

Etablierung einer risikoorientierten Diagnostik für enteropathogene *Bacillus cereus*

- Anschluss zu AiF 17506 N -

Koordinierung:	Forschungskreis der Ernährungsindustrie e.V. (FEI), Bonn
Forschungsstelle I:	Universität München Lehrstuhl für Hygiene und Technologie der Milch, Oberschleißheim Prof. Dr. Erwin Märtlbauer/Dr. Nadja Jeßberger
Forschungsstelle II:	Veterinärmedizinische Universität Wien Department für Pathobiologie Institut für Mikrobiologie Abt. Funktionelle Mikrobiologie Prof. Dr. Monika Ehling-Schulz
Industriegruppe:	Milchindustrie-Verband e.V. (MIV), Berlin
	Projektkoordinator: Reinhard Endt Karwendel-Werke Huber GmbH & Co., Buchloe
Laufzeit:	2015 – 2018
Zuwendungssumme:	€ 498.320,-- (Förderung durch BMWi via AiF/FEI)

Ausgangssituation:

Bacillus cereus ist ein ubiquitärer Bodenkeim, der über die Rohstoffe leicht in die Lebensmittelproduktion mit eingebracht werden kann. Neben dem Produktverderb besteht das Hauptproblem in der Pathogenität des Bakteriums aufgrund der Hitze-resistenz der Endosporen und vor allem der Toxinbildung. Enteropathogene Stämme lösen Lebensmittelinfektionen in Form von Diarrhö aus. Bislang gibt es keine definierten Kriterien, anhand derer potentielle Krankheitserreger und harmlose Stämme unterschieden werden können. Lebensmittelproduzierenden Unternehmen fehlt deshalb bislang eine wissenschaftlich fundierte Entscheidungshilfe für die Freigabe bzw. Sperrung kontaminierter Produkte.

Im Rahmen des vorangegangenen IGF-Projekts AiF 17506 N wurde ein Set an enteropathogenen sowie apathogenen *B. cereus*-Stämmen hinsichtlich Präsenz, Transkription und Expression von Virulenzfaktoren vergleichend charakterisiert. Es wurde dabei allerdings deutlich, dass weitere Pathogenitätsparameter, wie die Interaktion der Bakterien mit dem Wirtsmilieu sowie mit Lebensmitteln, eine entscheidende Rolle spielen.

Ziel des Forschungsvorhabens war es, aufbauend auf den Ergebnissen dieses Vorgängerprojekts, eine Risikoanalyse enteropathogener *B. cereus* basierend auf der Interaktion der Bakterien mit Darmepithelzellen sowie Lebensmitteln vorzunehmen. Zur Erstellung eines ganzheitlichen Risikobewertungsschemas sollten Parameter, wie Motilität, Auskeimungs- und Adhäsionsfähigkeit, und die Sekretion von Toxinen und Markerproteinen unter simulierten Darmbedingungen, vergleichend untersucht werden.

Forschungsergebnis:

Die Untersuchungen ergaben, dass Motilität, Auskeimung sowie Adhäsion an Darmepithelzellen stark stammspezifisch waren. Stark und schwach toxische Stämme unterschieden sich anhand dieser Parameter nicht. Dennoch können diese Fähigkeiten wichtige zusätzliche Virulenzfaktoren sein. Die Toxinbildung aller getesteten Stämme wurde unter simulierten Darmbedingungen ange-regt. Der bislang unbekannt Faktor wird von den Zellen bereits vor Kontakt mit *B. cereus* sezerniert, ist kleiner als 3 kDa und hitzestabil.

Durch eine Gesamt-RNA-Sequenzierung sowie Analysen des Surfaceoms wurden neue, putative Marker identifiziert. Diese sind verschiedene Exoproteasen, Collagenase, Flagellin, S-Layer sowie „Moonlight“-Proteine. Starke Toxinproduzenten zeigten bereits nach kurzer Zeit eine hohe (Metallo-)Proteaseaktivität, schwache Toxinproduzenten eine sehr geringe. Deutliche Unterschiede konnten auch im Exoproteasemuster und in der caseinolytischen Aktivität nachgewiesen werden. Das System zur Anzucht unter simulierten Darmbedingungen wurde getestet und für routinetauglich befunden. Die Marker, die bislang mittels ELISA oder in Blots detektiert werden können, sind die Enterotoxine Nhe und Hbl, Sphingomyelinase, Phospholipase C, Collagenase, die Metalloproteasen InhA1 und NprA, Flagellin sowie weitere Proteasen. In Sekretomstudien konnten NheB, Sphingomyelinase und Phospholipase C als für hochtoxische Stämme charakteristische Proteine identifiziert und mittels Western/Slot-Blots bestätigt werden.

Sporen aller Stämme überlebten die Magenpassage stammsspezifisch für mindestens 1 h. In Magensaft versetzt mit Folgemilch überlebten die Sporen kaum, gefolgt von lactosefreier Milch, Milchreis, 1,5 %, 3,5 % Milch, Sahne und Mascarpone. Nach Zugabe der Lebensmittel sank auch die toxische Wirkung der *B. cereus*-Kulturüberstände, da Lebensmittel- (vor allem Milch-) Komponenten an die einzelnen Enterotoxinkomponenten banden und somit vermutlich ihre Interaktion blockierten.

Für eine umfassende Risikobewertung müssen die Eigenschaften der kontaminierten Lebensmittel, die Keimzahl, sowie alle Pathogenitätsparameter eines *B. cereus*-Isolats berücksichtigt werden, die im Rahmen dieses Vorhabens und des Vorläuferprojekts ermittelt wurden. Da letztere Parameter z.T. nur durch aufwändige Tests untersucht werden können, werden diese durch einen Schnelltest ersetzt, der die Enterotoxine sowie zusätzliche hier ermittelte Virulenzfaktoren detektiert. Es konnte gezeigt werden, dass das neu entwickelte Immuno-Slot-Blot-System prinzipiell zur Toxizitätsbeurteilung geeignet ist. Es kann daher als Grundlage zur Entwicklung von neuen, verbesserten Schnelltests zur Abschätzung des enterotoxinogenen Potentials von *B. cereus*-Stämmen dienen.

Wirtschaftliche Bedeutung:

Es existieren keine statistischen Erhebungen über den durch *B. cereus* bundesweit entstehenden Schaden für die Milchindustrie, allerdings bewegt sich dieser nach Schätzungen von Industrievertretern pro Jahr zweifellos im zweistelligen Millionenbereich. Zum einen werden Lebensmittel, die

nur gering oder mit nicht gesundheitsgefährdenden *B. cereus* kontaminiert sind, umsonst vernichtet, was gerade für kleine und mittelständische Unternehmen einen immensen wirtschaftlichen Schaden bedeuten kann. Zum anderen kann eine Kontamination mit gesundheitsgefährdenden *B. cereus* einen Lebensmittelinfektionsausbruch nach sich ziehen, was neben dem Verlust des Verbrauchervertrauens auch rechtliche Konsequenzen für die Hersteller hat.

Ein quantitativer Schnelltest für *B. cereus*-Toxine sowie Virulenzfaktoren und ein belastbares Risikobewertungsschema sind also für die Unternehmen unabdingbar. Im Rahmen des Vorhabens wurden Virulenzfaktoren identifiziert sowie Tests zu deren Nachweis etabliert. Zusätzlich fließen Parameter, wie die Keimzahl, und das belastete Lebensmittel selbst mit ein. Hiermit wurde die Basis zur Bewertung von Gefahren für die Verbrauchergesundheit geschaffen. Der wirtschaftliche Vorteil für die Unternehmen liegt dabei vor allem in der schnellen, auf objektiven Daten beruhenden Entscheidung hinsichtlich Freigabe oder Sperrung von Produktchargen.

Von den Ergebnissen profitieren vor allem milcherzeugende und milchverarbeitende Betriebe, aber auch Unternehmen aus anderen Lebensmittelsparten, wie der Gewürz-, Gemüse- und Süßwarenindustrie sowie auch Hersteller von Convenience-Produkten, Lebensmittelzusatzstoffen oder diätetischen Lebensmitteln. Gleiches gilt für Hersteller von Säuglings- und Kleinkindernahrung, Teigwaren, Backwaren und Cerealien.

Publikationen (Auswahl):

1. FEI-Schlussbericht 2018.
2. Jeßberger, N., Dietrich, R., Mohr, A.K., Da Riolo, C. & Märtlbauer, E.: Porcine gastric mucin triggers toxin production of enteropathogenic *Bacillus cereus*. *Infect. Immun.* 87 (4), e00765-18. doi: 10.1128/IAI.00765-18 (2019).
3. Jeßberger, N., Kranzler, M., Da Riolo, C., Schwenk, V., Buchacher, T., Dietrich, R., Ehling-Schulz, M. & Märtlbauer, E.: Assessing the Toxic Potential of Enteropathogenic *Bacillus cereus*. *Food Microbiol.* 84, 103276. doi: 10.1016/j.fm.2019.103276 (2019).
4. Da Riolo, C., Dietrich, R., Märtlbauer, E. & Jeßberger, N.: Consumed Foodstuffs Have a Crucial Impact on the Toxic Activity of Enteropathogenic *Bacillus cereus*. *Front. Microbiol.* doi: 10.3389/fmicb.2018.01946 (2018).
5. Didier, A., Dietrich, R. & Märtlbauer, E.: Antibody Binding Studies Reveal Conformational Flexibility of the *Bacillus cereus* Non-Hemolytic Enterotoxin (Nhe) A-Component. *PLoS ONE* 11 (10), e0165135. doi: 10.1371/journal.pone.0165135 (2016).

Weiteres Informationsmaterial:

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

Veterinärmedizinische Universität Wien
Department für Pathobiologie
Institut für Mikrobiologie
Abt. Funktionelle Mikrobiologie
Veterinärplatz 1, 1210 Wien, Österreich
Tel.: +43 1 25077-2461
Fax: +43 1 25077-2479
E-Mail: monika.ehling-schulz@vetmeduni.ac.at

Forschungskreis der Ernährungsindustrie e.V. (FEI)
Godesberger Allee 125, 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 125, 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.