zielgen für *S. enterica* wurde das *invA*-Gen aus- gesucht. Auch hier erfolgten die Herstellung einer internen Amplifikationskontrolle sowie die Bestimmung der Sensitivität und Spezifität. Diese konnte mittels 30 *S. enteritidis*-Lebensmittelisolaten und 17 Kontrollstämmen, nahen Verwandten aus der Familie der *Enterobacteriaceae* und ausgewählten grampositiven Bakterienstämmen bestätigt werden.

Für die Adaption der Methoden an die Lebensmittelmatrices wurden Molkenpulver, Molkenprotein und Säuglingsnahrung gemäß ISO/TS 22964 auf *C. sakazakii*, gemäß § 64 LFGB auf *S. enterica* und gemäß § 35 LFGB sowie einer weiteren kulturellen Methode auf *B. cereus* untersucht. Anschließend wurden Aliquote dieser Pulver einmal mit dem *C. sakazakii*-Typstamm LTH 6611 und ein weiteres Mal mit dem *S. enteritidis*-Typstamm LTH 6488 inokuliert und die Wiederfindung wurde mittels Keimzahlbestimmung und RT-PCR untersucht.

Wenn Pulver mit *C. sakazakii* in einer Konzentration von 100 Kbe/g kontaminiert wurden, so war ein positiver Nachweis mit RT-PCR nach 6 h Anreicherung möglich. Der Nachweis von geringeren Keimzahlen von *C. sakazakii* war erst ab 12 bzw. 14 h möglich. Wenn Pulver mit *S. enteritidis* in den Konzentrationen von 10 Kbe/g und 100 Kbe/g kontaminiert wurden, so war ein positiver Nachweis mit RT-PCR nach 12 h Anreicherung möglich. Es ist zu erwarten, dass durch die Anwendung der Beads die Nachweisgrenze beider Zielkeime deutlich gesenkt werden kann und somit auch die Anreicherungszeit verkürzt werden kann.

In allen getesteten Pulvern konnte jedoch *B. cereus* nachgewiesen werden, weshalb von einer künstlichen Kontamination der Pulver abgesehen wurde. Die gefundenen Stämme wurden mit molekularbiologischen Methoden charakterisiert.

Um eine natürliche Kontamination zu simulieren, wurde Säuglingsnahrung mit *C. sakazakii* in unterschiedlichen Konzentrationen kontaminiert, getrocknet und bei Raumtemperatur für 4 Wochen gelagert. Die Wiederfindung von *C. sakazakii* erfolgte über die *Cronobacter*-Screening-

Bouillon (CSB) und einem Ausstrich auf dem Selektivagar *Enterobacter-sakazakii*-Isolations-Agar (ESIA). Die Simulation von geschädigten *C. sakazakii*-Zellen durch Trocknung in Säuglingsnahrung zeigte, dass Keimzahlen von 1 KbE/g und 0,1 KbE/g nach 4 Wochen Lagerung ohne Probleme sowohl kulturell als auch mittels Real-Time-PCR nachweisbar sind.

Für die Anreicherung von *B. cereus* standen bereits geeignete Enzyme in Forschungsgruppe 2 zur Verfügung. Zusätzlich zu den bereits vorhandenen und untersuchten CBD-Proteinen, welche alle ein breites, aber kein umfassendes Bindespektrum aufwiesen, wurden 15 neue CBD-Proteine identifiziert und hergestellt. Eines davon zeigte ein sehr breites Wirkspektrum und wurde in großen Mengen hergestellt. Es wurde gegen ca. 50 relevante *B. cereus*-Stämme sowie gegen einige *B. thuringiensis*, *B. mycoides* und andere Bacillen sowie nichtverwandte Grampositive Bakterien getestet. Das CBD-Protein ist selektiv und bindet nicht ausserhalb der *B.- cereus*-Gruppe.

Des Weiteren wurden zellwandbindende Tail-Spike (TS)-Proteine gegen *S. enterica* und *C. sakazakii* erforscht. Ein Phage, S16, wurde in einem parallel laufenden Projekt (nicht IGF-finanziert) isoliert und dessen TS-Proteine wurden als geeignet für die Durchführung des vorliegenden Projekts befunden. Die Arbeiten an Phage S16 wurden 2013 abgeschlossen und in einer wissenschaftlichen Zeitschrift (Molecular Microbiology) publiziert. Das TS-Protein von S16 ist identifiziert und komplett molekular charakterisiert. Sein Bindepartner (äußeres Membranprotein OmpC von *Salmonella*) wurde in einem unabhängigen Projekt identifiziert. Die Tests auf Aktivität des Proteins unter verschiedenen Salzkonzentrationen und pH-Werten lassen auf eine gute Aktivität im Lebensmittel schließen. Durch seine Größe lässt sich das TS-Protein nicht gut durch ungerichtete chemische Kopplung an die magnetischen Partikel binden. Deshalb wurde eine Modifikation des Proteins erzeugt, bei der die Kopplung gerichtet über ein Streptavidin-Biotin-System erfolgt. Damit konnten Schwankungen in der Herstellung der Proteine und deren Effizienz behoben werden. Wiederfindungsraten von 99 % sind erzielbar, auch unter nicht-optimalen pH-Werten und Salzkonzentrationen. Die bisher vorhandenen Phagenproteine gegen *C. sakazakii* haben sich im Laufe des Projekts als nicht geeignet herausgestellt - der Wirtsbereich ist zu eng und deckt (auch in Kombination) nicht genügend *C. sakazakii*-Stämme ab. Über 500 neue Phagen wurden isoliert und 30 davon nä-

her charakterisiert. Phage JDA12 hat sich als geeignet herausgestellt, deshalb wurde das TS-Protein identifiziert, rekombinant hergestellt (unter Zuhilfenahme von Faltungshelferproteinen) und auf Bindung untersucht. Es zeigt Aktivität gegen einen großen Teil der 53 *C. sakazakii*-Stämme aus der umfassenden Stammsammlung. Durch die Instabilität des Proteins bei Lagerung über mehrere Wochen werden noch verschiedene Methoden zur Erhöhung der Proteinestabilität untersucht.

Es wurden Versuche mit isolierten *Bacillus*-spezifischen CBD Proteinen, *Cronobacter*-spezifischen TS-Proteinen und *Salmonella*-spezifischen TS-Proteinen durchgeführt, um die Eignung verschiedener magnetischer Partikel (Beads) für die Verwendung als Immobilisierungsmatrix zu untersuchen. Als gut geeignet erwiesen sich die Epoxy-Dynabeads. Die Bead-Beschichtungsprozeduren wurden variiert und verbessert, um eine höhere Sättigung der Beads mit Bindeproteinen zu erreichen. Ca. 85-90 % der Beads können erfolgreich mit TS- oder CBD-Proteinen beschichtet werden. Die Wiederfindungsrate von Bakterien mit den beschichteten Beads wurde für *Salmonella* und *Bacillus* untersucht. Mit Epoxy-Beads werden für *Salmonella* ca. 80-85 % der Bakterienzahl von 200 koloniebildenden Einheiten (KBE) aus einem Volumen von 1 ml wiedergefunden, für *Bacillus* 90 %, was innerhalb der Projektspezifikationen liegt. Andere Organismen, wie *E. coli* oder *Staphylococcus*, werden zu einem weitaus geringeren Prozentsatz (< 5 %) wiedergefunden. Eine weitere massive Erhöhung der Beschichtungseffizienz und Wiederfindungsrate wurde durch die Modifikation des Proteins mit einem Biotinrest und die Verwendung von Streptavidinbeschichteten Beads erreicht. Damit können die Proteine gerichtet immobilisiert werden und es wurden Wiederfindungsraten von 99 % für *Salmonella* erreicht. Keine *E. coli* oder andere verwandte Organismen werden mit dem Streptavidin-System detektiert.

Für *Bacillus*-CBD-beschichtete magnetische Partikel wurden Versuche in Lebensmitteln durchgeführt. In verdünnter flüssiger Säuglingsmilch sind die Bindeproteine uneingeschränkt aktiv und Wiederfindungsraten von 90 % lassen sich erzielen. Eine Reduktion der künstlichen Kontamination auf 10 bzw. 1 KBE pro ml resultierte in keiner Verschlechterung der Wiederfindungsrate.

Für *Salmonella* wurden ebenfalls Versuche in Lebensmitteln durchgeführt (flüssige Säuglingsnahrung, Schokoladenmilch). Mit dem hier entwi-

ckelten System lassen sich 10 KBE von *Salmonella* in einem Volumen von 1 ml nachweisen; wenn das Detektionsvolumen auf 10 ml erhöht wird, lassen sich 1 KBE *Salmonella* pro 10 ml nachweisen. Beides liegt weit über den Projektspezifikationen.

Wirtschaftliche Bedeutung:

Das Vorkommen von bakteriellen Krankheitserregern stellt ein ernstzunehmendes Problem in der Lebensmittelindustrie dar. Lebensmittel und deren Rohstoffe sollten generell frei von Krankheitserregern sein, dies ist jedoch in der Praxis unmöglich zu erreichen. Milcherzeugnisse, wie Molke- oder Sahnepulver, werden oft als Zutat für andere Lebensmittel verwendet. Es wird eine sichere und schnelle Identifizierung von pathogenen Mikroorganismen verlangt, welche in der Regel aber zwischen drei und sechs Tagen dauert; eine Verkürzung der Methoden ist deshalb sowohl aus ökonomischen als auch aus Produktsicherheitsgründen anzustreben.

Vertreter von *Salmonella enterica* gehören zu den häufigsten bakteriellen Erregern humaner lebensmittelbedingter Durchfallerkrankungen in Deutschland. Erzeugnisse aus rohen Eiern, Milch und Milcherzeugnisse sind besonders gefährdet für eine Kontamination mit Enteritis-Salmonellen. Eine Kontamination der Produkte oder Zwischenprodukte kann primär über die Rohmilch oder sekundär über Rekontamination während der Verarbeitung stattfinden.

Cronobacter sakazakii (syn. *Enterobacter sakazakii*) kann bei Säuglingen und Kleinkindern lebensbedrohliche Erkrankungen wie Meningitis, nekrotisierende Enterokolitis und Sepsis verursachen. Die Übertragung durch Säuglingsanfangsnahrung führte zu mehreren kleinen Ausbrüchen mit schweren Erkrankungen und einigen Todesfällen.

Bacillus cereus kann das Diarrhoe-Syndrom und das emetische Syndrom verursachen. Während das emetische Syndrom durch ein Peptid, das Cereulid, verursacht wird, sind für die Diarrhoe das hitzelabile Enterotoxin Hämolyysin BL (HBL), das nicht-hämolytische Toxin Nhe und das Protein Toxin CytK hauptverantwortlich. Im Milchsektor waren Rohmilch, pasteurisierte Milch und Milchpulver in Ausbrüche verwickelt. Problematisch sind insbesondere Milchtrockenprodukte als Säuglings- und Kleinkindernahrung.

Im Rahmen des Forschungsvorhabens wurde eine neuartige, hochspezifische Methodik zur Anreicherung

und Identifizierung von *Salmonella enterica*, *Cronobacter spp.* und *Bacillus cereus* entwickelt. Mittels spezifischen, zellwandbindenden Proteinen von Bakteriophagen kann die Zeit für die Anreicherung der Zielkeime in flüssigen Lebensmitteln auf unter 5 Stunden verkürzt werden. Eine nachgeschaltete, hochspezifische TaqMan-Real-Time-PCR-Methode identifiziert den gefundenen Keim zweifelsfrei anhand genetischer Charakteristika. Die Methode ist schnell, zielführend und spezifisch. Für die Umsetzung im industriellen Labor muss außer einem Real-Time-PCR-Gerät (welches oft bereits vorhanden ist) kein zusätzliches Gerät angeschafft werden. Die Durchführung erfordert kein speziell ausgebildetes Personal und die Komponenten des Detektionssystems können kostengünstig in großen Mengen hergestellt werden. Diese sind bei geeigneter Lagerung Wochen oder Monate haltbar. All diese Vorteile ermöglichen auch kleinen und mittelständischen Unternehmen die Durchführung aussagekräftiger und verlässlicher Tests auf bakterielle Krankheitserreger, was unweigerlich zu einer Erhöhung der Lebensmittelsicherheit führen wird.

Die entwickelte Methodik übertrifft bereits in Teilen die gesetzlichen Vorgaben für den Nachweis von pathogenen bakteriellen Keimen in Lebensmitteln. So ist es beispielsweise möglich, eine einzelne KBE von *Salmonella* aus 1 ml Lebensmittel mit 99%iger Wahrscheinlichkeit zu detektieren. Eine Kommerzialisierung des Systems ist angestrebt.

Publikationen (Auswahl):

1. FEI-Schlussbericht 2013.
2. Zimmermann, J., Schmidt, H., Loessner, M.J. und Weiss, A.: Development of a rapid detection system for opportunistic pathogenic *Cronobacter spp.* in powdered milk products. *Food Microbiol.* 42, 19-25 (2014).
3. Zimmermann, J., Klumpp, J., Weiss, A., Loessner, M.J. und Schmidt, H.: Fast, Faster Phage – Schneller Nachweis von Krankheitserregern in Milcherzeugnissen. *lab & more* 1, 30-35 (2014).
4. Marti, R., Zurfluh K., Hagens, S., Pianezzi, J., Klumpp, J. und Loessner, M.J.: Long tail fibres of the novel broad-host-range T-even bacteriophage S16 specifically recognize *Salmonella* OmpC. *Mol. Microbiol.* 87, 818-834 (2013).

Weiteres Informationsmaterial:

Universität Hohenheim
Institut für Lebensmittelwissenschaft und
Biotechnologie
FG Lebensmittelmikrobiologie
Garbenstr. 28, 70593 Stuttgart
Tel.: +49 711 4592-3156
Fax: +49 711 4592-4199
E-Mail: hschmidt@uni-hohenheim.de

Eidgenössische Techn. Hochschule Zürich
Institut für Lebensmittelwissenschaft, Ernährung
und Gesundheit
Labor für Lebensmittelmikrobiologie
Schmelzbergstr. 9, CH- 8092 Zürich
Tel.: +41 1 632-3335
Fax: +41 1 632-1266
E-Mail: Martin.Loessner@ilw.agrl.ethz.ch

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

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

gefördert durch/via:



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