Entwicklung und Validierung schneller und selektiver Verfahren zum Nachweis von Salmonella enterica, Cronobacter spp. und Bacillus cereus in Milcherzeugnissen

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

Fakultät Naturwissenschaften Universität Hohenheim



Institut für Lebensmittelwissenschaft und Biotechnologie Fachgebiet Lebensmittelmikrobiologie

> vorgelegt von Jennifer Zimmermann

> > aus Reutlingen 2014

Dekan:	Prof. Dr. Heinz Breer
1. berichtende Person und Prüfer:	Prof. Dr. Herbert Schmidt
2. berichtende Person und Prüfer:	Prof. DrIng. habil. Jörg Hinrichs
3. Prüfer:	Prof. Dr. Martin Lössner
Eingereicht am:	11. März 2014
Mündliche Prüfung am:	27. Juni 2014

# Inhaltsverzeichnis

AbkürzungsverzeichnisIV		
Abbilo	dungsverzeichnis	VI
Tabell	lenverzeichnis	XIII
1. Ei	inleitung	1
1.1	Die Bacillus cereus-Gruppe	2
1.2	Das Genus Cronobacter	
1.3	Salmonella enterica	4
1.4	Mikrobiologische Qualität von Trockenmilchprodukten	5
1.5	Trockenmilcherzeugnisse Einteilung und Herstellung	
1.6	Nachweisverfahren in Lebensmitteln	10
1.7	Zielsetzung der vorliegenden Arbeit	17
2. M	laterial und Methoden	
2.1	Trockenmilchprodukte	<b>18</b> 
2.1 2.2	Trockenmilchprodukte	18 18 18
2.1 2.2 2.3	Trockenmilchprodukte Bakterienstämme Nährmedien und Puffer	18 18 18 26
2.1 2.2 2.3 2.4	Trockenmilchprodukte Bakterienstämme Nährmedien und Puffer Kultivierungsbedingungen	18 18 18 26 32
<ul><li>2.1</li><li>2.2</li><li>2.3</li><li>2.4</li><li>2.5</li></ul>	Trockenmilchprodukte Bakterienstämme Nährmedien und Puffer Kultivierungsbedingungen DNA-Isolierung und Quantifizierung	
<ul> <li>2.1</li> <li>2.2</li> <li>2.3</li> <li>2.4</li> <li>2.5</li> <li>2.6</li> </ul>	Trockenmilchprodukte Bakterienstämme Nährmedien und Puffer Kultivierungsbedingungen DNA-Isolierung und Quantifizierung Molekulare Differenzierung von <i>Bacillus cereus</i>	
<ul> <li>2.1</li> <li>2.2</li> <li>2.3</li> <li>2.4</li> <li>2.5</li> <li>2.6</li> <li>2.</li> </ul>	Trockenmilchprodukte Bakterienstämme Nährmedien und Puffer Kultivierungsbedingungen DNA-Isolierung und Quantifizierung Molekulare Differenzierung von <i>Bacillus cereus</i>	
2.1 2.2 2.3 2.4 2.5 2.6 2. 2. 2.	Trockenmilchprodukte Bakterienstämme Nährmedien und Puffer Kultivierungsbedingungen DNA-Isolierung und Quantifizierung Molekulare Differenzierung von <i>Bacillus cereus</i>	
<ul> <li>2.1</li> <li>2.2</li> <li>2.3</li> <li>2.4</li> <li>2.5</li> <li>2.6</li> <li>2.</li> </ul>	Trockenmilchprodukte Bakterienstämme Nährmedien und Puffer Kultivierungsbedingungen DNA-Isolierung und Quantifizierung Molekulare Differenzierung von <i>Bacillus cereus</i> 6.1 Amplifikation der 16S rDNA 6.2 Partielle Sequenzierung der 16S rDNA 6.3 Random Amplified Polymorphic DNA PCR zur Unterscheidung	
2.1 2.2 2.3 2.4 2.5 2.6 2. 2. 2. 2. 2. <i>B</i>	Trockenmilchprodukte Bakterienstämme Nährmedien und Puffer Kultivierungsbedingungen DNA-Isolierung und Quantifizierung Molekulare Differenzierung von <i>Bacillus cereus</i> 6.1 Amplifikation der 16S rDNA 6.2 Partielle Sequenzierung der 16S rDNA 6.3 Random Amplified Polymorphic DNA PCR zur Unterscheidung <i>Bacillus</i> cereus Isolate	

2.7.1	Random Amplified Polymorphic DNA PCR zur Unterscheidung der
Cronoba	cter spp. Isolate
2.7.2	Spezifische konventionelle PCR zur Differenzierung von
Cronoba	cter malonaticus und Cronobacter sakazakii
2.8 Spez	zifischer Nachweis von Bacillus cereus, Cronobacter spp. und
Salmonella	enterica
2.8.1	Etablierung konventioneller PCR Verfahren
2.8.1.1	Etablierung eines konventionellen PCR Verfahrens für den
spezifis	schen Nachweis von <i>Bacillus cereus</i>
2.8.1.2	Etablierung eines konventionellen PCR Verfahrens für den
spezifis	schen Nachweis von <i>Cronobacter</i> spp 44
2.8.1.3	Etablierung eines konventionellen PCR Verfahrens für den
spezifis	schen Nachweis von Salmonella enterica
2.8.1.4	Agarosegelelektrophorese47
2.8.2	Etablierung von SYBR <sup>®</sup> Green Real-Time PCR Verfahren
2.8.2.1	Ermittlung der optimalen Annealing-Temperatur 47
2.8.2.2	Spezifitätsprüfung des SYBR <sup>®</sup> Green Real-Time PCR Verfahrens
mittels	Schmelzkurvenanalyse
2.8.2.3	Erstellung einer Standardkurve für einen optimierten Assay 50
2.8.3	Etablierung von TaqMan Real-Time PCR Assays 51
2.8.3.1	TaqMan Sonden Design51
2.8.3.2	Ermittlung der optimalen Annealing-Temperatur
2.8.3.3	Herstellung einer internen Amplifikationskontrolle
2.8.3.4	Bestimmung der Sensitivität der TaqMan Real-Time PCR mittels
einer S	tandardkurve61
2.8.3.5	Bestimmung der Spezifität der TaqMan Real-Time PCR Verfahren 62
2.9 Kultu	Irelle Nachweisverfahren für die Zielkeime Bacillus cereus, Cronobacter
spp. und Sa	almonella enterica
2.9.1	Bestimmung von <i>Bacillus cereus</i> in Trockenmilchprodukten
2.9.2	Bestimmung von Cronobacter sakazakii in Trockenmilchprodukten 63
2.9.3	Bestimmung von Salmonella enterica in Trockenmilchprodukten 64

2	2.10	Nac	chweis von Cronobacter sakazakii und Salmonella enterica in künstlich	
ŀ	konta	minie	erten Trockenmilchpulvern65	,
	2.1	0.1	Künstliche Kontamination von rekonstituierten Trockenmilchpulvern mit	
	Crc	onoba	a <i>cter sakazakii</i> und Salmonella Enteritidis65	,
	2.1	0.2	Trocknungsversuche von künstlich kontaminierter Säuglingsnahrung	
	mit	Cror	nobacter sakazakii	;
3.	Erg	jebni	isse70	)
3	3.1	Diff	erenzierung von <i>Cronobacter</i> spp70	)
	3.1	.1	Random Amplified Polymorphic DNA PCR zur Unterscheidung der	
	Crc	noba	acter spp. Isolate	)
	3.1	.2	Spezifische konventionelle PCR zur Differenzierung von	
	Crc	onoba	acter malonaticus und Cronobacter sakazakii71	
	3.2	Spe	zifischer Nachweis von <i>Bacillus cereus</i>	;
	3.3	Spe	zifischer Nachweis von <i>Cronobacter</i> spp	)
	3.4	Spe	zifischer Nachweis von Salmonella enterica 103	;
3	3.5	Unt	ersuchung der Trockenmilchprodukte auf die Zielkeime Bacillus cereus,	
(	Crono	obaci	ter spp. und Salmonella enterica116	;
	3.5	.1	Überprüfung auf die Anwesenheit von Bacillus cereus 116	;
	3.5	.2	Überprüfung auf die Anwesenheit von Cronobacter sakazakii 118	;
	3.5	.3	Überprüfung auf die Anwesenheit von Salmonella enterica 119	)
3	3.6	Nac	chweis der Zielkeime in künstlich kontaminiertem Trockenmilchpulver 120	)
	3.6	.1	Künstliche Kontamination von rekonstituierten Trockenmilchpulvern 120	)
	3.6	.2	Künstliche Kontamination von pulverförmiger Säuglingsnahrung mit	
	deh	nydrie	erten <i>Cronobacter sakazakii</i> LTH 6611 Zellen 127	,
4.	Dis	kuss	sion 131	
5.	Zus	samr	nenfassung 145	;
6.	Lite	eratu	rverzeichnis	5

# Abkürzungsverzeichnis

ATCC	American Type Culture Collection
a <sub>w</sub> -Wert	Wasseraktivität
bp	Basenpaare
BHI	Hirn-Herz-Bouillon
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
BPW	Gepuffertes Peptonwasser
CSB	Cronobacter Screening Bouillon
Ct-Wert	Cycle Threshold
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DSMZ	Deutsche Stammsammlung von Mikroorganismen und
	Zellkulturen GmbH
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EFSA	European Food Safety Authority
ESIA	Enterobacter sakazakii Isolations Agar
FDA	Food and Drug Administration
g	Gramm
g	Erdbeschleunigung
ISO	Internationale Organisation für Normung
IAC	Interne Amplifikationskontrolle
KbE	Koloniebildende Einheit
kb	Kilobasen
LFGB	Lebensmittel- und Futtermittelgesetzbuch
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
LTH	interne Bezeichnung für Bakterienstämme des
	Fachgebietes Lebensmittelmikrobiologie der Universität
	Hohenheim
Μ	Mol/I
MilchErzV	Milcherzeugnisverordnung
min	Minute

ml	Milliliter
mLST	Modifizierte Laurylsulfat- Tryptose Bouillon
n	Nano
NaCl	Natriumchlorid
NTC	No template control
NCBI	National Center for Biotechnology Information
RAPD	Randomly amplified polymorphic DNA
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PEMBA	Polymyxin-Pyruvat-Eigelb-Mannit-Bromthymolblau-Agar
RT-PCR	Real-Time Polymerase Chain Reaction
rRNA	Ribosomale Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehung per Minute
RVS	Rappaport-Vassiliadis Anreicherungsbouillon
S	Sekunde
Таq	Thermus aquaticus
TE	Tris/EDTA
Tris-HCI	Tris-(hydroxymethyl)-Aminomethan-Hydrochlorid
TSPB	Trypton-Soja-Polymyxin-Bouillon
U	Unit
VO	Verordnung
WHO	Weltgesundheitsorganisation
XLD	Xylose-Lysin-Deoxycholat
z.B.	Zum Beispiel
μg	Mikrogramm

### Abbildungsverzeichnis

Abbildung 3: Agarosegel (2 %) mit den RAPD-PCR-Mustern von ausgewählten *Cronobacter* Lebensmittelisolaten (Tabelle 10) erhalten durch den Primer UBC 245.

Abbildung 7: Schmelzkurvenanalyse der SYBR<sup>®</sup> Green Real-Time PCR für den spezifischen Nachweis von *B. cereus* bei einer Schmelztemperatur von 81 °C. ..... 78

Abbildung 8: Erstellung der Standardkurve zur Bestimmung der Reaktionseffizienz für die SYBR<sup>®</sup> Green Real-Time PCR zum spezifischen Nachweis von *B. cereus*. Dargestellt ist die errechnete Standardkurve. X-Achse = Logarithmus der DNA

Abbildung 15: Validierung der TaqMan Real-Time PCR mit interner Amplifikationskontrolle zum Nachweis von *B. cereus*. Dargestellt sind beispielhaft die Amplifikationskurven von 13 ausgewählten *B. cereus* Lebensmittelisolaten und 13 Negativkontrollstämmen. X-Achse = Ct-Werte; Y-Achse = Zunahme der Fluoreszenz. 88

Abbildung 19: Erstellung der Standardkurve zur Bestimmung der Reaktionseffizienz für die SYBR<sup>®</sup> Green Real-Time PCR zum spezifischen Nachweis von *Cronobacter* spp. Dargestellt sind die Amplifikationskurven der Verdünnungsreihe für die Ermittlung der Ct-Werte. X-Achse = Ct-Werte; Y-Achse = Zunahme der Fluoreszenz.

Abbildung 20: Ermittlung der optimalen Annealing-Temperatur für die TaqMan Real-Time PCR zum spezifischen Nachweis von *Cronobacter* spp.. Dargestellt sind die Amplifikationskurven der getesteten Annealing-Temperaturen. X-Achse = Ct-Werte; Y-Achse = Zunahme der Fluoreszenz. 94

Abbildung 25: Validierung der TaqMan **Real-Time** PCR mit interner Amplifikationskontrolle zum Nachweis von Cronobacter spp.. Dargestellt sind Amplifikationskurven ausgewählten beispielhaft die von 21 Cronobacter

Abbildung 28: Schmelzkurvenanalyse der SYBR<sup>®</sup> Green Real-Time PCR für den spezifischen Nachweis von *S. enterica* bei einer Schmelztemperatur von 81 °C ... 105

Abbildung 29: Erstellung der Standardkurve zur Bestimmung der Reaktionseffizienz für die SYBR<sup>®</sup> Green Real-Time PCR zum spezifischen Nachweis von *S. enterica*. Dargestellt ist die errechnete Standardkurve. X-Achse = Logarithmus der DNA Konzentrationen (Log starting quantity); Y-Achse = Ct-Werte. Die berechnete Effizienz (E) lag bei 103,2 %, die Linearität der Standardkurve bei R^2=0,996..... 106

Abbildung 41: Vergleich des kulturellen Wachstums von *S.* Enteritidis LTH 6488 auf Xylose-Lysin-Deoxycholat Agar mit einer Inokulum-Konzentration von 10 KbE/g in verschiedenen rekonstituierten Trockenmilchprodukten und einer Inkubation bei 37 °C. X-Achse = Anreicherungsdauer in Stunden; Y-Achse = Keimzahlen in KbE/g.

Abbildung 42: Vergleich des kulturellen Wachstums von *S.* Enteritidis LTH 6488 auf Xylose-Lysin-Deoxycholat Agar mit einer Inokulum-Konzentration von 100 KbE/g in verschiedenen rekonstituierten Trockenmilchprodukten und einer Inkubation bei 37 °C. X-Achse = Anreicherungsdauer in Stunden; Y-Achse = Keimzahlen in KbE/g.

# Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Untersuchungen zum Vorkommen von B. cereus in Milchpulver
Tabelle 2: Untersuchungen zum Vorkommen von <i>C. sakazakii</i> in pulverförmiger Säuglingsnahrung
Tabelle 3: Einteilung der Trockenmilcherzeugnisse nach Spreer (2011) undMilchErzV (Anonym, 1970)9
Tabelle 4: Zusammenstellung verschiedener molekularbiologischer Methoden zum         Nachweis von <i>B. cereus</i> 12
Tabelle 5: Zusammenstellung verschiedener molekularbiologischer Methoden zumNachweis von Cronobacter spp
Tabelle 6: Zusammenstellung verschiedener molekularbiologischer Methoden zumNachweis von Salmonella enterica
Tabelle 7: Übersicht über die verwendeten pulverförmigen Trockenmilchprodukte 18
Tabelle 8: Verwendete Typ- und Referenzstämme
Tabelle    9:    Verwendete    B.    cereus    und    B.    thuringiensis    Lebensmittelisolate      unterschiedlicher    Herkunft    21
Tabelle    10:    Verwendete    C.    malonaticus    und    C.    sakazakii    Lebensmittelisolate      unterschiedlicher    Herkunft    23
Tabelle 11: Verwendete S. Enteritidis Lebensmittelisolate unterschiedlicher Herkunft

Tabelle 12: Verwendete Primer für die Amplifikation der 16S rDNA
Tabelle 13: Reaktionsansatz für die 16S rDNA PCR mit den Primern 616V und 630R
Tabelle 14: PCR-Programm für die 16S rDNA PCR mit den Primern 616V und 630R
Tabelle 15: Verwendeter Primer für die partielle 16S rDNA Sequenzierung
Tabelle    16:    Reaktionsansatz    für die Cycle-Reaktion der partiellen    16S rDNA      Sequenzierung
Tabelle 17: Amplifikationsprogramm f         ür die Cycle-Reaktion der partiellen 16S rDNA         Sequenzierung       36
Tabelle 18: Verwendeter Primer zur Differenzierung der B. cereus Isolate mit der         RAPD-PCR         37
Tabelle 19: Reaktionsansatz für die RAPD-PCR zur Differenzierung der B. cereus      Isolate      37
Tabelle 20: PCR-Programm für die RAPD-PCR zur Differenzierung der <i>B. cereus</i> Isolate mit dem Primer M13V38
Tabelle 21: Verwendeter Primer zur Differenzierung der Cronobacter Isolate mit der         RAPD-PCR         39
Tabelle 22: Reaktionsansatz f        General and General

Tabelle 23: PCR-Programm für die RAPD-PCR zur Differenzierung der Cronobacter
Isolate mit dem Primer UBC245 39
Tabelle 24: Verwendete Primer für die rpoB Gen spezifische PCR zur Differenzierung
von C. malonaticus und C. sakazakii
Tabelle 25: Reaktionsansatz für die rpoB Gen spezifische PCR zur Differenzierung
von C. malonaticus und C. sakazakii
Tabelle 26: PCR-Programm für die rpoB Gen spezifische PCR zur Charakterisierung
von C. sakazakii
Tabelle 27: PCR-Programm für die rpoB Gen spezifische PCR zur Charakterisierung
von <i>C. malonaticus</i>
Tabelle 28: Verwendete Primer für den spezifischen Nachweis von <i>B. cereus</i> 43
Tabelle 29: Reaktionsansatz für das konventionelle PCR Verfahren für den
spezifischen Nachweis von <i>B. cereus</i>
Tabelle 30: PCR-Programm für das konventionelle PCR Verfahren für den
spezifischen Nachweis von <i>B. cereus</i>
Tabelle 31: Verwendete Primer für den spezifischen Nachweis von Cronobacter spp.
Tabelle 32: Reaktionsansatz für das konventionelle PCR Verfahren für den
spezifischen Nachweis von Cronobacter spp
Tabelle 33: PCR-Programm für das konventionelle PCR Verfahren für den
spezifischen Nachweis von <i>Cronobacter</i> spp

Tabelle 34: Verwendete Primer für den spezifischen Nachweis von S. enterica ...... 46

Tabelle 35: Reaktionsansatz für das konventionelle PCR Verfahren für denspezifischen Nachweis von S. enterica46

Tabelle 36: PCR-Programm für das konventionelle PCR Verfahren für denspezifischen Nachweis von S. enterica46

Tabelle 38: PCR-Programm für das SYBR® Green Real-Time PCR Verfahren für dieDurchführung eines Temperaturgradienten48

Tabelle 39: PCR-Programm für die Schmelzkurvenanalyse der SYBR® Green Real-Time PCR für Cronobacter spp.49

Tabelle 41: PCR-Programm für die Aufzeichnung einer Standardkurve der SYBR®Green Real-Time PCR für Cronobacter spp.50

Tabelle 42: PCR-Programm für die Aufzeichnung einer Standardkurve der SYBR®Green Real-Time PCR für *B. cereus* und *S. enterica*51

Tabelle 43: Verwendete TaqMan Sonden für den spezifischen Nachweis von *B. cereus*, *Cronobacter* spp. und *S. enterica* mittels der TaqMan Real-Time PCR .. 52

Tabelle 44: Reaktionsansatz zur Bestimmung der optimalen Annealing-Temperatur der TaqMan Real-Time PCR für *B. cereus*, *Cronobacter* spp. und *S. enterica* ....... 53

Tabelle 45: PCR-Programm zur Bestimmung der optimalen Annealing-Temperatur der TaqMan Real-Time PCR für *B. cereus*, *Cronobacter* spp. und *S. enterica* ....... 53

Tabelle 48: PCR Programm der konventionellen PCR zur Konstruktion der internenAmplifikationskontrolle für Cronobacter spp. und S. enterica56

Tabelle 52: Verwendete TaqMan Sonden der TaqMan Real-Time PCR für dieDetektion der internen Amplifikationskontrolle für *B. cereus*, *Cronobacter* spp. und*S. enterica*60

Tabelle 54: PCR-Programm der TaqMan Real-Time PCR für den spezifischenNachweis von Cronobacter spp.61

Tabelle 55: PCR-Programm der TaqMan Real-Time PCR für den spezifischenNachweis von *B. cereus* und *S. enterica*61

Tabelle 60: Ergebnisse der spezifischen konventionellen PCR zur Charakterisierungvon C. sakazakii mit dem Primerpaar Csak75

Tabelle 61: Darstellung der Ct-Werte mit den zugehörigen Annealing-Temperaturenfür den TaqMan Real-Time PCR Assay zum Nachweis von *B. cereus*81

Tabelle 62: Dezimale Verdünnungsreihe der internen Amplifikationskontrolle für dieTaqMan Real-Time PCR zum Nachweis von *B. cereus*82

Tabelle63:BestimmungderoptimalenVerdünnungsstufeaninternerAmplifikationskontrolle für den Einsatz in der TaqMan Real-Time PCR zum Nachweisvon B. cereus.83

Tabelle 66: Dezimale Verdünnungsreihe der internen Amplifikationskontrolle für dieTaqMan Real-Time PCR zum Nachweis von Cronobacter spp.95

Tabelle67:BestimmungderoptimalenVerdünnungsstufeaninternerAmplifikationskontrolle für den Einsatz in der TaqMan Real-Time PCR zum Nachweisvon Cronobacter spp.96

Tabelle 68: Darstellung der Ct-Werte der errechneten Standardkurve der TaqManReal-Time PCR zum spezifischen Nachweis von Cronobacter spp.98

Tabelle 70: Dezimale Verdünnungsreihe der internen Amplifikationskontrolle für dieTaqMan Real-Time PCR zum Nachweis von S. enterica109

Tabelle 71: Bestimmung der optimalen IAC Verdünnungsstufe für den Einsatz in derTaqMan Real-Time PCR zum Nachweis von S. enterica110

### 1. Einleitung

Kontaminationen von Milcherzeugnissen, insbesondere von Milchpulver, durch Mikroorganismen pathogene stellen ein bedeutendes Risiko von lebensmittelbedingten Infektionen beim Menschen dar. Milchpulver ist ein vielseitig einsetzbares Produkt und wird vor allem als Zusatz für Lebensmittel verwendet. Besonders im Bereich der pulverförmigen Säuglingsnahrung ist Milchpulver ein Hauptbestandteil und somit eine Grundlage für die Ersatzernährung bei Säuglingen. Von der FAO und WHO (2004) wurden Cronobacter spp. und Salmonella als wichtigste Verursacher von Infektionen bei Säuglingen identifiziert, die durch den Konsum von pulverförmiger Nahrung ausgelöst werden (FAO und WHO, 2004). Cronobacter spp. kann lebensbedrohliche Erkrankungen wie nekrotisierende Enterokolitis, Sepsis oder Meningitis bei Säuglingen und Kleinkindern auslösen. den meist verbreitetesten Salmonella dagegen gehört zu Erregern von gastrointestinalen Infektionen beim Menschen und der Sporenbildner Bacillus cereus spielt eine wichtige Rolle als Lebensmittelvergifter. In pulverförmigen Nahrungen können sich diese drei Keime zwar nicht vermehren, sie sind jedoch dort lange überlebensfähig. Somit werden höchste hygienische Anforderungen an Milchpulver gestellt und es besteht ein großer Bedarf an schnellen und zuverlässigen Methoden zum Nachweis von B. cereus, Cronobacter spp. und S. enterica. Die amtlichen Nachweismethoden nach DIN EN ISO oder Lebensmittelund Futtermittelgesetzbuch (LFGB) bestehen üblicherweise aus einer Voranreicherung, gefolgt von einer selektiven Anreicherung, einem anschließenden Nachweis auf festen Selektivmedien sowie aufwändigen Bestätigungsreaktionen. Diese rein kulturellen Verfahren sind mit einem hohen Arbeitsaufwand verbunden und erfordern bis zu einer eindeutigen Speziesidentifizierung fünf bis sechs Tage. Diese lange erhebliche wirtschaftliche und ökonomische Zeitspanne können Verluste verursachen, da sich die Lagerzeit der Produkte bis zum Weiterverkauf verlängert oder es zu einem Rückruf der Lebensmittel kommen kann. Eine Zeitersparnis ermöglichen daher molekularbiologische Methoden, wie die Polymerase-Kettenreaktion (PCR). Da die Real-Time PCR jedoch im Vergleich zu der konventionellen PCR mit einem geringeren Arbeits- und Zeitaufwand verbunden ist und dadurch einen direkten Nachweis der Zielorganismen liefert, war es Ziel dieser Arbeit eine spezifische TaqMan Real-Time PCR zum Nachweis von *B. cereus*, *Cronobacter* spp. und *S. enterica* zu entwickeln. Um einen Nachweis über das Vorhandensein des Keims innerhalb von 24 Stunden zu erhalten, sollte die Real-Time PCR mit einer Anreicherung über Nacht kombiniert werden. Dadurch können die aufwendigen kulturellen Schritte der Standardmethoden massiv verkürzt werden.

#### 1.1 Die Bacillus cereus-Gruppe

Die Vertreter der *B. cereus*-Gruppe, die eine sehr homogene Untergruppe des Bacillus darstellt. sporenbildende fakultativ Genus sind und anaerobe Stäbchenbakterien. Diese Gruppe besteht aus den Arten: Bacillus anthracis Milzbrandes), B. cereus sensu stricto, Bacillus cytotoxicus, (Verursacher des Bacillus mycoides, Bacillus pseudomycoides, Bacillus thuringiensis und Bacillus weihenstephanensis (Guinebretiere et al., 2012; Dzieciol et al., 2013). B. cereus ist ein Lebensmittelverderber und kann lebensmittelbedingte Erkrankungen, den emetischen Typ und den diarrhöischen Typ, verursachen. Das emetische Syndrom wird durch eine Intoxikation des von B. cereus gebildeten Toxins Cereulid verursacht (Dommel et al., 2010). Der Krankheitsverlauf, mit Übelkeit und Erbrechen, tritt 0,5 bis 6 Stunden nach Aufnahme von kontaminierter Nahrung auf (Ehling-Schulz et al., 2004). Bei dem Diarrhö-Syndrom handelt es sich um eine Toxi-Infektion, verursacht durch die Aufnahme von vegetativen B. cereus Zellen oder Sporen (Clavel et 2004). Die Symptome dieser al.. Erkrankung sind Unterleibsschmerzen und wässrige Durchfälle, die durch die Bildung von Enterotoxinen im Dünndarm ausgelöst werden (Drobniewski et al., 1993). Die Infektionsdosis beider Symptome liegt bei 10<sup>5</sup> bis 10<sup>8</sup> Zellen oder Sporen (Granum und Lund, 1997). Die niedrigste Dosis B. cereus (200 KbE/g Lebensmittel) wurde während eines Ausbruches in Norwegen gefunden (Stenfors Arnesen et al., 2008).

*B. cereus* ist ein großer (1  $\mu$ m bis 5  $\mu$ m) mesophiler Organismus und hat die Fähigkeit sich in einem Temperaturbereich zwischen 10 und 50 °C zu vermehren. Die optimale Wachstumstemperatur liegt dabei zwischen 35 und 40 °C (Stenfors Arnesen et al., 2008). Die meisten *B. cereus* Stämme bilden unterschiedliche

extrazelluläre Enzyme und Toxine, die für die Pathogenität wichtige Faktoren darstellen (Vilas-Bôas et al., 2007). *B. mycoides* und *B. pseudomycoides* sind unbeweglich und weisen ein rhizoides Koloniewachstum auf, wodurch sie von den anderen Spezies der *B. cereus* Gruppe unterschieden werden können (Nakamura, 1998). *B. thuringiensis* wird häufig als Pestizid eingesetzt. Er produziert parasporale Kristalle, die gegenüber Insekten eine toxische Wirkung zeigen (Vilas-Bôas et al., 2007). *B. weihenstephanensis* hat die Eigenschaft bei 7 °C zu wachsen, jedoch nicht bei 43 °C. Dafür verantwortlich ist das Vorhandensein von Signalsequenzen der 16S rDNA und das Kälteschockgen *cspA*. Anhand dessen kann *B. weihenstephanensis* von *B. cereus* und *B. mycoides* unterschieden werden (Lechner et al., 1998).

#### 1.2 Das Genus Cronobacter

Cronobacter spp. wurde ursprünglich als gelb pigmentierter Enterobacter cloacae beschrieben und 1980 von Farmer et al. aufgrund molekularbiologischer und phänotypischer Eigenschaften zu einer neuen Spezies, Enterobacter sakazakii, umgruppiert (Farmer et al., 1980). Diese wurde anhand einer partiellen 16S rDNA Analyse in 16 verschiedene biochemische Gruppen eingeteilt (Iversen et al., 2006). Im Jahr 2007 erfolgte eine Umbenennung in das neue Genus Cronobacter gen. nov.. Dies wurde anhand von Ribotypisierung, phänotypischen Eigenschaften, f-amplified fragment length polymorphism (f-AFLP), DNA-DNA Hybridisierung und 16S rDNA Gensequenzierung bestätigt (Iversen et al., 2007a, 2007b). Das Genus Cronobacter ist taxonomisch der Familie der Enterobacteriaceae zugeordnet und besteht aus den Spezies Cronobacter sakazakii, Cronobacter malonaticus, Cronobacter turicensis, Cronobacter muytjensii, Cronobacter dublinensis mit drei Unterarten C. dublinensis, C. lausannensis und C. lactaridi, Cronobacter condimenti, Cronobacter universalis sowie den kürzlich beschriebenen reklassifizierten Spezies neu Cronobacter zurichensis, Cronobacter helveticus und Cronobacter pulveris (Iversen et al., 2007a, 2007b, 2008b; Joseph und Forsythe, 2012; Yan et al., 2012; Brady et al., 2013, Oren und Garrity, 2013). Zu den typischen Eigenschaften des Genus Cronobacter gehören die Bildung eines gelben Pigmentes (Farmer et al., 1980) und die α-Glukosidase Aktivität (Muytjens et al., 1984). Die α-Glukosidase Aktivität konnte

in allen getesteten Stämmen nachgewiesen werden, jedoch bilden nicht alle Stämme eine gelbe Pigmentierung auf Trypton-Soja-Agar bei 25 °C (Iversen und Forsythe, 2007). *C. sakazakii* ist in der Lage in menschliche Darmepithelzellen einzudringen und dafür ist das Protein A der äußeren Membran (OmpA) verantwortlich (Nair und Venkitanarayanan, 2007). Das *ompA* Gen hat eine spezifische Sequenz zum Nachweis von *Cronobacter* spp. das in allen Mitgliedern des Genus vorhanden ist (Nair und Venkitanarayanan, 2006; Dong et al., 2013). Sieben Spezies des Genus können lebensbedrohliche Erkrankungen, wie Meningitis, Bakteriämien und nekrotisierende Enterokolitis, bei Neugeborenen und Kleinkindern auslösen (Joseph und Forsythe, 2012), für die Spezies *C. zurichensis, C. helveticus* und *C. pulveris* konnte jedoch bisher keine Verbindung mit Erkrankungen beim Menschen gezeigt werden (Masood et al., 2013). Joseph und Forsythe (2011) fanden zudem heraus, dass besonders die *C. sakazakii* Variante ST4 (sequence type 4) bei Ausbrüchen mit Neugeborenen vorkommt.

Eine Differenzierung innerhalb des Genus *Cronobacter* ist mittels 16S rDNA Sequenzierung schwierig (Li et al., 2012). Dies zeigten bereits Lehner et al. (2004) anhand einer Untersuchung von 13 *C. sakazakii* Stämmen. Dabei konnten 99,4 bis 100 % Sequenzähnlichkeiten festgestellt werden (Lehner et al., 2004). Die Spezies *C. malonaticus* wurde ursprünglich als eine Subspezies von *C. sakazakii* beschrieben und deshalb können diese Spezies mittels einer 16S rDNA Analyse nicht voneinander unterschieden werden (Iversen et al., 2007a). Die *rpoB* Gen Sequenz wurde daher für bakterielle phylogenetische Analysen beschrieben und damit zur Unterscheidung zwischen sehr eng verwandten Spezies. Das *rpoB* Gen ist ein universelles Gen in Bakterien und kodiert für die  $\beta$ -Untereinheit der RNA Polymerase (Adékambi et al., 2008). Stoop et al. (2009) entwickelten zur Identifikation des Genus *Cronobacter* eine *rpoB* Gen spezifische PCR, die eine Differenzierung zwischen *C. malonaticus* und *C. sakazakii* ermöglicht.

#### 1.3 Salmonella enterica

Das Genus Salmonella wurde von Lignières im Jahr 1900 beschrieben und Kauffmann fasste 1961 alle Salmonella Isolate als eine Spezies auf, bevor er 1966

eine Einteilung nach den serologischen Eigenschaften vornahm. Das Genus besteht aus zwei Spezies, *Salmonella enterica* und *Salmonella bongori*. *S. enterica* ist in sechs Subspezies unterteilt: *S. enterica* subsp. *enterica*, *S. enterica* subsp. *salamae*, *S. enterica* subsp. *arizonae*, *S. enterica* subsp. *diarizonae*, *S. enterica* subsp. *houtenae* und *S. enterica* subsp. *indica*. Es handelt sich um 0,7-1,5 x 2-5 µm lange, bewegliche und fakultativ anaerobe Stäbchenbakterien (Garrity et al., 2005).

Die Invasion in intestinale Epithelzellen ist essentiell für die Pathogenese von *Salmonella*. Das 1989 von Galán und Curtiss (Galán und Curtiss, 1989) entdeckte *invA* Gen ist dafür ein wichtiges Gen. Es kodiert für ein Typ-III Sekretionssystem und befindet sich auf der *Salmonella*-Pathogenitätsinsel 1 (SP 1). Anhand der Verwendung dieses spezifischen Gens in konventionellen oder Real-Time PCR Verfahren ist es möglich *Salmonella* zu über 90 % erfolgreich in verschiedenen Lebensmittelproben nachzuweisen (Malorny et al., 2003).

Im Jahr 2012 erkrankten in Deutschland 20.849 Menschen an einer Infektion mit *Salmonella* (Anonym, 2012a). Nach einer Analyse in den Jahren von 2001 bis 2005 der World Health Organisation (WHO) konnten 65 % der Ausbrüche dem Serovar Enteritidis, 12 % dem Serovar Typhimurium und 4 % dem Serovar Newport zu geordnet werden. Infektionen mit *Salmonella* führen zu Magen-Darm-Entzündungen, Bakteriämie, Sepsis und Fieber. Die Inkubationszeit beträgt 6 bis 12 Stunden bis zum Auftreten der Symptome, wie Übelkeit, Erbrechen und wässrigen Durchfällen (Tschäpe und Bockemühl, 2002; Sánchez-Vargas et al., 2011).

#### 1.4 Mikrobiologische Qualität von Trockenmilchprodukten

Pulverförmige Säuglingsnahrung ist kein steriles Produkt, daher sind niedrige Konzentrationen an Mikroorganismen selbst bei einer kontrollierten Produktion nicht auszuschließen. Studien haben gezeigt, dass die häufigsten vorkommenden Mikroorganismen in pulverförmiger Säuglingsnahrung und anderen Trockenmilchprodukten *Cronobacter, Salmonella* und *B. cereus* sind. Alle drei Spezies sind in der Lage die Trocknung zu überleben und stellen so eine große Gefahr für die Produkt- und Verbrauchersicherheit dar (Doyle und Mazzotta, 2000; Ehling-Schulz et al., 2004; Chenu und Cox, 2009).

*B. cereus* Sporen sind in der Milchindustrie schwer zu kontrollieren (Andersson et al., 1995). Das Auftreten von *Bacillus* spp. in Milchprodukten stellt daher auch nach wie vor ein Problem für die Unternehmen dar, da die Sporen die Pasteurisierung oder die Trocknung der Milchpulver überleben können (Ehling-Schulz et al., 2004). In Tabelle 1 ist dazu das Vorkommen und die Kontaminationshöhe von *B. cereus* speziell in Milchpulvern gezeigt. Die Prävalenz von *Bacillus* spp. in Milchpulvern ist hoch, doch die in den Studien untersuchten Pulvern enthielten dagegen nur geringe Keimzahlen.

Probenzahl	Positive Proben	Keimzahl in KbE/g	Referenz
94	27	5 - 450	Wong et al., 1988
92	48	0,3 - 100	Becker et al., 1994
29	10	3 - 10	Reyes et al., 2007

Tabelle 1: Untersuchungen zum Vorkommen von B. cereus in Milchpulver

Salmonella spp. können aus verschiedenen Lebensmitteln, wie Fleisch und Fleischprodukten, Ei und Eiprodukten, Milch und Trockenmilchprodukten isoliert werden (Tschäpe und Bockemühl, 2002). Eine Studie von Leuschner et al. (2004) konnte dazu das Vorhandensein von Salmonella spp. in pulverförmiger Säuglingsnahrung zeigen. Es konnte eine Konzentration von 10 KbE/g mittels der Standardmethode ISO 6579:2002 festgestellt werden. Von Cahill et al. (2007) konnte das Vorhandensein von Salmonella Zellen in pulverförmiger Säuglingsnahrung bestätigt werden. Es wurden von dieser Arbeitsgruppe sechs Ausbrüche bei Kleinkindern beschrieben und in Verbindung mit dem Konsum von kontaminierter getrockneter Milchnahrung gebracht werden.

Cronobacter spp. kommen ubiquitär vor und die wichtigste Quelle für Infektionen stellt Säuglingsnahrung auf Milchpulverbasis dar (Bowen und Braden, 2006). In

Tabelle 2 sind verschiedene Studien zum Vorkommen und Gehalt an *C. sakazakii* in pulverförmiger Säuglingsnahrung dargestellt.

Probenzahl	Positive Proben	Keimzahl in KbE/g	Referenz
141	20	1	Muytjens et al., 1988
120	8	0,04	Nazarowec-White und Farber, 1997
131	7	n. a. <sup>a</sup>	Iversen und Forsythe, 2004
23	4	n. a.	Shaker et al., 2007

Tabelle2:UntersuchungenzumVorkommenvonC. sakazakiiinpulverförmigerSäuglingsnahrung

<sup>a</sup>n. a. = nicht angegeben

Mikroorganismen können entweder während des Herstellungsprozesses oder nach der Fertigstellung des Trockenmilchproduktes dessen mikrobiologische Qualität beeinflussen (Kielwein, 1994). Das Risiko einer Kontamination mit *Cronobacter* spp. während der Herstellung von Säuglingsnahrung oder anderen getrockneten Lebensmitteln ist hoch, da Milchpulver Hauptbestandteil von Säuglingsnahrung ist (O'Brien et al., 2009a). *C. sakazakii* wurde auch bereits in Milchpulver- und Milchprotein produzierenden Anlagen isoliert (Craven et al., 2010). In einer Studie von Jacobs et al. (2011) konnte ebenfalls *C. sakazakii* in Sprühtrocknungs- und Walzentrocknungsanlagen von verschiedenen Betrieben isoliert werden. Die von Mullane et al. (2008) untersuchten Kontaminationswege zeigten außerdem, dass eine Kontamination des Endproduktes über Luftfilter in der Produktion möglich wäre. Denn *Cronobacter* spp. sind in der Lage, den Trocknungsprozess von Milchpulvern durch Wärmetoleranz zu überleben (Chenu und Cox, 2009). Die Resistenz gegenüber Austrocknung macht *Cronobacter* spp. das Überleben in pulverförmiger Säuglingsnahrung bei einem a<sub>w</sub>-Wert von ca. 0,2 möglich (Breeuwer et al., 2003).

*S. enterica* können ebenfalls bei niedrigen a<sub>w</sub>-Werten in getrockneten Lebensmitteln überleben (Doyle und Mazzotta, 2000). In einer Studie von Mattick et al. (2000) konnten die getesteten *Salmonella* Stämme bei einem a<sub>w</sub>-Wert von 0,92 auch noch nach einer Lagerung von fünf Monaten nachgewiesen werden. Dies konnte auch für *C. sakazakii* gezeigt werden, denn *C. sakazakii* ist in der Lage zwei Jahre in pulverförmiger Säuglingsnahrung bei einem a<sub>w</sub>-Wert von 0,27 zu überleben (Edelson-Mammel et al., 2005). Dies konnte die Studie von Barron und Forsythe, (2007) bestätigen, hier war der Nachweis von *C. sakazakii* in künstlich kontaminierter pulverförmiger Säuglingsnahrung nach einer Lagerzeit von 2,5 Jahren noch möglich. Für Trockenmilcherzeugnisse sind aus diesem Grund mikrobiologische Kriterien gemäß der Verordnung (EG) Nr. 1441/2007 der Kommission vom 5. Dezember 2007 festgelegt. Es dürfen z.B. in 10 g getrockneter Säuglingsnahrung keine *Enterobacteriaceae* nachweisbar sein. Hingegen sind Konzentrationen von *Bacillus* Sporen zwischen 50 und 500 KbE/g erlaubt.

#### 1.5 Trockenmilcherzeugnisse Einteilung und Herstellung

Gemäß der Verordnung der Milcherzeugnisse (Milcherzeugnisverordnung, MilchErzV) und Spreer (2011) werden die Trockenmilcherzeugnisse nach ihrer Zusammensetzung, Fett- und Proteingehalt eingeteilt. In Tabelle 3 ist die Einteilung der Trockenmilcherzeugnisse dargestellt.

Bezeichnung	Zusammensetzung	Fettgehalt in 100	Protein-
		Gewichtsteilen	gehalt in %
Magermilchpulver	aus ungesäuerter Milch,	≥ 1	36
	5 % Wassergehalt		
Sahnepulver	aus Sahneerzeugnissen,	mind. 42,0	36
	5 % Wassergehalt		
Vollmilchpulver	aus molkereimäßig	mind. 26,0	25
	bearbeiteter Milch oder		
	Sahne, 5 % Wassergehalt		
Süßmolkenpulver	durch weitgehenden	mind. 10,0	11 – 15
	Entzug des Wassers aus		
	Süßmolke, mit höchstens		
	5 % Wasser, Gehalt an Milchzucker mindestens		
	Molkenprotein	hergestellt aus Süß- oder	mind. 10,0
	Sauermolke durch		
	weitgehenden Entzug von		
	Wasser, höchstens 7 %		
	Wassergehalt		

**Tabelle 3:** Einteilung der Trockenmilcherzeugnisse nach Spreer (2011) und MilchErzV(Anonym, 1970)

Trockenmilchprodukte sind vielseitig einsetzbar und werden zur Herstellung von vielen Lebensmitteln wie z.B. Back- und Süßwaren, Schokolade oder Speiseeis verwendet. Pulverförmige Säuglingsnahrung besteht hauptsächlich aus Milchpulver, dem unterschiedliche Zusätze, wie Vitamine und Mineralstoffe, beigemischt werden (Heller, 2006).

Das gängigste Verfahren für die Trocknung von Milchprodukten ist die Sprühtrocknung. Für die Herstellung von Säuglingsnahrung wird sprühgetrocknetes Milchpulver verwendet und zur Herstellung von Molkenpulver dient Süßmolke als Ausgangsstoff (Spreer, 2011). Die Herstellung von pulverförmiger Säuglingsnahrung erfolgt häufig auf zwei Arten. Zum einen wird das Milchpulver mit Vitaminen und Mineralien gemischt und in Wasser aufgelöst. Danach erfolgen die Pasteurisierung bei 85 °C und eine Sprühtrocknung. Desweiteren kann Säuglingsnahrung auch in einem trockenen Prozess hergestellt werden. Dazu wird das Pulver mit den zusätzlichen Nährstoffen gut gemischt, gefiltert, mit Stickstoff begast und anschließend verpackt (Mullane et al., 2007).

#### 1.6 Nachweisverfahren in Lebensmitteln

Eine Reihe an kulturellen und molekularbiologischen Nachweisverfahren für *B. cereus, Cronobacter* spp. und *S. enterica* aus Lebensmitteln wurde bereits beschrieben. Der kulturelle Nachweis und die genaue Bestimmung von *B. cereus* erfolgen nach nationalen und internationalen Standards (Ehling-Schulz und Messelhäusser, 2013). Eine dieser Standardmethoden wird von § 64 Lebensmittel-, und Futtermittelgesetzbuch (LFGB) beschrieben. Dabei handelt es sich um die Methode L 01.00-53:1992. Dieses Verfahren enthält eine selektive Anreicherung in Trypton-Soja-Polymyxin-Bouillon und die Isolierung von *B. cereus* erfolgt auf Polymyxin-Eigelb-Mannitol-Bromthymolblau Agar (Anonym 1992). Zur Verbesserung des kulturellen Nachweises von *B. cereus* haben Fricker et al. (2008) zwei neue chromogene Medien beurteilt. Dabei wurde das *B. cereus* group plating Medium als geeigneter bewertet, da es im Vergleich zu den Standardmedien die Begleitflora besser hemmen kann.

Eine Methode zum Nachweis von *C. sakazakii* wurde von der U. S. Food and Drug Administration (FDA) vorgeschlagen (Anonym, 2002). Dieses Verfahren beinhaltet eine Voranreicherung in gepuffertem Peptonwasser, gefolgt von einer spezifischen Anreicherung in *Enterobacteriaceae* Bouillon und ein anschließender Ausstrich auf Violett-Rot-Galle-Glukose Agar. Auf diesem Agar bildet *C. sakazakii* purpurfarbene Kolonien mit purpurfarbenem Gallensäurenpräzipitathof, und wird letztlich auf Trypton-Soja Agar anhand der Bildung des gelben Pigmentes nachgewiesen. Eine ähnliche Methode wurde von der International Organization for Standardization und der International Dairy Federation als ISO/TS 22964 Methode beschrieben (Anonym, 2006a). Bei dieser Methode erfolgt zuerst eine unselektive Voranreicherung in gepuffertem Peptonwasser, gefolgt von einer selektiven Anreicherung in modifizierter Laurylsulfat-Tryptose Bouillon Vancomycin. Anschließend mit erfolat die Identifizierung C. sakazakii blau-grüne von als Kolonien auf dem Enterobacter sakazakii Isolations Agar. Dieser Agar macht sich die α-Glukosidase-Aktivität von Cronobacter spp. zu Nutze (siehe Kapitel 1.2), weshalb Cronobacter spp. blau-grüne Kolonien bilden. Diese gefundenen Kolonien sollten jedoch noch zusätzlich auf Trypton-Soja Agar ausgestrichen werden und die erhaltenen gelben Kolonien sind dann ein Indiz für den Nachweis von C. sakazakii (Anonym, 2006a). Ein neues Anreicherungsmedium zur ergänzenden Anwendung von chromogenen Nährmedien wurde von der Arbeitsgruppe Iversen et al. (2008) beschrieben. Die Cronobacter Screening Bouillon dient zur Identifizierung des Genus in künstlich als natürlich Cronobacter sowohl auch in kontaminierten Lebensmittelproben. Alle getesteten Zielorganismen (n=229) konnten ohne Zweifel in dieser Bouillon nachgewiesen werden (Iversen et al., 2008).

Die amtliche Untersuchung zum Nachweis von *Salmonella* spp. erfolgt nach § 64 LFGB, Methode L00.00-20, 2004-12 (Anonym 2008). Dabei erfolgt zunächst eine unselektive Anreicherung in gepuffertem Peptonwasser über Nacht, gefolgt von einer selektiven Anreicherung in Rappaport-Vassiliadis Bouillon und die Identifikation erfolgt auf Xylose-Lysin-Deoxycholat Agar mit anschließenden biochemischen Tests zur endgültigen Speziesidentifizierung. Die neueren kulturellen Methoden kombinieren jedoch nur eine Anreicherung in einem selektiven Medium, gefolgt von einer Isolierung auf einem chromogenen Agar, dadurch wird die Begleitflora durch die selektiven Zusatzstoffe im Medium unterdrückt (Margot et al., 2013).

Die derzeit verwendeten kulturellen Verfahren zum Nachweis von *B. cereus, Cronobacter* spp. und *S. enterica* sind mit einem hohen Arbeits- und Materialaufwand verbunden. Daher besteht der Bedarf diese kulturellen Verfahren durch schnellere und genauso zuverlässige, wie durch molekularbiologische Nachweisverfahren zu ergänzen oder zu ersetzen. Dafür eignen sich vor allem PCR Methoden, die auf einen Nachweis von spezifischen Genabschnitten beruhen. Zahlreiche PCR Verfahren wurden in den letzten Jahren zum Nachweis von *B. cereus,*  Cronobacter spp. und S. enterica entwickelt. Eine Übersicht der molekularbiologischen Verfahren ist in den Tabellen 4 bis 6 zusammengestellt.

**Tabelle 4:** Zusammenstellung verschiedener molekularbiologischer Methoden zumNachweis von *B. cereus* 

Methode	Zielgen	Sensitivität in KbE/g	Lebensmittel- matrix	Referenz
konventionelle PCR	hblA, hblC, nheA <sup>a</sup>	10 <sup>4</sup>	Trockenmilch	Gracias und McKillip, 2011
Real-Time PCR	16S rDNA	0,1	Gelatine	Reekmans et al., 2009
Real-Time PCR	gyr₿ <sup>⊳</sup>	1,91 x 10 <sup>3</sup>	Milch, Sahne	Dzieciol et al., 2013
Real-Time PCR	ces <sup>c</sup>	10 <sup>3</sup> - 10 <sup>5</sup>	Reis	Fricker et al., 2007
Real-Time PCR	pc-plc <sup>d</sup>	60	rekonstituierte Säuglingsnahrung	Martínez- Blanch et al., 2009

<sup>a</sup>Enterotoxin Gene

<sup>b</sup>Gyrase B Gen

<sup>c</sup>Cereulid Synthetase Gen

<sup>d</sup>Phosphatidylcholin-Phospholipase C Gen

Für den Einsatz von Real-Time PCR Nachweisverfahren in der Diagnostik sollte das System eine interne Amplifikationskontrolle und/ oder eine Zielgen spezifische Sonde vorweisen (Dzieciol et al., 2013). Bei den entwickelten Verfahren von Gracias und McKillip (2011) und Martínez-Blanch et al. (2009) wurde eine interne Amplifikationskontrolle jedoch nicht mit einbezogen. Denn nur eine Real-Time PCR mit einer nicht Ziel-DNA Sequenz als Amplifikationskontrolle kann falsch-negative Ergebnisse ausschließen. Reekmanns et al. (2009) beschrieb dagegen eine TaqMan Real-Time PCR mit einer Amplifikationskontrolle für die Bestimmung von *B. cereus* in Gelatine. Der Nachweis dieser PCR erfolgt über die 16S rDNA, doch konserviertere Gene, wie das *groEL* Gen, sind als Marker für den Nachweis von *B. cereus* besser geeignet. Chang et al. (2003) haben dazu bereits auf der Basis der Sequenz des *groEL*-Gens die phylogenetische Verwandtschaft von *B. cereus* Stämmen untersucht. Das *groEL*-Gen codiert für ein Protein, das für die Faltung der Proteine in Pro- und Eukaryoten verantwortlich ist. Dieses Gen ist in allen Spezies der *B. cereus* Gruppe vorhanden und garantiert daher eine sichere Identifizierung aller Spezies (Chang et al., 2003).

Eine spezifische Real-Time PCR zum Nachweis des emetischen Toxin Genes *ces* wurde von Fricker et al. (2007) entwickelt und die PCR Nachweisverfahren von Gracias und McKillip (2011) und Martínez-Blanch et al. (2009) basieren auf den spezifischen Nachweis von Enterotoxin Genen (Tabelle 4). Diese Methoden erlauben jedoch nicht den Nachweis und die Bestimmung von emetischen und nichtemetischen *B. cereus* in einem Verfahren, sondern nur für eine der beiden Spezies.

Methode	Zielgen	Sensitivität in KbE/g	Lebensmittel- matrix	Referenz
konventionelle PCR	ompA <sup>a</sup>	10 <sup>-1</sup>	rekonstituierte Säuglingsnahrung	Nair und Venkitanaraya nan, 2006
Real-Time PCR	MMS Operon <sup>b</sup>	0,6	rekonstituierte Säuglingsnahrung	Seo und Brackett, 2005
Real-Time PCR	MMS Operon <sup>b</sup>	1 - 1,2 x 10 <sup>3</sup>	rekonstituierte Säuglingsnahrung	Wang et al., 2012
Real-Time PCR	16S rDNA	10 <sup>3</sup>	nicht vorhanden	Malorny und Wagner, 2005
Real-Time PCR	ITS <sup>c</sup>	1,1	rekonstituierte Säuglingsnahrung	Liu et al. 2006a

**Tabelle 5:** Zusammenstellung verschiedener molekularbiologischer Methoden zumNachweis von Cronobacter spp.

<sup>a</sup>kodiert für das Protein A der äußeren Membran

<sup>b</sup>Makromolekulare Synthese Operon

<sup>c</sup>internal transcribed spacer Region

Liu et al. (2006a) entwickelten eine Real-Time PCR zum Nachweis von *C. sakazakii*. Dieser Assay liefert innerhalb von 2 Tagen ein Ergebnis, inklusive einer selektiven Anreicherung in modifizierter Lauryl-Sulfat-Bouillon für 20 Stunden gefolgt von einer fünfstündigen Anreicherung in Hirn-Herz-Bouillon. Für einen schnelleren Nachweis ist jedoch eine Verkürzung der Anreicherungszeit unumgänglich. Der beschriebene TaqMan Real-Time PCR Assay von Malorny und Wagner (2005) hat eine interne Amplifikationskontrolle integriert, jedoch wurde dieses System nicht in der Lebensmittelmatrix, wie in pulverförmiger Säuglingsnahrung, evaluiert. Die Validierung einer neuen Nachweismethode mit geeigneten Lebensmitteln zum Ausschluss eventueller Matrixeffekte und zur Bestimmung einer Nachweisgrenze ist
von Vorteil. Die beschriebene konventionelle PCR von Nair und Venkitanarayanan, (2006) basiert auf dem *ompA* Gen. Dieses Gen ist essentiell für den Nachweis der pathogenen Vertreter des Genus *Cronobacter*. Eine konventionelle PCR mit anschließender Agarosegelelektrophorese ist jedoch sehr zeitaufwendig, weshalb für einen schnellen und sicheren Nachweis eine Real-Time PCR mit dem Zielgen *ompA* zum Nachweis von pathogenen *Cronobacter* besser geeignet ist.

Methode	Zielgen	Sensitivität in KbE/g	Lebensmittel- matrix	Referenz
konventionelle PCR	himA <sup>a</sup>	10 <sup>2</sup>	Austern	Bej et al., 1994
Real-Time PCR	hilA <sup>b</sup>	1,17	Fleisch	McCabe et al., 2011
Real-Time PCR	fimC <sup>c</sup>	4 x 10 <sup>5</sup>	Eis, Salami	Krascenicsov á et al., 2008
Real-Time PCR	orgC <sup>d</sup>	10	rohe Eier	Day et al., 2009
Real-Time PCR	invA <sup>e</sup>	> 10	Milch	Nam et al., 2005
Real-Time PCR	invA	0,04	Chillipulver, Shrimps	Cheng et al., 2008
	Dindeprotein			

**Tabelle 6:** Zusammenstellung verschiedener molekularbiologischer Methoden zumNachweis von Salmonella enterica

<sup>b</sup>Hyperinvasive Locus A

<sup>c</sup>kodiert für ein Chaperon Protein

<sup>d</sup>kodiert für ein Virulenzprotein

<sup>e</sup>Invasionsgen

Der entwickelte TaqMan Real-Time PCR Assay nach McCabe et al. (2011) basiert auf dem Nachweis des *hilA* Gens (Tabelle 6). Dieses Verfahren beinhaltet zwei Anreicherungsschritte, eine unselektive Anreicherung für 24 Stunden in gepuffertem Peptonwasser gefolgt von einer selektiven Anreicherung für sechs Stunden in Rappaport-Vassiliadis Bouillon und war somit in der Lage 1,17 KbE/g *S. enterica* in Fleisch nachzuweisen. Um eine hohe Sensitivität zu erreichen und um falsch negative Ergebnisse ausschließen zu können, ist es somit von Vorteil eine Anreicherung vor dem Einsatz der PCR einzuschieben (Jasson et al., 2011). Allerdings wurden die meisten in Tabelle 6 dargestellten molekularbiologischen Methoden zum Nachweis von *S. enterica* nur mit wenigen speziellen Lebensmitteln, wie beispielsweise pulverförmiger Säuglingsnahrung oder Milchpulver, ausreichend validiert.

Der Einsatz molekularbiologischer Nachweisverfahren, insbesondere Real-Time PCR Verfahren, bietet eine gute Alternative zu den kulturellen Standardmethoden, da sich auch nach einer Voranreicherung über Nacht ein Ergebnis innerhalb kurzer Zeit erzielen lässt.

#### 1.7 Zielsetzung der vorliegenden Arbeit

Kontaminationen von Lebensmitteln durch Cronobacter spp., Salmonella enterica und Bacillus cereus sind weltweit für eine große Zahl von Erkrankungen verantwortlich. Lebensmittel unterliegen Gründen daher aus des Verbraucherschutzes höchsten hygienischen Qualitätsansprüchen. Der Nachweis dieser pathogenen Mikroorganismen aus Lebensmitteln mittels konventionellen kulturellen Untersuchungsmethoden dauert bisher zwischen vier und sechs Tagen und ist mit einem hohen Arbeitsaufwand verbunden. Zudem müssen positive Ergebnisse mit aufwendigen biochemischen Tests bestätigt werden. Daher besteht ein großer Bedarf an schnellen und spezifischen Methoden zum Nachweis dieser drei pathogenen Keime. Durch den Einsatz von PCR Verfahren, insbesondere Real-Time PCR Verfahren, kann die Zeitspanne bis zu einem endgültigen Ergebnis jedoch verkürzt werden. Der Nachweis von B. cereus, Cronobacter spp. und S. enterica sollte innerhalb von 24 Stunden erfolgen können, um somit eine erhebliche Verkürzung der Nachweiszeit im Vergleich zu den Standardmethoden zu erhalten.

Aus diesem Grund sollten TaqMan Real-Time PCR Verfahren zum Nachweis von *S. enterica, Cronobacter* spp. und *B. cereus* entwickelt werden. Der Nachweis sollte auf spezifische Genabschnitte und Sonden basieren und mit einer integrierten internen Amplifikationskontrolle einen zuverlässigen Nachweis garantieren. Ein weiterer Schwerpunkt dieser Arbeit stellten die Untersuchungen zur Optimierung der Anreicherungszeiten dar. In einer ersten Versuchsreihe sollten dazu die Wachstumsraten und die Eignung der Real-Time PCR aus künstlich kontaminierten rekonstituierten Trockenmilchprodukten beurteilt werden. Zur näheren Bewertung der entwickelten Methoden sollte der Nachweis von gestressten Zellen in pulverförmiger Säuglingsnahrung erfolgen. Eine künstliche Kontamination mit trockengestressten *C. sakazakii* Zellen sollte eine natürliche Kontamination im Labormaßstab simulieren und so die Anwendbarkeit der entwickelten TaqMan Real-Time PCR beurteilen.

## 2. Material und Methoden

## 2.1 Trockenmilchprodukte

Für die Untersuchungen und Kontaminationsversuche wurden die in Tabelle 7 dargestellten pulverförmigen Milchprodukte verwendet.

Produktname	Hersteller
Säuglingsnahrung, Folgemilch 2	Humana GmbH (Herford)
Säudingenahrung, Boha Folgonahrung 2	Noctlá Nutrition CmbH (Frankfurt)
Saugingshannung, beba Folgenannung z	
Säuglingsnahrung, Bio-Folgemilch	Hipp GmbH & Co KG (Pfaffenhofen)
Budgingshamidig, Die Folgenmen	
Säuglingsnahrung, Folgemilch 2	Bebivita GmbH (München)
Molkeneiweißkonzentrat, Ultralac <sup>®</sup> -30	Biolac GmbH (Harbarnsen)
Süßmolkenpulver	Wheyco (Hamburg)
-	

Tabelle 7: Übersicht über die verwendeten pulverförmigen Trockenmilchprodukte

## 2.2 Bakterienstämme

Für die Etablierung und Validierung der PCR Assays wurden verschiedene Typ- und Referenzstämme als Kontrollstämme aus der Stammsammlung des Fachgebiets Lebensmittelmikrobiologie, Institut für Lebensmittelwissenschaft und Biotechnologie der Universität Hohenheim verwendet (Tabelle 8). Freundlicherweise wurden die Stämme LTH 6776 und 6777 von Siegfried Scherer (TU München), LTH 6611, 6960 bis 6963, 6968 und 7006 bis 7009 von Roger Stephan (Universität Zürich), LTH 6949 bis 6955 von Julia-Stefanie Frick (Universität Tübingen), LTH 6807 von Martin Lössner (ETH Zürich) und LTH 6958 von Wolfgang Beyer (Universität Hohenheim) zur Verfügung gestellt.

Nr.	Spezies	Stammbezeichnung	LTH-Nr. <sup>1</sup>
1	Bacillus amyloliquefaciens	DSMZ 7 <sup>T</sup>	5914
2	B. cereus	DSMZ 31 <sup>T</sup>	6773
3	B. cereus (emetisch)	WSBC 10530	6776
4	Bacillus circulans	NCTC 5846	6958
5	Bacillus coagulans	$DSMZ\ 1^{T}$	6938
6	B. lichenformis	$DSMZ\ 13^T$	5810
7	Bacillus megaterium	<b>_</b> <sup>2</sup>	3996
8	B. mycoides	$DSMZ\ 2048^{T}$	7015
9	B. pseudomycoides	$DSMZ\ 12442^{T}$	7016
10	Bacillus pumilus	DSMZ 492	5776
11	Bacillus subtilis	DSMZ 10 <sup>T</sup>	3561
12	B. thuringiensis	$DSMZ\ 2046^{T}$	6807
13	B. weihenstephanensis	WSBC 10204 <sup>T</sup>	6777
14	Citrobacter freundii	$DSMZ\ 30039^{T}$	620
15	C. condimenti	LMG 26250 <sup>T</sup>	7009
16	C. dublinensis sp.	E798	6960
17	C. dublinensis subsp. dublinensis	$DSMZ\ 18705^{T}$	7004
18	C. dublinensis subsp. lactaridi	$DSMZ\ 18707^{T}$	6961
19	C. dublinensis subsp. lausannensis	$DSMZ\ 18706^{T}$	7005
20	C. helveticus	DSMZ 18396	7001
21	C. malonaticus	$DSMZ\ 18702^{T}$	7003
22	C. muytjensii	$DSMZ\ 21870^{T}$	6963
23	C. muytjensii	E488	6962
24	C. sakazakii	DSMZ 4485 <sup>T</sup>	6611
25	C. sakazakii	ST4 (SU12-20)	7006
26	C. sakazakii	ST4 (SU12-26)	7007
27	C. turicensis	DSMZ 18703 <sup>⊤</sup>	6968
28	C. pulveris	DSMZ 19144	7002

Tabelle 8: Verwendete Typ- und Referenzstämme

<sup>&</sup>lt;sup>1</sup> interne Stammnummer des Fachgebiets Lebensmittelmikrobiologie der Universität Hohenheim <sup>2</sup> bei diesem Stamm handelt es sich um ein Isolat

Nr.	Spezies	Stammbezeichnung	LTH-Nr. <sup>1</sup>
29	C. universalis	NCTC 9529 <sup>T</sup>	7008
30	Enterobacter aerogenes	$DSMZ\ 30053^T$	6949
31	Ent. cloacae	ATCC 13047 <sup>T</sup>	6950
32	Escherichia coli	DSMZ 787	463
33	Enterobacter dissolvens	$DSMZ\ 16657^T$	6665
34	Hafnia alvei	$DSMZ\ 30163^T$	6956
35	Klebsiella pneumoniae	$DSMZ\ 30104^T$	6951
36	Lactobacillus delbrueckii	$DSMZ\ 20074^{T}$	2368
37	Listeria monocytogenes	DSMZ 20600 <sup>T</sup>	5593
38	Lysinibacillus sphaericus	$DSMZ\ 28^{T}$	4063
39	Providencia alcalifaciens	$DSMZ\ 30120^T$	6957
40	Proteus vulgaris	$DSMZ\ 13387^{T}$	6952
41	Pseudomonas aeruginosa	ATCC 15442	6953
42	Pseudomonas fluorescens	$DSMZ\ 50090^{T}$	6013
43	Salmonella Enteritidis	$DSMZ\ 17420^{T}$	6488
44	S. Typhimurium	$DSMZ\ 17058^{T}$	6666
45	Serratia marcescens	$DSMZ\ 30121^T$	6954
46	Staphylococcus aureus	DSMZ 20231 <sup>⊤</sup>	6243
47	Staphylococcus epidermis	$DSMZ\ 20044^{T}$	2908
48	Staphylococcus haemolyticus	$DSMZ\ 20263^T$	6244
49	Yersinia enterocolitica	$DSMZ\ 4780^{T}$	6955

In Tabelle 9 sind alle verwendeten B. cereus Lebensmittelisolate dargestellt. Zweiundvierzig B. cereus Lebensmittelisolate mit den LTH Nummern von 6839 bis 7023 und drei B. thuringiensis Lebensmittelisolate mit den LTH Nummern 6883, 6917, 6918 wurden der Stammsammlung des Fachgebiets aus Lebensmittelmikrobiologie, am Institut für Lebensmittelwissenschaft und Biotechnologie, der Universität Hohenheim verwendet. In dieser Arbeit erfolgte ebenfalls die Isolierung von sechs B. cereus Isolaten aus Säuglingsnahrung, Molkenpulver und Molkenproteinpulver (LTH 6969 bis LTH 6974).

LTH-Nr.	Herkunft
B. cereus	
6839	Basilikum
6841	Nelken
6842	Kräuter (Salatkräuter)
6847	Kreuzkümmel
6849	Zimtstücke
6850	Kardamon (grüner)
6851	Kräuter der Provence
6853	Gewürzmischung
6855	Oregano
6856	Paprika (gemahlen)
6857	Gewürzmischung
6858	Sea Parsley/ Celery
6859	Safran
6861	Salat (Mini-Romana)
6868	Curry
6869	Gewürzmischung
6873	Kümmel (gemahlen)
6875	Dinkel-Hafer
6876	Reis (Milchreis)
6881	Reis (Basmati)
6885	Pfeffer
6886	Wacholderbeeren
6890	Gewürz (Pizza)
6892	Maismehl
6894	Chili (gemahlen)
6895	Tee (Ceylon)
6897	Tee (Assam)
6901	Majoran

**Tabelle 9:** Verwendete *B. cereus* und *B. thuringiensis* Lebensmittelisolate unterschiedlicher

 Herkunft

LTH-Nr.	Herkunft
6904	Bourbon-Vanille
6905	Sesam (ungeschält)
6906	Sesam (ungeschält)
6908	Salbei
6910	Pfefferminze
6913	Curry
6915	Tee (Earl Grey)
6969	Molkenproteinpulver
6970	Molkenpulver
6971	Säuglingsnahrung
6972	Säuglingsnahrung
6973	Säuglingsnahrung
6974	Säuglingsnahrung
7017	Molkenpulver
7018	Molkenpulver
7019	Säuglingsnahrung
7020	Säuglingsnahrung
7021	Säuglingsnahrung
7022	Säuglingsnahrung
7023	Säuglingsnahrung

#### B. thuringiensis

6883	Majoran
6917	Tankmilch
6918	Tankmilch

Die sechs *C. malonaticus* und 34 *C. sakazakii* Lebensmittelisolate wurden von unterschiedlichen Stellen zur Verfügung gestellt (Tabelle 10). Die Isolate mit den Nummern LTH 6596 bis 6610 wurden uns freundlicherweise von Ulrich Busch (Bayerisches Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit); LTH 6575 bis 6579 und 6591 bis 6595 von Erwin Märtelbauer (Ludwig-Maximilians-Universität,

München); LTH 6617 bis 6621 von Jürgen Heesemann (Max von Pettenkofer Institut); LTH 6615 und 6616 von Roger Stephan (Universität Zürich); LTH 6626 bis 6628 von Jörg Rau (Chemisches und Veterinäruntersuchungsamt, Stuttgart); LTH 6589 von Helge Karch (Universitätsklinikum Münster, Institut für Hygiene) und LTH 6562 von Matthias Frosch (Institut für Hygiene und Mikrobiologie, Universität Würzburg) überlassen.

**Tabelle 10:** Verwendete C. malonaticus und C. sakazakiiLebensmittelisolateunterschiedlicher Herkunft

LTH-Nr.	Herkunft
C. malonaticus	
6575	Betriebslabor Säuglingsnahrungshersteller
6593	Betriebslabor Säuglingsnahrungshersteller
6599	Speiseeis
6605	Speiseeis
6615	unbekannt
6616	unbekannt
C. sakazakii	
6562	unbekannt
6576	Betriebslabor Säuglingsnahrungshersteller
6577	Betriebslabor Säuglingsnahrungshersteller
6578	Betriebslabor Säuglingsnahrungshersteller
6579	Betriebslabor Säuglingsnahrungshersteller
6589	klinisches Humanisolat
6591	Betriebslabor Säuglingsnahrungshersteller
6592	Betriebslabor Säuglingsnahrungshersteller
6594	Betriebslabor Säuglingsnahrungshersteller
6595	Betriebslabor Säuglingsnahrungshersteller
6596	Speiseeis
6597	Speiseeis
6598	Speiseeis

LTH-Nr.	Herkunft
6600	Speiseeis
6601	Speiseeis
6602	Speiseeis
6603	Speiseeis
6604	Speiseeis
6606	Speiseeis
6607	Speiseeis
6608	Speiseeis
6609	Speiseeis
6610	Speiseeis
6612	Speiseeis
6613	unbekannt
6614	unbekannt
6617	unbekannt
6618	unbekannt
6619	unbekannt
6620	unbekannt
6621	unbekannt
6626	unbekannt
6627	unbekannt
6628	unbekannt

Dreißig S. Enteritidis Lebensmittelisolate wurden aus der Stammsammlung des Fachgebiets Lebensmittelmikrobiologie, am Institut für Lebensmittelwissenschaft und Biotechnologie, an der Universität Hohenheim verwendet (Tabelle 11). Die Isolate mit den Nummern LTH 6779 bis 6805 wurden vom Robert Koch Institut und die Isolate LTH 6812 bis 6814 wurden vom Bundesinstitut für Risikobewertung (BFR) zur Verfügung gestellt.

LTH-Nr.	Herkunft
6779	Landgeflügel
6780	Fleisch/Fleischprodukte
6781	Fleisch/Fleischprodukte
6782	Wassergeflügel
6783	Landgeflügel
6784	Landgeflügel
6785	Kuchen/Speisen mit Ei
6786	andere Lebensmittel
6787	Kuchen/Speisen mit Ei
6788	Kuchen/Speisen mit Ei
6789	Landgeflügel
6790	Landgeflügel
6791	Hühner-Ei
6792	Hühner-Ei
6793	Landgeflügel
6794	Landgeflügel
6795	Landgeflügel
6796	Landgeflügel
6797	Landgeflügel
6798	Landgeflügel
6799	Hühner-Ei
6800	Landgeflügel
6801	Landgeflügel
6802	Kuchen/Speisen mit Ei
6803	Kuchen/Speisen mit Ei
6804	Kuchen/Speisen mit Ei
6805	Landgeflügel
6812	Hühner-Ei
6813	Hühner-Ei
6814	Huhn, Fleisch

Tabelle 11: Verwendete S. Enteritidis Lebensmittelisolate unterschiedlicher Herkunft

## 2.3 Nährmedien und Puffer

Zur Herstellung der Nährmedien und Puffer wurden die angegebenen Chemikalien verwendet und in entionisiertem Wasser durch Rühren gelöst. Der pH-Wert wurde gegebenenfalls mit 1 N oder 4 N Salzsäure bzw. Natronlauge mittels des pH-Meters (pH 720, WTW inoLab, Weilheim) eingestellt. Alle Medien und Puffer wurden auf ein Endvolumen von 1 Liter berechnet und das Autoklavieren erfolgte für 20 min bei 121 °C und 1 bar Überdruck (Technoklav, Integra Bioscience, Fernwald). Antibiotika, wie Ampicillin, Polymyxin B-Sulfat und Vancomycin, wurden zuerst Steril filtriert und dann nach dem Autoklavieren zugegeben.

#### <u>Nährmedien</u>

#### Hirn-Herz Agar (Merck KGaA, 1.13825):

Nährsubstrat (Hirn-, Herzextrakt und Pepton)	27,5 g
Glukose	2 g
Natriumchlorid	5 g
di-Natriumhydrogenphosphat	2,5 g
Agar	15 g
pH 7,4 ± 0,2	

#### Hirn-Herz Bouillon (Merck KGaA, 1.10493):

Nährsubstrat (Hirn-, Herzextrakt und Pepton)	27,5 g
Glukose	2 g
Natriumchlorid	5 g
di-Natriumhydrogenphosphat	2,5 g
pH 7,4 ± 0,2	

#### Standard-I Agar:

Bacto-Trypton (Becton Dickinson, 211701)	15 g
Hefeextrakt (Becton Dickinson, 212730)	3 g
Natriumchlorid (Carl Roth GmbH + Co. KG, 3957)	6 g
Glukose (Merck KGaA, 108342)	1 g

Agar (Becton Dickinson, 257353)	12 g
pH 7,5 ± 0,2	

#### Standard-I Bouillon:

Bacto-Trypton (Becton Dickinson, 211701)	15 g
Hefeextrakt (Becton Dickinson, 212730)	3 g
Natriumchlorid (Carl Roth GmbH + Co. KG, 3957)	6 g
Glukose (Merck KGaA, 108342)	1 g
pH 7,5 ± 0,2	

#### Gepuffertes Peptonwasser (Merck KGaA, 1.07228):

Pepton	10 g
Natriumchlorid	5 g
di-Natriumhydrogenphosphat	9 g
Kaliumdihydrogenphosphat	1,5 g
pH 7,2 ± 0,2	

#### modifizierte Laurylsulfat Tryptose Bouillon (mLST) (Oxoid, CM 1133):

Natriumchlorid	34 g
Enzymatischer Verdau von Pflanzen- und Tiergewebe	20 g
Laktose	5 g
Kaliumdihydrogenphosphat	2,75 g
di-Kaliumhydrogenphosphat	2,75 g
Natriumlaurylsulfat	0,1 g
Vancomycin (Carl Roth GmbH + Co. KG, 0242.3)	10 mg
pH 6,8 ± 0,2	

#### Cronobacter Screening Bouillon (CSB) (Oxoid, CM1121):

10 g
3 g
5 g
4 mg

Saccharose	10 g
Vancomycin (Carl Roth GmbH + Co. KG, 0242.3)	10 mg
pH 7,4 ± 0,2	

#### Enterobacter sakazakii Isolation Agar (ESIA) (Fluka Analytical, 14703):

Pepton	7 g
Natriumchlorid	5 g
Hefeextrakt	3 g
Natriumdeoxycholat	0,6 g
5-Brom-4-Chlor-3-Indol α-D-Glykopyranosid	0,15 g
Kristallviolett	2 mg
Agar	15 g
pH 7,0 ± 0,2	

#### Polymyxin-Pyruvat-Eigelb-Mannit-Bromthymolblau-Agar (PEMBA):

Als Basis des Nährbodens wurde *Bacillus-Cereus*-Selektive-Agarbasis (Oxoid, CM0617) verwendet.

Caseinpepton	1 g
D-Mannit	10 g
Natriumpyruvat	10 g
Magnesiumsulfat	0,1 g
Natriumchlorid	2 g
di-Natriumhydrogenphosphat	2,5 g
Kaliumdihydrogenphosphat	0,25 g
Bromthymolblau	0,12 g
Agar	15 g
pH 7,2 ± 0,2	

nach dem Autoklavieren zugegeben:	
Sterile Eigelbemulsion (Merck KGaA, 1.03784)	50 ml
Bacillus cereus Selektivsupplement (Merck KGaA, 1.09875)	2 ml

## Trypton-Soja-Polymyxin-Bouillon (TSPB) (Merck KGaA, 1.05459):

Caseinpepton	17 g
Sojapepton	3 g
Natriumchlorid	5 g
Glukose	2,5 g
di-Kaliumhydrogenphosphat	2,5 g
Polymyxin B-Sulfat (Carl Roth GmbH + Co. KG, 0235)	100 µl
pH 7,3 ± 0,2	

## Rappaport-Vassiliadis Anreicherungsbouillon (RVS) (Becton Dickinson,

#### 257257.01):

Bacto-Trypton	4,54 g
Natriumchlorid	7,2 g
Kaliumdihydrogenphosphat	1,45 g
Magnesiumchlorid	13,4 g
Malachitgrün-Oxalat	0,036 g
pH 5,2 ± 0,2	

#### Xylose-Lysin-Deoxycholat-Agar (XLD) (Merck KGaA, 1.05287):

Hefeextrakt	3 g
Natriumchlorid	5 g
Xylose	3,75 g
Laktose	7,5 g
Saccharose	7,5 g
L (+) Lysin	5 g
Natriumdeoxycholat	1 g
Natriumthiosulfat	6,8 g
Ammonium Eisen(III)zitrat	0,8 g
PhenoIrot	0,08 g
Agar	14,5 g
pH 7,3 ± 0,2	

Luria-Bertani (LB) Bouillon:	
Bacto-Trypton (Becton Dickinson, 211701)	10 g
Hefeextrakt (Becton Dickinson, 212730)	5 g
Natriumchlorid (Carl Roth GmbH + Co. KG, 3957)	10 g
pH 7,5 ± 0,2	
Zusatz für LB/AXI-Platten:	
Agar (Becton Dickinson, 257353)	15 g
nach dem autoklavieren zugegeben:	
Ampicillin (Carl Roth GmbH + Co. KG, K029)	100 µg/ml
5-Brom-4-chlor-3-indoxyl-ß-DGalaktopyranosid (X-Gal) (Carl	80 µg/ml
Roth GmbH + Co. KG, 2315)	
Isopropyl-1-thio- ß-D-Galactose (IPTG) (Genaxxon	2,5 mM
Bioscience GmbH, M3198)	

#### SOC-Medium:

Bacto-Trypton (Becton Dickinson, 211701)	20 g
Hefeextrakt (Becton Dickinson, 212730)	5 g
Natriumchlorid (Carl Roth GmbH + Co. KG, 3957)	0,5 g
Kaliumchlorid 0,25 M (Merck KGaA, 104936)	10 ml
Magnesiumchlorid 2 M (Merck KGaA, 172571)	5 ml
Glukose 1 M (Merck KGaA, 108342)	20 ml

#### Puffer – allgemein

Natriumchloridlösung (0,9 %):	
Natriumchlorid (Carl Roth GmbH + Co. KG, 3957)	9 g
1x Tris-EDTA Puffer (TE-Puffer):	
Tris-HCl (1 M; pH 8,0) (AppliChem GmbH, A1086)	10 ml
EDTA (0,5 M; pH 8,0) (Biomol GmbH, E2210.1)	2 ml
50 x konzentrierter Tris-Acetat (TAE)-Puffer:	
Tris-HCI (AppliChem GmbH, A1086)	242 g
EDTA (Biomol GmbH, E2210.1)	18,6 g
pH 8,3 (mit 1 M Eisessig eingestellt)	
20 mM Tris-HCI:	
Tris-HCI (1 M; pH 8,0) (AppliChem GmbH, A1086)	20 ml
2 mM EDTA:	
EDTA (0,5 M; pH 8,0) (Biomol GmbH, E2210.1)	4 ml
10 x Gelladepuffer:	
Bromphenolblau (Merck KGaA, 111746)	12,5 mg
Xylencyanol (Merck KGaA, 11059)	12,5 mg
0,5 M EDTA (Biomol GmbH, E2210.1)	5 ml
Glycerin (AppliChem GmbH, A 2364)	25 ml
auf 50 ml mit Reinstwasser auffüllen	

## 2.4 Kultivierungsbedingungen

Zur Anzucht aller Stämme wurde Hirn-Herz Medium verwendet (Kapitel 2.3). Die Kultivierung für *C. sakazakii* und *S. enterica* erfolgte aerob bei 37°C und für *B. cereus* aerob bei 30 °C in 10 ml Hirn-Herz Bouillon bei 180 RPM im Inkubationsschüttler (Infors AG, CH-4103 Bottmingen) über Nacht.

## 2.5 DNA-Isolierung und Quantifizierung

Für die Herstellung von Biomasse wurde eine Übernachtkultur verwendet (siehe Kapitel 2.4). Die Zellernte erfolgte am nächsten Tag durch eine 10 minütige Zentrifugation (Heraeus Fresco 17, Thermoscientific, USA) von 2 ml der jeweiligen Übernachkulturen bei 4 °C und 17.000 x g. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

Die Präparation und Reinigung der genomischen DNA erfolgte mit dem DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen GmbH, Hilden). Dabei wurde nach den Anweisungen des Herstellers für grampositive und gramnegative Bakterien gearbeitet.

#### Grampositive Bakterien

Als enzymatischer Lysepuffer wurde der vom Hersteller (Qiagen GmbH, Hilden) vorgeschlagene Puffer hergestellt.

#### Enzymatischer Lysepuffer:

20 mM Tris-HCl (siehe Kapitel 2.3)
2 mM EDTA (siehe Kapitel 2.3)
1,2 % Triton<sup>®</sup> X-100 (Serva Electrophoresis GmbH, 39795)
20 mg/ml Lysozym (Serva Electrophoresis GmbH, 28262) (kurz vor Gebrauch zugeben)

Die Zerstörung der Zellmembran erfolgte abweichend von der Empfehlung bei 37 °C und 650 RPM für 30 min im Thermomixer Comfort (Eppendorf AG, Hamburg).

#### **Gramnegative Bakterien**

Die Lyse erfolgte laut dem Hersteller (Qiagen GmbH, Hilden) bei 56 °C und abweichend von den Empfehlungen erfolgte die Inkubation in einem Thermomixer bei 1300 RPM für 25 min. Die Zentrifugation nach den Waschschritten erfolgte bei 10.000 x g für 1 min und die Trocknung der DNeasy Mini Spin Säule wurde bei 17.000 x g für 5 min durchgeführt. Die Elution erfolgte mit 150 µl vom Hersteller vorgeschriebenen Lösung mit einer anschließenden Zentrifugation bei 7000 x g für 1 min. Die Konzentration und Reinheit der erhaltenen genomischen DNA wurde photometrisch bei den Wellenlängen 230 nm, 260 nm und 280 nm mittels eines Nanodrop (Nanodrop<sup>™</sup> 4000, Thermoscientific, USA) vermessen.

#### 2.6 Molekulare Differenzierung von Bacillus cereus

#### 2.6.1 Amplifikation der 16S rDNA

Zur Amplifikation der gesamten 16S rDNA wurde das Primerpaar 616V und 630R (Eurofins MWG Operon) eingesetzt. Die Sequenzen dazu sind in Tabelle 12 dargestellt.

Bezeich- nung	Sequenz (5' – 3')	Annealing- Temperatur	Referenz
616V	AGA GTT TGA TYM TGG CTC	57,0 °C	Lehner et al. 2004
630R	AAG GAG GTG ATC CAR CC	57,0 °C	Sterr et al. 2009

Taballa 12:	Vorwondoto	Drimor fi	"ir dia A	molifikation	dor 169	
Tabelle 12:	verwendete	Primerin	u ale A	пріпкацоп	uer 165	IDINA

Der Reaktionsansatz der 16S rDNA PCR ist in Tabelle 13 und das zugehörige Thermocycler-Programm ist in Tabelle 14 dargestellt. Die PCR Experimente erfolgten in einem T1 Thermocycler 96 der Biometra GmbH (Göttingen).

PCR-Reagenzien	Volumen pro Ansatz (25 µl)
	in µl
PCR-Puffer (S) 10 x mit 15 mM MgCl <sub>2</sub>	2,50
dNTP-Mix [je 10 mM]	0,50
Primer 616V [10 pmol/µl]	0,50
Primer 630R [10 pmol/µl]	0,50
Taq-Polymerase [5 U/µl]	0,30
Template-DNA	1,00
steriles Reinstwasser	19,70

Tabelle 13: Reaktionsansatz für die 16S rDNA PCR mit den Primern 616V und 630R

Tabelle 14: PCR-Programm für die 16S rDNA PCR mit den Primern 616V und 630R

Zyklus		Temperatur	Zeit in s
		in °C	
1 x	Denaturierung	94	240
	C Denaturierung	94	30
35 x	Annealing	57	60
	Elongation	72	120
1 x	Elongation	72	300
1 x	Kühlen	4	×

Die PCR Produkte wurden zur Überprüfung auf einem 1 %igen Agarosegel unter konstanter Spannung von 120 Volt für 60 min aufgetrennt (siehe Kapitel 2.8.1.4). Zur Größenabschätzung wurden 10  $\mu$ l des  $\lambda$  DNA/ Eco RI + HindIII Marker (Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland) mit aufgetragen.

#### Aufreinigung der 16S rDNA PCR-Produkte:

Die 16S rDNA PCR Produkte wurden mit einer Exo-SAP Methode auf gereinigt. Dabei werden überschüssige Nukleotide und ungebundene Primer abgebaut. Die Methode benötigt eine einfache Zugabe von Enzymen und verhindert dadurch den Verlust von DNA (Werle et al., 1994). Zu 5 µl 16S rDNA PCR-Produkt wurden 0,5 µl Exonuklease I [20 U/ $\mu$ ] (Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland) und 2  $\mu$ l Shrimp Alkaline Phosphatase [1 U/ $\mu$ l] (Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland) gegeben und anschließend für 15 min bei 37 °C und danach für weitere 15 min bei 80 °C in einem Biometra T1 Thermocycler inkubiert.

#### 2.6.2 Partielle Sequenzierung der 16S rDNA

Die Sequenzierung wurde freundlicherweise von Markus Kranz (Technischer Assistent) des Fachgebiets Lebensmittelmikrobiologie der Universität Hohenheim nach der Methode von Sanger et al. (1977) mit dem Sequenzer CEQ<sup>™</sup> 8000 Genetic Analysis System (Beckmann Coulter, Krefeld, Deutschland) durchgeführt. Bei dieser Methode werden in Mengen fluoreszensmarkierte 2', 3'geringen Didesoxyribonukleosidtriphosphate (ddNTPs) zusätzlich zu den Desoxyribonukleosidtriphosphaten (dNTPs) dem Ansatz zugesetzt. Da den ddNTPs am 3'-Ende eine Hydroxylgruppe fehlt, kommt es nach deren Einbau bei der neu synthetisierten DNA zu einem Kettenabbruch. Dadurch entstehen unterschiedliche lange DNA-Fragmente, die jeweils mit einem der vier ddNTPs enden. Es wurde die Kapillarelektrophorese Longfastread 1 angewandt, weshalb die DNA-Fragmente anschließend der Größe nach aufgetrennt und registriert wurden. Die Analyse der Daten erfolgte mit der CEQ<sup>™</sup> Software (Beckmann Coulter, USA). Es sollte eine DNA Konzentration von 25 bis 50 fmol für eine erfolgreiche Seguenzierung eingesetzt werden. Für die partielle Sequenzierung der 16S rDNA wurden die Primer 616V (Tabelle 12) und 97K (Tabelle 15) verwendet.

		_
Bezeich-	Sequenz (5' – 3')	Referenz
nung		
97K	CTG CTG CCT CCC GTA	Sterr et al. 2009

Tabelle 15: Verwendeter Primer für die partielle 16S rDNA Sequenzierung

Der verwendete Reaktionsansatz und das zugehörige Amplifikationsprogramm sind in Tabelle 16 und Tabelle 17 gezeigt.

Reagenzien	Volumen pro Ansatz (10 µl)
	in µl
25-50 fmol Exo-SAP-Verdau	0,5-7,5
CEQ <sup>™</sup> Quick StartMix (Beckmann Coulter) [dNTPS, ddNTPs, Polymerase, Puffer]	1,50
Primer [5 pmol/µl]	1,00
steriles Reinstwasser	ad 10,0

Tabelle 16: Reaktionsansatz für die Cycle-Reaktion der partiellen 16S rDNA Sequenzierung

 Tabelle 17:
 Amplifikationsprogramm f
 ür die Cycle-Reaktion der partiellen 16S rDNA
 Sequenzierung

Zyklus		Temperatur	Zeit in s
		in °C	
	Denaturierung	96	20
30 x	Annealing	50	20
	L Elongation	60	240
1 x	Kühlen	4	×

Die erhaltenen Fragmente wurden mit der BioEdit Software nach Hall (1999) zusammengeführt und mit den hinterlegten 16S rDNA Sequenzen sowie der Sequenz des *B. cereus* Typstammes (AE016877) des National Center for Biotechnology Information (NCBI, http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast) verglichen.

## 2.6.3 Random Amplified Polymorphic DNA PCR zur Unterscheidung der Bacillus cereus Isolate

Die Random Amplified Polymorphic DNA PCR (RAPD-PCR) wurde von Williams et al. (1990) zum ersten Mal beschrieben. Bei dieser PCR wird nur ein unspezifischer Primer eingesetzt, der zufällig an die Ziel-DNA bindet und so unterschiedlich lange DNA-Fragmente entstehen. Die RAPD-PCR wurde zur Unterscheidung einzelner *Bacillus* Lebensmittelisolate aus den verschiedenen Milchpulvern durchgeführt. Es wurde der Primer M13V (Tabelle 18) eingesetzt, der von der Firma Eurofins MWG Operon hergestellt wurde.

 Tabelle 18:
 Verwendeter
 Primer zur Differenzierung der B. cereus
 Isolate mit der RAPD-PCR

Bezeich-	Sequenz (5' – 3')	mittlere Schmelz-	Referenz
nung		Temperatur	
M13V	GTT TTC CCA GTC ACG AC	52,8 °C	Ehrmann et
			al. 2003

Die Durchführung der PCR sowie das verwendete Thermocycler Programm ist in Tabelle 19 und Tabelle 20 gezeigt. Durchgeführt wurde diese PCR in einem T1 Thermocycler 96 der Biometra GmbH (Göttingen).

Tabelle 19: Reaktionsansatz für die RAPD-PCR zur Differenzierung der B. cereus Isolate

PCR-Reagenzien	Volumen pro Ansatz (25 µl)
	in µl
PCR-Puffer (S) 10 x mit 15 mM MgCl <sub>2</sub>	2,50
MgCl <sub>2</sub> [25 mM]	3,50
dNTP-Mix [je 10 mM]	1,00
Primer M13V [100 pmol/µl]	0,50
Taq-Polymerase [5 U/µl]	0,15
Template-DNA	1,00
steriles Reinstwasser	16,35

Zyklus		Temperatur	Zeit in s
		in °C	
1 x	Denaturierung	94	45
ſ	Denaturierung	94	180
3 x {	Annealing	40	300
l	Elongation	72	300
ſ	Denaturierung	94	60
32 x {	Annealing	60	120
l	Elongation	72	180
1 x	Kühlen	4	×

**Tabelle 20:** PCR-Programm für die RAPD-PCR zur Differenzierung der *B. cereus* Isolate mitdem Primer M13V

Um die PCR Produkte sichtbar zu machen, wurden je 10 µl auf ein 2 %iges Agarosegel aufgetragen und bei konstanter Spannung von 120 Volt für 2,5 Stunden aufgetrennt (siehe Kapitel 2.8.1.4). Zum Größenvergleich wurden je 10 µl des 100 bp DNA Markers und des 1 kb DNA Markers (beide Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland) mit aufgetragen (siehe Kapitel 2.8.1.4).

## 2.7 Molekulare Differenzierung von Cronobacter spp.

## 2.7.1 Random Amplified Polymorphic DNA PCR zur Unterscheidung der *Cronobacter* spp. Isolate

Die RAPD-PCR (siehe Kapitel 2.6.3) wurde zur Charakterisierung der *Cronobacter* spp. Lebensmittelisolate verwendet. Alle Isolate wurden auf geringe Unterschiede anhand ihres Bandenmusters untersucht. In Tabelle 21 ist der verwendete Primer (Eurofins MWG Operon) dargestellt. Die Durchführung aller RAPD-PCR Experimente erfolgte in einem T1 Thermocycler 96 der Biometra GmbH (Göttingen).

Tabelle 21:	Verwendeter	Primer zu	r Differenzierung	der C	Cronobacter	Isolate mit	der	RAPD-
PCR			-					

Bezeich-	Sequenz (5' – 3')	mittlere Schmelz-	Referenz
nung		Temperatur	
UBC245	CGC GTG CCA G	36 °C	Nazarowec-
			White and
			Farber 1999

Die Durchführung der PCR sowie das verwendete Thermocycler Programm ist in Tabelle 22 und Tabelle 23 dargestellt.

Tabelle 22: Reaktionsansatz für die RAPD-PCR zur Differenzierung der Cronobacter Isolate

PCR-Reagenzien	Volumen pro Ansatz (25 µl)
	in µl
PCR-Puffer (S) 10 x mit 15 mM MgCl <sub>2</sub>	2,50
MgCl <sub>2</sub> [25 mM]	0,40
dNTP-Mix [je 10 mM]	0,50
Primer UBC245 [10 pmol/µl]	2,50
Taq-Polymerase [5 U/µl]	0,30
Template-DNA	1,00
steriles Reinstwasser	17,80

**Tabelle 23:** PCR-Programm f
 ür die RAPD-PCR zur Differenzierung der Cronobacter Isolate mit dem Primer UBC245

Zyklus		Temperatur	Zeit in s
		in °C	
1 x	Denaturierung	94	120
	Denaturierung	94	60
35 x	Annealing	35	60
	Elongation	72	90
1 x	Elongation	72	300
1 x	Kühlen	4	×

Das RAPD-PCR Produkt wurde anschließend in einem 2 %igen Agarosegel unter konstanter Spannung von 120 Volt für 2,5 Stunden aufgetrennt (siehe Kapitel 2.8.1.4). Das Ladevolumen betrug 10  $\mu$ l des PCR-Produktes und als Größenstandards wurden je 10  $\mu$ l des 100 bp und des 1 kb DNA Markers (beide Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland) eingesetzt.

## 2.7.2 Spezifische konventionelle PCR zur Differenzierung von Cronobacter malonaticus und Cronobacter sakazakii

Das *rpoB* Gen, das für die beta-Untereinheit der RNA Polymerase kodiert, wurde als Alternative für die bakterielle Genotypisierung von Mollet et al. (1997) beschrieben (siehe Kapitel 1.2). Dieses Gen wurde von Stoop et al. (2009) zur Differenzierung des Genus *Cronobacter* verwendet. Die konventionelle PCR mit dem Zielgen *rpoB* wurde hier zur Differenzierung von *C. sakazakii* und *C. malonaticus* eingesetzt. In Tabelle 24 sind die verwendeten Primer (Eurofins MWG Operon) dargestellt. Das Primerpaar Csak zur Charakterisierung von *C. sakazakii* ergibt ein Produkt mit der Länge von 554 bp. Für die Differenzierung und Charakterisierung von *C. malonaticus* wurden die Primer Cmal eingesetzt, diese ergeben ein Produkt mit der Länge von 287 bp.

Bezeich- nung	Sequenz (5' – 3')	mittlere Schmelz- Temperatur in °C	Referenz
Csakf	ACG CCA AGC CTA TCT CCG CG	63,5	Stoop et al. 2009
Csakr	ACG GTT GGC GTC ATC GTG	58,2	Stoop et al. 2009
Cmalf	CGT CGT ATC TCT GCT CTC	56,0	Stoop et al. 2009
Cmalr	AGG TTG GTG TTC GCC TGA	56,0	Stoop et al. 2009

**Tabelle 24:** Verwendete Primer für die *rpoB* Gen spezifische PCR zur Differenzierung von *C. malonaticus* und *C. sakazakii* 

f = forward Primer, r = reverse Primer

Der Reaktionsansatz und die verwendeten Thermocycler-Programme sind in Tabelle 25, Tabelle 26 und Tabelle 27 dargestellt.

**Tabelle 25:** Reaktionsansatz für die *rpoB* Gen spezifische PCR zur Differenzierung von *C. malonaticus* und *C. sakazakii* 

PCR-Reagenzien	Volumen pro Ansatz (25 μl)
	in µl
PCR-Puffer (S) 10 x mit 15 mM MgCl <sub>2</sub>	2,50
dNTP-Mix [je 10 mM]	0,50
Primer-f [10 pmol/µl]	0,50
Primer-r [10 pmol/µl]	0,50
Taq-Polymerase [5 U/µl]	0,30
Template-DNA	1,00
steriles Reinstwasser	19,70

**Tabelle 26:** PCR-Programm für die *rpoB* Gen spezifische PCR zur Charakterisierung von *C. sakazakii* 

Zyklus			Temperatur	Zeit in s
			in °C	
1 x		Denaturierung	94	180
30 x	ſ	Denaturierung	94	60
	ĺ	Annealing	67	30
1 x		Elongation	72	60
1 x		Kühlen	4	$\infty$

Zyklus		Temperatur	Zeit in s
		in °C	
1 x	Denaturierung	94	180
	Denaturierung	94	60
30 x	Annealing	58	30
	Elongation	72	30
1 x	Elongation	72	300
1 x	Kühlen	4	×

**Tabelle 27:** PCR-Programm für die *rpoB* Gen spezifische PCR zur Charakterisierung von

 *C. malonaticus*

Die PCR Produkte wurden anschließend in einem 2 %igen Agarosegel aufgetrennt (siehe Kapitel 2.8.1.4).

# 2.8 Spezifischer Nachweis von *Bacillus cereus*, *Cronobacter* spp. und *Salmonella enterica*

#### 2.8.1 Etablierung konventioneller PCR Verfahren

Für die Etablierung der konventionellen PCR Assays wurde in einem ersten Schritt ein spezifisches Zielgen für die entsprechende Spezies ausgewählt. Das ausgesuchte Gen sollte charakteristisch und essentiell für jede Spezies sein, damit nur der Zielorganismus nachgewiesen werden kann. Zu jedem der Gene wurden anschließend Primer mit der Beacon Designer 7 Software (Premier Biosoft) hergestellt. Dabei sollten die Primer verschiedene Kriterien aufweisen. Die Schmelztemperatur (T<sub>m</sub>) sollte zwischen 50 °C und 60 °C liegen und einen GC-Gehalt zwischen 40 und 60 % sowie eine Länge von 18 bis 25 Basen aufweisen. Die Herstellung der Primer erfolgte durch die Firma Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Deutschland. Die konventionellen PCR Assays wurden in einem T1 Thermocycler 96 der Biometra GmbH (Göttingen) durchgeführt und alle verwendeten Reagenzien stammten von der Firma Genaxxon Bioscience GmbH (Ulm, Deutschland).

## 2.8.1.1 Etablierung eines konventionellen PCR Verfahrens für den spezifischen Nachweis von Bacillus cereus

Als Zielgen für B. cereus wurde das groEL-Gen verwendet (siehe Kapitel 1.6). Es wurden die Primer groEL-J1-fw und groEL-J1-rev (Tabelle 28) mit einer Produktlänge von 150 bp konstruiert. Der Reaktionsansatz und das zur Amplifikation eingesetzte Thermocycler-Programm ist in Tabelle 29 und Tabelle 30 dargestellt.

Bezeichnung	Sequenz (5' – 3')	mittlere Schmelz- Temperatur in °C
groEL-J1 fw	GGG TCT TCG TAA AGG TAT CG	57,3
groEL-J1 rev	GCT TCA GCG ATT AAT TGA CC	55,3
fw – forward Primer	rev – reverse Primer	

fw = forward Primer, rev = reverse Primer

Tabelle 29: Reaktionsansatz für das konventionelle PCR Verfahren für den spezifischen Nachweis von *B. cereus* 

(Iג

Zyklus		Temperatur	Zeit in s
		in °C	
1 x	Denaturierung	94	120
	Denaturierung	94	60
30 x	Annealing	55	60
	L Elongation	72	90
1 x	Elongation	72	300
1 x	Kühlen	4	$\infty$

 Tabelle 30:
 PCR-Programm f
 ür das konventionelle PCR Verfahren f
 ür den spezifischen Nachweis von B. cereus

Das erhaltene *groEL*-PCR-Produkt wurde anschließend in einem 3 %igen Agarosegel aufgetrennt (siehe Kapitel 2.8.1.4). Zur Größenabschätzung wurden 10 µl des 100 bp DNA-Markers (Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland) mit auf das Gel aufgetragen.

## 2.8.1.2 Etablierung eines konventionellen PCR Verfahrens für den spezifischen Nachweis von *Cronobacter* spp.

Für *Cronobacter* spp. wurde *ompA* als Zielgen verwendet (siehe Kapitel 1.2). Für die PCR wurden die Primer ompA-fw J1 und ompA-rev J1 (Tabelle 31) konstruiert. Das Primerpaar ergibt ein Produkt mit einer Länge von 151 bp.

Bezeich-	Sequenz (5' – 3')	mittlere Schmelz-
nung		Temperatur in °C
ompA-fw J1	GTA TAA AGG CGA CAC TGT AAA CG	58,9
ompA-rev J1	GCC AGC GAT GTT AGA AGA GG	59,4

Tabelle 31: Verwendete Primer für den spezifischen Nachweis von Cronobacter spp.

fw = forward Primer, rev = reverse Primer

Der Reaktionsansatz und das zur Amplifikation eingesetzte Thermocycler-Programm ist in Tabelle 32 und Tabelle 33 dargestellt.

PCR-Reagenzien	Volumen pro Ansatz (25 µl)
	in µl
PCR-Puffer (S) 10 x mit 15 mM MgCl <sub>2</sub>	2,50
dNTP-Mix [je 10 mM]	0,50
Primer ompA-fw J1 [10 pmol/µl]	1,25
Primer ompA-rev J1 [10 pmol/µl]	1,25
Taq-Polymerase [5 U/µl]	0,30
Template-DNA	1,00
steriles Reinstwasser	18,20

**Tabelle 32:** Reaktionsansatz für das konventionelle PCR Verfahren für den spezifischenNachweis von *Cronobacter* spp.

**Tabelle 33:** PCR-Programm für das konventionelle PCR Verfahren für den spezifischen Nachweis von *Cronobacter* spp.

Zyklus		Temperatur	Zeit in s
		in °C	
1 x	Denaturierung	94	120
	Denaturierung	94	60
30 x	Annealing	55	60
	L Elongation	72	90
1 x	Elongation	72	300
1 x	Kühlen	4	×

Das *ompA*-PCR-Produkt wurde anschließend in einem 3 %igen Agarosegel aufgetrennt und zur Größenabschätzung dienten 10 µl des 100 bp DNA Markers (Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland) (siehe Kapitel 2.8.1.4).

## 2.8.1.3 Etablierung eines konventionellen PCR Verfahrens für den spezifischen Nachweis von Salmonella enterica

Als Zielgen für *S. enterica* wurde das *invA*-Gen verwendet (siehe Kapitel 1.3). Es wurden die Primer invA-JR-fw und invA-JR-rev (Tabelle 34) für den PCR Assay konstruiert und ergibt ein Produkt mit einer Länge von 106 bp.

Bezeich-	Sequenz (5' – 3')	mittlere Schmelz-
nung		Temperatur in °C
invA-JR-fw	TTA ACC TTG TGG AGC ATA TTC G	56,5
invA-JR-rev	TCC TCA ACT TCA GCA GAT ACC	57,9

Tabelle 34: Verwendete Primer für den spezifischen Nachweis von S. enterica

fw = forward Primer, rev = reverse Primer

Der Reaktionsansatz der konventionellen PCR ist in Tabelle 35 und das zur Amplifikation eingesetzte Thermocycler-Programm ist in Tabelle 36 gezeigt.

**Tabelle 35:** Reaktionsansatz für das konventionelle PCR Verfahren für den spezifischen Nachweis von *S. enterica*

PCR-Reagenzien	Volumen pro Ansatz (25 µl)
	in µl
PCR-Puffer (S) 10 x mit 15 mM MgCl <sub>2</sub>	2,50
dNTP-Mix [je 10 mM]	0,50
Primer invA-JR-fw [10 pmol/µl]	1,25
Primer invA-JR-rev [10 pmol/µl]	1,25
Taq-Polymerase [5 U/μΙ]	0,30
Template-DNA	1,00
steriles Reinstwasser	18,20

Zyklus		Temperatur	Zeit in s
		in °C	
1 x	Denaturierung	94	120
	C Denaturierung	94	60
30 x	Annealing	55	60
	Elongation	72	90
1 x	Elongation	72	300
1 x	Kühlen	4	∞

Das *invA*-PCR-Produkt wurde anschließend in einem 3 %igen Agarosegel aufgetrennt und zur Größenabschätzung dienten 10 µl des 100 bp DNA Markers (Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland) (siehe Kapitel 2.8.1.4).

#### 2.8.1.4 Agarosegelelektrophorese

Die PCR-Produkte wurden in einem 3 %igem (wt/vol) Agarosegel (LE Agarose, Biozym, Oldendorf) bei konstanter Spannung von 120 Volt und 1-fach TAE-Puffer 60 min aufgetrennt. Anschließend wurde das Gel in Ethidiumbromid (10 mg/ml) 10 min gefärbt und nach kurzem Wässern unter UV-Licht (302 nm, Bachhofer) sichtbar gemacht und mit Hilfe der Digitalkamera (Herolab) dokumentiert.

## 2.8.2 Etablierung von SYBR<sup>®</sup> Green Real-Time PCR Verfahren

Die Real-Time PCR ermöglicht die direkte Verfolgung der Amplifikation durch die proportionale Zunahme der zu detektierenden Fluoreszenz. Als Fluoreszenzfarbstoff wurde SYBR<sup>®</sup> Green eingesetzt, der nach Anregung von Lichtsignalen fluoresziert und unspezifisch in die doppelsträngige DNA interkaliert (Anonym, 2006b). Die Untersuchungen erfolgten mit einem iQ<sup>TM</sup>5 Real-Time PCR Detektionssystem und der iQ<sup>TM</sup>5 Optical System Software (BioRad Laboratories GmbH, München). Die Auswertung der Daten erfolgte über Cycle Threshold (Ct) Werte, diese beschreiben die Anzahl der Zyklen, an dem die Fluoreszenz erstmalig über das Hintergrundrauschen hinaus steigt (Anonym, 2006b).

#### 2.8.2.1 Ermittlung der optimalen Annealing-Temperatur

Um die optimale Annealing-Temperatur für die beste Anlagerung der Primer in der SYBR<sup>®</sup> Green Real-Time PCR Reaktion zu ermitteln, wurde ein Temperaturgradient zwischen 55 und 65 °C durchgeführt. Die Durchführung von diesem Gradient erlaubt den Test von verschiedenen Annealing-Temperaturen, um den Assay optimieren zu können. Dazu wurden acht verschiedene Annealing-Temperaturen zwischen den

oben angegebenen Temperaturen in einem PCR Lauf getestet. Der Reaktionsansatz ist in Tabelle 37 und das Thermocycler-Programm in Tabelle 38 gezeigt.

**Tabelle 37:** Reaktionsansatz für das SYBR<sup>®</sup> Green Real-Time PCR Verfahren für den spezifischen Nachweis von *B. cereus*, *Cronobacter* spp. und *S. enterica* 

PCR-Reagenzien	Volumen pro Ansatz (25 µl)
	in µl
iQ SYBR <sup>®</sup> Green Supermix (Bio-Rad)	12,51
Primer-f [10 pmol/µl]	0,75
Primer-r [10 pmol/µl]	0,75
Template-DNA	1,00
steriles Reinstwasser DNase/RNase frei	10,0

**Tabelle 38:** PCR-Programm für das SYBR<sup>®</sup> Green Real-Time PCR Verfahren für dieDurchführung eines Temperaturgradienten

Zyklus		Temperatur	Zeit in s	
		in °C		
1 x	Denaturierung	95	300	
40 x	∫ Denaturierung	95	15	
10 X	2 Annealing	55 – 65	45	

## 2.8.2.2 Spezifitätsprüfung des SYBR<sup>®</sup> Green Real-Time PCR Verfahrens mittels Schmelzkurvenanalyse

Der Farbstoff SYBR<sup>®</sup> Green bindet jede doppelsträngige DNA, daher ist es wichtig, die Spezifität der Reaktion anhand einer Analyse der PCR-Produkte zu testen. Dies wurde mittels einer Schmelzkurvenanalyse durchgeführt. Die Schmelzkurvenanalyse kann verschiedene Reaktionsprodukte, einschließlich unspezifischer Produkte, identifizieren. Nach der Beendigung der Amplifikationsreaktion wird durch die Erhöhung der Temperatur in kleinen Schritten die Schmelzkurve hergestellt und die Fluoreszenz in jedem Schritt aufgezeichnet. Die Fluoreszenz steigt an, sobald die

doppelsträngige DNA denaturiert und ein charakteristischer Peak entsteht. Dieser Peak zeigt die Schmelztemperatur, bei der 50 % der Basenpaare bereits getrennt sind. Primer-Dimere (Primer Moleküle die gegenseitig aneinander binden) schmelzen bei einer anderen Temperatur und bilden einen weiteren Peak im selben Reaktionsdurchlauf (Anonym, 2006b). Der Reaktionsansatz dazu ist in Tabelle 37 und das Thermocycler-Programm für die Schmelzkurvenanalyse für *Cronobacter* spp. ist in Tabelle 39, für *B. cereus* und *S. enterica* in Tabelle 40 gezeigt.

**Tabelle 39:** PCR-Programm für die Schmelzkurvenanalyse der SYBR<sup>®</sup> Green Real-Time PCR für *Cronobacter* spp.

Zyklus		Temperatur	Zeit in s	
		in °C		
1 x	Denaturierung	95	300	
40 x	∫ Denaturierung	95	15	
40 %	ک Annealing	57	45	
1 x	Denaturierung	95	60	
1 x	Denaturierung	57	60	
77 x	Annealing	57	10	

**Tabelle 40:** PCR-Programm für die Schmelzkurvenanalyse der SYBR<sup>®</sup> Green Real-Time PCR für *B. cereus* und *S. enterica* 

Zyklus		Temperatur	Zeit in s
		in °C	
1 x	Denaturierung	95	300
40 x	∫ Denaturierung	95	15
+0 X	C Annealing	56	45
1 x	Denaturierung	95	60
1 x	Denaturierung	56	60
79 x	Annealing	56	10

#### 2.8.2.3 Erstellung einer Standardkurve für einen optimierten Assay

Die Effizienz und Reproduzierbarkeit der SYBR<sup>®</sup> Green Real-Time PCR Reaktion wurde durch die Herstellung einer Kalibriergeraden bestimmt. Als Standard wurde die DNA der jeweiligen Typstämme der Zielorganismen eingesetzt, sowie ein Referenzstamm als Negativkontrolle. Dadurch konnte die Nachweisgrenze des Assays bestimmt werden. Für *Cronobacter* spp. wurde der *C. sakazakii* Typstamm LTH 6611 (Tabelle 8) in den DNA Konzentration 50 ng/µl (als Stocklösung) und eine dezimale Verdünnungsreihe von 10 bis 0,001 ng/µl eingesetzt. Als Negativkontrolle für die spätere Auswertung diente *Ent. cloacae* LTH 6960 mit einer DNA Konzentration von 27 ng/µl (Tabelle 8). In Tabelle 37 ist der Reaktionsansatz und in Tabelle 41 das zugehörige Thermocycler-Programm gezeigt.

Tabelle 41: PCR-Programm für die	e Aufzeichnung	einer	Standardkurve	der	SYBR®	Green
Real-Time PCR für Cronobacter spr	).					

Zyklus		Temperatur	Zeit in s
		in °C	
1 x	Denaturierung	95	300
40 x	∫ Denaturierung	95	15
	L Annealing	57	45

Für die Erstellung der Kalibriergeraden für *B. cereus* wurde der Typstamm LTH 6773 (Tabelle 8) in der DNA Konzentration 54 ng/µl und für *S. enterica* wurde der *S*. Enteritidis Typstamm LTH 6488 (Tabelle 8) mit 15 ng/µl (beide als Stocklösung) eingesetzt. Für beide Spezies wurde ebenfalls eine dezimale Verdünnungsreihe von 10 bis 0,001 ng/µl eingesetzt. Als Referenz wurde *L. monocytogenes* LTH 5593 mit einer Konzentration von 228 ng/µl verwendet. Der Reaktionsansatz dazu ist in Tabelle 37 und das Thermocycler-Programm für beide Spezies in Tabelle 42 dargestellt.
Tabelle	42: P	CR-Programm	für	die	Aufzeichnung	einer	Standardkurve	der	SYBR®	Green
Real-Tin	ne PC	R für <i>B. cereus</i>	und	S. (	enterica					

Zyklus		Temperatur	Zeit in s
		in °C	
1 x	Denaturierung	95	300
40 x	∫ Denaturierung	95	15
- <del>1</del> 0 X	l Annealing	56	45

#### 2.8.3 Etablierung von TaqMan Real-Time PCR Assays

Die TaqMan Real-Time PCR benötigt eine Zielgen spezifische Sonde, die an beiden Enden mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert wurde, und ein Zielgen spezifisches Primerpaar. TaqMan basierte PCR Assays weisen eine hohe Spezifität sowie ein hohes Signal-Stör-Verhältnis auf. Die Auswertung der TaqMan Real-Time PCR erfolgt ebenfalls anhand der ermittelten Ct-Werte und der Stärke der Fluoreszenzsignale (Anonym, 2006b).

#### 2.8.3.1 TaqMan Sonden Design

Für einen erfolgreichen TaqMan Assay werden eine Sequenz-spezifische, Fluoreszenz markierte Oligonukleotid-Sonde und zusätzlich Sequenz-spezifische Primer benötigt. Die Sonden wurde mit zwei fluoreszierenden Farbstoffen sowohl am 5'- als auch am 3'-Ende markiert. Für die 5'-Markierung diente als Reporter 6-Carboxy-Fluorescein (FAM) und für die 3'-Markierung wurde als Quencher 6-Carboxy-tetramethylrhodamin (TAMRA) gewählt. Die TaqMan-Sonden wurden zugehörig zu jedem Zielgen mit der Beacon Designer 7 Software (Premier Biosoft) hergestellt. Dazu wurden folgende Kriterien zur Auswahl beachtet:

- Tm 5 °C bis 10 °C höher als Primer
- Länge von 20 bis 29 Basen
- GC-Gehalt von 30 % bis 80 %
- kein G am 5'-Ende
- Entfernung zum Primer maximal 10 Basen

Die Herstellung der TaqMan-Sonden erfolgte durch die Firma Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Deutschland. Die PCR Assays wurden in einem iQ<sup>™</sup>5 Real-Time PCR Detektionssystem durchgeführt und mittels der iQ<sup>™</sup>5 Optical System Software (BioRad Laboratories GmbH, München) ausgewertet. Alle verwendeten Reagenzien stammten ebenfalls von der Firma BioRad. Die Sequenzen der hergestellten TaqMan Sonden sind in Tabelle 43 gezeigt.

Sequenz (5' – 3')	GC-Gehalt
	in %
FAM-CAG CAC GCC ATA CCA T-TAMRA	56,3
FAM-CGT CAG CCG CAG AAA TAG CAG	59,1
C-TAMRA	
FAM-ACT GCT CGT AAT TCG CCG CCA	54,2
TTG-TAMRA	
	Sequenz (5' – 3') FAM-CAG CAC GCC ATA CCA T-TAMRA FAM-CGT CAG CCG CAG AAA TAG CAG C-TAMRA FAM-ACT GCT CGT AAT TCG CCG CCA TTG-TAMRA

**Tabelle 43:** Verwendete TaqMan Sonden für den spezifischen Nachweis von *B. cereus,Cronobacter* spp. und *S. enterica* mittels der TaqMan Real-Time PCR

#### 2.8.3.2 Ermittlung der optimalen Annealing-Temperatur

Um die optimale Annealing-Temperatur für die Amplifikation der Primer und TaqMan Sonde zu ermitteln, wurde eine Auswahl an Annealing-Temperaturen über und unter der errechneten Schmelztemperatur der Primer getestet. Es wurde ebenfalls ein Gradient zwischen 55 °C und 65 °C durchgeführt (siehe Kapitel 2.8.2.1). Der Reaktionsansatz dazu ist in Tabelle 44 und das Thermocycler-Programm in Tabelle 45 gezeigt. **Tabelle 44:** Reaktionsansatz zur Bestimmung der optimalen Annealing-Temperatur der TaqMan Real-Time PCR für *B. cereus*, *Cronobacter* spp. und *S. enterica*

PCR-Reagenzien	Volumen pro Ansatz (20 µl)
	in µl
Sso Fast Probes Supermix	10,0
Primer-f [10 pmol/µl]	0,20
Primer-r [10 pmol/µl]	0,20
Sonde Zielgen [10 pmol/µl]	0,20
Template DNA	1,00
steriles Reinstwasser	8,40

**Tabelle 45:** PCR-Programm zur Bestimmung der optimalen Annealing-Temperatur derTaqMan Real-Time PCR für *B. cereus*, *Cronobacter* spp. und *S. enterica* 

Zyklus		Temperatur	Zeit in s
		in °C	
1 x	Denaturierung	95	300
40 x	∫ Denaturierung	95	15
10 /	l Annealing	55 – 65	45

#### 2.8.3.3 Herstellung einer internen Amplifikationskontrolle

Durch den Einsatz von internen Amplifikationskontrollen können falsch-negative Ergebnisse ausgeschlossen werden. Es kann sonst keine Aussage getroffen werden, ob das Ergebnis der Real-Time PCR tatsächlich negativ war oder ob eine Inhibition der PCR zu einem negativen Ergebnis geführt hat. Die interne Amplifikationskontrolle (IAC) stellt eine Nicht-Ziel-DNA dar, die gleichzeitig mit der Ziel-DNA im selben Reaktionsgefäß unter denselben Reaktionsbedingungen amplifiziert wird (Hoorfar et al., 2004). Für die TaqMan Real-Time PCR wurde eine kompetitive IAC entwickelt. Zur Amplifikation der Ziel-DNA und der IAC wurde dasselbe Primerpaar verwendet. Die Herstellung der IAC erfolgte über eine konventionelle PCR, wobei der pGEM<sup>®</sup>-T-Easy Vektor (Promega; USA) als Template diente. Es wurden dazu zusammengesetzte Primer verwendet. Die überhängenden 5' Enden waren identisch mit den Primern der Ziel-DNA, und die 3' Enden weisen komplementäre Sequenzen zum pGEM<sup>®</sup>-T-Easy Vektor auf. Die zusammengesetzten Primer zur Herstellung der IAC für die jeweilige Spezies sind in Tabelle 46 dargestellt und wurden von der Firma Eurofins MWG Operon hergestellt.

Bezeich-	Sequenz (5' – 3')	mittlere Schmelz-
nung		Temperatur in °C
IAC-fw	GTA TAA AGG CGA CAC TGT AAA C <u>GG</u>	> 75
(ompA)	<u>GCG ATG GCC CAC TAC G</u>	
IAC-rev	GCC AGC GAT GTT AGA AGA GG <u>C TTG</u>	> 75
(ompA)	<u>CCA GCG CCC TAG C</u>	
IAC 2-fw	TTA ACC TTG TGG AGC ATA TTC G <u>GCC</u>	73,8
(invA)	<u>CGC TTT CCA GTC G</u>	
IAC 2-rev	TCC TCA ACT TCA GCA GAT ACC TAC	73,7
(invA)	<u>CGC CTT TGA GTG AGC</u>	
IAC 3 Bac-fw	GGG TCT TCG TAA AGG TAT CG <u>A TTG</u>	74
(groEL)	<u>GGC GCT CTT CCG</u>	
IAC 3 Bac-rev	GCT TCA GCG ATT AAT TGA CC <u>A AAA</u>	71,7
(groEL)	CGC CAG CAA CGC	

**Tabelle 46:** Verwendete Primer zur Konstruktion der internen Amplifikationskontrolle fürB. cereus, Cronobacter spp. und S. enterica

Die kursiv gedruckten Basen stellen die Sequenz der Zielgen spezifischen Primer, die unterstrichenen Basen die Sequenz des pGEM<sup>®</sup>-T-Easy Vektors dar. Die Größe der IAC für das Zielgen *ompA* für *Cronobacter* spp. beträgt 225 bp, für das Zielgen *invA* für *S. enterica* 212 bp und für *B. cereus* mit dem Zielgen *groEL* 233 bp. Die IAC sollte immer größer als die der Ziel-DNA sein, um die Reaktion in Richtung des kleineren Produktes zu lenken.

Abbildung 1 zeigt die Konstruktion der IAC mit den zusammengesetzten Primern. Im ersten Schritt wird in einer konventionellen PCR der pGEM<sup>®</sup>-T-Easy Vektor mit den zusammengesetzten Primern (siehe Tabelle 46) amplifiziert. Die Sequenz der Zielgen spezifischen Primer wird in das entstehende Produkt des pGEM<sup>®</sup>-T-Easy Vektors eingebaut. Somit besitzt die hergestellte IAC die gleichen Primeranlagerungsstellen wie die Ziel-DNA. Dadurch sind die Zielgen spezifischen Primer in der Lage sowohl die Seguenz der Ziel-DNA als auch die Seguenz des pGEM<sup>®</sup>-T-Easy Vektors als IAC gleichzeitig zu amplifizieren.



**Abbildung 1:** Schematische Darstellung zur Konstruktion der internen Amplifikationskontrolle für *B. cereus*, *Cronobacter* spp. und *S. enterica* 

Die konventionelle PCR zur Konstruktion der IAC für alle drei Spezies lief nach dem Pipettierschema wie in Tabelle 47 gezeigt ab.

**Tabelle 47:** Reaktionsansatz der konventionellen PCR zur Konstruktion der internen

 Amplifikationskontrolle für *B. cereus*, *Cronobacter* spp. und *S. enterica*

PCR-Reagenzien	Volumen pro Ansatz (25 µl)
	in µl
PCR-Puffer (S) 10 x mit 15 mM MgCl <sub>2</sub>	2,50
dNTP-Mix [10 mM]	0,50
Primer-f [10 pmol/µl]	2,50
Primer-r [10 pmol/µl]	2,50
Taq-Polymerase [5 U/µl]	0,50
Template pGEM <sup>®</sup> -T-Easy Vektor	0,50
steriles Reinstwasser	16,00

Das Thermocycler-Programm für die Konstruktion der IAC für *Cronobacter* und *S. enterica* ist in Tabelle 48 und für *B. cereus* in Tabelle 49 dargestellt. Die Amplifikationen fanden in einem T1 Thermocycler 96 der Biometra GmbH (Göttingen, Deutschland) statt und alle Reagenzien wurden von der Firma Genaxxon Bioscience GmbH (Ulm, Deutschland) verwendet.

Zyklus		Temperatur	Zeit in s	
		in °C		
1 x	Denaturierung	94	120	
	Denaturierung	94	60	
30 x	Annealing	70	60	
	Elongation	72	90	
1 x	Elongation	72	300	
1 x	Kühlen	4	∞	
1 x 1 x	Kühlen	4	SUU ∞	

**Tabelle 48:** PCR Programm der konventionellen PCR zur Konstruktion der internenAmplifikationskontrolle für Cronobacter spp. und S. enterica

 Tabelle 49:
 PCR
 Programm
 der
 konventionellen
 PCR
 zur
 Konstruktion
 der
 internen

 Amplifikationskontrolle für *B. cereus* Amplifikationskontrole für *B. cereus*

Zyklus		Temperatur	Zeit in s
		in °C	
1 x	Denaturierung	94	120
	Denaturierung	94	60
30 x	Annealing	71	60
	L Elongation	72	30
1 x	Elongation	72	180
1 x	Kühlen	4	∞

Das vervielfältigte PCR-Produkt wurde mittels einem 2 %igen Agarosegel identifiziert und zur Bestätigung der richtigen Größe des Produktes wurde ein 100 bp Marker eingesetzt (Kapitel 2.8.1.4). Anschließend wurde die Gelbande in der richtigen Größe ausgeschnitten und mittels des Wizard<sup>®</sup> SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, USA) gemäß Herstelleranleitung aufgereinigt. Das aufgereinigte Amplikon wurde in den pGEM<sup>®</sup>-T-Easy Vektor kloniert und in Single Step (KRX) kompetente Zellen (beide Promega, USA) transformiert.

# Ligation der PCR-Produkte zur Herstellung der internen Amplifikationskontrolle für den Nachweis von *B. cereus*, *Cronobacter* spp. und *S. enterica*:

Die Ligation der PCR-Produkte zur Herstellung der IAC erfolgte in den pGEM<sup>®</sup>-T-Easy Vektor. Der Vektor ist ein 3015 bp großes Plasmid und enthält eine Ampicillin-Resistenz. Zudem liegt ein Thymin-Überhang vor, der eine erfolgreiche Ligation von PCR-Produkten ermöglicht. Das Plasmid enthält außerdem das *lacZ*-Gen, dies kodiert für das Enzym ß-Galaktosidase und wird durch die Zugabe von Isopropyl-1thio-ß-D-Galaktose (IPTG) gebildet. Das gebildete Enzym spaltet 5-Brom-4-chlor-3indoxyl-ß-D-Galaktopyranosid (X-Gal), dadurch wird ein blauer Farbstoff gebildet und die Bakterienkolonien werden blau gefärbt. Die Multiple Cloning Site (MCS) liegt im *lacZ*-Gen, so dass dieses Gen bei erfolgreicher Ligation unterbrochen ist und keine ß-Galaktosidase gebildet werden kann. Die Bakterienkolonien haben daher eine weiße Farbe und können mittels der Blau-Weiß-Selektion auf LB/AXI Platten (Kapitel 2.3) unterschieden werden.

Der Ligationsansatz zur Herstellung der IAC für alle drei Spezies ist in Tabelle 50 gezeigt und die Inkubation erfolgte über Nacht bei 16 °C in einem Biometra T1 Thermocycler.

Volumen pro Ansatz (10 μl)	
in µl	
1,00	
0,60	
1,00	
4,40	
3,00	

**Tabelle 50:** Zusammensetzung des Ligationsansatzes zur Herstellung der internenAmplifikationskontrolle

## Transformation des pGEM<sup>®</sup>-T-Easy Vektors in chemisch kompetente Zellen zur Herstellung der internen Amplifikationskontrolle für *B. cereus*, <u>Cronobacter spp. und S. enterica</u>:

Für die Transformation wurden zu je 2 µl Ligationsansatz je 50 µl chemisch kompetente Zellen (Single Step Competent Cells, Promega GmbH, Mannheim) gegeben und das Gemisch auf Eis für 30 min inkubiert. Danach wurde der Ansatz einem Hitzeschock unterzogen und dafür zuerst 45 sec bei 42 °C im Wasserbad erhitzt und sofort für weitere 2 min auf Eis gekühlt. Zu den Zellen wurden 450 µl auf 37 °C vorgewärmtes SOC Medium (Kapitel 2.3) gegeben und dann bei 37 °C und 300 RPM für 1 Stunde inkubiert. Zweimal 150 µl und einmal 200 µl der transformierten Zellen wurde auf LB/AXI-Platten (Kapitel 2.3) ausgestrichen und bei 37 °C für 24 h inkubiert. Aufgrund des in den Agarplatten enthaltenen Ampicillins können nur Zellen wachsen, die ein funktionierendes Plasmid mit dem Ampicillin-Resistenzgen tragen. Durch die Blau-Weiß-Selektion können somit transformierte Zellen von nicht-transformierten Zellen unterschieden werden. Von den weißen Kolonien wurden zufällig 10 mit einem sterilen Zahnstocher aufgenommen und sowohl auf eine LB/AXI-Platte ausgestrichen als auch in 10 ml LB Medium mit Ampicillin (100 mg/ml) gegeben und über Nacht bei 37 °C und 180 RPM inkubiert. Das Plasmid, das die Sequenz für die IAC enthält, wurde anschließend mit dem EndoFree<sup>®</sup> Plasmid Purification Maxi Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland) nach der Herstelleranleitung aufgereinigt, um eine größere Menge an Plasmid zu erhalten, und anschließend mittels dem Restriktionsenzym Nde I (Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland) linearisiert.

## Linearisierung des Vektors pGEM<sup>®</sup>-T-Easy zur Herstellung der internen Amplifikationskontrolle für alle drei Spezies:

Der Ansatz für die Linearisierung ist in Tabelle 51 gezeigt.

**Tabelle 51:** Reaktionsansatz zur Linearisierung des Vektors pGEM<sup>®</sup>-T-Easy zur Herstellung der internen Amplifikationskontrolle

Reagenzien	Volumen pro Ansatz (20 μl)		
	in µl		
Puffer 0 [10 x]	2,00		
Nde I [10 u/ µl]	2,00		
Plasmid [51 ng/ μl]	10,0		
Nuklease freies Wasser	6,00		

Die Inkubation erfolgte für 3 Stunden bei 37 °C und die Inaktivierung des Enzyms wurde bei 65 °C für 20 min durchgeführt. Danach erfolgte die Bestimmung der Konzentration mittels des Spektrophotometer Nanodrop (Nanodrop<sup>™</sup> 4000 Thermo Scientific, USA) sowie die Bestimmung der Kopienzahl (Formel 1). Die IAC wurde zur Stabilisierung bei -20°C aufbewahrt und die Verdünnungen erfolgten in 10 mM Tris.

#### Formel 1: Berechnung der Kopienzahl pro µl

Kopienzahl/µl =  $\frac{m}{M_r \times y} \times A_G$ 

m = Masse des Plasmids in  $g/\mu l$ 

 $M_r$  = Mittel des relativen Molekulargewichtes eines Nukleotids, bei dsDNA 660 g/mol

y = Anzahl der Basenpaare

 $A_G$  = Avogadrosche Zahl = 6 x 10<sup>23</sup> (mol<sup>-1</sup>)

Als Detektionssystem für die IAC wurde ebenfalls eine TaqMan Sonde verwendet. Diese sind am 5'-Ende mit dem Reporter-Farbstoff Hexachlorfluorescein (HEX) und am 3'-Ende mit dem Quencher-Farbstoff BlackHole<sup>™</sup> Dark Quencher (BHQ2) markiert und besitzen die angegebenen Sequenzen, wie in Tabelle 52 gezeigt. Die Primer und TaqMan Sonden wurden ebenfalls mittels der Software Beacon Designer 7 (Premier Biosoft) hergestellt (siehe Kapitel 2.8.3.1).

**Tabelle 52:** Verwendete TaqMan Sonden der TaqMan Real-Time PCR für die Detektion der internen Amplifikationskontrolle für *B. cereus*, *Cronobacter* spp. und *S. enterica* 

Bezeich-	Sequenz (5' – 3')	GC-Gehalt in
nung		%
IAC-probe	HEX-CCG CTC CTT TCG CTT TCT	56,5
(Cronobacter spp.)	TCC CT-BHQ2	
IAC 2 Salm-probe	HEX-CGC CGC AGC CGA ACG ACC	76,2
(S. enterica)	GAG-BHQ2	
IAC 3 probe	HEX-TCC TCG CTC ACT GAC TCG	63,6
(B. cereus)	CTG C-BHQ2	

Mittels einer dezimalen Verdünnungsreihe der IAC wurde die niedrigste Konzentration an IAC in der TaqMan Real-Time PCR ermittelt, die gerade noch in der Lage war, ein positives Signal zu erzielen, ohne die Amplifikation der Ziel-DNA zu hemmen. Als Template dienten die jeweiligen Typstämme der einzelnen Spezies in zwei unterschiedlichen Konzentrationen. Der Reaktionsansatz und das Thermocycler-Programm sind in Tabelle 53, Tabelle 54 und Tabelle 55 dargestellt. Der Mastermix wurde von der Firma BioRad Laboratories GmbH verwendet.

Tabelle	53:	Reaktions	sansatz	zur	Bestin	nmung	der	niedrig	gsten	Konze	entration	der	inter	nen
Amplifika	tions	skontrolle	mittels	TaqN	/lan R	eal-Tin	ne P(	CR für	B. ce	ereus,	Cronoba	cter	spp.	und
S. enterio	ca													

Volumen pro Ansatz (20 µl)
in µl
10,0
1,20
1,20
0,20
0,30
2,00
1,00
4,10

Für *Cronobacter* spp. wurde folgendes Thermocycler-Programm verwendet (Tabelle 54).

**Tabelle 54:** PCR-Programm der TaqMan Real-Time PCR für den spezifischen Nachweis von

 *Cronobacter* spp.

An	zahl der Zyklen	Art der Zyklen	Temperatur	Zeit in s
			in °C	
1		Denaturierung	95	300
	Į	Denaturierung	95	15
40	L	Annealing	56	30

Für *B. cereus* und *S. enterica* wurde nachfolgendes Programm verwendet (Tabelle 55).

**Tabelle 55:** PCR-Programm der TaqMan Real-Time PCR f
 Fir den spezifischen Nachweis von

 B. cereus und S. enterica

Anzahl	der Zyklen	Art der Zyklen	Те	mperatur	Zeit in s	
			in	°C		
1		Denaturierung	95		300	
	Į	Denaturierung	95		15	
40	Ĺ	Annealing	56	i	45	

Die Auswertung erfolgte anhand der ermittelten Ct-Werte und der exponentiellen Kurvenverläufe der Fluoreszenzsignale der Reporter Farbstoffe FAM und HEX.

## 2.8.3.4 Bestimmung der Sensitivität der TaqMan Real-Time PCR mittels einer Standardkurve

Um die Effizienz und die Reproduzierbarkeit der TaqMan Real-Time PCR mit der IAC zu bestimmen wurde eine Kalibriergerade mit verschiedenen DNA-Konzentrationen erstellt (siehe Kapitel 2.8.2.3). Die Amplifikation der Ziel-DNA und die der IAC fanden in einem Reaktionsgefäß statt. Die Bestimmung erfolgte in einem dreifachen Ansatz und als Ziel-DNA wurden die jeweiligen Typstämme der Spezies eingesetzt.

Reaktionsansatz und Thermocycler-Programm dazu sind in Tabelle 56 sowie Tabelle 54 und Tabelle 55 gezeigt.

**Tabelle 56:** Reaktionsansatz der TaqMan Real-Time PCR mit interner Amplifikationskontrolle für den spezifischen Nachweis von *B. cereus*, *Cronobacter* spp. und *S. enterica* 

PCR-Reagenzien	Volumen pro Ansatz (20 μl)
	in µl
Sso Fast Probes Supermix	10,0
Primer ompA-fw J1 [10 pmol/µl]	1,20
Primer ompA-rev J1 [10 pmol/µl]	1,20
Sonde ompA_probe [10 pmol/µl]	0,20
Sonde IAC-probe [10 pmol/µl]	0,30
Template DNA	2,00
IAC	1,00
steriles Reinstwasser	4,101

#### 2.8.3.5 Bestimmung der Spezifität der TaqMan Real-Time PCR Verfahren

Für die Validierung des TaqMan Verfahrens unterschiedliche wurden Lebensmittelisolate der jeweiligen Spezies sowie die zugehörigen Typstämme verwendet. Die Cronobacter Lebensmittelisolate sind in Tabelle 10, die B. cereus Lebensmittelisolate in Tabelle 9 und die S. Enteritidis Lebensmittelisolate in Tabelle 11 gezeigt. Die verwendeten Typ- und Referenzstämme dazu sind in Tabelle 8 dargestellt. Die Validierung des Assay erfolgte in einem dreifachen Ansatz mit der niedrigsten IAC Verdünnung, ohne die Amplifikation der Ziel-DNA zu stören. Der Reaktionsansatz ist in Tabelle 56 und die Programme für den Thermocycler in Tabelle 54 und Tabelle 55 dargestellt. Es wurde eine dreifach Bestimmung für alle Proben durchgeführt.

## 2.9 Kulturelle Nachweisverfahren für die Zielkeime Bacillus cereus, Cronobacter spp. und Salmonella enterica

#### 2.9.1 Bestimmung von Bacillus cereus in Trockenmilchprodukten

Die Bestimmung von *B. cereus* in Trockenmilchprodukten erfolgte laut der amtlichen Sammlung von Untersuchungsmethoden nach § 64 LFGB. Es wurde die Methode L 01.00-53:1992 (Anonym, 1992), "Bestimmung von präsumtiver *Bacillus cereus* in Milch und Milchprodukten", ein Verfahren mit selektiver Anreicherung angewendet. Es wurde eine Probenmenge von 1 g der zu untersuchenden Trockenmilchpulver verwendet, in 10 ml Trypton-Soja-Polymyxin-Bouillon gelöst und angereichert für 48 Stunden bei 30 °C. Der Ausstrich erfolgte danach auf Polymyxin-Pyruvat-Eigelb-Mannit-Bromthymolblau-Agar (37 °C, 24 Stunden).

Im Vergleich dazu erfolgte die Bestimmung mittels einer Modifizierung der Methode nach § 35 LFGB (Anonym, 1992). Hierfür wurden 10 g des zu untersuchenden Milchpulvers in 90 ml Hirn-Herz-Bouillon homogenisiert und für 18 Stunden bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde ein Verdünnungsausstrich auf Polymyxin-Pyruvat-Eigelb-Mannit-Bromthymolblau-Agar durchgeführt. Die Platten wurden bei 37 °C für 24 bis 48 Stunden inkubiert und danach ausgewertet. Typische *B. cereus* Kolonien haben einen unregelmäßigen Rand, eine blaugrüne Farbe und weisen einen breiten Präzipitathof auf. Es wurde bei beiden Methoden immer eine dreifach Bestimmung für jedes Pulver durchgeführt.

#### 2.9.2 Bestimmung von Cronobacter sakazakii in Trockenmilchprodukten

Die Ermittlung von C. sakazakii in Milch und Milchprodukten erfolgte mittels der ISO/TS 22964 | IDF/RM 210:2006 "Milk and milk products - Detection of Enterobacter sakazakii" (Anonym, 2006a). Sie ist für EU-Länder ein Standardverfahren zum Nachweis von C. sakazakii in Trockenmilchpulvern und Säuglingsnahrung (Verordnung (EG) Nr. 2073/2005 der Kommission vom 15. mikrobiologische Kriterien November 2005 über für Lebensmittel). Eine Probenmenge von 10 g wurde mit 90 ml gepuffertem Peptonwasser homogenisiert und für 18 Stunden bei 37 °C inkubiert. Anschließend erfolgte eine selektive

Anreicherung in flüssigem Nährmedium. Hierfür wurden 100 µl in 10 ml modifizierter Lauryl-Sulfat-Tryptose-Bouillon überimpft und bei 44 °C für 24 Stunden inkubiert. Nach dieser Inkubation erfolgte ein Verdünnungsausstrich auf *Enterobacter sakazakii* Isolations Agar. Die Platten wurden für weitere 24 Stunden bei 44 °C bebrütet. Typische *Cronobacter* Kolonien sind klein und grün bis blaugrün gefärbt, wohingegen untypische Kolonien transparent oder violett gefärbt sind. Für jede Probe wurde ein dreifacher Ansatz durchgeführt.

#### 2.9.3 Bestimmung von Salmonella enterica in Trockenmilchprodukten

Der Nachweis von S. enterica erfolgt laut der amtlichen Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 LFGB. Es wurde die Methode L00.00-20, 2004-12 (Anonym, 2008), "Horizontales Verfahren zum Nachweis von Salmonella spp. in Lebensmitteln", angewendet. Die Bestimmung nach diesem Verfahren erfolgt in vier aufeinander folgenden Schritten. Für Milch- und Milcherzeugnisse wurde eine Probenmenge von 25 g eingesetzt und mit 225 ml gepuffertem Peptonwasser verdünnt. Die Proben wurden anschließend bei 37 °C für 18 Stunden bebrütet. Eine weitere Anreicherung erfolgte in der selektiven Rappaport-Vassiliadis Anreicherungsbouillon bei 41,5 °C für 24 Stunden. Dafür wurden 100 µl aus der Verdünnung in 10 ml dieser Bouillon überimpft. Die Identifizierung erfolgte mittels Ausstrich auf Xylose-Lysin-Deoxycholat-Agar. Die Platten wurden für 24 Stunden bei 37 °C bebrütet. Typische Salmonella Kolonien besitzen ein schwarzes Zentrum und die rote Farbe des Mediums bleibt erhalten, da kein Umschlag des pH-Indikators stattfindet. Alle getesteten Proben wurden in einem dreifachen Ansatz untersucht.

# 2.10 Nachweis von *Cronobacter sakazakii* und *Salmonella enterica* in künstlich kontaminierten Trockenmilchpulvern

## 2.10.1 Künstliche Kontamination von rekonstituierten Trockenmilchpulvern mit Cronobacter sakazakii und Salmonella Enteritidis

Um die Nachweismethoden am Produkt zu erproben wurden verschiedene Milcherzeugnisse (Tabelle 7) künstlich kontaminiert. Hierbei sollten verschiedene Stufen der Kontamination sowie verschiedene Anreicherungszeiten untersucht werden. Für die künstliche Kontamination wurden drei verschiedene Milchpulver ausgewählt: Pulverförmige Säuglingsanfangsnahrung (Humana, Folgemilch 2), Molkenproteinpulver mit einem 30 %igen Proteinanteil (Biolac) und Molkenpulver mit einem Proteinanteil zwischen 10 % und 15 % (Arlafoods) (Tabelle 7). Alle drei Pulver wurden zuerst nach der amtlichen Methode ISO/TS 22964 auf die Abwesenheit von C. sakazakii, laut § 64 LFGB L00.00-20 auf die Abwesenheit von Salmonella und nach § 64 LFGB L 01.00-53 auf die Abwesenheit von B. cereus untersucht (siehe Kapitel 2.9). In Abbildung 2 ist der Versuchsablauf für die Kontamination der Übernachtkultur Milchpulver abgebildet. Eine des jeweiligen Typstammes (C. sakazakii LTH 6611 und S. Enteritidis LTH 6488) wurde hergestellt und mit Hilfe einer Verdünnungsreihe auf die Konzentrationen 10 KbE/ml und 100 KbE/ml eingestellt. 10 g der jeweiligen Trockenmilchprodukte wurden mit 90 ml Hirn-Herz-Bouillon rekonstituiert (siehe Kapitel 2.3) und mit je 1 ml der verschiedenen Bakteriensuspensionen inokuliert. Als Negativkontrolle diente je 1 ml 0,9 %ige Natriumchlorid-Lösung (siehe Kapitel 2.3). Die Homogenisation erfolgte mittels eines Stomachers für 2 min und die Inkubation wurde bei 37 °C durchgeführt. Die Probennahmen erfolgten sofort, und nach 4, 6, 12, 14 und 18 Stunden Inkubation. Aus einem Teil der Proben wurde mittels Zentrifugation Biomasse gewonnen und DNA isoliert (Kapitel 2.5). Anschließend erfolgte der Nachweis durch die TagMan Real-Time PCR (Kapitel 2.8.3). Für eine Korrelation zwischen den Real-Time PCR Ergebnissen und den ermittelten Keimzahlen wurden die Proben zusätzlich auf Enterobacter sakazakii Isolations Agar (für C. sakazakii) und Xylose-Lysin-Deoxycholat-Agar (für S. Enteritidis) (siehe Kapitel 2.3) ausplattiert und die Keimzahlen bestimmt. Dafür wurden für jede Probe drei Agarplatten des jeweiligen

Mediums verwendet. Der komplette Versuchsablauf wurde dreimal wiederholt und ist in Abbildung 2 dargestellt.



**Abbildung 2:** Schematische Darstellung des Versuchsablaufes für die künstliche Kontamination von Molkenproteinpulver, Molkenpulver und pulverförmiger Säuglingsnahrung

## 2.10.2 Trocknungsversuche von künstlich kontaminierter Säuglingsnahrung mit Cronobacter sakazakii

Für die experimentelle Validierung des Verfahrens zum Nachweis von dehydrierten *C. sakazakii* Zellen wurde ausschließlich pulverförmige Säuglingsnahrung (Humana, Folgemilch 2) (Tabelle 7) verwendet. Dadurch konnte eine natürliche Kontamination von Säuglingsnahrung mit *C. sakazakii* im Labormaßstab nachgestellt werden. Jeweils 10 g des Pulvers wurden dafür in sterile Petrischalen gefüllt und für jede Probenahme mit 1, 0,1 und 0,01 KbE/g *C. sakazakii* LTH 6611 inokuliert. Für diesen Versuch wurde die Wasseraktivität (ein Maß für frei verfügbares Wasser, auch a<sub>w</sub>-

Wert) der Säuglingsnahrung vor der Kontamination und nach der Trocknung mittels eines a<sub>w</sub>-Wert Messgerätes (Hygropalm AW-D10, Rotronic, Ettlingen, Deutschland) bestimmt. Der aw-Wert der nicht kontaminierten Pulver lag in einem Bereich von 0,20 bis 0,22. Nach der Inokulation wurden die Pulver im Inkubationsschrank bei 37°C für 18 Stunden getrocknet, um den ungefähren aw-Wert des nicht kontaminierten Pulvers wieder zu erreichen. Der aw-Wert der kontaminierten Säuglingsnahrung lag nach der Trocknung bei einem Wert von 0,19 bis 0,22. Durch diese Methode wurde der Trocknungsprozess von Säuglingsnahrung im Labor simuliert und die C. sakazakii Zellen unter Stress gesetzt werden. Als Negativkontrolle diente 0,9 %-ige Natriumchlorid-Lösung (siehe Kapitel 2.3). Die Petrischalen wurden mit Parafilm verschlossen und dunkel bei Raumtemperatur für 4 Wochen gelagert. Für jede C. sakazakii Konzentration wurden 30 Proben hergestellt. Die Validierung der Methode erfolgte laut DIN EN ISO 16140 (Anonym, 2005). Nach dieser Vorschrift mindestens drei verschiedene Konzentrationen bei der künstlichen sollen Kontamination und eine Negativkontrolle eingesetzt werden. Zudem muss eine Mehrfachbestimmung pro Konzentration durchgeführt werden, idealerweise zwischen 25 und 50 Proben. Die neue entwickelte Methode wurde im Vergleich mit einer modifizierten Methode nach ISO/TS 22964 (Anonym, 2006a) durchgeführt. Dabei erfolgte alternativ die selektive Anreicherung in Cronobacter Screening Bouillon (siehe Kapitel 2.3). Die Probenahme erfolgten sofort und nach 4 Wochen. Dabei wurden die kontaminierten Pulver in 90 ml gepuffertem Peptonwasser (siehe Kapitel 2.3) rekonstituiert und in einem Stomacher homogenisiert. Die Inkubation erfolgte für 18 Stunden bei 37 °C. Anschließend erfolgte der Ausstrich auf Enterobacter sakazakii Isolations Agar (siehe Kapitel 2.3) und zusätzlich wurden 100 µl in 10 ml Cronobacter Screening Bouillon überführt und für weitere 24 Stunden bei 42 °C inkubiert. Außerdem erfolgte die Entnahme von je 1 ml der Anreicherung für die Isolierung von genomischer DNA (Kapitel 2.5), die für die TaqMan Real-Time PCR (siehe Kapitel 2.8.3) benutzt wurde. Aus der Cronobacter Screening Bouillon wurde ebenfalls 1 ml der Kultur entnommen und abschließend erfolgte ein weiterer Verdünnungsausstrich auf Enterobacter sakazakii Isolations Agar. Die blau-grünen Kolonien zeigen ein positives Ergebnis für C. sakazakii an, deshalb wurden diese Kolonien zur zusätzlichen Bestätigung mittels einer Kolonie-PCR untersucht.

## Kolonie PCR zur Bestätigung von *C. sakazakii* auf dem *Enterobacter sakazakii* Isolations Agar:

Der Reaktionsansatz für die Kolonie-PCR ist in Tabelle 57 und das Thermocycler-Programm in Tabelle 58 dargestellt. Es wurden die *ompA*-Gen Primer des spezifischen Nachweises von *Cronobacter* spp. (vgl. Tabelle 31) verwendet, um eine konventionelle PCR zum Nachweis von *C. sakazakii* durchzuführen. Dabei wurde Koloniematerial von dem *Enterobacter sakazakii* Isolations Agar, ohne DNA Isolierung, direkt für die PCR verwendet.

**Tabelle 57:** Reaktionsansatz f
 ür die konventionelle Kolonie-PCR zum spezifischen Nachweis von Cronobacter auf dem Enterobacter sakazakii Isolations Agar

PCR-Reagenzien	Volumen pro Ansatz (25 μl)
	in µl
PCR-Puffer 10 x mit 15 mM MgCl <sub>2</sub>	2,50
dNTP-Mix [je 10 mM]	0,50
Primer ompA-fw J1 [10 pmol/µl]	1,25
Primer ompA-rev J1 [10 pmol/µl]	1,25
Taq-Polymerase [5 U/μl]	0,125
steriles Reinstwasser	19,40

**Tabelle 58:** PCR-Programm f

 Conventionelle
 Kolonie-PCR
 zum
 spezifischen
 Nachweis
 von
 Cronobacter
 auf dem
 Enterobacter sakazakii
 Isolations
 Agar
 Agar

Zyklus		Temperatur	Zeit in s	
		in °C		
1 x	Denaturierung	95	600	
	Denaturierung	95	60	
30 x	Annealing	57	60	
	L Elongation	72	90	
1 x	Elongation	72	300	
1 x	Kühlen	4	×	

Es wurden blau-grüne Kolonien der Agarplatten mit einem sterilen Zahnstocher aufgenommen und direkt in den PCR Mastermix übertragen. Von jeder *C. sakazakii* Konzentration der künstlichen Kontamination in Säuglingsnahrung wurden je 10 Platten, wenn möglich, verwendet und mittels Kolonie-PCR untersucht. Als Positivkontrolle diente der *C. sakazakii* LTH 6611 Typstamm und als Negativkontrolle *Ent. dissolvens* LTH 6665 (beide siehe Tabelle 8), eine Kontrolle ohne Probe wurde ebenfalls mitgeführt. Der Reaktions-Puffer und die Taq Polymerase wurden von der Firma New England Biolabs (Frankfurt, Deutschland) verwendet. Das PCR-Produkt mit einer Größe von 150 bp wurde mittels einem 2 %igen Agarosegel der Größe nach aufgetrennt, gefärbt mit Ethidiumbromid und unter UV-Licht (302 nm) sichtbar gemacht (siehe Kapitel 2.8.1.4).

## 3. Ergebnisse

Für den spezifischen Nachweis von *B. cereus*, *Cronobacter* spp. und *S. enterica* in Trockenmilchprodukten wurde in drei Stufen ein spezifisches TaqMan Real-Time PCR Verfahren entwickelt (Kapitel 2.8, 3.2, 3.3 und 3.4). Die neu entwickelten Nachweismethoden wurden zusätzlich in künstlich kontaminierten rekonstituierten Trockenmilchprodukten angewendet (Kapitel 2.10.1 und 3.6.1). Zudem erfolgte die Simulation einer natürlichen Kontamination von pulverförmiger Säuglingsnahrung mit dehydrierten *C. sakazakii* Zellen im Labormaßstab (Kapitel 2.10.2 und 3.6.2). Zur Unterscheidung der *B. cereus* und auch der *Cronobacter* spp. Lebensmittelisolate auf Stammebene, diente eine Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) PCR (Kapitel 2.6.3, 2.7.1, 3.1.1 und 3.5.1). Zudem wurden die *B. cereus* Isolate über Sequenzierung ihrer 16S rDNA und einer dadurch möglichen Spezieszuordnung identifiziert werden (Kapitel 2.6.2, 3.5.1). Die *C. sakazakii* und *C. malonaticus* Isolate wurden zusätzlich mittels einer spezifischen konventionellen PCR differenziert (Kapitel 2.7.2 und 3.1.2).

#### 3.1 Differenzierung von Cronobacter spp.

## 3.1.1 Random Amplified Polymorphic DNA PCR zur Unterscheidung der *Cronobacter* spp. Isolate

Von allen verwendeten *Cronobacter* Lebensmittelisolaten (Tabelle 10) wurde die genomische DNA isoliert (Kapitel 2.5) und mittels der RAPD-PCR (Kapitel 2.7.1) eine Differenzierung auf Stammesebene durchgeführt. Die RAPD-PCR erfolgte mit dem Primer UBC245 (Tabelle 21). Die Bandenmuster von 18 *Cronobacter* Isolate (vgl. Tabelle 10) sind exemplarisch in Abbildung 3 dargestellt. Die RAPD-PCR Bandenmuster wurden visuell anhand der unterschiedlichen Größen und Anzahl der Banden im Agarosegel beurteilt. Der Primer UBC254 erzeugte bei allen getesteten Isolaten 6 bis 15 amplifizierte Produkte mit Größen zwischen 0,45 und 3,5 kb. Dadurch wurde festgestellt, dass 35 von den 40 untersuchten *Cronobacter* 

Lebensmittelisolaten gut differenzierbare und somit unterschiedliche Bandenmuster zeigen.



Abbildung 3: Agarosegel (2 %) mit den RAPD-PCR-Mustern von ausgewählten *Cronobacter* Lebensmittelisolaten (Tabelle 10) erhalten durch den Primer UBC 245. Für eine bessere Übersicht sind für *C. sakazakii* die Abkürzung CS und für *C. malonaticus* CM in Klammern mit den zugehörigen LTH Nummern gezeigt. M: 1 kb DNA Marker, 1: (CS) LTH 6611, 2: (CS) LTH 6562, 3: (CM) LTH 6575, 4: (CS) LTH 6576, 5: (CS) LTH 6577, 6: (CS) LTH 6578, 7: (CS) LTH 6579, 8: (CS) LTH 6589, 9: (CS) LTH 6591, 10: (CS) LTH 6592, 11: (CM) LTH 6593, 12: (CS) LTH 6594, 13: (CS) LTH 6595, 14: (CS) LTH 6596, 15: (CS) LTH 6597, 16: (CS) LTH 6598, 17: (CM) LTH 6599, 18: (CS) LTH 6600, M: 100 bp DNA Marker.

## 3.1.2 Spezifische konventionelle PCR zur Differenzierung von *Cronobacter malonaticus* und *Cronobacter sakazakii*

Zur Differenzierung zwischen *C. malonaticus* und *C. sakazakii* wurde eine spezifische konventionelle PCR mit dem Zielgen *rpoB* (Kapitel 1.2) durchgeführt (Kapitel 2.7.2). Getestet wurden die Typstämme *C. malonaticus* und *C. sakazakii*, alle Lebensmittelisolate sowie neun Typstämme des Genus *Cronobacter* als Referenz mit zwei verschiedenen Primerpaaren. Dadurch konnte eine Unterscheidung zwischen *C. sakazakii* und *C. malonaticus* anhand verschieden großer PCR-Produkte gemacht werden. Die Primer Cmal (Tabelle 24) wurden zur Identifikation von *C. malonaticus* eingesetzt und ergeben ein PCR-Produkt mit der Größe von 287 bp. Die Ergebnisse dazu sind exemplarisch in Abbildung 4 gezeigt und Tabelle 59 zeigt die kompletten Ergebnisse der konventionellen PCR mit diesem Primerpaar. Der *C. malonaticus* Typstamm LTH 7003 sowie die Isolate LTH 6575, 6593, 6599, 6605, 6615 und 6616 weisen PCR-Produkte in der erwartenden Größe auf (mit einem + in Tabelle 59 gekennzeichnet). Der *C. sakazakii* Typstamm LTH 6611 hat kein PCR-Produkt ergeben, so wie die restlichen untersuchten Lebensmittelisolate. Auch alle Referenzstämme ergaben bis auf *C. helveticus* LTH 7001 kein PCR-Produkt. Die *rpoB*-Gen Sequenz konnte mit den Primern Cmal somit auch bei *C. helveticus* in der erwartenden Größe nachgewiesen werden (Tabelle 59).



**Abbildung 4:** Agarosegel (2 %) mit den PCR-Produkten der spezifischen konventionellen PCR mit dem Zielgen *rpoB* und ausgewählten *Cronobacter* Lebensmittelisolaten (Tabelle 10) unter Verwendung der Cmal Primer.

Für eine bessere Übersicht sind für *C. sakazakii* die Abkürzung CS und für *C. malonaticus* CM in Klammern mit den zugehörigen LTH Nummern gezeigt. M: 100 bp DNA Marker, 1: (CS) LTH 6611<sup>T</sup>, 2: (CM) LTH 7003<sup>T</sup>, 3: (CS) LTH 6562, 4: (CM) LTH 6575, 5: (CS) LTH 6576, 6: (CS) LTH 6577, 7: (CS) LTH 6578, 8: (CS) LTH 6579, 9: (CS) LTH 6589, 10: (CS) LTH 6591, 11: (CS) LTH 6592, 12: (CM) LTH 6593, 13: (CS) LTH 6594, 14: (CS) LTH 6595, 15: (CS) LTH 6596, 16: (CS) LTH 6597, 17: (CS) LTH 6598, 18: (CM) LTH 6599, M: 100 bp DNA Marker

Bezeichnung <sup>a</sup>	Amplifikation <sup>b</sup>	Bezeichnung	Amplifikation
LTH 6611	-	LTH 6609	-
LTH 7003	+	LTH 6610	-
LTH 6562	-	LTH 6612	-
LTH 6575	+	LTH 6613	-
LTH 6576	-	LTH 6614	-
LTH 6577	-	LTH 6615	+
LTH 6578	-	LTH 6616	+
LTH 6579	-	LTH 6617	-
LTH 6589	-	LTH 6618	-
LTH 6591	-	LTH 6619	-
LTH 6592	-	LTH 6620	-
LTH 6593	+	LTH 6621	-
LTH 6594	-	LTH 6626	-
LTH 6595	-	LTH 6627	-
LTH 6596	-	LTH 6628	-
LTH 6597	-	LTH 6962	-
LTH 6598	-	LTH 6963	-
LTH 6599	+	LTH 6961	-
LTH 6600	-	LTH 6960	-
LTH 6601	-	LTH 7004	-
LTH 6602	-	LTH 7005	-
LTH 6603	-	LTH 6968	-
LTH 6604	-	LTH 7008	-
LTH 6605	+	LTH 7009	-
LTH 6606	-	LTH 7001	+
LTH 6607	-	LTH 7002	-
LTH 6608	-	NTC <sup>c</sup>	-

**Tabelle 59:** Ergebnisse der spezifischen konventionellen PCR zur Charakterisierung von

 *C. malonaticus* mit dem Primerpaar Cmal

<sup>a</sup> siehe Tabelle 10

 $b^{+}$  + = positive Amplifikation; - = keine Amplifikation

<sup>c</sup> NTC = no template control

Die Primer Csak (Tabelle 24) wurden zur Identifikation von *C. sakazakii* eingesetzt. Diese Primer weisen jedoch auch *C. malonaticus* nach, da die *rpoB*-Gen Sequenz bei den beiden Spezies sehr ähnlich ist. Die Ergebnisse sind exemplarisch in Abbildung 5 gezeigt und die restlichen Ergebnisse sind in Tabelle 60 dargestellt. Für die positiven Proben wurde ein PCR-Produkt in der Größe von 580 bp erwartet. Die Typstämme *C. malonaticus* LTH 7003, *C. sakazakii* LTH 6611 sowie alle getesteten Lebensmittelisolate weisen PCR-Produkte in der erwartenden Größe auf (gekennzeichnet mit + in Tabelle 60). Das Isolat LTH 6612 weist sowohl mit den Primern Cmal als auch mit Csak kein PCR-Produkt auf. Somit konnte es weder als *C. sakazakii* noch als *C. malonaticus* identifiziert werden. Die Referenzstämme sowie eine Kontrolle mit Wasser anstatt der Probe (NTC) ergaben kein PCR-Produkt. Der *C. helveticus* Typstamm LTH 7001 hat jedoch ein kleineres und schwaches PCR-Produkt in einer Größe von ca. 500 bp ergeben und kann somit auch nicht als *C. sakazakii* identifiziert werden.



**Abbildung 5:** Agarosegel (2 %) mit den PCR-Produkten der spezifischen konventionellen PCR mit dem Zielgen *rpoB* und ausgewählten *Cronobacter* Lebensmittelisolaten (Tabelle 10) unter Verwendung der Csak Primer.

Für eine bessere Übersicht sind für *C. sakazakii* die Abkürzung CS und für *C. malonaticus* CM in Klammern mit den zugehörigen LTH Nummern gezeigt. M: 100 bp DNA Marker, 1: (CS) LTH 6611<sup>T</sup>, 2: (CM) LTH 7003<sup>T</sup>, 3: (CS) LTH 6562, 4: (CM) LTH 6575, 5: (CS) LTH 6576, 6: (CS) LTH 6577, 7: (CS) LTH 6578, 8: (CS) LTH 6579, 9: (CS) LTH 6589, 10: (CS) LTH 6591, 11: (CS) LTH 6592, 12: (CM) LTH 6593, 13: (CS) LTH 6594, 14: (CS) LTH 6595, 15: (CS) LTH 6596, 16: (CS) LTH 6597, 17: (CS) LTH 6598, 18: (CM) LTH 6599, M: 100 bp DNA Marker

Bezeichnung <sup>a</sup>	Amplifikation <sup>b</sup>	Bezeichnung	Amplifikation
LTH 6611	+	LTH 6609	+
LTH 7003	+	LTH 6610	+
LTH 6562	+	LTH 6612	-
LTH 6575	+	LTH 6613	+
LTH 6576	+	LTH 6614	+
LTH 6577	+	LTH 6615	+
LTH 6578	+	LTH 6616	+
LTH 6579	+	LTH 6617	+
LTH 6589	+	LTH 6618	+
LTH 6591	+	LTH 6619	+
LTH 6592	+	LTH 6620	+
LTH 6593	+	LTH 6621	+
LTH 6594	+	LTH 6626	+
LTH 6595	+	LTH 6627	+
LTH 6596	+	LTH 6628	+
LTH 6597	+	LTH 6962	-
LTH 6598	+	LTH 6963	-
LTH 6599	+	LTH 6961	-
LTH 6600	+	LTH 6960	-
LTH 6601	+	LTH 7004	-
LTH 6602	+	LTH 7005	-
LTH 6603	+	LTH 6968	-
LTH 6604	+	LTH 7008	-
LTH 6605	+	LTH 7009	-
LTH 6606	+	LTH 7001	+
LTH 6607	+	LTH 7002	-
LTH 6608	+	NTC <sup>c</sup>	-

**Tabelle 60:** Ergebnisse der spezifischen konventionellen PCR zur Charakterisierung von

 *C. sakazakii* mit dem Primerpaar Csak

<sup>a</sup> siehe Tabelle 10 <sup>b</sup>+ = positive Amplifikation; - = keine Amplifikation <sup>c</sup> NTC = no template control

#### 3.2 Spezifischer Nachweis von Bacillus cereus

Die Etablierung eines Real-Time PCR basierenden Systems zum Nachweis von *B. cereus* erfolgte in einem 3-Schritt Verfahren. In einem ersten Schritt erfolgte die Etablierung einer konventionellen PCR, in einem zweiten Schritt die Entwicklung eines SYBR<sup>®</sup> Green Real-Time PCR Verfahrens und zum Schluss erfolgte die Validierung und Optimierung des TaqMan Real-Time PCR Systems mit interner Amplifikationskontrolle.

Zur Bestätigung der richtigen Amplikongröße sowie zur Prüfung der Spezifität und erfolgte die konventionelle PCR der Primer mit anschließender Agarosegelelektrophorese (siehe Kapitel 2.8.1.1). Die groEL-PCR-Produkte (siehe Abbildung 6) wurden in einem 3 %igen Agarosegel aufgetrennt. Drei Typstämme der B. cereus-Gruppe (B. cereus, B. thuringiensis und B. weihenstephanensis) (siehe Tabelle 8) sowie ausgewählte Lebensmittelisolate von *B. cereus* und *B. thuringiensis* (Tabelle 9), wurden mittels dieser konventionellen PCR getestet. In Abbildung 6 sind die PCR-Produkte für fünf B. cereus und drei B. thuringiensis Lebensmittelisolate (Tabelle 9) sowie für die fünf Kontrollstämme L. monocytogenes LTH 5593, E. coli LTH 463, Ent. dissolvens LTH 6665, C. sakazakii LTH 6611, S. Typhimurium LTH 6666 gezeigt. Alle Stämme von B. cereus (Spur 1 bis 5) und B. thuringiensis (Spur 6 bis 8) zeigen deutlich eine Bande bei einer Größe von 150 bp, die Kontrollstämme (Spur 9 bis 13) weisen dagegen zwischen 100 und 200 bp kein PCR-Produkt auf. Daher kann die konventionelle PCR mit dem Zielgen groEL als spezifischer Nachweis für die B. cereus Gruppe angesehen werden.



**Abbildung 6:** Agarosegelelektrophorese (3 %) mit den PCR-Produkten der spezifischen konventionellen PCR zum Nachweis der *B. cereus* Gruppe mit ausgewählten Stämmen (siehe Text).

M: 100 bp DNA Marker, 1: *B. cereus* LTH 6876, 2: *B. cereus* LTH 6861, 3: *B. cereus* LTH 6904, 4: *B. cereus* LTH 6871, 5: *B. cereus* LTH 6911, 6: *B. thuringiensis* LTH 6883, 7: *B. thuringiensis* LTH 6917, 8: *B. thuringiensis* LTH 6918, 9: *L. monocytogenes* LTH 5593, 10: *E. coli* LTH 463, 11: *Ent. dissolvens* LTH 6665, 12: *C. sakazakii* LTH 6611, 13: *S.* Typhimurium LTH 6666, 14: NTC, M: 100 bp DNA Marker

Danach erfolgte eine Validierung der genspezifischen Primer in einem SYBR<sup>®</sup> Green Real-Time PCR Assay. Dabei wurde anhand einer Schmelzkurvenanalyse die Spezifität der Reaktion ermittelt und mittels einer Standardkurve die Effizienz der Über Reaktion bestimmt (siehe Kapitel 2.8.2.2 und 2.8.2.3). die Schmelzkurvenanalyse wurde die charakteristische Schmelztemperatur des groEL PCR-Produktes bestimmt, bei der 50 % der DNA Amplifikate doppelsträngig vorliegen. Dabei ist diese Schmelztemperatur von der Konzentration der doppelsträngigen DNA, der Amplikonlänge und der Nukleotidseguenz abhängig (De Medici et al., 2003). Der Schmelzpeak bei einer Temperatur von 81 °C stellt das spezifische Produkt der groEL Gen PCR dar (siehe Abbildung 7). Dieser Peak wird automatisch von der iQ<sup>™</sup>5 Optical System Software (BioRad Laboratories GmbH, München) errechnet. Dabei wird die erste negative Ableitung der Fluoreszenzänderung als Funktion der Temperatur aufgetragen (Anonym, 2006b). Es wurden während dieser Reaktion keine weiteren Peaks gebildet, weder durch die Negativkontrolle L. monocytogenes LTH 5593, noch durch die NTC oder die Primer selber. Somit haben sich keine nicht-spezifischen Produkte und auch keine Primer Dimere (Kapitel 2.8.2.2) gebildet.



**Abbildung 7:** Schmelzkurvenanalyse der SYBR<sup>®</sup> Green Real-Time PCR für den spezifischen Nachweis von *B. cereus* bei einer Schmelztemperatur von 81 °C.

Ermittlung der Reaktionseffizienz erfolgte durch die Erstellung Die einer Standardkurve. Genomische DNA des B. cereus Typstammes LTH 6773 wurde zur Herstellung einer Verdünnungsreihe benutzt. Dafür wurden die DNA Konzentrationen 54 ng/µl (als Stocklösung) und eine dezimale Verdünnungsreihe von 10 bis 0,001 ng/µl eingesetzt. Die Standardkurve wurde von der iQ<sup>™</sup>5 Optical System Software (BioRad Laboratories GmbH, München) automatisch berechnet und hergestellt (Abbildung 8). Dabei ist der Logarithmus jeder bekannten DNA Konzentration auf der X-Achse (Log starting quantity) gegen die Ct-Werte auf der Y-Achse aufgetragen. Dabei wird der PCR-Zyklus, an dem die Fluoreszenz über die Hintergrundfluoreszenz ansteigt als Ct-Wert bezeichnet (Holzapfel und Wickert, 2007). Die Effizienz der Amplifikation (auch E genannt) wird anhand der Steigung (auch slope genannt) der Standardkurve berechnet. Folgende Formel wird dazu verwendet: E =  $10^{-1/\text{Steigung}}$  x 100 % (Anonym, 2006b). Die aus der Steigung der Standardkurve berechneten Effizienz lag hier bei E = 98 % und die Linearität der Reaktion war bei R<sup>2</sup> = 0,997. Das R<sup>2</sup> spiegelt die Linearität der Standardkurve wieder und sollte einen Wert über 0,980 erreichen. Dies zeigen auch die parallel verlaufenden Amplifikationskurven in Abbildung 9, denn daraus lassen sich die Ct-Werte für die Erstellung der Standardkurve ermitteln sowie die gute Linearität der Reaktion bestätigen. Dabei sind auf der X-Achse die Ct-Werte und auf der Y-Achse die Fluoreszenz der Amplifikation, die proportional zur Menge des PCR-Produktes zu nimmt, gezeigt (Abbildung 9). Ein weiteres Kennzeichen für einen optimierten und guten Real-Time PCR Assay ist eine hohe Reaktionseffizienz. Diese sollte für einen reproduzierbaren Assay in einem Bereich zwischen 90 % und 105 % liegen (Anonym, 2006b). Wie in Abbildung 8 hervorgeht wurde dies für den spezifischen SYBR<sup>®</sup> Green Real-Time PCR Assay zum Nachweis von *B. cereus* erreicht.



**Abbildung 8:** Erstellung der Standardkurve zur Bestimmung der Reaktionseffizienz für die SYBR<sup>®</sup> Green Real-Time PCR zum spezifischen Nachweis von *B. cereus*. Dargestellt ist die errechnete Standardkurve. X-Achse = Logarithmus der DNA Konzentrationen (Log starting quantity); Y-Achse = Ct-Werte. Die berechnete Effizienz (E) lag bei 98,0 %, die Linearität der Standardkurve bei R^2=0,997.



**Abbildung 9:** Erstellung der Standardkurve zur Bestimmung der Reaktionseffizienz für die SYBR<sup>®</sup> Green Real-Time PCR zum spezifischen Nachweis von *B. cereus*. Dargestellt sind die Amplifikationskurven der Verdünnungsreihe für die Ermittlung der Ct-Werte. X-Achse = Ct-Werte; Y-Achse = Zunahme der Fluoreszenz.

Die Beschriftungsnummern 1 bis 6 in den Abbildungen 8 und 9 zeigen den *B. cereus* LTH 6773 Typstamm in den verschiedenen DNA Konzentrationen (1: 54 ng/µl, 2: 10 ng/µl, 3: 1 ng/µl, 4: 0,1 ng/µl, 5: 0,01 ng/µl, 6: 0,001 ng/µl) und Nr. 7 zeigt die Negativkontrolle *L. monocytogenes* LTH 5593.

Die passende Temperatur für die Anlagerung der Primer und Sonde der TaqMan Real-Time PCR wurde mittels eines Temperaturgradienten bestimmt (siehe Kapitel 2.8.3.2). In Abbildung 10 sind auf der X-Achse die Ct-Werte und auf der Y-Achse die Zunahme der Fluoreszenz der Amplifikation gezeigt. Dort wird automatisch von der iQ<sup>™</sup>5 Optical System Software (BioRad Laboratories GmbH, München) eine Thresholdlinie gezogen. Die Ct-Werte werden dann für jede Reaktion ermittelt, sobald die Fluoreszenz gegenüber dem Hintergrund ansteigt. Für jede getestete Annealing-Temperatur wurde eine dreifache Bestimmung durchgeführt. Aus Abbildung 10 und Tabelle 61 geht hervor, dass die s-förmig verlaufende Kurve bei 55,8°C Annealing-Temperatur den niedrigsten Ct-Wert von 14,4 bei höchster Fluoreszenz aufweist. Daher wurde für den spezifischen TaqMan Real-Time PCR Assay zum Nachweis von *B. cereus* die Annealing-Temperatur von 56 °C gewählt. **Tabelle 61:** Darstellung der Ct-Werte mit den zugehörigen Annealing-Temperaturen für denTaqMan Real-Time PCR Assay zum Nachweis von *B. cereus* 

[°C]	65,0	64,5	63,3	61,4	58,9	57,1	55,8	55,0
Ct-Wert	N/A <sup>a</sup>	N/A	19,8	16,5	14,9	14,6	14,4	14,7
			± 0,5 <sup>b</sup>	± 0,1	± 0,0	±0,2	± 0,4	± 0,6

<sup>a</sup> N/A = nicht detektierbar

<sup>b</sup>Standardabweichungen sind an den Ct-Werten mit angegeben



**Abbildung 10:** Ermittlung der optimalen Annealing-Temperatur für die TaqMan Real-Time PCR zum spezifischen Nachweis von *B. cereus*. Dargestellt sind die Amplifikationskurven der getesteten Annealing-Temperaturen. X-Achse = Ct-Werte; Y-Achse = Zunahme der Fluoreszenz.

# Herstellung der internen Amplifikationskontrolle für die TaqMan Real-Time PCR zum Nachweis von *B. cereus*

Die Herstellung der IAC erfolgte wie in Kapitel 2.8.3.3 beschrieben. Nach der Aufreinigung und Linearisierung betrug die gemessene molekulare Masse der IAC 2,7 ng/µl. Eine Kopienzahl von 7,5 x 10<sup>8</sup> Kopien/µl wurde anschließend anhand der Formel 1 (vgl. Kapitel 2.8.3.3) errechnet. Diese Kopienzahl wurde mittels einer dezimalen Verdünnungsreihe (Tabelle 62) verdünnt, um anschließend die beste Konzentration für den Assay ermitteln zu können.

Kopienzahl/µl	Molekulare Masse in ng/µl	Verdünnungsstufe
7,5 x 10 <sup>8</sup>	2,7	10 <sup>0</sup>
7,5 x 10 <sup>7</sup>	0,27	10 <sup>-1</sup>
7,5 x 10 <sup>6</sup>	2,7 x 10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-2</sup>
7,5 x 10 <sup>5</sup>	2,7 x 10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-3</sup>
7,5 x 10 <sup>4</sup>	2,7 x 10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-4</sup>
7,5 x 10 <sup>3</sup>	2,7 x 10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-5</sup>
7,5 x 10 <sup>2</sup>	2,7 x 10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-6</sup>

**Tabelle 62:** Dezimale Verdünnungsreihe der internen Amplifikationskontrolle für die TaqManReal-Time PCR zum Nachweis von *B. cereus* 

Zur Überprüfung der IAC sowie der hergestellten Verdünnungsreihe wurde eine konventionelle PCR mit anschließender Agarosegelelektrophorese durchgeführt (siehe Kapitel 2.8.1.1). Hiermit sollte in einem ersten Schritt die geringste Konzentration an IAC bestimmt werden, die gerade noch in der Lage war, ein positives Signal zu erzielen ohne die Amplifikation des groEL-Gens zu hemmen. Die richtige Größe der IAC von 233 bp konnte mittels Agarosegel (Abbildung 11) bestätigt werden. Es wurden alle IAC Verdünnungen aus der Tabelle 62 mit dem B. cereus Typstamm LTH 6773 in Kombination eingesetzt. Aus Abbildung 11 ist zu erkennen, dass das PCR-Produkt der Zielgen DNA kleiner ist und eine Größe von 150 bp aufweist. Das PCR-Produkt der IAC ist größer (233 bp) und zeigt direkt oberhalb des groEL PCR-Produktes eine weitere Bande. Die Verdünnungsstufe 10<sup>-4</sup> (Spur 6) ist die niedrigste Stufe an IAC, die in der konventionellen PCR die Amplifikation des Zielgenes nicht beeinflusst. Die höheren Verdünnungen können mittels Agarosegel nicht mehr detektiert werden und wurden aus diesem Grund nicht in der Real-Time PCR getestet. Die IAC Verdünnungsstufen 10<sup>-3</sup> und 10<sup>-4</sup> wurden daher in einer Doppelbestimmung in der TaqMan Real-Time PCR getestet.



**Abbildung 11:** Agarosegel (2 %) der spezifischen konventionellen PCR zum Nachweis von *B. cereus* zur Bestimmung der geeigneten Konzentration an interner Amplifikationskontrolle.

M: 100 bp DNA Marker, 1: *B. cereus* LTH 6773, 2: *B. cereus* LTH 6773 und IAC  $10^{0}$ , 3: *B. cereus* LTH 6773 und IAC  $10^{-1}$ , 4: *B. cereus* LTH 6773 und IAC  $10^{-2}$ , 5: *B. cereus* LTH 6773 und IAC  $10^{-3}$ , 6: *B. cereus* LTH 6773 und IAC  $10^{-4}$ , 7: *B. cereus* LTH 6773 und IAC  $10^{-5}$ , 8: *B. cereus* LTH 6773 und IAC  $10^{-6}$ , 9: *B. cereus* LTH 6773 und IAC  $10^{-7}$ , 10: NTC, M: 100 bp DNA Marker

**Tabelle 63:** Bestimmung der optimalen Verdünnungsstufe an interner Amplifikationskontrolle für den Einsatz in der TaqMan Real-Time PCR zum Nachweis von *B. cereus*

Verdünnungsstufe IAC	Ct-Werte für <i>B. cereus</i> LTH 6773				
Verdumungssture iAe	14,5 ng/µl	1,45 ng/µl			
IAC 10 <sup>-3</sup>	$17,8 \pm 0,2^{a}$	20,9 ± 0,1			
IAC 10 <sup>-4</sup>	17,7 ± 0,3	$20,9 \pm 0,1$			

<sup>a</sup> Standardabweichungen sind an den Ct-Werten mit angegeben

Die niedrigsten Ct-Werte wurden mit der IAC Verdünnung  $10^{-4}$  (Kopienzahl 7,5 x  $10^{4}$ /µl) (Tabelle 63) erzielt, die somit für die weiteren Untersuchungen eingesetzt wurde. Diese Verdünnung beeinflusst die Amplifikation des Zielgenes *groEL* laut Abbildung 12 nicht, dies zeigt der ansteigende Kurvenverlauf an. In Abbildung 12 sind auf der X-Achse die Ct-Werte und auf der Y-Achse die Zunahme der Fluoreszenz der Amplifikation zu sehen.



**Abbildung 12:** Bestimmung der optimalen Verdünnungsstufe der internen Amplifikationskontrolle für die TaqMan Real-Time PCR zum Nachweis von *B. cereus*. Dargestellt sind die Amplifikationskurven des *B. cereus* Typstammes LTH 6773 mit den DNA-Konzentrationen 14,5 ng/µl und 1,45 ng/µl und einer Konzentration der internen Amplifikationskontrolle von 10<sup>-4</sup> pro Ansatz. X-Achse = Ct-Werte; Y-Achse = Zunahme der Fluoreszenz.

Die Reaktionseffizienz wurde anschließend mit dem TagMan Real-Time PCR Assay erneut bestimmt (siehe Kapitel 2.8.3.4). Hierfür wurden die B. cereus LTH 6773 DNA Konzentrationen 14,5 ng/µl (als Stocklösung) und eine dezimale Verdünnungsreihe von 10 bis 0,001 ng/µl eingesetzt. Anhand der Ct-Werte aus der Standardkurve wurde auch die Nachweisgrenze für den TagMan Real-Time PCR Assay bestimmt. Die Standardkurve wurde auf dieselbe Weise wie für die SYBR<sup>®</sup> Green Real-Time PCR bestimmt und ausgewertet (siehe oben). Aus der Steigung der Standardkurve (grün in Abbildung 13 dargestellt) wurde hier eine Effizienz von 104 % berechnet und dieser Wert liegt somit in dem Bereich zwischen 90 und 105 % für einen optimierten Real-Time PCR Assay (siehe oben bei SYBR® Green Real-Time PCR). Die Linearität der Reaktion war bei  $R^2 = 0.999$  (siehe Abbildung 13). Die interne Amplifikationskontrolle (lila in Abbildung 13 dargestellt) zeigt Ct-Werte zwischen 23 und 24 und beeinflusst die Zielgen Reaktion nicht. Die X-Achse zeigt den Logarithmus der DNA Konzentrationen und die Y-Achse die zugehörigen Ct-Werte. Die Nachweisgrenze für den TaqMan Real-Time PCR wurde bei einem Ct-Wert von 27,5 festgesetzt, also bei einer DNA Konzentration von 0,01 ng/µl *B. cereus* LTH 6773 (Tabelle 64). Höhere Ct-Werte können demnach nicht mehr eindeutig als *B. cereus* identifiziert werden und es würde zu falsch positiven Ergebnissen kommen. Die 0,001 ng/µl *B. cereus* Konzentration wurde daher als negativ gewertet, da der Ct-Wert von 30,9 über der Grenze liegt (Tabelle 64). Zudem zeigt die Amplifikationskurve Nr. 6 in Abbildung 14 keinen s-förmigen Kurvenverlauf, wie es bei der Kurve Nr. 1 der Fall ist. Daraus ist nicht eindeutig zu erkennen, ob es sich bei dieser Probe um *B. cereus* handelt. Die Negativkontrolle *L. monocytogenes* LTH 5593 konnte in keinem Durchlauf detektiert werden (Abbildung 14).

<i>B. cereus</i> LTH 6773 DNA Konzentration in ng/µl	Ct-Wert
14,5	18,0 ± 0,1 <sup>a</sup>
10	$18,2 \pm 0,3$
1	$21,4 \pm 0,2$
0,1	$24,7 \pm 0,6$
0,01	$27,5 \pm 0,2$
0,001	$30,9 \pm 0,4$

**Tabelle 64:** Darstellung der Ct-Werte der errechneten Standardkurve der TaqMan Real-TimePCR zum spezifischen Nachweis von *B. cereus* 

<sup>a</sup> Standardabweichungen

Die *B. cereus* DNA Konzentration von 0,01 ng/µl entspricht 1,7 x 10<sup>3</sup> KbE. Dies wurde anhand folgender Parameter berechnet: 1 Da  $\triangleq$  1,66 x 10<sup>-27</sup> kg; Genom *B. cereus*  $\triangleq$  5,43 x 10<sup>6</sup> bp; molekulare Masse (MW) = Anzahl der Basenpaare x 660 Da, molekulare Masse einer Zelle von 5,43 x 10<sup>6</sup> bp  $\triangleq$  5,9 x 10<sup>-18</sup> kg.



**Abbildung 13:** Erstellung der Standardkurve zur Bestimmung der Reaktionseffizienz für die TaqMan Real-Time PCR zum spezifischen Nachweis von *B. cereus*. Dargestellt ist die errechnete Standardkurve (grün) mit der internen Amplifikationskontrolle (IAC) (lila). X-Achse = Logarithmus der DNA Konzentrationen; Y-Achse = Ct-Werte. Die berechnete Effizienz (E) lag bei 104,0 %, die Linearität der Standardkurve bei R^2=0,999.



**Abbildung 14:** Erstellung der Standardkurve zur Bestimmung der Reaktionseffizienz für die TaqMan Real-Time PCR zum spezifischen Nachweis von *B. cereus*. Dargestellt sind die Amplifikationskurven der Verdünnungsreihe für die Ermittlung der Ct-Werte X-Achse = Ct-Werte; Y-Achse = Zunahme der Fluoreszenz.
Die Beschriftungsnummern 1 bis 4 bzw. 1 bis 6 in den Abbildungen 13 und 14 zeigen den *B. cereus* LTH 6773 Typstamm in den verschiedenen DNA Konzentrationen (1: 14,5 ng/µl, 2: 10 ng/µl, 3: 1 ng/µl, 4: 0,1 ng/µl, 5: 0,01 ng/µl, 6: 0,001 ng/µl).

Die Validierung des Verfahrens wurde in einem letzten Schritt durchgeführt. Dies erfolgte mit 48 *B. cereus* Lebensmittelisolaten (Tabelle 9) und 19 Typ- und Referenzstämmen als Kontrollstämme (aus Tabelle 8 die Nr. 1 bis 13, 36 bis 38 und 46 bis 48). Die Validierung des TaqMan Real-Time PCR Assay erfolgte in einem dreifachen Ansatz mit der internen Amplifikationskontrolle (siehe Kapitel 2.8.3.5). In Abbildung 15 ist der Kurvenverlauf von ausgewählten *B. cereus* Lebensmittelisolaten aus Tabelle 9 und 13 Kontrollstämmen gezeigt. Bei den dargestellten 13 Kontrollstämmen in Abbildung 15 handelt es sich um *B. circulans* LTH 6958, *B. amyloliquefaciens* LTH 5914, *B. coagulans* LTH 6938, *B. megaterium* LTH 3996, *B. lichenformis* LTH 5810, *B. pumilus* LTH 5776, *B. sphaericus* LTH 4067, *B. subtilis* LTH 6012, *L. delbrueckii* LTH 2368, *Staph. aureus* LTH 6243, *Staph. epidermis* LTH 2908, *Staph. haemolyticus* LTH 6244, *L. monocytogenes* LTH 5593 (vgl. Tabelle 8). In Abbildung 15 sind auf der X-Achse die Ct-Werte und auf der Y-Achse die Zunahme der Fluoreszenz der Amplifikation gezeigt.

Alle Typstämme der B. cereus-Gruppe, bis auf B. anthracis, wurden für die Real-Time PCR verwendet. B. cereus, B. mycoides, B. thuringiensis und B. weihenstephanensis konnten eindeutig identifiziert werden. Jedoch konnte B. pseudomycoides auch nach einer Wiederholung der PCR nicht nachgewiesen werden. Die Ct-Werte der B. cereus Lebensmittelisolate lagen zwischen 15,3 und 19,8 und die Typstämme der B. cereus Gruppe wiesen Ct-Werte zwischen 16,5 und 24,3 auf. Die Stämme, welche als Negativkontrolle dienten, konnten nicht detektiert werden (Abbildung 15). Die interne Amplifikationskontrolle zeigte Ct-Werte von 22 bis 23 bei allen getesteten Stämmen. Somit konnten keine falsch-positiven Ergebnisse erzielt werden. Um die Reinheit der Reagenzien zusätzlich zu überprüfen wurde eine no template control (NTC) mitgeführt.



**Abbildung 15:** Validierung der TaqMan Real-Time PCR mit interner Amplifikationskontrolle zum Nachweis von *B. cereus*. Dargestellt sind beispielhaft die Amplifikationskurven von 13 ausgewählten *B. cereus* Lebensmittelisolaten und 13 Negativkontrollstämmen. X-Achse = Ct-Werte; Y-Achse = Zunahme der Fluoreszenz.

Die Spezifität und Sensitivität des TaqMan Real-Time PCR Verfahrens mit interner Amplifikationskontrolle konnte für den Nachweis von *B. cereus* Stämmen bestätigt werden. Es ist zusätzlich möglich vier Mitglieder der *B. cereus*-Gruppe mittels dieser PCR nachzuwiesen.

## 3.3 Spezifischer Nachweis von Cronobacter spp.

Die Etablierung des spezifischen Nachweisverfahrens für *Cronobacter* spp. erfolgte wie in Kapitel 3.2 beschrieben. Das PCR-Produkt der konventionellen PCR mit anschließender Agarosegelelektrophorese zum Nachweis von *Cronobacter* spp. hat eine Größe von 151 bp (siehe Kapitel 2.8.1.2 und 2.8.1.4). Sechs *C. malonaticus* und 34 *C. sakazakii* Lebensmittelisolate sowie *C. sakazakii* LTH 6611, *C. dublinensis* subsp. *lactaridi* LTH 6961, *C. dublinensis* sp. LTH 6960 und *C. muytjensii* LTH 6963 als Positivkontrollstämme und vier Negativkontrollstämme (*L. monocytogenes* LTH 5593, *E. coli* LTH 463, *Ent. dissolvens* LTH 6665 und *S.* Typhimurium LTH 6666) (siehe auch Tabelle 8) wurden mittels dieser konventionellen PCR getestet.

In Abbildung 16 sind vier ausgewählte *C. sakazakii* Lebensmittelisolate sowie der *C. sakazakii* Typstamm LTH 6611 und alle getesteten Negativkontrollen dargestellt. Die untersuchten *C. sakazakii* Lebensmittelisolate sowie der Typstamm (Spur 1 bis 5) weisen ein PCR-Produkt mit einer Größe von 151 bp auf. Die Stämme der Negativkontrollen (Spur 6 bis 10) zeigen dagegen zwischen 200 und 100 bp keine Bande. Die nicht dargestellten restlichen Lebensmittelisolate sowie die Positivkontrollstämme (siehe oben) weisen ebenfalls PCR-Produkte mit einer Größe von 151 bp auf. Daher kann die konventionelle PCR mit dem Zielgen *ompA* zum Nachweis für *Cronobacter* spp. als spezifisch angesehen werden.



**Abbildung 16:** Agarosegel (3 %) mit den PCR-Produkten der spezifischen konventionellen PCR zum Nachweis von *Cronobacter* spp. mit ausgewählten Stämmen (siehe Text).

M: 100 bp DNA Marker, 1: *C. sakazakii* LTH 6611, 2: *C. sakazakii* LTH 6592, 3: *C. sakazakii* LTH 6589, 4: *C. sakazakii* LTH 6606, 5: *C. sakazakii* LTH 6620, 6: *L. monocytogenes* LTH 5593, 7: *E. coli* LTH 463, 8: *Ent. dissolvens* LTH 6665, 9: S. Typhimurium LTH 6666, 10: NTC, M: 100 bp DNA Marker

Die Validierung der Primer und die Bestimmung der Reaktionseffizienz erfolgte hier ebenfalls in einem SYBR<sup>®</sup> Green Real-Time PCR Assay (Kapitel 2.8.2). Mittels einer Standardkurve (Kapitel 2.8.2.3) wurde die Effizienz der Reaktion und über die Schmelzkurvenanalyse (Kapitel 2.8.2.2) wurde die charakteristische Schmelztemperatur des *ompA*-PCR-Produktes bestimmt (siehe Kapitel 3.2). Der automatisch errechnete Schmelzpeak bei einer Temperatur von 86,5 °C zeigt das spezifische Produkt der *ompA* Gen PCR an (Abbildung 17), daher können Bildungen von Primer Dimeren ausgeschlossen werden (Kapitel 3.2).



**Abbildung 17:** Schmelzkurvenanalyse der SYBR<sup>®</sup> Green Real-Time PCR für den spezifischen Nachweis von *Cronobacter* spp. bei einer Schmelztemperatur von 86,5°C.

Die Reaktionseffizienz wurde durch die Erstellung einer Standardkurve ermittelt. Genomische DNA des *C. sakazakii* Typstammes LTH 6611 wurde zur Erstellung einer Verdünnungsreihe benutzt. Die Konzentrationen von 50 ng/µl (als Stocklösung) und eine dezimale Verdünnungsreihe von 10 bis 0,001 ng/µl wurden dafür verwendet. Die Standardkurve wurde wie in Kapitel 3.2 beschrieben erstellt und ist für den *Cronobacter* spp. SYBR<sup>®</sup> Green Real-Time PCR Assay in Abbildung 18 dargestellt. Der auf der X-Achse dargestellte Logarithmus der DNA Konzentrationen wurde gegen die Ct-Werte der Y-Achse aufgetragen. Die Linearität der Reaktion lag bei R<sup>2</sup> = 0,998 und die aus der Steigung der Standardkurve berechneten Effizienz bei 94,0 % (Kapitel 3.2). Die errechneten Werte für diese Standardkurve (Abbildung 18) liegen somit in dem Wertebereich, der für einen reproduzierbaren Assay angegeben ist (Kapitel 3.2). Die zugehörigen Amplifikationskurven in Abbildung 19 verlaufen in einem parallelen Abstand und bestätigen somit zusätzlich eine gute Linearität der Reaktion. Dabei sind auf der X-Achse die Ct-Werte und auf der Y-Achse die Zunahme der Fluoreszenz der Amplifikation dargestellt.



**Abbildung 18:** Erstellung der Standardkurve zur Bestimmung der Reaktionseffizienz für die SYBR<sup>®</sup> Green Real-Time PCR zum spezifischen Nachweis von *Cronobacter* spp.. Dargestellt ist die errechnete Standardkurve. X-Achse = Logarithmus der DNA Konzentrationen (Log starting quantity); Y-Achse = Ct-Werte. Die berechnete Effizienz (E) lag bei 94,0 %, die Linearität der Standardkurve bei R^2=0,998.



**Abbildung 19:** Erstellung der Standardkurve zur Bestimmung der Reaktionseffizienz für die SYBR<sup>®</sup> Green Real-Time PCR zum spezifischen Nachweis von *Cronobacter* spp. Dargestellt sind die Amplifikationskurven der Verdünnungsreihe für die Ermittlung der Ct-Werte. X-Achse = Ct-Werte; Y-Achse = Zunahme der Fluoreszenz.

Die Beschriftungsnummern 1 bis 7 bzw. 1 bis 8 in den Abbildungen 18 und 19 zeigen den *C. sakazakii* LTH 6611 Typstamm in den verschiedenen DNA Konzentrationen (1: 50 ng/µl, 2: 10 ng/µl, 3: 1 ng/µl, 4: 0,1 ng/µl, 5: 0,01 ng/µl, 6: 0,001 ng/µl), sowie den Kontrollstamm *Ent. dissolvens* LTH 6665 (Nr. 7) und eine NTC (Nr. 8).

Die optimale Annealing-Temperatur für die Anlagerung des Primerpaars und der Sonde wurde mittels eines Temperaturgradienten bestimmt (Kapitel 2.8.3.2). In Abbildung 20 sind auf der X-Achse die Ct-Werte und auf der Y-Achse die Werte der Grundlinie zur korrekten Bestimmung der Ct-Werte gezeigt. Für jede getestete Annealing-Temperatur wurde eine dreifache Bestimmung durchgeführt. Abbildung 20 und Tabelle 65 zeigen, dass die s-förmig verlaufende Kurve bei 55,8 °C Annealing-Temperatur den niedrigsten Ct-Wert von 18,0 aufweist (vgl. Kapitel 3.2). Daher wurde für den spezifischen TaqMan Real-Time PCR Assay zum Nachweis von *Cronobacter* spp. eine Annealing-Temperatur von 56 °C gewählt (Tabelle 54).

**Tabelle 65:** Darstellung der Ct-Werte mit den zugehörigen Annealing-Temperaturen für denTaqMan Real-Time PCR Assay zum Nachweis von Cronobacter spp.

[°C]	65,0	64,5	63,3	61,4	58,9	57,1	55,8	55,0
Ct-Wert	N/A <sup>a</sup>	N/A	27,7	22,0	19,2	18,8	18,0	18,5
			± 1,7 <sup>b</sup>	± 1,2	± 0,2	± 1,1	± 0,5	± 0,7

<sup>a</sup> N/A = nicht detektierbar

<sup>b</sup> Standardabweichungen sind an den Ct-Werten mit angegeben



**Abbildung 20:** Ermittlung der optimalen Annealing-Temperatur für die TaqMan Real-Time PCR zum spezifischen Nachweis von *Cronobacter* spp.. Dargestellt sind die Amplifikationskurven der getesteten Annealing-Temperaturen. X-Achse = Ct-Werte; Y-Achse = Zunahme der Fluoreszenz.

# Herstellung der internen Amplifikationskontrolle für die TaqMan Real-Time PCR zum Nachweis von Cronobacter spp.

Die Herstellung der IAC erfolgte wie in Kapitel 2.8.3.3 beschrieben. Die molekulare Masse der hergestellten IAC für *Cronobacter* spp. betrug nach der Aufreinigung und Linearisierung 24,3 ng/µl. Daraus wurde mittels der Formel 1 (vgl. Kapitel 2.8.3.3) eine Kopienzahl von 6,8 x  $10^9$  Kopien/µl errechnet. Diese Kopienzahl wurde mittels einer dezimalen Verdünnungsreihe (Tabelle 66) für den Einsatz in die TaqMan Real-Time PCR verdünnt, um die niedrigste Konzentration an IAC zu bestimmen.

Kopienzahl/µl	Molekulare Masse in ng/µl	Verdünnungsstufe
6,8 x 10 <sup>9</sup>	24,3	10 <sup>0</sup>
6,8 x 10 <sup>8</sup>	2,4	10 <sup>-1</sup>
6,8 x 10 <sup>7</sup>	0,24	10 <sup>-2</sup>
6,8 x 10 <sup>6</sup>	2,4 x 10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>
6,8 x 10 <sup>5</sup>	2,4 x 10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup>
6,8 x 10 <sup>4</sup>	2,4 x 10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-5</sup>
6,8 x 10 <sup>3</sup>	2,4 x 10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-6</sup>
6,8 x 10 <sup>2</sup>	2,4 x 10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-7</sup>
68	2,4 x 10 <sup>-7</sup>	10 <sup>-8</sup>
6,8	2,4 x 10 <sup>-8</sup>	10 <sup>-9</sup>

**Tabelle 66:** Dezimale Verdünnungsreihe der internen Amplifikationskontrolle für die TaqManReal-Time PCR zum Nachweis von *Cronobacter* spp.

Mittels einer konventionellen PCR wurde die geringste Konzentration an IAC anhand einer dezimalen Verdünnungsreihe (Tabelle 66) bestimmt, die gerade noch in der Lage war ein positives Signal zu erzielen ohne die Amplifikation des ompA-Gens zu hemmen (Kapitel 2.8.1.2). Die Größe der IAC mit 233 bp wurde, wie in Abbildung 21 gezeigt, bestätigt. Es wurden alle IAC Verdünnungen (Tabelle 66) mit dem C. sakazakii Typstamm LTH 6611 in einer Reaktion eingesetzt. In Abbildung 21 ist zu erkennen, dass die PCR-Produkte des ompA Genes eine Größe von 151 bp aufweisen und damit kleiner als die PCR-Produkte der IAC PCR. Das PCR-Produkt der IAC sollte immer größer als das der Ziel-DNA, um die Reaktion in Richtung des kleineren Produktes zu lenken. Die Verdünnungsstufen  $10^{-1}$  und  $10^{-2}$  (Spur 3 und 4) sind die Konzentrationen, die in der konventionellen PCR die Amplifikation des Zielgenes nicht beeinflussen. Die anderen IAC Konzentrationen waren in der konventionellen PCR nicht detektierbar (Abbildung 21). Zur Bestimmung der geringsten IAC Verdünnung in der TagMan Real-Time PCR wurden die Verdünnungsstufen 10<sup>-3</sup>, 10<sup>-4</sup> und 10<sup>-5</sup> in einer Doppelbestimmung getestet, um möglichst eine geringe Menge an IAC für die PCR einsetzen zu müssen.



**Abbildung 21:** Agarosegel (2 %) der spezifischen konventionellen PCR zum Nachweis von *Cronobacter* spp. zur Bestimmung der geeigneten Konzentration an interner Amplifikationskontrolle.

M: 100 bp DNA Marker, 1: *C. sakazakii* LTH 6611, 2: *C. sakazakii* LTH 6611 und IAC  $10^{0}$ , 3: *C. sakazakii* LTH 6611 und IAC  $10^{-1}$ , 4: *C. sakazakii* LTH 6611 und IAC  $10^{-2}$ , 5: *C. sakazakii* LTH 6611 und IAC  $10^{-3}$ , 6: *C. sakazakii* LTH 6611 und IAC  $10^{-4}$ , 7: *C. sakazakii* LTH 6611 und IAC  $10^{-5}$ , 8: *C. sakazakii* LTH 6611 und IAC  $10^{-6}$ , 9: *C. sakazakii* LTH 6611 und IAC  $10^{-7}$ , 10: *C. sakazakii* LTH 6611 und IAC  $10^{-8}$ , 11: *C. sakazakii* LTH 6611 und IAC  $10^{-9}$ , 12: NTC, M: 100 bp DNA Marker

Verdünnungsstufe IAC	Ct-Werte für C. sakazakii LTH 6611				
Verdumungsstare ind	64 ng/μl	6,4 ng/µl	0,64 ng/µl		
IAC 10 <sup>-3</sup>	17,5 ± 0,6 <sup>a</sup>	$20,1 \pm 0,0$	$23,5 \pm 0,4$		
IAC 10 <sup>-4</sup>	17,1 ± 0,1	$20,5 \pm 0,7$	23,6 ± 0,2		
IAC 10 <sup>-5</sup>	17,3 ± 0,6	$20,3 \pm 0,4$	$23,7 \pm 0,6$		

**Tabelle 67:** Bestimmung der optimalen Verdünnungsstufe an interner Amplifikationskontrolle für den Einsatz in der TaqMan Real-Time PCR zum Nachweis von *Cronobacter* spp.

<sup>a</sup> Standardabweichungen sind an den Ct-Werten mit angegeben

Die niedrigsten Ct-Werte konnten mit der IAC Verdünnung 10<sup>-3</sup> (Kopienzahl 6,8 x 10<sup>6</sup>/µl) (vgl. Tabelle 67 und Abbildung 22) erzielt werden. Durch diese Verdünnung wird die Amplifikation des Zielgenes am wenigsten beeinflusst, dies zeigen die sförmigen Kurvenverläufe in Abbildung 22. Auf der X-Achse sind dazu die Ct-Werte und auf der Y-Achse die Zunahme der Fluoreszenz der Amplifikation zu sehen. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde die Verdünnung 10<sup>-3</sup> der IAC für die weiteren Untersuchungen eingesetzt.



**Abbildung 22:** Bestimmung der optimalen Verdünnungsstufe der internen Amplifikationskontrolle für die TaqMan Real-Time PCR zum Nachweis von *Cronobacter* spp.. Dargestellt sind die Amplifikationskurven des *C. sakazakii* Typstammes LTH 6611 mit den DNA-Konzentrationen 6,4 ng/µl und 0,64 ng/µl und einer Konzentration der internen Amplifikationskontrolle von 10<sup>-3</sup> pro Ansatz. X-Achse = Ct-Werte; Y-Achse = Zunahme der Fluoreszenz.

Die Reaktionseffizienz der TaqMan Real-Time PCR wurde ebenfalls anhand einer Standardkurve bestimmt (Kapitel 2.8.3.4). Die Nachweisgrenze der Real-Time PCR wurde mittels der Ct-Werte aus der Standardkurve bestimmt. Die Bestimmung und Auswertung erfolgte wie beim SYBR<sup>®</sup> Green Assay (Kapitel 3.2). Die Software iQ<sup>TM</sup>5 von BioRad Laboratories GmbH (München) berechnete automatisch aus der Steigung der Standardkurve (grün in Abbildung 23 dargestellt) die Effizienz der Reaktion mit 98,1 % und einer Linearität von R<sup>2</sup> = 0,995 (Abbildung 23). Beide Werte liegen in einem optimalen Bereich (Reaktionseffizienz 90 bis 105% und R<sup>2</sup> > 0,980) (siehe oben und Kapitel 3.2). Die interne Amplifikationskontrolle (lila in Abbildung 23 dargestellt) zeigt Ct-Werte bei 22 und beeinflusst die Zielgen Reaktion nicht. Die X-Achse zeigt den Logarithmus der DNA Konzentrationen und die Y-Achse die zugehörigen Ct-Werte. Laut Tabelle 68 liegt die Nachweisgrenze für die TaqMan

Real-Time PCR zum Nachweis von *Cronobacter* spp. bei einem Ct-Wert von 25, dies entspricht einer DNA Konzentration von 0,1 ng/µl *C. sakazakii* LTH 6611. Dieser Ct-Wert ist niedriger als die der Negativkontrollen (*C. helveticus* weist einen Ct-Wert von 29,0 auf) und zeigt außerdem noch einen s-förmigen Kurvenverlauf. Höhere Ct-Werte werden demnach nicht mehr als pathogene *Cronobacter* identifiziert.

<i>C. sakazakii</i> LTH 6611 DNA Konzentration in ng/µl	Ct-Wert
61,5	$15,3 \pm 0,3^{a}$
10	$17,8 \pm 0,4$
1	21,1 ± 0,4
0,1	$24,3 \pm 0,3$
0,01	$28,2 \pm 0,6$
0,001	36,3 ± 11,8

**Tabelle 68:** Darstellung der Ct-Werte der errechneten Standardkurve der TaqMan Real-TimePCR zum spezifischen Nachweis von *Cronobacter* spp.

<sup>a</sup> Standardabweichungen sind an den Ct-Werten mit angegeben

Die *C. sakazakii* DNA Konzentration von 0,1 ng/µl entspricht 2,0 x  $10^4$  KbE. Dies wurde anhand folgender Parameter berechnet: 1 Da  $\triangleq$  1,66 x  $10^{-27}$  kg; Genom *C. sakazakii*  $\triangleq$  4,5 x  $10^6$  bp; molekulare Masse (MW) = Anzahl der Basenpaare x 660 Da; molekulare Masse einer Zelle von 4,5 x  $10^6$  bp  $\triangleq$  4,93 x  $10^{-18}$  kg.



**Abbildung 23:** Erstellung der Standardkurve zur Bestimmung der Reaktionseffizienz für die TaqMan Real-Time PCR zum spezifischen Nachweis von *Cronobacter* spp. Dargestellt ist die errechnete Standardkurve (grün) mit der internen Amplifikationskontrolle (IAC) (lila). X-Achse = Logarithmus der DNA Konzentrationen; Y-Achse = Ct-Werte. Die berechnete Effizienz (E) lag bei 98,1 %, die Linearität der Standardkurve bei R^2=0,995.



**Abbildung 24:** Erstellung der Standardkurve zur Bestimmung der Reaktionseffizienz für die TaqMan Real-Time PCR zum spezifischen Nachweis von *Cronobacter* spp.. Dargestellt sind die Amplifikationskurven der Verdünnungsreihe für die Ermittlung der Ct-Werte X-Achse = Ct-Werte; Y-Achse = Zunahme der Fluoreszenz.

Die Beschriftungsnummern 1 bis 4 bzw. 1 bis 6 in den Abbildungen 23 und 24 zeigen den *C. sakazakii* LTH 6611 Typstamm in den verschiedenen DNA Konzentrationen (1: 61,5 ng/µl, 2: 10 ng/µl, 3: 1 ng/µl, 4: 0,1 ng/µl, 5: 0,01 ng/µl, 6: 0,001 ng/µl).

Die Validierung des TaqMan-Assay erfolgte mit sechs C. malonaticus und 34 C. sakazakii Lebensmittelisolaten (Tabelle 10) und 30 Typ- und Referenzstämmen als Positiv- und Negativkontrollstämme (Tabelle 8). Bei den Positivkontrollstämmen handelt es sich um die pathogenen Spezies des Genus Cronobacter aus Tabelle 8 (Nr. 15 bis 19, 21, 22, 24 bis 27 und 29) und als Negativkontrollstämme dienten die nicht-pathogenen Spezies des Genus Cronobacter (C. helveticus LTH 7001 und C. pulveris LTH 7002), nahe Verwandte aus der Familie der Enterobacteriaceae und ausgewählte grampositive Bakterienstämme aus Tabelle 8 (Nr. 2, 14, 30 bis 35, 37, 39 bis 45 und 49). Die Validierung des Assay erfolgte in einem dreifachen Ansatz mit der IAC Verdünnung 10<sup>-3</sup> (Kapitel 2.8.3.5). In den Abbildungen 26 und 27 sind auf der X-Achse die Ct-Werte und auf der Y-Achse die Zunahme der Fluoreszenz der Amplifikation gezeigt. In Abbildung 25 ist der Kurvenverlauf von 21 ausgewählten C. sakazakii Lebensmittelisolaten aus Tabelle 10 und neun Kontrollstämmen gezeigt. Bei den dargestellten Kontrollstämmen handelt sich um P. vulgaris LTH 6952, P. alcalifaciens LTH 6957, P. aeruginosa LTH 6953, P. fluorescence LTH 6013, S. Enteritidis LTH 6488, S. Typhimurium LTH 6666, Staph. aureus LTH 6243, Ser. marcescens LTH 6954, Y. enterocolitica LTH 6955 (Tabelle 8). In Abbildung 26 sind die Amplifikationskurven der pathogenen Spezies des Genus Cronobacter, der nicht-pathogenen Spezies C. helveticus LTH 7001 und C. pulveris LTH 7002 und von 14 Negativkontrollstämmen gezeigt. Bei den Kontrollstämmen in Abbildung 26 handelt es sich um die Stämme Ent. cloacae LTH 6950, Ent. dissolvens LTH 6665, E. coli LTH 463, Cit. freundii LTH 620, Ent. aerogenes LTH 6950, S. Enteritidis LTH 6488, S. Typhimurium LTH 6666, H. alvei LTH 6956, K. pneumoniae LTH 6951, P. vulgaris LTH 6952, P. alcalifaciens LTH 6957, Ser. marcescens LTH 6954, Y. enterocolitica LTH 6955, L. monocytogenes LTH 5593 (Tabelle 8).

Die getesteten pathogenen *Cronobacter* Stämme sowie die Lebensmittelisolate konnten eindeutig identifiziert werden (Abbildung 25 und Abbildung 26). Die Ct-Werte der pathogenen *Cronobacter* Stämmen sowie die der Lebensmittelisolate lagen

zwischen 15,7 und 19,3. Die Ct-Werte der Kontrollstämmen lagen im Bereich von 29,0 und 38,5 oder konnten nicht detektiert werden. Die Ct-Werte der zwei nichtpathogenen Mitglieder des Genus *Cronobacter, C. helveticus* LTH 7001 (Ct 29,0) und *C. pulveris* LTH 7002 (Ct 30,3), liegen nah an denen der Zielorganismen. Da die Nachweisgrenze jedoch bei einem Ct-Wert von 25 liegt (siehe weiter oben in diesem Kapitel), wurden diese Stämme als negativ bewertet. Auch die Ct-Werte der Kontrollstämme sind wesentlich größer als die der getesteten *Cronobacter* Stämme oder wurden nicht detektiert und wurden somit als nicht-pathogene *Cronobacter* identifiziert bzw. als negativ in der PCR gewertet. Die interne Amplifikationskontrolle zeigte Ct-Werte von 20 bis 22 bei allen getesteten Stämmen. Somit konnten keine falsch-positiven Ergebnisse erzielt werden. Um die Reinheit der Reagenzien zu überprüfen wurde auch hier eine NTC mitgeführt.



Abbildung 25: Validierung der TaqMan Real-Time PCR mit interner Amplifikationskontrolle zum Nachweis von Cronobacter spp.. Dargestellt sind Amplifikationskurven von 21 ausgewählten beispielhaft die Cronobacter Lebensmittelisolaten und neun Negativkontrollstämmen. X-Achse = Ct-Werte; Y-Achse = Zunahme der Fluoreszenz.



**Abbildung 26:** Validierung der TaqMan Real-Time PCR mit interner Amplifikationskontrolle zum Nachweis von *Cronobacter* spp.. Dargestellt sind beispielhaft die Amplifikationskurven der pathogenen *Cronobacter*, nicht-pathogenen *Cronobacter* Stämmen (siehe oben) und 14 Negativkontrollstämmen. X-Achse = Ct-Werte; Y-Achse = Zunahme der Fluoreszenz.

Auf Grund der erzielten Ergebnisse konnte die Spezifität des TaqMan Real-Time PCR Verfahrens mit interner Amplifikationskontrolle für alle human pathogenen *Cronobacter* Stämme bestätigt werden.

### 3.4 Spezifischer Nachweis von Salmonella enterica

Die Entwicklung eines Real-Time PCR basierenden Nachweissystems von S. enterica. erfolgte wie in Kapitel 2.8 und 3.2 beschrieben. Die konventionelle PCR zum Nachweis von S. enterica erfolgte zur Bestätigung der richtigen Amplikongröße sowie zur Überprüfung der Spezifität der Primer (Kapitel 2.8.1.3). Das invA-PCR-Produkt mit einer Größe von 106 bp wurde in einem 3 %igen Agarosegel aufgetrennt (Kapitel 2.8.1.4). Der S. Enteritidis Typstamm LTH 6488 und der S. Typhimurium Typstamm LTH 6666 sowie ein S. Enteritidis Lebensmittelisolat (LTH 6780 aus dieser konventionellen Tabelle 11) wurden mittels PCR getestet. Als Negativkontrollstämme dienten 14 gramnegative Stämme (12 davon stammten aus der Familie der Enterobacteriaceae) und drei ausgewählte grampositive Stämme (aus Tabelle 8 Nr. 2, 14, 24, 30 bis 35, 37, 39 bis 42, 45, 46 und 49). In Abbildung 27 sind der S. Enteritidis Typstamm LTH 6488, ein S. Enteritidis Lebensmittelisolat LTH 6780 sowie der S. Typhimurium Typstamm LTH 6666 und sechs der Negativkontrollen (C. sakazakii LTH 6611, Cit. freundii LTH 620, Ent. aerogenes LTH 6949, 7: Ent. dissolvens LTH 6665, 8: Ent. cloacae LTH 6950, 9: E. coli LTH 463) dargestellt. Alle Salmonella Stämme (Spur 1 bis 3) zeigen deutlich eine Bande mit einer Größe von 106 bp, die Stämme der Negativkontrollen (Spur 4 bis 10) weisen dagegen zwischen 100 und 200 bp keine Bande auf (Abbildung 27). Daher kann die konventionelle PCR mit dem Zielgen invA als spezifisch für S. enterica angesehen werden.



**Abbildung 27:** Agarosegel (3 %) mit den PCR Produkten der spezifischen konventionellen PCR zum Nachweis von *S. enterica* mit ausgewählten Stämmen (siehe Text).

M: 100 bp DNA Marker, 1: S. Enteritidis LTH 6488, 2: S. Typhimurium LTH 6666, 3: S. Enteritidis LTH 6780, 4: C. sakazakii LTH 6611, 5: Cit. freundii LTH 620, 6: Ent. aerogenes LTH 6949, 7: Ent. dissolvens LTH 6665, 8: Ent. cloacae LTH 6950, 9: E. coli LTH 463, 10: NTC, M: 100 bp DNA Marker

Mittels einer Standardkurve (Kapitel 2.8.2.3) wurde die Effizienz der Reaktion und über die Schmelzkurvenanalyse (Kapitel 2.8.2.2) die charakteristischen Schmelztemperaturen in einem SYBR<sup>®</sup> Green Real-Time PCR Assay zum Nachweis von S. enterica bestimmt. Über die Schmelzkurvenanalyse wurde die charakteristische Schmelztemperatur des invA PCR-Produktes identifiziert (Kapitel 3.2). Der Schmelzpeak bei einer Temperatur von 81 °C stellt das spezifische PCR Produkt mit dem Zielgen invA dar (Abbildung 28). Dieser Peak wird automatisch von der iQ<sup>™</sup>5 Optical System Software (BioRad Laboratories GmbH, München) (Kapitel 3.2) erstellt. Es konnte bei der durchgeführten Schmelzkurvenanalyse keine weiteren Peaks von unspezifischen Produkten, weder durch die Negativkontrolle L. monocytogenes LTH 5593 oder die NTC, und somit auch keine Dimer-Bildung festgestellt werden (Abbildung 28).



**Abbildung 28:** Schmelzkurvenanalyse der SYBR<sup>®</sup> Green Real-Time PCR für den spezifischen Nachweis von *S. enterica* bei einer Schmelztemperatur von 81 °C

Die Reaktionseffizienz wurde durch die Erstellung einer Standardkurve ermittelt (Kapitel 2.8.2.3). Genomische DNA des S. Enteritidis Typstammes LTH 6488 wurde zur Erstellung einer Verdünnungsreihe benutzt. Als Kontrollstamm diente der L. monocytogenes Typstamm LTH 5593. Als DNA-Konzentrationen des S. Enteritidis Typstammes wurden 15 ng/µl (als Stocklösung) und eine dezimale Verdünnungsreihe von 10 bis 0,001 ng/µl verwendet. Die Standardkurve in Abbildung 29 wurde erstellt, indem die bekannten DNA Konzentration auf der X-Achse (Log starting quantity) gegen die Ct-Werte auf der Y-Achse aufgetragen wurden (Kapitel 3.2). Die aus der Steigung berechneten Reaktionseffizienz lag bei 103,2 % und die Linearität der Reaktion bei R<sup>2</sup> = 0,996. Für einen reproduzierbaren Assay sollte die Linearität bei > 0.980 und die Effizienz in einem Bereich zwischen 90 und 105 % liegen (Anonym, 2006b und siehe Kapitel 3.2). Die Amplifikationskurven in Abbildung 30 verlaufen in einem parallelen Abstand und somit konnte eine gute Linearität der Reaktion zusätzlich bestätigt werden. Dabei sind auf der X-Achse die Ct-Werte und auf der Y-Achse die Zunahme der Fluoreszenz der Amplifikation gezeigt.



**Abbildung 29:** Erstellung der Standardkurve zur Bestimmung der Reaktionseffizienz für die SYBR<sup>®</sup> Green Real-Time PCR zum spezifischen Nachweis von *S. enterica*. Dargestellt ist die errechnete Standardkurve. X-Achse = Logarithmus der DNA Konzentrationen (Log starting quantity); Y-Achse = Ct-Werte. Die berechnete Effizienz (E) lag bei 103,2 %, die Linearität der Standardkurve bei R^2=0,996.



**Abbildung 30:** Erstellung der Standardkurve zur Bestimmung der Reaktionseffizienz für die SYBR<sup>®</sup> Green Real-Time PCR zum spezifischen Nachweis von *S. enterica*. Dargestellt sind die Amplifikationskurven der Verdünnungsreihe für die Ermittlung der Ct-Werte X-Achse = Ct-Werte; Y-Achse = Zunahme der Fluoreszenz.

Die Beschriftungsnummern 1 bis 4 bzw. 1 bis 5 in den Abbildungen 29 und 30 zeigen den *S.* Enteritidis LTH 6488 Typstamm in den verschiedenen DNA Konzentrationen (1: 15 ng/µl, 2: 10 ng/µl, 3: 1 ng/µl, 4: 0,1 ng/µl, 5: 0,01 ng/µl und 0,001 ng/µl).

Die optimale Annealing-Temperatur für die Anlagerung der Primer und der TaqMan Sonde wurde mittels eines Temperaturgradienten (Kapitel 2.8.3.2) bestimmt. Die Ct-Werte aus Tabelle 69 liegen sehr nahe beieinander. Die Standardabweichung des Ct-Wertes der Temperatur von 64,5 °C konnte leider nicht berechnet werden. Dies ist darauf zurück zu führen, dass bei der Doppelbestimmung nur ein Wert zur Auswertung herangezogen werden konnte. Abbildung 31 zeigt, dass die beste sförmig verlaufende Kurve mit der höchsten Fluoreszenz bei einer Annealing-Temperatur von 55,8°C auftritt. Auf der X-Achse sind die Ct-Werte und auf der Y-Achse die Zunahme der Fluoreszenz der Amplifikation gezeigt (Abbildung 31). Daher wurde für den TaqMan Real-Time PCR Assay zum Nachweis von *S. enterica* eine Annealing-Temperatur von 56 °C gewählt.

**Tabelle 69:** Darstellung der Ct-Werte mit den zugehörigen Annealing-Temperaturen für denTaqMan Real-Time PCR Assay zum Nachweis von S. enterica

[°C]	65,0	64,5	63,3	61,4	58,9	57,1	55,8	55,0
Ct-	26,8 <sup>a</sup>	24,5	22,9	21,8	20,9	20,9	20,9	20,9
Wert	± 0,4	$\pm N/A^{b}$	± 0,2	± 0,1	± 0,1	± 0,2	± 0,0	± 0,2

<sup>a</sup> Standardabweichungen sind an den Ct-Werten mit angegeben

<sup>b</sup> N/A = nicht detektierbar



**Abbildung 31:** Ermittlung der optimalen Annealing-Temperatur für die TaqMan Real-Time PCR zum spezifischen Nachweis von *S. enterica*. Dargestellt sind die Amplifikationskurven der getesteten Annealing-Temperaturen. X-Achse = Ct-Werte; Y-Achse = Zunahme der Fluoreszenz.

## Herstellung der internen Amplifikationskontrolle für die TaqMan Real-Time PCR zum Nachweis von S. enterica

Die Herstellung der IAC erfolgte wie in Kapitel 2.8.3.3 beschrieben. Die molekulare Masse der hergestellten IAC für *S. enterica* betrug nach der Aufreinigung und Linearisierung 16,3 ng/µl. Daraus wurde mittels der Formel 1 (vgl. Kapitel 2.8.3.3) eine Kopienzahl von 6,9 x  $10^9$  Kopien/µl errechnet. Diese Kopienzahl wurde mittels einer dezimalen Verdünnungsreihe (Tabelle 70) für den Einsatz in die TaqMan Real-Time PCR verdünnt, um die niedrigste Konzentration an IAC zu bestimmen.

Kopienzahl/µl	Molekulare Masse in ng/µl	Verdünnungsstufe
6,9 x 10 <sup>9</sup>	16,3	10 <sup>0</sup>
6,9 x 10 <sup>8</sup>	1,63	10 <sup>-1</sup>
6,9 x 10 <sup>7</sup>	0,16	10 <sup>-2</sup>
6,9 x 10 <sup>6</sup>	1,6 x 10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>
6,9 x 10 <sup>5</sup>	1,6 x 10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup>
6,9 x 10 <sup>4</sup>	1,6 x 10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-5</sup>
6,9 x 10 <sup>3</sup>	1,6 x 10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-6</sup>

**Tabelle 70:** Dezimale Verdünnungsreihe der internen Amplifikationskontrolle für die TaqManReal-Time PCR zum Nachweis von S. enterica

Um die hergestellte IAC zu überprüfen wurde eine konventionelle PCR (Kapitel 2.8.1.3) und eine anschließende Agarosegelelektrophorese (Kapitel 2.8.1.4) durchgeführt. Hiermit sollte die geringste Konzentration an IAC anhand einer dezimalen Verdünnungsreihe (Tabelle 70) bestimmt werden, die gerade noch in der Lage war ein positives Signal zu erzielen ohne die Amplifikation des Zielgenes *invA* zu hemmen. Die IAC zeigt im Agarosegel eine Bande mit der Größe von 212 bp und die der Ziel-DNA eine Bande mit 106 bp (siehe Abbildung 32). Es wurden alle IAC Verdünnungen aus Tabelle 70 mit dem S. Enteritidis Typstamm LTH 6488 in Kombination eingesetzt. Die Verdünnungsstufen 10<sup>-4</sup> und 10<sup>-5</sup> (Spur 6 und 7) sind die niedrigsten Stufen, die in der konventionellen PCR die *invA*-PCR nicht beeinflussen (Abbildung 32). Zur Bestimmung der geringsten Verdünnung an IAC in der TaqMan Real-Time PCR wurden die Verdünnungsstufen 10<sup>-3</sup>, 10<sup>-4</sup> und 10<sup>-5</sup> getestet.



**Abbildung 32:** Agarosegel (2 %) der spezifischen konventionellen PCR zum Nachweis von *S. enterica* zur Bestimmung der geeigneten Konzentration an interner Amplifikationskontrolle.

M: 100 bp DNA Marker, 1: S. Enteritidis LTH 6488, 2: S. Enteritidis LTH 6488 und IAC  $10^{0}$ , 3: S. Enteritidis LTH 6488 und IAC  $10^{-1}$ , 4: S. Enteritidis LTH 6488 und IAC  $10^{-2}$ , 5: S. Enteritidis LTH 6488 und IAC  $10^{-3}$ , 6: S. Enteritidis LTH 6488 und IAC  $10^{-4}$ , 7: S. Enteritidis LTH 6488 und IAC  $10^{-5}$ , 8: S. Enteritidis LTH 6488 und IAC  $10^{-6}$ , 9: NTC und IAC  $10^{0}$ , 10: NTC, M: 100 bp DNA Marker

**Tabelle 71:** Bestimmung der optimalen IAC Verdünnungsstufe für den Einsatz in der TaqMan Real-Time PCR zum Nachweis von S. enterica

Vordünnungsstufe IAC	Ct-Werte für S. Enteritidis LTH 6488			
verdunnungssture IAC	92,2 ng/µl	9,2 ng/µ		
IAC 10 <sup>-3</sup>	$13,9 \pm 0,2^{a}$	16,9 ± 0,2		
IAC 10 <sup>-4</sup>	13,8 ± 0,0	17,1 ± 0,3		
IAC 10 <sup>-5</sup>	$13,9 \pm 0,4$	$17,2 \pm 0,1$		

<sup>a</sup> Standardabweichungen sind an den Ct-Werten mit angegeben

Die besten Ct-Werte konnten mit der Verdünnung  $10^{-4}$  (Kopienzahl 6,9 x  $10^{5}/\mu$ l) in einer Doppelbestimmung erzielt werden, obwohl die Werte der Verdünnungen  $10^{-3}$  und  $10^{-4}$  eng beieinander liegen (Tabelle 71). Jedoch beeinflusst die Verdünnung von  $10^{-3}$  die Amplifikation des Zielgenes in der konventionellen PCR mehr (siehe Abbildung 32), da die Bande der Zielgen PCR schwächer ist als die der internen Kontrolle. Daher wurde die IAC Verdünnung  $10^{-4}$  für alle weiteren Versuche

verwendet. Abbildung 33 zeigt, dass die IAC Verdünnung 10<sup>-4</sup> in der TaqMan Real-Time PCR keinen Einfluss auf die Amplifikation des Zielgenes *invA* hat (siehe die sförmig verlaufenden Amplifikationskurven). In Abbildung 33 sind auf der X-Achse die Ct-Werte und auf der Y-Achse die Zunahme der Fluoreszenz der Amplifikation zu sehen, zudem wurde zur besseren Übersicht nur ein Wert der Doppelbestimmung dargestellt.



**Abbildung 33:** Bestimmung der optimalen Verdünnungsstufe der internen Amplifikationskontrolle für die TaqMan Real-Time PCR zum Nachweis von *S. enterica*. Dargestellt sind die Amplifikationskurven des *S.* Enteritidis Typstammes LTH 6488 mit den DNA-Konzentrationen 92,2 ng/µl und 9,2 ng/µl und einer Konzentration der internen Amplifikationskontrolle von 10<sup>-4</sup> pro Ansatz. X-Achse = Ct-Werte; Y-Achse = Zunahme der Fluoreszenz.

Die Reaktionseffizienz wurde anschließend mit der Ermittlung einer Standardkurve (Kapitel 2.8.3.4) für den TaqMan Real-Time PCR Assay erneut bestimmt. Die Standardkurve wurde erstellt (Abbildung 34) und die Software iQ5 V von Bio-Rad Laboratories GmbH (München) berechnete automatisch aus der Steigung der Standardkurve (grün in Abbildung 34 dargestellt) die Effizienz der Reaktion mit 83,0 %. Die Effizienz liegt nicht in dem optimalen Bereich zwischen 90 und 105 % (Kapitel 3.2). Dies liegt daran, dass durch die IAC zwei Reaktionen in einem Gefäß ablaufen und dies zu einer Minderung der Effizienz führen kann (Anonym, 2006b). Dazu wurde eine Linearität der Standardkurve von  $R^2 = 0,998$  erreicht (siehe

Abbildung 34). Die interne Amplifikationskontrolle (lila in Abbildung 34 dargestellt) zeigt Ct-Werte bei 21 und beeinflusst die Zielgen Reaktion nicht. Die X-Achse zeigt den Logarithmus der DNA Konzentrationen und die Y-Achse die zugehörigen Ct-Werte. Anhand der Ct-Werte in Tabelle 72 aus der Standardkurve wurde die Nachweisgrenze bestimmt. Laut Tabelle 72 liegt die Nachweisgrenze für die TaqMan Real-Time PCR bei einem Ct-Wert von 24,00, also einer DNA Konzentration von 0,1 ng/µl *S.* Enteritidis LTH 6488. Dieser Ct-Wert ist niedriger als die der Negativkontrolle *L. monocytogenes* LTH 5593 (Ct-Wert 29,6) und zeigt außerdem noch einen s-förmigen Kurvenverlauf (Abbildung 35). In dieser Abbildung sind auf der X-Achse die Ct-Werte und auf der Y-Achse die Werte der Grundline zur korrekten Bestimmung der Ct-Werte gezeigt. Höhere Ct-Werte als 24,0 werden nicht mehr als *S.* Enteritidis identifiziert.

S. Enteritidis LTH 6488 DNA Konzentration [ng/µl]	Ct-Wert
92,2	13,2 ± 0,2 <sup>a</sup>
10	$17,0 \pm 0,1$
1	$20,5 \pm 0,0$
0,1	$24,0 \pm 0,0$
0,01	$29,5 \pm 0,4$
0,001	N/A <sup>b</sup>

**Tabelle 72:** Darstellung der Ct-Werte der errechneten Standardkurve der TaqMan Real-TimePCR zum spezifischen Nachweis von S. enterica

<sup>a</sup> Standardabweichungen sind an den Ct-Werten mit angegeben

<sup>b</sup> N/A = nicht detektierbar

Die *S.* Enteritidis DNA Konzentration von 0,1 ng/µl entspricht 1,9 x 10<sup>4</sup> KbE. Dies wurde anhand folgender Parameter berechnet: 1 Da  $\triangleq$  1,66 x 10<sup>-27</sup> kg, Genom *S.* Enteritidis  $\triangleq$  4,686 x 10<sup>6</sup> bp molekulare Masse (MW) = Anzahl der Basenpaare x 660 Da, molekulare Masse einer Zelle von 4,686 x 10<sup>6</sup> bp  $\triangleq$  5,13 x 10<sup>-18</sup> kg.



**Abbildung 34:** Erstellung der Standardkurve zur Bestimmung der Reaktionseffizienz für die TaqMan Real-Time PCR zum spezifischen Nachweis von *S. enterica*. Dargestellt ist die errechnete Standardkurve (grün) mit der internen Amplifikationskontrolle (IAC) (lila). X-Achse = Logarithmus der DNA Konzentrationen; Y-Achse = Ct-Werte. Die berechnete Effizienz (E) lag bei 83,0 %, die Linearität der Standardkurve bei R^2=0,998.



**Abbildung 35:** Erstellung der Standardkurve zur Bestimmung der Reaktionseffizienz für die TaqMan Real-Time PCR zum spezifischen Nachweis von *S. enterica*. Dargestellt sind die Amplifikationskurven der Verdünnungsreihe für die Ermittlung der Ct-Werte X-Achse = Ct-Werte; Y-Achse = Zunahme der Fluoreszenz.

Die Beschriftungsnummern 1 bis 3 in Abbildung 34 zeigt die S. Enteritidis LTH 6488 DNA Konzentrationen von 1: 10 ng/µl, 2: 1 ng/µl, 3: 0,1 ng/µl und Abbildung 35 zeigt die Konzentrationen von 1: 14,5 ng/µl, 2: 10 ng/µl, 3: 1 ng/µl, 4: 0,1 ng/µl, 5: 0,01 ng/µl, 6: 0,001 ng/µl.

Für die Validierung des TaqMan Real-Time PCR Verfahrens wurden 30 S. Enteritidis Lebensmittelisolate (Tabelle 11) sowie jeweils die Typstämme von S. Enteritidis LTH 6488 und S. Typhimurium LTH 6666 (Tabelle 8) verwendet. Als Negativkontrollen dienten 17 Kontrollstämme, 13 Stämme aus der Familie der *Enterobacteriaceae* und drei ausgewählte grampositive Bakterienstämme (aus Tabelle 8 Nr. 2, 14, 24, 30 bis 35, 37, 39 bis 42, 45, 46 und 49). Die Validierung des Assays erfolgte in einem dreifachen Ansatz mit der IAC Verdünnung 10<sup>-4</sup>. In Abbildung 36 ist der Kurvenverlauf von ausgewählten S. Enteritidis Lebensmittelisolaten und acht Kontrollstämmen gezeigt. Bei den acht dargestellten Kontrollstämme in Abbildung 36 handelt es sich um *C. sakazakii* LTH 6611, *Cit. freundii* LTH 620, *Ent. aerogenes* LTH 6949, *Ent. cloacae* LTH 6950, *Ent. dissolvens* LTH 6665, *E. coli* LTH 463, *H. alvei* LTH 6956, *K. pneumoniae* LTH 6951.

Die Ct-Werte der 30 *S.* Enteritidis Lebensmittelisolate lagen zwischen 14,1 und 18,9. Die Ct-Werte der 17 Kontrollstämmen waren im Bereich von 31,3 und 33,3 oder konnten nicht detektiert werden. In Abbildung 36 sind dazu auf der X-Achse die Ct-Werte und auf der Y-Achse die Zunahme der Fluoreszenz der Amplifikation gezeigt. Da die Ct-Werte der Kontrollstämme größer als die der getesteten *S.* Enteritidis Lebensmittelisolate waren, somit über der Nachweisgrenze von einem Ct-Wert von 24 (siehe oben in diesem Kapitel), konnten diese eindeutig als nicht-*S.* Enteritidis identifiziert werden. Die IAC zeigte Ct-Werte zwischen 20 und 29 bei allen getesteten Stämmen und somit konnten keine falsch-positiven Ergebnisse erzielt werden. Um die Reinheit der Reagenzien zu überprüfen wurde ebenfalls eine no template control (NTC) mitgeführt.



**Abbildung 36:** Validierung der TaqMan Real-Time PCR mit interner Amplifikationskontrolle zum Nachweis von *S. enterica*. Dargestellt sind beispielhaft die Amplifikationskurven von 15 ausgewählten *S.* Enteritidis Lebensmittelisolaten und acht Negativkontrollstämmen. X-Achse = Ct-Werte; Y-Achse = Zunahme der Fluoreszenz.

Laut diesen Ergebnissen konnte die Spezifität und Sensitivität des TaqMan Real-Time PCR Verfahrens mit interner Amplifikationskontrolle für den Nachweis von *S. enterica* bestätigt werden.

# 3.5 Untersuchung der Trockenmilchprodukte auf die Zielkeime Bacillus cereus, Cronobacter spp. und Salmonella enterica

#### 3.5.1 Überprüfung auf die Anwesenheit von Bacillus cereus

Die Überprüfung von potentiellen *B. cereus* in den Trockenmilchprodukten erfolgte mittels der Methode nach § 64 LFGB, L 01.00-53:1992 (Kapitel 2.9.1). Bereits nach der selektiven Anreicherung in Trypton-Soja-Polymyxin-Bouillon (Kapitel 2.3) wurden B. cereus gefunden. Diese konnten dann anhand der typischen Merkmale auf Polymyxin-Pyruvat-Eigelb-Mannitol-Bromthymolblau-Agar (Kapitel 2.3) identifiziert werden. Die typischen B. cereus Kolonien auf diesem Agar sind gezackt, 2 bis 5 mm groß und Türkis bis blau gefärbt, umgeben von einem Eigelb-Präzipitationshof. Diese Merkmale unterscheidet B. cereus von anderen Bacillus Spezies. Somit konnten B. cereus aus den getesteten Trockenmilchprodukten isoliert werden. Insgesamt wurden 13 B. cereus Stämme aus verschiedenen Trockenmilchprodukten isoliert. Davon stammen neun aus pulverförmigen Säuglingsnahrung, drei aus Molkenpulver und eines aus Molkenproteinpulver. Diese Stämme wurden einer näheren Charakterisierung unterzogen (Kapitel 2.6). Eine taxonomische Einordnung der isolierten Stämme wurde anhand einer 16S rDNA Sequenzierung (Kapitel 2.6.2) durchgeführt. Die 16S rDNA wurde amplifiziert, mittels der Primer 616V und 97K ansequenziert und anhand der National Center for Biotechnology Information (NCBI) Datenbank verglichen und identifiziert (siehe Kapitel 2.6.1). Die DNA-Sequenz der Isolate LTH 6971, 6972 und 6974 waren zu 100% identisch zu B. cereus LTH 6773 (Accession No. AE016877.1). Die Sequenz des Stammes aus Molkenproteinpulver LTH 6969 und die Isolate LTH 6070, 6973 waren zu 99% identisch zu dem B. cereus LTH 6773 (Accession No. AE016877.1). Alle isolierten Stämme wurden in die Stammsammlung für Mikroorganismen des Fachgebiets Lebensmittelmikrobiologie der Universität Hohenheim hinterlegt (Tabelle 9). Zur Differenzierung der einzelnen B. cereus Isolate wurde eine RAPD-PCR mit dem Primer M13V durchgeführt (Kapitel 2.6.3). Die Abbildung 37 zeigt die Ergebnisse mit dem Referenzstamm B. cereus LTH 6773 und den isolierten Stämmen aus Molkenpulver und -proteinpulver sowie aus der pulverförmigen Säuglingsnahrung mit den LTH Nummern 6969 bis 6974 (Tabelle 9). Visuell ist in Abbildung 37 zu erkennen, dass alle untersuchten Isolate

gut differenzierbare Bandenmuster ergeben haben. Zwei Proben (Spur 6 und 7) weisen gleiche Muster auf und können durch diese PCR nicht unterschieden werden. Da beide Proben aus derselben Charge pulverförmiger Säuglingsnahrung stammen handelt es sich vermutlich um ein und dieselbe Probe. Außerdem kann visuell festgestellt werden, dass alle gefundenen Isolate unterschiedliche Bandenmuster im Vergleich zum *B. cereus* Typstamm LTH 6773 aufweisen.



**Abbildung 37:** Agarosegel (2 %) mit den RAPD-PCR Mustern der erhaltenen *B. cereus* Isolate erhalten durch den Primer M13V.

M: 100 bp DNA Marker, 1: *B. cereus* LTH 6773, 2: *B. cereus* LTH 6969 aus Molkenproteinpulver, 3: *B. cereus* LTH 6970 aus Molkenpulver, 4: *B. cereus* LTH 6971 aus pulverförmigen Säuglingsnahrung, 5: *B. cereus* LTH 6972 aus pulverförmigen Säuglingsnahrung, 6: *B. cereus* LTH 6973 aus pulverförmigen Säuglingsnahrung, 7: *B. cereus* LTH 6973 aus pulverförmigen Säuglingsnahrung, 8: *B. cereus* LTH 6974 aus pulverförmigen Säuglingsnahrung, 9: NTC, M: 1 kb DNA Marker.

Die RAPD-Bandenmuster wurden zusätzlich mit der Bionumerics Software (Version 7; Applied Maths, Sint-Martens-Latern, Belgium) evaluiert. Durch die Erstellung eines Dendrogramms konnten die verschiedenen Bandenmuster aus Abbildung 37 untereinander verglichen und Clustergruppen zugewiesen. Aus der Abbildung 38 ist zu erkennen, dass die Isolate LTH 6973 identisch sind, da beide Isolate aus derselben Probe pulverförmiger Säuglingsnahrung stammen sind diese mit derselben Bezeichnung gezeigt. Zugleich weist dieses Isolat sehr große Ähnlichkeit mit dem Isolat LTH 6971 auf. Die Isolate aus pulverförmiger Säuglingsnahrung können zu einem Cluster zusammengefasst werden und haben große Ähnlichkeiten untereinander (siehe roter Kreis in Abbildung 38).



**Abbildung 38:** Dendrogramm der RAPD-PCR (erhalten durch den Primer M13V) der aus Trockenmilchprodukten isolierten *B. cereus* Isolaten

#### 3.5.2 Überprüfung auf die Anwesenheit von Cronobacter sakazakii

Für die Durchführung der künstlichen Kontaminationsversuche wurden verschiedene pulverförmige Säuglingsnahrungen sowie Molkenproteinpulver und Molkenpulver (Tabelle 7) nach der ISO/TS 22964, 2006 Methode untersucht (Kapitel 2.9.2). Die erste Anreicherung erfolgte in gepuffertem Peptonwasser über Nacht bei 37 °C, danach erfolgte die selektive Anreicherung in modifizierter Lauryl-Sulfat-Tryptose-Bouillon bei 44 °C für 24 Stunden. Dieser Anreicherungsschritt konnte als negativ bewertet werden (keine Trübung), lediglich die Positivkontrolle *C. sakazakii* LTH 6611 war in der Lage in dieser Bouillon zu wachsen. Die Selektivität dieses Mediums wurde durch die Zugabe von Antibiotika (10 mg/l Vancomycin) und Natriumchlorid und durch eine hohe Inkubationstemperatur erreicht. Das Vancomycin wurde hierzu zur Hemmung der grampositiven Begleitflora eingesetzt. *Cronobacter* spp. haben die Fähigkeit hohen osmotischen Druck zu tolerieren, während die anderen Mitglieder der Familie der *Enterobacteriaceae* dies nicht können. Um einen hohen osmotischen Druck zu erreichen wurde eine Natriumchlorid Konzentration von 0.5 M der mLST-

weiteren Bestätigung erfolgte der Ausstrich Bouillon zugesetzt. Zur auf Enterobacter sakazakii Isolations Agar mit einer Inkubation bei 44 °C für 24 Stunden, der auch als negativ bewertet werden konnte. Die Positivkontrolle C. sakazakii LTH 6611 zeigte blau-grün gefärbte Kolonien. Dieser chromogene Agar macht sich die α-Glukosidase-Aktivität von Cronobacter spp. zu Nutze. Das zugesetzte Substrat 5bromo-4-chloro-3-indolyl α-D-Glukopyranosid kann von Cronobacter spp. durch das Enzym α-Glukosidase hydrolisiert werden und bildet somit auf dem Agar blau-grüne Kolonien (Kapitel 1.2). Andere Mitglieder der Familie der Enterobacteriaceae können dieses Substrat nicht spalten und bilden farblose bis leicht violett gefärbte Kolonien. Zusätzlich erhöht Natriumchlorid den osmotischen Druck und Natriumdeoxycholat, sowie Kristallviolett hemmen das Wachstum von grampositiven Mikroorganismen, auch besonders von Staphylococcus.

In keinem der getesteten Trockenmilchprodukte konnte *Cronobacter* spp. nachgewiesen werden.

#### 3.5.3 Überprüfung auf die Anwesenheit von Salmonella enterica

Laut § 64 LFGB, Methode L00.00-20, 2004-12 wurden die in Tabelle 7 dargestellten Trockenmilchprodukte auf die Abwesenheit von S. enterica untersucht (Kapitel 2.9.3). Als flüssiges Selektivmedium wurde die Rappaport-Vassiliadis-Bouillon zur Anreicherung von S. enterica aus Milch und Milchprodukten eingesetzt. Für die Hemmung anderer Mikroorganismen wurde dem Medium Malachitgrün zugesetzt. Nach der Inkubation von 24 Stunden bei 41,5 °C zeigt eine starke milchige Trübung das Wachstum verdächtiger S. enterica an. Ein klares Medium ist nicht immer negativ für bakterielles Wachstum, weshalb eine Bestätigung auf festem Selektivmedium durchgeführt werden sollte. Für diesen Nachweis wurde Xylose-Lysin-Deoxycholat-Agar verwendet. Die Selektivität des Nährmediums zeichnet sich durch die Verwertung von Xylose, die Decarboxylierung von Lysin und der Bildung von Schwefelwasserstoff aus. Salmonella spp. können Xylose fermentieren und Lysin decarboxylieren, dadurch wird der pH-Wert des Mediums in den basischen Bereich verschoben. Der enthaltene pH Indikator Phenolrot verändert seine Farbe nicht, das Medium bleibt rot und klar. Positives Wachstum von S. enterica auf diesem Medium zeichnet sich auch durch die farblosen Kolonien mit einem schwarzen Zentrum aus. Die schwarzen Koloniezentren entstehen durch die Bildung von Schwefelwasserstoff. Als Hemmstoff gegen coliforme Bakterien wurde dem Medium Deoxycholat zugesetzt. Alle anderen Mikroorganismen, welche Laktose und Saccharose verwerten können, sowie Lysin-positive coliforme Bakterien, verschieben den pH-Wert in den sauren Bereich und das Medium zeigt einen Farbumschlag zu gelb. Durch den dadurch entstandenen hohen Säuregehalt wird die Schwärzung der Kolonien verhindert, wodurch *S. enterica* eindeutig erkannt wird.

In keinem Trockenmilchprodukt wurde *S. enterica* nachgewiesen, daher konnten alle Produkte für die weiteren Versuche eingesetzt werden.

# 3.6 Nachweis der Zielkeime in künstlich kontaminiertem Trockenmilchpulver

#### 3.6.1 Künstliche Kontamination von rekonstituierten Trockenmilchpulvern

#### Künstliche Kontamination mit C. sakazakii LTH 6611

Um die Nachweismethode für Cronobacter spp. am Produkt zu erproben wurden verschiedene Milcherzeugnisse (Molkenproteinpulver, Molkenpulver und pulverförmige Säuglingsnahrung) in Hirn-Herz-Bouillon gelöst und künstlich kontaminiert (Abbildung 2). Der Versuchsablauf wurde laut Kapitel 2.10.1 durchgeführt. Die Durchführung erfolgte mit dem C. sakazakii Typstamm LTH 6611 (Tabelle 8). Für eine Korrelation zwischen den TaqMan Real-Time PCR Ergebnissen die (Kapitel 3.3) und Keimzahlen wurden Proben zusätzlich auf Enterobacter sakazakii Isolations Agar ausplattiert und die Keimzahlen bestimmt. Der komplette Versuchsablauf wurde dreimal wiederholt. In Tabelle 73 und Tabelle 74 sind die Ct-Werte der TagMan Real-Time PCR mit den inokulierten C. sakazakii Konzentrationen 10 und 100 KbE/g der künstlichen Kontamination dargestellt. Die Nachweisgrenze dieser PCR liegt bei einem Ct-Wert von 25 (vgl. Kapitel 3.3, Tabelle 64). Die Ct-Werte unter 25 wurden als positiv gewertet und Werte darüber wurden nicht-Cronobacter identifiziert. Eine erfolgreiche Detektion von als einer Anfangskeimzahl von 10 KbE/g konnte in allen Trockenmilchprodukten ab einer

Anreicherungszeit von 12 Stunden erreicht werden (Tabelle 73). Die Inokulum-Konzentration von 100 KbE/g *C. sakazakii* konnte mittels der Real-Time PCR aus Molkenproteinpulver und Molkenpulver schon nach einer Anreicherung von 6 Stunden und aus pulverförmiger Säuglingsnahrung nach 12 Stunden nachgewiesen werden (Tabelle 74). Die Ct-Werte der IAC lagen bei allen Proben zwischen 20 und 22, somit konnten keine falsch positiven Ergebnisse erzielt werden. Die Natriumchlorid Kontrolle konnte nicht detektiert werden oder zeigte Ct-Werte über 31.

**Tabelle 73:** Darstellung der Ct-Werte von drei unabhängigen Wiederholungen der künstlichen Kontamination von rekonstituierten Trockenmilchprodukten mit einer *C. sakazakii* LTH 6611 Inokulum-Konzentration von 10 KbE/g

Molkenprotein-	Molkenpulver	pulverförmige	
pulver		Säuglingsnahrung	
$33,0 \pm 0,6^{a}$	$32,9 \pm 0,3$	34,7 ± 2,2	
$36,9 \pm 0,5$	$35,0 \pm 2,5$	$37,4 \pm 0,3$	
29,2 ± 1,2	29,6 ± 1,1	$29,7 \pm 0,8$	
$19,9 \pm 0,9$	17,3 ± 0,9	19,2 ± 1,1	
19,9 ± 0,5	17,6 ± 0,9	19,3 ± 1,1	
19,9 ± 1,0	16,6 ± 1,2	18,8 ± 0,5	
	Molkenprotein- pulver $33,0 \pm 0,6^{a}$ $36,9 \pm 0,5$ $29,2 \pm 1,2$ $19,9 \pm 0,9$ $19,9 \pm 0,5$ $19,9 \pm 1,0$	Molkenprotein- pulverMolkenpulver $33,0 \pm 0,6^a$ $32,9 \pm 0,3$ $36,9 \pm 0,5$ $35,0 \pm 2,5$ $29,2 \pm 1,2$ $29,6 \pm 1,1$ $19,9 \pm 0,9$ $17,3 \pm 0,9$ $19,9 \pm 0,5$ $17,6 \pm 0,9$ $19,9 \pm 1,0$ $16,6 \pm 1,2$	

<sup>a</sup> Standardabweichungen sind an den Ct-Werten mit angegeben

**Tabelle 74:** Darstellung der Ct-Werte von drei unabhängigen Wiederholungen der künstlichen Kontamination von rekonstituierten Trockenmilchprodukten mit einer *C. sakazakii* LTH 6611 Inokulum-Konzentration von 100 KbE/g

Anreicherungszeit	Molkenprotein-	Molkenpulver	pulverförmige	
	pulver		Säuglingsnahrung	
0 Stunden	$29,3 \pm 0,5^{a}$	31,9 ± 0,7	34,1 ± 2,6	
4 Stunden	$33,5 \pm 3,5$	31,6 ± 1,3	36,2 ± 1,6	
6 Stunden	25,8 ± 1,1	25,8 ± 1,2	27,1 ± 1,9	
12 Stunden	$18,8 \pm 0,5$	17,1 ± 0,5	19,4 ± 0,5	
14 Stunden	$18,4 \pm 0,7$	$17,6 \pm 0,3$	19,2 ± 1,0	
18 Stunden	17,9 ± 0,7	17,6 ± 0,7	18,7 ± 0,5	

<sup>a</sup> Standardabweichungen sind an den Ct-Werten mit angegeben

Der Vergleich des Wachstums von C. sakazakii in allen drei getesteten Trockenmilchprodukten mit der Inokulum-Konzentration von 10 KbE/g ist in Abbildung 39 und mit der Inokulum-Konzentration von 100 KbE/g ist in Abbildung 40 dargestellt. In beiden Abbildungen ist pulverförmige Säuglingsnahrung in blau, Molkenproteinpulver in rot und Molkenpulver in grün dargestellt. Auf der X-Achse sind die Anreicherungsdauer in Stunden und auf der Y-Achse die Keimzahlen in KbE/g aufgetragen. Im Vergleich zu den anderen beiden Pulvern ist ein geringfügig höheres Wachstum von C. sakazakii in der pulverförmigen rekonstituierten Säuglingsnahrung festzustellen. Dies konnte für beide C. sakazakii Konzentrationen gezeigt werden (Abbildung 39 und Abbildung 40). Die Nachweisgrenze der TaqMan Real-Time PCR mit der Inokulum-Konzentration von 10 KbE/g lag bei allen drei Pulvern bei einer Anreicherungszeit von 12 Stunden. Dies entspricht Keimzahlen von 10<sup>8</sup> bis 10<sup>9</sup> KbE/g *C. sakazakii* (Abbildung 39). Die Inokulum-Konzentration 100 KbE/g C. sakazakii konnte mittels der PCR schon nach 6 Stunden Anreicherung in Molkenproteinpulver und Molkenpulver detektiert werden. Laut Abbildung 40 entspricht dies einer Keimzahl von 10<sup>5</sup> KbE/g. Die Ergebnisse zeigen, dass eine Anreicherung von 12 Stunden für einen erfolgreichen Nachweis von einer Inokulum-Konzentration von 10 KbE/g C. sakazakii aus der Lebensmittelmatrix mittels der TaqMan Real-Time PCR, als auch mittels kultureller Methode ausreichend ist.


**Abbildung 39:** Vergleich des kulturellen Wachstums von *C. sakazakii* LTH 6611 auf *Enterobacter sakazakii* Isolations Agar mit einer Inokulum-Konzentration von 10 KbE/g in verschiedenen rekonstituierten Trockenmilchprodukten und einer Inkubation bei 37 °C. X-Achse = Anreicherungsdauer in Stunden; Y-Achse = Keimzahlen in KbE/g.



**Abbildung 40:** Vergleich des kulturellen Wachstums von *C. sakazakii* LTH 6611 auf *Enterobacter sakazakii* Isolations Agar mit einer Inokulum-Konzentration von 100 KbE/g in verschiedenen rekonstituierten Trockenmilchprodukten und einer Inkubation bei 37 °C. X-Achse = Anreicherungsdauer in Stunden; Y-Achse = Keimzahlen in KbE/g.

#### Künstliche Kontamination mit S. Enteritidis LTH 6488

Die Nachweismethode für S. enterica wurde direkt am Produkt, durch die künstliche Kontamination von unterschiedlichen rekonstituierten Trockenmilchprodukten (Tabelle 7), getestet. Der Versuchsablauf ist in Kapitel 2.10.1 gezeigt und wurde mit dem S. Enteritidis Typstamm LTH 6488 durchgeführt. Für eine Korrelation zwischen den Ergebnissen der Real-Time PCR und den Keimzahlen wurden die Proben zusätzlich auf Xylose-Lysin-Deoxycholat Agar (Kapitel 2.3) ausplattiert und die Keimzahlen bestimmt. Der komplette Versuchsablauf wurde dreimal wiederholt. In Tabelle 75 und Tabelle 76 sind die Ct-Werte der TagMan Real-Time PCR (Kapitel 2.8.1.3) mit den Inokulum-Konzentrationen 10 und 100 KbE/g der künstlichen Kontamination von den rekonstituierten Milchpulvern dargestellt. Die Nachweisgrenze dieser Real-Time PCR liegt bei einem Ct-Wert von 24 (vgl. Kapitel 3.4, Tabelle 68). Daher wurden Ct-Werte unter bzw. gleich 24 als positiv und Werte darüber wurden als negativ gewertet. Eine erfolgreiche Detektion einer Inokulum-Konzentration von 10 KbE/g S. Enteritidis konnte in allen Trockenmilchprodukten ab einer Anreicherungszeit von 12 Stunden gezeigt werden (Tabelle 75). Die Inokulum-Konzentration 100 KbE/g konnte mittels der Real-Time PCR in Molkenpulver und Molkenproteinpulver nach 12 Stunden und in pulverförmiger Säuglingsnahrung schon nach einer Anreicherung von 6 Stunden nachgewiesen werden (Tabelle 76). Die Kontrolle mit Natriumchlorid (Kapitel 2.3) konnte mittels der Real-Time PCR nicht detektiert werden oder die Ct-Werte lagen über 33 (Tabelle 75 und Tabelle 76). Für die IAC konnten Ct-Werte von ca. 22 bei allen Proben erreicht werden, falschpositive Ergebnisse konnten daher ausgeschlossen werden.

Tabelle 75:Darstellung der Ct-Werte von drei unabhängigen Wiederholungen der<br/>künstlichen Kontamination von rekonstituierten Trockenmilchprodukten mit einer<br/>S. Enteritidis LTH 6488 Inokulum-Konzentration von 10 KbE/g

Anreicherungszeit	Molkenprotein-	Molkenpulver	pulverförmige	
	pulver		Säuglingsnahrung	
0 Stunden	N/A	N/A	N/A	
4 Stunden	N/A	N/A	N/A	
6 Stunden	N/A	N/A	31,7 ± 0,1 <sup>a</sup>	
12 Stunden	21,3 ± 1,3	19,2 ± 1,4	18,7 ± 2,5	
14 Stunden	$18,9 \pm 0,8$	$16,2 \pm 0,4$	17,2 ± 0,4	
18 Stunden	$16,3 \pm 0,4$	14,5 ± 0,2	17,4 ± 0,6	

<sup>a</sup> Standardabweichungen sind an den Ct-Werten mit angegeben

Tabelle 76:Darstellung der Ct-Werte von drei unabhängigen Wiederholungen der<br/>künstlichen Kontamination von rekonstituierten Trockenmilchprodukten mit einer<br/>S. Enteritidis LTH 6488 Inokulum-Konzentration von 100 KbE/g

Anreicherungszeit	Molkenprotein	Molkenpulver	pulverförmige
			Säuglingsnahrung
0 Stunden	N/A	N/A	N/A
4 Stunden	N/A	N/A	N/A
6 Stunden	$28,2 \pm 0,9^{a}$	$29,7 \pm 6,0$	24,2 ± 0,1
12 Stunden	18,3 ± 1,5	16,5 ± 1,6	17,2 ± 0,9
14 Stunden	$16,4 \pm 0,7$	14,1 ± 0,2	16,9 ± 1,0
18 Stunden	16,1 ± 0,5	$14,3 \pm 0,4$	15,8±0,9

<sup>a</sup> Standardabweichungen sind an den Ct-Werten mit angegeben

Der Vergleich des Wachstums von *S.* Enteritidis in allen drei Lebensmittelmatrices mit einer Inokulum-Konzentration von 10 KbE/ml ist in Abbildung 41 und mit der Inokulum-Konzentration 100 KbE/g ist in Abbildung 42 dargestellt. In den Abbildungen ist pulverförmige Säuglingsnahrung in blau, Molkenproteinpulver in rot und Molkenpulver in grün dargestellt. Auf der X-Achse sind die Anreicherungsdauer in Stunden und auf der Y-Achse die Keimzahlen in KbE/g aufgetragen. Es ist im Vergleich zu den anderen beiden Milchpulvern ein geringfügig höheres Wachstum von *S.* Enteritidis in pulverförmiger Säuglingsnahrung festzustellen. Dies konnte für

beide inokulierte Konzentrationen gezeigt werden. Die Nachweisgrenze der TaqMan Real-Time PCR der Inokulum-Konzentration 10 KbE/g lag bei allen drei Pulvern bei einer Anreicherungszeit von 12 Stunden. Dies entspricht Keimzahlen von 10<sup>6</sup> bis 10<sup>8</sup> KbE/g *S.* Enteritidis (Abbildung 41). Die Inokulum-Konzentration 100 KbE/g konnte mittels der PCR aus rekonstituierter pulverförmiger Säuglingsnahrung schon nach 6 Stunden Anreicherung detektiert werden, dies entspricht einer Keimzahl von 10<sup>5</sup> KbE/g (Abbildung 42). Bei Molkenpulver und –proteinpulver war eine Detektion erst ab einer Anreicherung von 12 Stunden möglich, was Keimzahlen von ca. 10<sup>8</sup> bis 10<sup>9</sup> KbE/g *S.* Enteritidis entspricht (Abbildung 42). Die Ergebnisse zeigen, dass ein sicherer Nachweis von inokulierten 10 und 100 KbE/g *S.* Enteritidis in allen getesteten Trockenmilchprodukten sowohl mittels Real-Time PCR als auch mittels kultureller Methode nach einer Anreicherungszeit von 12 Stunden möglich ist.



**Abbildung 41:** Vergleich des kulturellen Wachstums von *S.* Enteritidis LTH 6488 auf Xylose-Lysin-Deoxycholat Agar mit einer Inokulum-Konzentration von 10 KbE/g in verschiedenen rekonstituierten Trockenmilchprodukten und einer Inkubation bei 37 °C. X-Achse = Anreicherungsdauer in Stunden; Y-Achse = Keimzahlen in KbE/g.



**Abbildung 42:** Vergleich des kulturellen Wachstums von *S.* Enteritidis LTH 6488 auf Xylose-Lysin-Deoxycholat Agar mit einer Inokulum-Konzentration von 100 KbE/g in verschiedenen rekonstituierten Trockenmilchprodukten und einer Inkubation bei 37 °C. X-Achse = Anreicherungsdauer in Stunden; Y-Achse = Keimzahlen in KbE/g.

# 3.6.2 Künstliche Kontamination von pulverförmiger Säuglingsnahrung mit dehydrierten *Cronobacter sakazakii* LTH 6611 Zellen

Pulverförmige Säuglingsnahrung (Tabelle 7) wurde mit 1; 0,1 und 0,01 KbE/g C. sakazakii LTH 6611 inokuliert und in einem Inkubationsschrank auf einen aw-Wert von 0,22 getrocknet (Kapitel 2.10.2). Die Anreicherung erfolgte für 18 Stunden in gepuffertem Peptonwasser (Kapitel 2.3) und die Analyse erfolgte sofort und nach einer Lagerung von vier Wochen (Kapitel 2.10.2). Die kulturbasierte Methode nach ISO/TS 22964 (Kapitel 2.9.2) wurde mit der entwickelten TaqMan Real-Time PCR (Kapitel 2.8.1.2) verglichen. Der Nachweis von trockengestressten C. sakazakii Zellen in pulverförmiger Säuglingsnahrung nahm sowohl mit der kulturellen Methode als auch mit der Real-Time PCR innerhalb der Lagerdauer von 4 Wochen ab (Tabelle 77 und Tabelle 78). Die Nachweisgrenze der TagMan Real-Time PCR lag bei einem Ct-Wert von ca. 27 und einem s-förmigen Kurvenverlauf (Kapitel 3.3, Tabelle 64). Höhere erzielte Ct-Werte sowie kein s-förmiger Amplifikationskurvenverlauf wurden daher als negativ gewertet. Die Anzahl der positiven Ergebnisse aller 30 Proben für jede inokulierte Konzentration und

Untersuchungszeitpunkt sind dazu in Tabelle 77 und Tabelle 78 gezeigt. Beide Tabellen zeigen die Ergebnisse der kulturellen Methode (*Cronobacter* Screening Bouillon und *Enterobacter sakazakii* Isolations Agar (Kapitel 2.3)) mit der TaqMan Real-Time PCR im Vergleich. Die Ct-Werte der positiv gewerteten Proben lagen zwischen 16,3 und 27,2 mit einem s-förmigen Kurvenverlauf und die Werte der IAC lagen konstant bei 21. Eine falsch positive Bewertung der Proben konnte somit ausgeschlossen werden.

In der ersten Untersuchung zum Zeitpunkt  $T_0$  (Tabelle 77) konnten alle positiven Ergebnisse der kulturellen Methode auch mittels TaqMan Real-Time PCR als positiv bestätigt werden. Lediglich eine Probe mit der Ausgangskeimzahl 0,01 KbE/g konnte direkt aus der Anreicherung in gepuffertem Peptonwasser nicht mittels der Real-Time PCR detektiert werden (Tabelle 77).

Bei der zweiten Untersuchung nach einer vierwöchigen Lagerung (Tabelle 78) konnten ebenfalls alle positiven Ergebnisse der kulturellen Methode auch mittels der Real-Time PCR bestätigt werden. Eine Probe mit der Inokulum-Konzentration 0,1 KbE/g und zwei Proben mit 0,01 KbE/g direkt aus der Anreicherung konnten mittels der Real-Time PCR nicht identifiziert werden. Dagegen war eine zusätzliche Probe mit 0,1 KbE/g nach der selektiven Anreicherung in *Cronobacter* Screening Bouillon mittels der Real-Time PCR positiv (Tabelle 78). Die Negativkontrolle mit Natriumchlorid wurde weder kulturell noch mittels der Real-Time PCR zu allen Zeitpunkten nicht detektiert (Tabelle 77 und Tabelle 78).

Tabelle	77:	Darstellung	der	Ergebni	sse vo	n j	eweil	ls 30	unt	ersuchte	en pulve	förmigen
Säugling	snah	rungen mitte	s Tao	qMan Re	eal-Tim	e P	CR ir	m Vei	rgleic	h zur ku	ulturellen	Methode
mit eine	r Ino	kulum-Konze	ntratio	on von	jeweils	1,	0,1	und (	0,01	KbE/g t	trockenge	estresster
C. sakaz	<i>akii</i> L	TH 6611 Zell	en zu	im Zeitpi	unkt T <sub>0</sub>					-	-	

To	1 KbE/g	0,1 KbE/g	0,01 KbE/g	Kontrolle
Real-Time PCR (aus BPW <sup>a</sup> )	30	25	4	0
ESIA <sup>b</sup>	30	25	5	0
Real-Time PCR (aus CSB <sup>c</sup> )	30	25	5	0
CSB	30	25	5	0

<sup>a</sup> BPW = gepuffertes Peptonwasser

<sup>b</sup> ESIA = Enterobacter sakazakii Isolations Agar

<sup>c</sup> CSB = *Cronobacter Screening* Bouillon

Tabelle	78:	Darstellung	der	Ergebnisse	von	jeweils	30	untersuchten	pulverförmigen
Säugling	snah	rungen mittel	s Ta	qMan Real-1	Time	PCR in	n Verg	gleich zur kulti	urellen Methode
mit eine	r Ino	kulum-Konze	ntrati	on von jewe	eils 1	, 0,1 u	ind 0	,01 KbE/g tro	ckengestresster
C. sakaz	<i>akii</i> L	TH 6611 Zell.	en na	ach einer viel	rwöch	igen La	igerur	ng	-

4 Wochen Lagerung	1 KbE/g	0,1 KbE/g	0,01 KbE/g	Kontrolle (NaCl)
Real-Time PCR (aus BPW <sup>a</sup> )	30	16	3	0
ESIA <sup>b</sup>	30	17	5	0
Real-Time PCR (aus CSB <sup>c</sup> )	30	18	5	0
CSB	30	17	5	0

<sup>a</sup> BPW = gepuffertes Peptonwasser

<sup>b</sup> ESIA = *Enterobacter sakazakii* Isolations Agar

<sup>c</sup> CSB = *Cronobacter Screening* Bouillon

Zur Bestätigung der potentiellen C. sakazakii auf Enterobacter sakazakii Isolations Agar wurde eine Kolonie-PCR durchgeführt (vgl. Kapitel 2.10.2). Wenn möglich, wurden zehn Platten aus jeder inokulierten C. sakazakii Konzentration und Zeitpunkt für diese PCR verwendet. In Abbildung 43 sind exemplarisch die Ergebnisse der Kolonie-PCR zum Zeitpunkt T<sub>0</sub> dargestellt. Alle Isolate wurden mit dem C. sakazakii LTH 6611 Typstamm als Positivkontrolle in dieser PCR verglichen. Als Negativkontrolle diente Ent. dissolvens LTH 6665 (Tabelle 8) und eine NTC. Folgende Nummern der jeweils 30 Proben pro Konzentration wurden für die PCR zum Zeitpunkt T<sub>0</sub> verwendet: für <u>1 KbE/g Nr.:</u> 2, 4, 8, 15, 16, 18, 19, 22, 27, 29; für 0,1 KbE/g Nr.: 1, 5, 7, 13, 15, 18, 21, 23, 26, 28 und für 0,01 KbE/g Nr.: 4, 9, 13, 14, 17. Alle getesteten Proben zeigten wie erwartet PCR-Produkte in einer Größe von 150 bp (Abbildung 43). Die Kontrollen dagegen weisen keine PCR-Produkte auf. Nach der Lagerung von 4 Wochen wurde ebenfalls eine Kolonie-PCR von den Agarplatten durchgeführt. Dafür wurden folgende Nummern der jeweils 30 Proben verwendet: für 1 KbE/g Nr.: 2, 4, 8, 15, 16, 18, 19, 22, 27, 29; für 0,1 KbE/g Nr.: 1, 3, 6, 8, 12, 14, 18, 19, 26, 28 und für 0,01 KbE/g Nr.: 6, 8, 23, 25, 29. Auch hier waren alle Proben positiv und zeigten eine Bande bei einer Größe von 150 bp. Anhand dieser Ergebnisse konnte das Wachstum von C. sakazakii auf den Enterobacter sakazakii Isolations Agarplatten bestätigt werden.



**Abbildung 43:** Agarosegel (2 %) der Kolonie-PCR zum Nachweis von *C. sakazakii* auf *Enterobacter sakazakii* Isolations Agar zum Zeitpunkt T<sub>0</sub>.

M: 100 bp DNA Marker, 1: *C. sakazakii* LTH 6611, 2: <u>1 KbE/g</u> Nr. 2, 3: 1 KbE/g Nr. 4, 4: 1 KbE/g Nr. 8, 5: 1 KbE/g Nr. 15, 6: 1 KbE/g Nr. 16, 7: 1 KbE/g Nr. 18, 8: 1 KbE/g Nr. 19, 9: 1 KbE/g Nr. 22, 10: 1 KbE/g Nr. 27, 11: 1 KbE/g Nr. 29, 12: <u>0,1 KbE/g</u> Nr. 1, 13: 0,1 KbE/g Nr. 5, 14: 0,1 KbE/g Nr. 7, 15: 0,1 KbE/g Nr. 13, 16: 0,1 KbE/g Nr. 15, 17: 0,1 KbE/g Nr. 18, 18: 0,1 KbE/g Nr. 21, M: 100 bp DNA Marker

## 4. Diskussion

Bakterielle Krankheitserreger in Trockenmilchprodukten stellen ein Problem für die Lebensmittelindustrie dar, denn speziell diese Produkte werden häufig als Zusatz für andere Lebensmittel verwendet. Ein zuverlässiger und schneller Nachweis dieser Krankheitserreger ist daher für ein sicheres Lebensmittel notwendig. Kulturelle Nachweisverfahren sind zeitaufwendig und arbeitsintensiv. Jedoch werden diese Methoden insbesondere in der Milchindustrie noch häufig als Standard verwendet (Boyer und Combrisson, 2013). Molekulare Verfahren, wie PCR Methoden, machen dagegen einen schnellen, spezifischen sensitiven und Nachweis von lebensmittelassoziierten Mikroorganismen möglich. Im Rahmen dieser Arbeit erfolgte die Entwicklung von TaqMan Real-Time PCR Verfahren zum Nachweis von B. cereus, Cronobacter spp. und S. enterica in Trockenmilchprodukten innerhalb von 24 Stunden.

Für einen schnellen und spezifischen Nachweis von B. cereus wurde eine TaqMan Real-Time PCR entwickelt, da der Nachweis von B. cereus mittels der konventionellen Medien nach § 64 LFGB (Anonym, 1992) zu falschen Identifizierung oder auch zur Unterschätzung von B. cereus führen kann. In einer Studie von Fricker et al. (2008) konnte gezeigt werden, dass 72 % der getesteten B. cereus Lebensmittelisolate nicht die typischen Kolonien auf Polymyxin-Eigelb-Mannitol-Bromthymolblau-Agar zeigten. Eine spezifische Real-Time PCR und eine zusätzliche Bestätigung über neue chromogene Medien, wie z.B. das *B. cereus* group plating medium (BCM® von Biosynth AG, Schweiz), wäre somit ein zuverlässigerer Nachweis von B. cereus. Auch eine Differenzierung von B. cereus und der Begleitflora in Lebensmitteln ist mittels der konventionellen Nachweismethoden schwierig. Daher ist der Einsatz von molekularbiologischen Methoden für einen spezifischen Nachweis von pathogenen B. cereus unumgänglich. Die entwickelte TagMan Real-Time PCR identifiziert die 48 B. cereus Lebensmittelisolate und alle getesteten Typstämme der B. cereus Gruppe bis auf die Spezies B. pseudomycoides zuverlässig. Zudem konnten die verwendeten 13 Negativkontrollstämme nicht nachgewiesen werden (siehe Kapitel 3.2, Abbildung 15).

*B. mycoides* und *B. pseudomycoides* sind sehr eng miteinander verwandt. Beide haben einen auffallenden Phänotyp und zeigen Rhizobien Wachstum auf Agarplatten (Nakamura, 1998). Die Unterscheidung zwischen *B. mycoides* und *B. pseudomycoides* ist demnach auch nur mittels einer gaschromatographischen Fettsäureanalyse möglich (Luna et al., 2007). In dieser Arbeit war es möglich mit der entwickelten TaqMan Real-Time PCR *B. pseudomycoides* von den anderen Mitgliedern der *B. cereus* Gruppe anhand des *groEL* Gens zu unterscheiden (siehe Kapitel 3.2). Eine solche Unterscheidung war auch der Arbeitsgruppe von Oliwa-Stasiak et al. (2011) anhand einer Real-Time PCR mit dem Zielgen *motB* gelungen.

Zudem wurden bisher noch keine lebensmittelbedingten Krankheitsausbrüche mit *B. pseudomycoides* in Verbindung gebracht. In einer Studie von Prüß et al. (1999) wurde außerdem gezeigt, dass *B. pseudomycoides* keinen nachweisbaren Gehalt an HBL Proteinen aufweist und somit im Vergleich zu den anderen Mitgliedern der *B. cereus* Gruppe nicht toxisch wirkt.

Dzieciol et al. (2013) entwickelten einen neuen diagnostischen Real-Time PCR Assay zum Nachweis von emetischen und nicht-emetischen *B. cereus* aus Milch. Die Nachweisgrenze dieser Methode betrug  $1,91 \times 10^3$  KbE/ml. Die Nachweisgrenze der entwickelten TaqMan Real-Time PCR Methode für *B. cereus* in dieser Arbeit liegt dagegen bei einer geringeren Keimzahl von  $1,7 \times 10^3$  KbE/ml (siehe Kapitel 3.2, Tabelle 64). Eine ähnliche Anzahl an *B. cereus* konnte auch mittels Real-Time PCR in der Studie von Yang et al. (2007) beständig detektiert werden.

Die konventionelle PCR von Chang et al. (2003) setzt als Zielgen das *groEL* Gen ein. Das *groEL* Gen ist spezifisch, kommt in allen Spezies des Genus *B. cereus* vor (siehe Kapitel 1.6) und ist daher für einen spezifischen Nachweis gut geeignet. Aus diesem Grund wurde dieses Gen auch zum spezifischen Nachweis von *B. cereus* in dieser Arbeit als Zielgen verwendet (siehe Kapitel 2.8). In vielen Studien wird jedoch die 16S rDNA als Zielgen einer PCR zum Nachweis von *B. cereus* eingesetzt, wie beispielsweise in der Arbeit von Fernández-No et al. (2011). Im Anbetracht einer schlechten Differenzierung von *Bacillus* spp. über die 16S rDNA ist diese PCR nicht sehr spezifisch für die Detektion von *B. cereus* und zudem fehlt dieser Methode eine interne Amplifikationskontrolle zum Ausschluss falsch-negativer Ergebnisse. In dieser Arbeit erfolgte daher der spezifische Nachweis von *B. cereus* mittels TaqMan Real-Time und einer internen Amplifikationskontrolle von innerhalb 1,5 Stunden (siehe Kapitel 3.2).

Yang et al. (2007) entwickelten ein schnelles Verfahren zum Nachweis von enterotoxischen B. cereus. Dabei kombiniert diese Arbeitsgruppe die Most-Probable-Number-Methode mit einer SYBR<sup>®</sup> Green Real-Time PCR. Ein Nachweis von 10<sup>0</sup> KbE/ml war nach acht Stunden, inklusive einer sechs-stündigen Anreicherung in Tryptose-Soja-Polymyxin-Bouillon, zu erreichen (Yang et al., 2007). Der Nachteil dieser Methode besteht jedoch darin, dass nur entertoxische B. cereus identifiziert werden können. Zudem erfüllen nur Assays die Bestimmungen für den Einsatz in der Diagnostik, wenn eine Zielgen-spezifische Sonde die Spezifität der Reaktion anzeigen kann (Dzieciol et al., 2013). Dies ist jedoch mittels des Farbstoffs SYBR® Green nicht möglich, da er unspezifisch an DNA bindet (Boyer und Combrisson, 2013). In der Studie von Ueda et al. (2013) wurden zwei Real-Time PCR Verfahren (SYBR<sup>®</sup> Green und TaqMan) zum Nachweis von *B. cereus* auf ihre Schnelligkeit und Sensitivität beurteilt. Der Nachteil dieser Nacheisverfahren besteht jedoch darin, dass als Zielsequenz das ces Gen diente und somit nur ein Nachweis von emetischen B. cereus möglich war. Für den Nachweis von B. cereus in dieser Arbeit wurde eine groEL Gen spezifische TagMan-Sonde (Tabelle 43) eingesetzt und garantierte somit den zuverlässigen Nachweis von emetischen und nicht-emetischen B. cereus (siehe Kapitel 3.2, Abbildung 15).

Martínez-Blanch et al. (2009) entwickelten ebenfalls ein Real-Time PCR Verfahren zum Nachweis der *B. cereus* Gruppe aus getrockneter Säuglingsnahrung. Die Anwendung des Systems im Lebensmittel erfolgte anhand einer künstlichen Kontamination von rekonstituierter Säuglingsnahrung. Dies erfolgte hier allerdings mit lebenden vitalen Zellen aus einer Kultur. Zudem geht nicht hervor wie hoch die Ausgangskeimzahl an *B. cereus* in der Säuglingsnahrung war, da eine Kontamination mit *B. cereus* nicht vermeidbar ist (Ehling-Schulz et al., 2004). Eine Anwendung der entwickelten TaqMan Real-Time PCR dieser Arbeit in künstlich kontaminierten Milcherzeugnissen war nicht durchführbar, da bereits eine natürliche Kontamination der getesteten Trockenmilchprodukte bestand (siehe Kapitel 3.5.1 in Abbildung 37 und Abbildung 38). Somit waren eine eindeutige Bestimmung der Nachweisgrenze und eine Differenzierung zu der künstlichen Kontamination nicht möglich.

Die zweite entwickelte TagMan Real-Time PCR zum Nachweis von Cronobacter spp. identifiziert zuverlässig die humanpathogenen Spezies C. sakazakii, C. condimenti, C. dublinensis, C. malonaticus, C. muytjensii, C. turicensis und C. universalis Typstämme sowie insgesamt 40 Lebensmittelisolate der Spezies C. malonaticus und C. sakazakii anhand der Sequenz des ompA Gens (siehe Kapitel 3.3, Abbildung 25 und Abbildung 26). Es wurden auch Stämme des C. sakazakii ST4 Typs erfolgreich nachgewiesen, da dieser Typ in Zusammenhang mit Meningitis bei Neugeborenen Forsythe, 2012). gebracht wurde (Joseph und Achtzehn Stämme als Negativkontrollen konnten mittels der PCR nicht detektiert werden, sowie die kürzlich reklassifizierten nicht-pathogenen C. helveticus und C. pulveris Stämme. Beide Stämme konnten in der PCR eindeutig ausgeschlossen werden und die zusätzliche interne Amplifikationskontrolle beinflusst die Spezifität der Reaktion nicht (siehe Kapitel 3.3 in Abbildung 26).

Eine solche genaue Differenzierung der Stämme ist nur mittels eines PCR basierenden Verfahrens möglich, denn bei einer konventionellen kulturellen Methode wie der ISO/TS 22964 ist dies schwer zu erreichen. Die Arbeitsgruppe von Kim und Rhee (2011) entwickelten ein neues kostengünstiges und selektives Medium zum Nachweis von Cronobacter spp.. Das Medium basiert auf Salicin zur Differenzierung der verschiedenen Bakterien und war sogar in der Lage trocken- und hitzegestresste Cronobacter Zellen zuverlässig nachzuweisen (Kim und Rhee et al., 2011). Einige Cronobacter Stämme zeigen jedoch nicht das typische Wachstum auf spezifischen chromogenen Medien, können jedoch mittels PCR zweifelsfrei identifiziert werden (Iversen et al 2007b). Für den PCR basierenden Nachweis von C. sakazakii aus Trockenmilchprodukten sind einige Methoden beschrieben (z.B. Seo und Brackett, 2005; Liu et al., 2006; Kang et al., 2007). Das entwickelte TagMan Real-Time PCR Verfahren von Kang et al. (2007) basiert auf der 16S rDNA Sequenz, mit einer Produktgröße von 426 bp. Die 16S rDNA Sequenz von Cronobacter spp. ist jedoch sehr ähnlich zu anderen Spezies der Familie der Enterobacteriaceae, was eine exakte Unterscheidung mittels PCR schwierig macht. Zudem sollte das Produkt für eine Real-Time PCR recht klein (ca. 200 bp) sein, um die Reaktionszeit während der PCR kurz zu halten (Boyer und Combrisson, 2013). In dieser Arbeit konnten die pathogenen Mitglieder des Genus *Cronobacter* spezifisch nachgewiesen werden (Abbildung 26), die Größe des PCR Produktes beläuft sich auf 151 bp (siehe Kapitel 3.3 in Abbildung 16) und somit wird eine Reaktionszeit von unter 1,5 Stunden erreicht.

Seo und Brackett (2005) beschrieben ebenfalls einen TaqMan Real-Time PCR Assay mit dem MMS Operon als Zielgen. Diesem Verfahren fehlt allerdings eine interne Amplifikationskontrolle, die essentiell für den Ausschluss von falsch positiven Ergebnissen ist. Daher wurde dem Verfahren in dieser Arbeit eine interne Amplifikationskontrolle hinzugefügt (siehe 3.3, Abbildung 21 und Abbildung 23).

Liu et al. (2006a) entwickelten zwei verschiedene Real-Time PCR Verfahren zum Nachweis von C. sakazakii aus Säuglingsnahrung. Die Detektion erfolgte nach einer 25-stündigen selektiven Anreicherung in mLST Bouillon sowie in Hirn-Herz-Bouillon, innerhalb von zwei Tagen. Solche Verfahren, die direkt im Lebensmittel Anwendung finden sollen, können nur erfolgreich nach einer Anreicherung der Bakterienzellen durchgeführt werden, da diese in ihrem gestressten Zustand Zeit für eine Vermehrung und Revitalisierung benötigen. Muytjens et al. (1988) fanden in Säuglingsnahrung eine Konzentration von 0,36 KbE/100 g an Cronobacter Zellen, daher ist eine Anreicherung der Zellen für einen erfolgreichen Nachweis des Pathogens notwendig. Eine unselektive Anreicherung ist für eine ausreichende Erholung und Vermehrung der Bakterienzellen empfehlenswerter, da in selektiven Medien das Wachstum von gestressten Zellen eher gehemmt wird und dies zu falschen Ergebnissen führen kann (Kandhai et al., 2010). In einer Studie dazu wurde die Wiederfindungsrate von trockengestressten C. sakazakii Zellen in Säuglingsnahrung untersucht. Die künstlich kontaminierten Proben wurden 20 Tage bei Raumtemperatur gelagert und nach einer Anreicherung für 24 Stunden untersucht. Sowohl für gepuffertes Peptonwasser als auch für Hirn-Herz-Bouillon wurden dieselben Ergebnisse von 1,3 KbE/300 g erzielt (Chen et al., 2010). In dieser Arbeit wurde für eine erste Versuchsreihe zur Wiederfindung von C. sakazakii in Trockenmilchprodukten Hirn-Herz-Bouillon (Abbildung 2 und Kapitel 3.6.1) und für eine zweite Versuchsreihe gepuffertes Peptonwasser verwendet (Kapitel 2.10.2 und 3.6.2), um eine Unterdrückung des Wachstums der gestressten *C. sakazakii* Zellen durch konkurrierende Bakterien in der Säuglingsnahrung zu vermeiden.

Ein weiterer Vorteil von einer Anreicherung vor der Durchführung der Real-Time PCR ist nach Zhou et al (2008) die Vermeidung von negativen Effekten der rekonstituierten Milchpulver auf die DNA Isolierung und PCR Detektion (Zhou et al., 2008). In einer ersten Versuchsreihe wurde in dieser Arbeit die Wiederfindungsrate von C. sakazakii in drei verschiedenen Trockenmilchprodukten untersucht. Hierzu erfolgte die künstliche Kontamination von rekonstituiertem Molkenpulver. Molkenproteinpulver und Säuglingsnahrung sowie die Optimierung einer geeigneten Anreicherungszeit für den Nachweis von C. sakazakii mittels Real-Time PCR (siehe Kapitel 2.10.1). Nach einer Anreicherung von 12 Stunden in Hirn-Herz-Bouillon konnte eine Inokulum-Konzentration von 10 KbE/g Säuglingsnahrung mittels der entwickelten TaqMan Real-Time PCR nachgewiesen werden (Tabelle 73). Dies entspricht nach der kulturellen ISO/TS 22964 Methode Keimzahlen von 108 bis 109 KbE/g (Abbildung 39). Für eine Anfangskeimzahl von 100 KbE/g in Molkenpulver war sogar nur eine Inkubation von 6 Stunden für einen Nachweis ausreichend (Tabelle 74). Nach der Untersuchung mittels ISO/TS 22964 Methode, wurde nach diesem Zeitpunkt eine Keimzahl von  $10^5$  KbE/g erreicht (Abbildung 40).

Hyeon et al. (2010) haben eine ähnliche Methode zum Nachweis von C. sakazakii aus Säuglingsnahrung angewandt. Die künstliche Kontamination der Säuglingsnahrung erfolgte hier mit vitalen lebenden Zellen und der Nachweis erfolgte nach einer Stabilisierung bei 4 °C über Nacht und einer weiteren anschließenden Inkubation von 24 Stunden in gepuffertem Peptonwasser (37 °C). Die Nachweisgrenze dieser Methode lag zwar bei 0,1 KbE C. sakazakii /g, aber die Ergebnisse lagen erst nach ca. zwei Tagen vor. Eine weitere ähnliche Methode haben Soler et al. (2012) entwickelt. Dabei wurden 10 g Säuglingsnahrung in 90 ml gepuffertem Peptonwasser mit 1 ml Cronobacter Flüssigkultur inokuliert und anschließend für 18 Stunden inkubiert. Die Nachweisgrenze lag hier bei 1 KbE/g, aber es erfolgten die Versuche mit vitalen und nicht dehydrierten Zellen, so wie es in natürlich kontaminierter Säuglingsnahrung der Fall wäre. Cronobacter spp. ist in der Lage unter trockenen Bedingungen und unter osmotischen Druck zu überleben, nach Healy et al. (2010) ist es jedoch sehr unwahrscheinlich, dass vitale Cronobacter Zellen in getrockneten Lebensmitteln vorkommen. In einer zweiten Versuchsreihe wurde daher im Labormaßstab versucht, eine natürliche Kontamination von pulverförmigen Säuglingsnahrung zu simulieren. Dafür wurde pulverförmige Säuglingsnahrung mit *C. sakazakii* Zellen in unterschiedlichen Konzentrationen künstlich kontaminiert, getrocknet und für vier Wochen gelagert. Die Untersuchung erfolgte nach einer 18-stündigen Anreicherung in gepuffertem Peptonwasser, um eine optimale Vermehrung und Regeneration der Zellen zu gewährleisten (siehe Kapitel 2.10.2). Gemäß der DIN ISO 16140 darf in dreißig 10 g Lebensmittelproben kein *C. sakazakii* nachweisbar sein, weshalb nach diesen Kriterien die zweite Versuchsreihe aufgebaut wurde. Es wurde für jede *C. sakazakii* Konzentration 30 parallele Proben hergestellt und untersucht. Die Trocknung der Zellen erfolgte direkt im Pulver bei einem anfänglichen a<sub>w</sub>-Wert des Pulvers zwischen 0,20 – 0,22 (siehe Kapitel 2.10.2).

Laut Breeuwer et al. (2003) liegt der a<sub>w</sub>-Wert von getrockneter Säuglingsnahrung bei ca. 0,2 was in dieser Arbeit bestätigt werden konnte. Nach einer Studie von Edelson-Mammel et al. (2005) konnte C. sakazakii mit einer Inokulationskonzentration von 10<sup>6</sup> KbE/g in Säuglingsnahrung nach zwei Jahren bei einem aw-Wert von 0,27 noch nachgewiesen werden. Auch bei Beuchat et al. (2009) war C. sakazakii in der Lage bei einem  $a_w$ -Wert von 0,25 – 0,30 in Säuglingsnahrung zu überleben. Chen et al. (2010) detektierten nach 20 Tagen Lagerung nur 44 KbE C. sakazakii /10 g Säuglingsnahrung nach einer Anreicherung von 24 Stunden in gepuffertem Peptonwasser. In dieser Arbeit war es hingegen möglich eine Inokulum Konzentration von 0,01 KbE C. sakazakii /g Säuglingsnahrung bei einem aw-Wert von 0,19 bis 0,22 nach zu weisen (siehe Kapitel 3.6.2,). Die entwickelte TaqMan Real-Time PCR identifizierte an Tag 0 vier Proben (Tabelle 77) und nach der Lagerung von 4 Wochen noch drei Proben mit einer Inokulum-Konzentration von 0,01 KbE/g (Tabelle 78). Während die kulturelle Methode an beiden Zeitpunkten fünf von 30 Proben dieser Konzentration nachweisen konnte (siehe Tabelle 77 und Tabelle 78), ist hier die Sensitivität höher als die der entwickelten PCR.

Eine mögliche Erklärung könnte die Arbeit von Miled et al (2010) liefern. Diese Untersuchungen zeigten, dass das frühe Wachstum von *Cronobacter* durch die Säuerung der Anreicherungsbouillon oder durch die Produktion von Bakteriozin der mikrobiellen Begleitflora beeinflusst wird. Aus der Studie von Joosten et al. (2008) geht zudem hervor, dass die mikrobielle Flora von Säuglingsnahrung aus Bacillus spp. und grampositiven Kokken besteht. Zudem können grampositive Spezies mit Enterobacteriaceae konkurrieren und dies wäre demnach mit C. sakazakii im gepuffertem Peptonwasser während der Inkubation möglich. Membré et al. (2005) zeigten, dass die Wachstumsrate von Bacillus spp. in einem unselektiven Anreicherungsmedium und einer Inkubation bei 37 °C stark ansteigen kann. Daher besteht die Möglichkeit eines Konkurrenzverhaltens zwischen Cronobacter spp. und Bacillus spp. während der Inkubation. Desweiteren hatten die C. sakazakii Zellen unter der Anwendung der kulturellen Methode mehr Zeit sich zu erholen und zu vermehren, während bei der Real-Time PCR die Zellen nur eine Erholungsphase von 18 Stunden in gepuffertem Peptonwasser zur Verfügung hatten. Die Nachweiszeit der entwickelten TaqMan Real-Time PCR inklusive DNA Präparation hat nach der Anreicherung über Nacht eine Dauer von ca. einem halben Arbeitstag. Es ist aus dieser Sicht daher möglich, die Ergebnisse kulturell mittels der Standardmethode ISO/TS 22964 oder über andere selektive Medien zu bestätigen. Die Standardmethode umfasst vier Kultivierungsschritte und eine zusätzliche biochemische Bestätigung der Ergebnisse, mit einer Dauer von vier bis sechs Tagen. Die entwickelte Nachweismethode inklusive unselektiver Anreicherung, DNA Isolierung und Bestätigung mittels TaqMan Real-Time PCR ist innerhalb eines Tages durchzuführen. Es konnten somit drei Kultivierungsschritte im Vergleich zu der Standardmethode reduziert werden und eine Bestätigung der Ergebnisse mittels eines schnellen molekularen Verfahrens erweitert werden.

Die entwickelte Real-Time PCR Methode zum Nachweis von *S. enterica* basiert auf einem spezifischen Primerpaar und Sonde, hergestellt an die Sequenz des spezifischen *invA* Gens. Diese Methode identifiziert die Typstämme *S.* Enteritidis und *S.* Typhimurium zuverlässig und zusätzlich insgesamt 30 *S.* Enteritidis Lebensmittelisolate (siehe Kapitel 3.4, Abbildung 36). Die *Salmonella* Serovare *S.* Enteritidis und *S.* Typhimurium sind die bedeuteten Erreger von *Salmonella* verursachenden humanen Durchfallerkrankungen in Deutschland (Tschäpe und Bockenmühl, 2002). Daher wurden diese Serovare für die Validierung der

entwickelten TaqMan Real-Time PCR Methode ausgewählt. Als Negativkontrollen dienten 17 Stämme und alle Stämme konnten in der PCR eindeutig ausgeschlossen 3.4, Abbildung Die werden (siehe Kapitel 36). zusätzliche interne Amplifikationskontrolle beinflusst die Spezifität der Reaktion nicht. Dies zeigt, dass das invA Gen spezifisch in S. enterica vorkommt und daher für einen Nachweis mittels PCR für die Diagnostik geeignet ist. Dies konnte auch die Studie von Rahn et al. (1992) bestätigen, denn dort war es möglich, 99,4 % der getesteten S. enterica Stämme eindeutig über die Sequenz des invA Genes zu identifizieren.

Für den Nachweis von *S. enterica* mittels PCR wurden einige Verfahren bereits veröffentlicht (Bej et al., 1994; Malorny et al., 2004; Day et al., 2009). Das entwickelte Verfahren von Bej et al. (1994) basiert auf dem *himA* Gen, das für ein DNA Bindeprotein kodiert und in vielen Darmbakterien vorkommt. Bei diesem Verfahren handelt es sich jedoch um eine konventionelle PCR mit anschließender Agarosegelelektrophorese, welches sehr arbeits- und zeitaufwendig ist. In dieser Arbeit wurde eine TaqMan Real-Time PCR entwickelt, die *S. enterica* spezifisch in kurzer Zeit (1,5 Stunden) nachweisen kann (siehe Kapitel 3.4).

Delibato et al. (2013) entwickelten eine diagnostische Real-Time PCR zum Nachweis von Salmonella spp. innerhalb eines Tages mit einer kurzen selektiven Anreicherung der kontaminierten Lebensmittel. Die Methode erzielte eine Sensitivität und Spezifität von 100 % mit einer Nachweisgrenze von 10<sup>3</sup> KbE/ml. Day et al. (2009) entwickelten ebenfalls eine TaqMan Real-Time PCR zum Nachweis von S. Enteritidis aus Eiern. Dazu wurden rohe Eier mit S. Enteritidis aus Übernachtkulturen künstlich kontaminiert und entsprechende Verdünnungen auf XLD Agar plattiert. Der Nachweis mittels Real-Time PCR erfolgte mittels DNA, isoliert direkt von Koloniematerial der XLD Agarplatten. Es erfolgte in dieser Studie keine Versuche zum Nachweis von S. Enteritidis direkt aus dem Lebensmittel. Demnach ist nicht festzustellen, ob das entwickelte PCR Verfahren auch zuverlässig direkt aus der Lebensmittelmatrix anwendbar ist. Zusätzlich fehlt der Methode von Day et al. (2009) eine interne Amplifikationskontrolle, die eine fehlerfreie Beurteilung der Ergebnisse möglich macht. In dieser Arbeit war es möglich S. Enteritidis mit einer Anfangskeimzahl von 10 KbE/g aus verschiedenen rekonstituierten Trockenmilchprodukten mittels der TaqMan Real-Time PCR zuverlässig nach einer Anreicherung von 12 Stunden nachzuweisen (Tabelle 75) und somit einen Matrixeffekt der Lebensmittel ausschließen zu können. Zusätzlich verfügt die entwickelte Methode über eine interne Amplifikationskontrolle, die zur Eliminierung von falsch positiven Ergebnissen verwendet wird (siehe Kapitel 3.4).

In einer Studie von Malorny et al. (2004) wurde eine weitere TaqMan Real-Time PCR mit interner Amplifikationskontrolle für den Nachweis von *Salmonella* spp. entwickelt. Das Verfahren detektiert 10<sup>4</sup> KbE/g nach einer Anreicherung von 20 Stunden in Hühnerfleisch und Fischfilet. Die künstliche Kontamination der Lebensmittel erfolgte mit vitalen Zellen aus einer Kultur, mit Konzentrationen von 0 bis 1000 KbE/ml. Laut DGHM darf in Säuglingsnahrung auf Milchpulverbasis in 25 g *Salmonella* spp. nicht nachweisbar sein (Anonym, 2011). In dieser Arbeit lag die Nachweisgrenze bei 10<sup>5</sup> KbE/g *S*. Enteritidis in rekonstituierter Säuglingsnahrung mit einer Anfangskeimzahl von 100 KbE/g nach einer Anreicherungszeit von sechs Stunden (Abbildung 42). Ein Anreicherungsschritt zur Erhöhung der Zellzahl für den Einsatz in die Real-Time PCR ist somit notwendig.

einer Arbeit von Krascsenicsová (2008)In et al. wurde jedoch die Wiederfindungsrate von gestressten S. enterica Zellen in Milchund Fleischprodukten untersucht. Die Zellen wurden durch Kochen (25 min) gestresst und mit Peptonwasser, sowie 25 g des Lebensmittels für 18 Stunden inkubiert. Danach erfolgte eine selektive Anreicherung für fünf weitere Stunden. Nach der zweistufigen Anreicherung konnten Keimzahlen von 10<sup>7</sup> KbE/ 25 g Eiscreme und Salami erzielt werden. Die Wiederfindungsrate für den entwickelten TaqMan Assay erfolgte in dieser Arbeit anhand einer künstlichen Kontamination von rekonstituierten Trockenmilchprodukten. Für diese Versuchsreihe wurden drei verschiedene Trockenmilchpulver in Hirn-Herz-Bouillon gelöst und mit dem S. Enteritidis Typstamm LTH 6488 künstlich kontaminiert, die Wiederfindungsrate bestimmt und die Anreicherungszeit optimiert. Der Nachweis erfolgte mittels der entwickelten TaqMan Real-Time PCR und die Ergebnisse wurden zusätzlich mittels der kulturellen Standardmethode nach § 64 LFGB bestätigt (siehe Kapitel 2.10.1). Nach einer Anreicherung von 12 Stunden in Hirn-Herz-Bouillon konnten mittels der Real-Time PCR die Anfangskeimzahl 10 KbE/g S. Enteritidis in allen Trockenmilchpulvern nachgewiesen werden (Tabelle 75). Für 100 KbE/g Säuglingsnahrung war der Nachweis schon nach einer Anreicherungszeit von sechs Stunden möglich (Tabelle 76). Dies entspricht nach der Standardmethode § 64 LFGB einer Keimzahl von 10<sup>5</sup> KbE/g (siehe Abbildung 42). Hyeon et al. (2010) haben eine ähnliche Methode zum Nachweis von S. enterica aus Säuglingsnahrung angewandt. Die künstliche Kontamination der Säuglingsnahrung erfolgte hier auch mit vitalen Zellen direkt aus einer Kultur und der Nachweis wurde mit einer anschließenden Inkubation von 24 Stunden in gepuffertem Peptonwasser bei 37 °C durchgeführt. Die Nachweisgrenze dieser Methode lag bei 0,1 KbE/g S. enterica. Die nachgewiesene S. enterica Konzentration ist hier geringer als in der vorliegenden Arbeit (siehe Kapitel 3.6.1). Dies könnte an dem Anreicherungsmedium liegen, denn Hyeon et al. (2010) benutzten gepuffertes Peptonwasser als Anreicherungsmedium wohingegen in dieser Arbeit Hirn-Herz-Bouillon verwendet wurde. Nach Nam et al. (2005) ist gepuffertes Peptonwasser für das Wachstum und die Revitalisierung von sublethal geschädigten Salmonella Zellen eine bessere Wahl. In Säuglingsnahrung ist die grampositive Begleitflora, wie Bacillus spp., hoch und diese können in Konkurrenz mit Enterobacteriaceae treten, sowie deren Wachstum hemmen. Besonders in wie reichaltigen Medien, Hirn-Herz-Bouillon, ist die Wachstumsrate der grampositiven Flora höher (Membré et al. 2005; Joosten et al. 2008).

Zhang et al. (2013) testeten dazu fünf verschiedene Flüssigmedien für den geeigneten Einsatz als Voranreicherung zum Nachweis von *S*. Enteritidis. Trypton-Soja-Bouillon wurde als bestes Medium identifiziert, da *S*. Enteritidis höheres Wachstum (bis zu einer Log-Stufe) zeigte als in den anderen vier Medien. Die meisten molekularbiologischen Methoden basieren auf einer Voranreicherung. Der Einsatz einer Anreicherung vor dem Einsatz der PCR bestimmt somit den Erfolg oder das Misslingen eines Nachweises (Zhang et al., 2013). So könnte ein Austausch des Anreicherungsmediums Hirn-Herz-Bouillon die Nachweisgrenze von *S. enterica* aus Trockenmilchpulvern in dieser Arbeit senken und so einen zuverlässigen Nachweis bieten.

Lebensmittelmatrizes, speziell Milcherzeugnisse, enthalten Inhibitoren, die die Sensitivität der PCR herabsetzten kann. Der häufigste Grund für eine fehlerhafte PCR ist nicht genügend vorhandene DNA in einer Probe (Alaeddini, 2011). Es können aber auch verschiedene Stoffe in den Lebensmitteln oder in den Anreicherungsmedien die PCR hemmen, wie beispielsweise Fett, Proteine, Enzyme oder Polysaccharide (Rossen et al., 1992). Die Sensitivität der entwickelten TagMan Real-Time PCR liegt sowohl für Cronobacter spp. als auch für S. enterica bei ca. 10° KbE/ml aus künstlich kontaminierten rekonstituierten Trockenmilchprodukten. Der Nachweis einer Anfangskeimzahl von 100 KbE/ml war mit der entwickelten Real-Time PCR Verfahren bereits nach einer Anreicherung von sechs Stunden möglich (Abbildung 40 und Abbildung 42). Dies zeigt, dass die Lebensmittelmatrix keinen Einfluss auf die Detektion von C. sakazakii und S. Enteritidis mittels der spezifischen Nachweismethoden hat. Dies konnten auch Wang et al. (2012) in einer Studie wurde C. sakazakii ohne Einfluss bestätigen, denn es der Matrix aus Säuglingsnahrung, Milchpulver, steriler Milch und Hühnerfleisch detektiert. Dies zeigten auch Pochop et al. (2011) in der Studie für S. enterica, hier konnten sowohl S. Enteritidis als auch S. Typhimurium ohne Einfluss der Lebensmittelmatrix aus Milch- und Fleischprodukten nachgewiesen werden.

Nach Kontanis und Reed (2006) können Hemmstoffe auch die Lyse der Zellen während der DNA Isolierung beeinträchtigen, die Nukleinsäuren zerstören oder die Aktivität der Polymerase stören. Um diesem vorzubeugen, ist es sinnvoll, DNA Reinigungskits mit Filter-Säulen einzusetzen oder die DNA-Proben zu verdünnen (Kontanis und Reed, 2006). Deshalb wurde ein kommerzielles DNA Isolierungskit mit Filter-Säulen zur Aufreinigung der DNA und zur Entfernung möglicher Inhibitoren eingesetzt (siehe Kapitel 2.5). Das Verhältnis des Absorbtionsgrades von A<sub>260</sub> zu A<sub>280</sub> bewegte sich dabei zwischen den Werten 1,5 und 2,2 (sofern DNA nachweisbar war). Anhand dieser Werte kann auf eine Reinheit der DNA Proben für den Einsatz in die Real-Time PCR geschlossen werden. Dies zeigen auch die durchgeführten Versuche Erstellung einer Standardkurve die zur und Messung der Reaktionseffizienz. Für B. cereus wurde eine Effizienz von 104 % erreicht (Abbildung 13), für Cronobacter spp. 98,1 % (Abbildung 23) und für S. enterica 83 % (Abbildung 34). Diese errechneten Reaktionseffizienzen zeigen, dass die PCR Reaktion nicht durch Inhibitoren beeinflusst worden ist.

Lebensmittel mit einer niedrigen Wasseraktivität (a<sub>w</sub>-Wert) haben entweder einen natürlichen niedrigen Feuchtegehalt oder wurden durch Trocknung hergestellt. Vegetative Zellen von lebensmittelassoziierten Pathogenen können in Lebensmitteln mit niedrigen a<sub>w</sub>-Werten (< 0,85) verweilen und überleben ebenfalls die Trocknungsprozesse über einen langen Zeitraum hinweg (Beuchat et al., 2013). Das Überleben von *C. sakazakii* in pulverförmiger Säuglingsnahrung erfolgte in dieser Arbeit anhand einer künstlichen Kontamination mit anschließender Trocknung des Pulvers bei 37 °C für 18 Stunden (Kapitel 2.10.2). Der Nachweis erfolgte sowohl kulturell als auch mit der entwickelten TaqMan Real-Time PCR nach einer Anreicherung über Nacht. Nach einer 4-wöchigen Lagerung war der Nachweis von *C. sakazakii* mit einer Anfangskonzentration von 0,01 KbE/g und einem aw-Wert bei ca. 0,22 möglich (Tabelle 78).

B. cereus Sporen sind ebenfalls in der Lage Wärmebehandlungen von Trockenmilchprodukten zu überleben (Vilas-Bôas et al., 2007). Zudem ist es B. cereus möglich an Edelstahl zu binden und so an Geräte oder Tanks verweilen, um dann die späteren hergestellten Produkte zu kontaminieren (Pena et al., 2014). Aus diesem Grund wurde in der Studie von Stoeckel et al. (2013) die Inaktivierung von *B. cereus* Sporen in getrockneter Säuglingsnahrung bei Temperaturen zwischen 90 und 110 °C bestimmt. Nach dieser Untersuchung sollten die Hitzebehandlungen solcher gefährdeten Produkte angepasst werden, um ein sicheres Produkt ohne B. cereus Sporen zu erhalten. Eine Studie von Choi et al. (2013) zeigte ebenfalls eine Methode zur Dekontaminierung von C. sakazakii und S. enterica in pulverförmiger Säuglingsnahrung. Durch die Zugabe von natürlichen Komponenten, wie Caprylsäure, Zitronensäure und Vanillin, entsteht ein antimikrobieller Effekt (Choi et al., 2013). Doch ein Zusatz dieser Stoffe in pulverförmiger Säuglingsnahrung würde zu Problemen führen, da besondere Vorschriften über das Inverkehrbringen und die Zusammensetzung der Nahrung für Säuglinge und Kleinkinder gelten. Solche Lebensmittel dürfen nicht in den Verkehr gebracht werden und würden vom Markt auch nicht angenommen werden.

#### **Schlussfolgerung**

In dieser Arbeit wurden drei spezifische TaqMan Real-Time PCR Verfahren zum Nachweis von B. cereus, Cronobacter spp. und S. enterica aus Milcherzeugnissen entwickelt. Die entwickelten Methoden zeigten dabei vielversprechende Ergebnisse, sie sind genauso sensitiv und spezifisch wie die Referenzmethoden und generieren keine falsch-negativen Ergebnisse aus Lebensmittelmatrizes, wie den Milcherzeugnissen. Für eine Umsetzung der Verfahren in die Praxis sollten keine hohen Kosten für speziell ausgebildetes Personal oder teure Geräte für die Anwendung anfallen. Zudem sollte das Verfahren anwenderfreundlich sein, deshalb wurde in dieser Arbeit ein fertiger Mastermix der Firma BioRad Laboratories GmbH (München) verwendet und nur noch die entsprechenden Konzentrationen an Primer und Sonde zugegeben (siehe Kapitel 2.8.3). Die zugehörigen PCR Protokolle können außerdem an jedem Real-Time PCR Thermocycler angewendet werden.

Diese TaqMan Real-Time PCR Verfahren können somit als schnelle und zuverlässige molekularbiologische Methoden ihre Anwendung für den Nachweis von *B. cereus, Cronobacter* spp. und *S. enterica* aus Trockenmilchprodukten in der Routineanalyse finden.

## 5. Zusammenfassung

Kontaminationen von Lebensmitteln mit Bacillus cereus, Cronobacter spp. und Salmonella enterica sind weltweit für eine große Zahl an Erkrankungen verantwortlich. Daher werden bei Lebensmitteln hohe Ansprüche auf Hygiene und Qualität gelegt. Häufig betroffen sind Milcherzeugnisse, da diese wie z.B. Milch-, Molke- oder Sahnepulver oft als Zutat für andere Lebensmittel verwendet werden. Diese Produkte sollten jedoch generell frei von Krankheitserregern sein, um dadurch die Produktsicherheit erhöhen zu können. Es wird daher eine spezifische, zuverlässige und schnelle Identifizierung der drei pathogenen Mikroorganismen verlangt. In der Regel dauern die bisherigen verwendeten kulturellen Standardverfahren (§ 64 LFGB, ISO/TS 22964) zwischen drei und sechs Tagen. Eine Zeitersparnis zeigen dagegen molekularbiologische Verfahren, wie die Polymerase Kettenreaktion (PCR), besonders die Real-Time PCR liefert einen schnellen und direkten Nachweis der Erreger.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit lag daher in der Entwicklung und Validierung eines molekularbiologischen Verfahrens zum Nachweis von B. cereus, Cronobacter spp. und S. enterica. Eine Diagnose, ob die Lebensmittelprobe den Erreger enthält oder nicht soll innerhalb von 24 Stunden erfolgen. Die Identifizierung der drei Zielorganismen mittels der entwickelten TaqMan Real-Time PCR erfolgte anhand spezifischer genetischer Charakteristika und unter Verwendung einer internen Amplifikationskontrolle, um falsch positive Ergebnisse ausschließen zu können. Für *B. cereus* wurde das *groEL* Gen, das für ein Hitzeschockprotein kodiert ausgewählt. Für den Nachweis von Cronobacter spp. diente das ompA Gen und für S. enterica das invA Gen. Beide Gene sind für die Invasion der beiden Pathogene in die menschlichen Epithelzellen des Gehirns und des Darms verantwortlich. Die Adaption der Verfahren an die Lebensmittelmatrix und eine Optimierung der Anreicherungszeit erfolgte mittels künstlicher Kontamination verschiedener Trockenmilchprodukte. Dabei war es möglich 10<sup>5</sup> KbE/g C. sakazakii und S. Enteritidis Zellen mit einer Anfangskeimzahl von 100 KbE/g in rekonstituierter Säuglingsnahrung nach einer Anreicherungszeit von sechs Stunden nachzuweisen. Zur Simulierung einer natürlichen Kontamination im Labormaßstab wurde pulverförmige Säuglingsnahrung mit *C. sakazakii* Zellen künstlich kontaminiert, getrocknet und für 4 Wochen gelagert.

Mit der entwickelten TaqMan Real-Time PCR war der Nachweis einer Anfangskeimzahl von 0,01 KbE/g trocken gestresster *C. sakazakii* Zellen bei einem a<sub>w</sub>-Wert von 0,22 nach einer Anreicherung über Nacht möglich.

Die entwickelten Real-Time PCR basierenden Verfahren für den Nachweis der drei wichtigen pathogenen Mikroorganismen in Milcherzeugnissen sind schnell, spezifisch und zuverlässig sowie innerhalb von 24 Stunden durchzuführen.

### Summary

The presence of pathogens is a serious problem in the food industry and contaminations of food with Bacillus cereus, Cronobacter spp. and Salmonella enterica are responsible for a large number of diseases worldwide. Milk products like milk, whey or cream powder are widely used in industry as an ingredient in other foods. Therefore it requires a fast and reliable identification of pathogenic microorganisms. The official methods according to § 64 LFGB or ISO/TS 22964 apply a common scheme of pre-enrichment, selective enrichment, detection and confirmation and take between three and six days.

The aim of this work was the development and validation of a real-time PCR based method, which identifies the existence of the three pathogens in dairy products within 24 hours. The identification of B. cereus, Cronobacter spp. and S. enterica with the developed TagMan real-time PCR was performed using specific genetic characteristics and an internal amplification control to eliminate false negative results. For *B. cereus*, the groEL gene, which codes for a heat shock protein, was selected as target. For the detection of Cronobacter spp. the ompA gene and for S. enterica the invA gene was chosen. Both genes are responsible for the invasion of the pathogens in the human epithelial cells. The adaptation of the method to the food matrix and an optimization of the enrichment time were affected by an artificial contamination of various dry dairy products. It was possible to detect 10<sup>5</sup> cfu/g C. sakazakii and S. Enteritidis cells with an initial concentration of 100 cfu/g in reconstituted powdered infant formula after enrichment of six hours. To simulate a natural contamination, powdered infant formula was contaminated with desiccated C. sakazakii cells in various concentrations and analyzed with the developed realtime PCR method. It was possible to detect an inoculum concentration of 0.01 CFU/g dry stressed *C. sakazakii* cells at low a<sub>w</sub> values (0.22).

The new TaqMan real-time PCR is fast, reliable and specific for the clearly detection of the three major pathogenic microorganisms in milk products and was carried out within 24 hours.

## 6. Literaturverzeichnis

Adékambi, T., Drancourt, M., Raoult, D., 2008. The *rpoB* gene as a tool for clinical microbiologists. Trends Microbiol. 17, 37-45.

Agaisse, H., Gominet, M., Okstad, O.A., Kolosto, A.B., Lereclus, D., 1999. PlcR is a pleiotropic regulator of extracellular virulence factor gene expression in *Bacillus thuringiensis.* Mol. Microbiol. 32, 1043-1053.

Agata,N., Mori,M., Ohta, M., Suwan, S., Ohtani, I., Isobe, M., 1994. A novel dodecadepsipeptide, cereulide, isolated from *Bacillus cereus* causes vacuole formation in HEp-2 cells. FEMS Microbiol. Lett. 121, 31-34.

Agata, N., Ohta, M., Mori, M., Isobe, M., 1995. A novel dodecadepsipeptide, cereulide, is an emetic toxin of *Bacillus cereus*. FEMS Microbiol. Lett. 129, 17-20.

Agata, N., Ohta, M., Yokoyama, K., 2002. Production of *Bacillus cereus* emetic toxin (cereulide) in various foods. Int. J. Food Microbiol. 73, 23-27.

**Alaeddini, R..** 2012. Forensic implications of PCR inhibition-A review. Forensic Sci. Int. 6, 297-305.

Almeida, C., Azevedo, N.F., Iversen, C., Fanning, S., Keevil, C.W., Vieira, M.J., 2009. Development and application of a novel peptide nucleic acid probe for the specific detection of *Cronobacter* genomospecies (*Enterobacter sakazakii*) in powdered infant formula. Appl. Environ. Microbiol. 75, 2925-2930.

Andersson, A., Rönner, U., Granum, P.E., 1995. What problems does the food industry have with the spore-forming pathogens *Bacillus cereus* and *Clostridium perfringens*?. Int. J. Food Microbiol. 28, 145-155.

**Anonym**,1970. Verordnung über Milcherzeugnisse (Milcherzeugnisverordnung - MilchErzV). Beuth Verlag.

**Anonym**,1992. Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 LFGB (1992). Untersuchung von Lebensmitteln. Bestimmung von präsumtiver *Bacillus cereus* in Milch und Milchprodukten. L 01.00.53.

**Anonym,** 2002. FDA/CFSAN: Isolation and Enumeration of *Enterobacter sakazakii* from Dehydrated Powdered Infant Formula. July 2002; revised August 2002. http://www.fda.gov/food/foodscienceresearch/laboratorymethods/ucm114665.htm

**Anonym,** 2004. ISO 7932: 2004 Microbiology of food and animal feeding stuffs --Horizontal method for the enumeration of presumptive Bacillus cereus -- Colonycount technique at 30 degrees C. International Organization for Standardization (ISO)

**Anonym,** 2005. Verordnung (EG) Nr. 2073/2005 Der Kommission vom 15. November über mikrobiologische Kriterien für Lebensmittel. *Amtsblatt der Europäischen Union* 

**Anonym,** 2006a. ISO/TS 22964 | IDF/RM 210:2006 "Milk and milk products - Detection of *Enterobacter sakazakii*"

**Anonym**, 2006b. Bio-Rad laboratories ©, Inc. All rights reserved. Real-time PCR applications guide.

**Anonym,** 2008. Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 LFGB (2008). Untersuchung von Lebensmitteln. Horizontales Verfahren zum Nachweis von *Salmonella* spp. in Lebensmitteln. L 00.00 20.

**Anonym,** 2011. Veröffentlichte mikrobiologische Richt- und Warnwerte zur Beurteilung von Lebensmitteln (Stand November 2011) der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie (DGHM), www.dghm.org.

Anonym, 2012a. Epidemiologisches Bulletin 17, 29. April 2013, Datenstand 1. März 2013.

**Anonym,** 2012b. U.S. Food and Drug Administration (FDA). Bacteriological Analytical Manual, Chapter 29, *Cronobacter*. http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm289378.htm

Ash, C., Farrow, J.A.E., Dorsch, M., Stackebrandt, E., Collins, M.D., 1991. Comparative analysis of *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, and related species on the basis of reverse transcriptase sequencing of 16s rRNA. Int. J. Syst. Bacteriol. 41, 343-346.

**Barron J.C., Forsythe, S.J.,** 2007. Dry stress and survival time of *Enterobacter sakazakii* and other *Enterobacteriaceae* in dehydrated powdered infant formula. J. Food Prot. 70, 2111-2117.

**Bartoszewicz, M., Hansen, B.M., Swiecicka, I.,** 2008. The members of the *Bacillus cereus* group are commonly present contaminants of fresh and heat-treated milk. Food Microbiol. 25, 588-596.

**Bartoszewicz, M., Bideshi, D.K., Kraszewska, A., Modzelewska, E., Swiecicka, I.,** 2009. Natural isolates of *Bacillus thuringiensis* display genetic and psychotropic properties characteristics of *Bacillus weihenstephanensis*. J. Appl. Microbiol. 106, 1967-1975.

Baumgartner, A., Grand, M., Liniger, M., Iversen, C., 2009. Detection and frequency of *Cronobacter* spp. (*Enterobacter* sakazakii) in different categories of ready-to-eat foods other than infant formula. Int. J. Food Microbiol. 136, 189-192.

Becker, H., Schaller, G., von Wiese, W., Terplan, G., 1994. *Bacillus cereus* in infant foods and dried milk products. Int. J. Food Microbiol. 23, 1-15.

Beecher, D.J., Schoeni, J.L., Lee Wong, A.C., 1995. Enterotoxic activity of Hemolysin BL from *Bacillus cereus*. Infect. Immun. 63, No. 11, 4423-4428.

Bennett, S.D., Walsh, K.A., Gould, L.H., 2013. Foodborne disease outbreaks caused by *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens*, and *Staphylococcus aureus*— United States, 1998–2008. Clin. Infect. Dis. 57, 425 433.

Beuchat, L.R., Kim, H., Gurtler, J.B., Lin, L., Ryu, J., Richards, G.M., 2009. *Cronobacter sakazakii* in foods and factors affecting its survival, growth, and inactivation. Int. J. Food Microbiol. 136, 204-213.

Beuchat, L.R., Komitopoulou, E., Beckers, H., Betts, R.P., Bourdichon, F., Fanning, S., Joosten H.M., Ter Kuile, B.H., 2013. Low-water activity foods: increased concern as vehicles of foodborne pathogens. J. Food Prot. 76, 150-172.

Bej, A.K., Mahbubani, M.H., Boyce, M.J., Atlas, R.M., 1994. Detection of *Salmonella* spp. in oysters by PCR. Appl. Environ. Microbiol. 60, 368-373.

Bowen, A.B. and Braden, C.R., 2006. Invasive *Enterobacter sakazakii* disease in infants. Emerg. Infect. Dis. 12, 1185-1189.

**Boyer, M., Combrisson, J.,** 2013. Analytical opportunities of quantitative polymerase chain reaction in dairy microbiology. Int. Dairy J. 30, 45-52.

**Brady, C., Cleenwerck, I., Venter, S., Coutinho, T., De Vos, P.,** 2013. Taxonomic evaluation of the genus *Enterobacter* based on multilocus sequence analysis (MLSA): Proposal to reclassify *E. nimipressuralis* and *E. amnigenus* into *Lelliottia* gen. nov. as *Lelliottia nimipressuralis* comb. nov. and *Lelliottia amnigena* comb. nov., respectively, *E. gergoviae* and *E. pyrinus* into *Pluralibacter* gen. nov. as *Pluralibacter* 

gergoviae comb. nov. and Pluralibacter pyrinus comb. nov., respectively, E. cowanii, E. radicincitans, E. oryzae and E. arachidis into Kosakonia gen. nov. as Kosakonia cowanii comb. nov., Kosakonia radicincitans comb. nov., Kosakonia oryzae comb. nov. and Kosakonia arachidis comb. nov., respectively, and E. turicensis, E. helveticus and E. pulveris into Cronobacter as Cronobacter zurichensis nom. nov., Cronobacter helveticus comb. nov. and Cronobacter pulveris comb. nov., respectively, and emended description of the genera Enterobacter and Cronobacter. Syst. Appl. Microbiol. 36, 309-319.

Breeuwer, P., Lardeau, A., Peterz, M., Joosten, H.M., 2003. Desiccation and heat tolerance of *Enterobacter sakazakii.* J. Appl. Microbiol. 95, 967-973.

**Buchanan, R.L., Oni, R.,** 2012. Use of microbiological indicators for assessing hygiene controls for the manufacture of powdered infant formula. J. Food. Prot. 75, 989-997.

Cahill, S.M., Wachsmuth, I.K., de Lourdes Costarrica, M., Embarek, P.K.B., 2007. Powdered infant formula as a source of *Salmonella* infection in infants. Food Safety 46, 268-273.

Cai, X., Yu, H., Ruan, Z., Yang, L., Bai, J., Qiu, D., Jian, Z., Xiao, Y., Yang, J., Le, T.H., Zhu, X., 2013. Rapid detection and simultaneous genotyping of *Cronobacter* spp. (formerly *Enterobacter sakazakii*) in powdered infant formula using real-time PCR and high resolution melting (HRM) analysis. PLos One 8, e67082.

Callegan, M.C., Jett, B.D., Hancook, L.E., Gilmore, M.S., 1999. Role of hemolysin BL in the pathogenesis of extraintestinal *Bacillus cereus* infection assessed in an endophthalmitis model. Infect. Immun. 67, No. 7, 3357 3366.

**Chang, Y.H., Shangkuan, Y.H., Lin, H.C., Liu, H.W.,** 2003. PCR assay of the *groEL* gene for detection and differentiation of *Bacillus cereus* group cells. Appl. Environ. Microbiol. 69, No. 8, 4502-4510.

Chap, J., Jackson, P., Siqueira, R., Gaspar, N., Quintas, C., Park, J., Osaili, T., Shaker, R., Jaradat, Z., Hartantyo, S.H.P., Abdullah Sani, N., Estuningsih, S., Forsythe, S.J., 2009. International survey of *Cronobacter sakazakii* and other *Cronobacter* spp. in follow up formulas and infant foods. Int. J. Food Microbiol. 136, 185-188.

**Chen, Y., Song, K.Y., Brown, E.W., Lampel, K.A.,** 2010. Development of an improved protocol for the isolation and detection of *Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter*) from powdered infant formula. J. Food Prot. 73, 1016-1022.

Cheng, C., Lin, W., Van, K.T., Phan, L., Tran, N.N., Farmer, D., 2008. Rapid detection of *Salmonella* in foods using real-time PCR. J. Food Prot. 71, 2436-2441.

**Chenu, J.W., Cox, J.M.,** 2009. *Cronobacter* (*"Enterobacter sakazakii*"): current status and future prospects. Lett. Appl. Microbiol. 49, 153-159.

Choi, M.J., Kim, S.A., Lee, N.Y., Rhee, M.S., 2013. New decontamination method based on caprylic acid in combination with citric acid or vanillin for elimination *Cronobacter sakazakii* and *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium in reconstituted infant formula. Int. J. Food Microbiol. 166, 499-507.

Chon, J.W., Song, K.Y., Kim, S.Y., Hyeon, J.Y., Seo, K.H., 2012. Isolation and characterization of *Cronobacter* from desiccated foods in Korea. J. Food Sci. 77, No. 7.

Clavel, T., Carlin, F., Lairon, D., Nguyen-The, C., Schmitt, P., 2004. Survival of *Bacillus cereus* spores and vegetative cells in acid media simulating human stomach. J. Appl. Microbiol. 97, 214-219.

**Collazo, C. M., Galán, J. E.,** 1997. The invasion-associated type-III protein secretion system in *Salmonella* – a review. Gene 192, 51-59.

**Cooper, R.M., McKillip, J.L.,** 2006. Enterotoxigenic *Bacillus* spp. DNA fingerprint revealed in naturally contaminated nonfat dry milk powder using rep-PCR. J. Basic Microbiol. 46, 358-364.

**Craven, H.M., McAuley, C.M., Duffy, L.L., Fegan, N.**, 2010. Distribution, prevalence and persistence of *Cronobacter (Enterobacter sakazakii)* in the non processing and processing environments of five milk powder factories. J. Appl. Microbiol. 109, 1044-1052.

Daffonchio, D., Raddadi, N., Merabishvili, M., Cherif, A., Carmagnola, L., Brusetti, L., Rizzi, A., Chanishvili, N., Visca, P., Sharp, R., Borin, S., 2006. Strategy for identification of *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* strains closely related to *Bacillus anthracis*. Appl. Environ. Microbiol. 72, No. 2, 1295-1301.

Daum, L.T., Barnes, W.J., McAvin, J.C., Neidert, M.S., Cooper, L.A., Huff, W.B., Gaul, L., Riggins, W.S., Morris, S., Salmen, A., Lohman, K.L., 2002. Real-time PCR detection of *Salmonella* in suspect foods from a gastroenteritis outbreak in Kerr County, Texas. J. Clin. Microbiol. 40, 3050-3052.

Day, J. B., Lee, C. A., 2003. Secretion of the *orgC* gene product by *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium. Infec. Immun. 71, 6680-6685.

**Day, J. B., Basavanna, U., Sharma, S. K.,** 2009. Development of a cell culture method to isolate and enrich *Salmonella enterica* serotype Enteritidis from shell eggs for subsequent detection by real-time pcr. Appl. Environ. Microbiol. 75, 5321-5327.

Delibato, E., Anniballi, F., Vallebona, P.S., Palleschi, G., Volpe, G., Losio, M.N., De Medici, D., 2013. Validation of a 1-day analytical diagnostic real-time PCR for the detection of *Salmonella* in different food meat categories. Food Anal. Methdos 6, 996-1003.

**De Medici, D., Croci, L., Delibato, E., Di Pasquale, S., Filetici, E., Toti, L.,** 2003. Evaluation of DNA extraction methods for use in combination with SYBR Green I real-time PCR to detect *Salmonella enterica* serotype Enteritidis in poultry. Appl. Environ. Microbiol. 69, 3456-3461.

**Dommel, M.K., Frenzel, E., Strasser, B., Blöchinger, C., Scherer, S., Ehling-Schulz, M.,** 2010. Identification of the main promoter directing cereulide biosynthesis in emetic *Bacillus cereus* and its application for real-time monitoring of *ces* gene expression in foods. Appl. Environ. Microbiol. 76, 1232-1240.

**Dong, X., Wu, Q., Wu, K., Zhang, J.**, 2013. Real-time PCR targeting *ompA* gene for detection of *Cronobacter* spp. in powdered infant formula. Food Sci. Biotechnol. 22, 309-313.

**Doyle, M.E., Mazzotta, A.S.,** 2000. Review of studies on the thermal resistance of Salmonellae. J. Food Prot. 63, 779-795.

**Drobniewski, F.A.,** 1993. *Bacillus cereus* and related species. Clin. Microbiol. Reviews 6, 324-338.

Dzieciol, M., Fricker, M., Wagner, M., Hein, I., Ehling-Schulz, M., 2013. A novel diagnostic real-time PCR assay for quantification and differentiation of emetic and non-emetic *Bacillus cereus*. Food Control 32, 176-185.

Edelson-Mammel, S.G., Buchanan, R.L., 2004. Thermal inactivation of *Enterobacter sakazakii* in rehydrated infant formula. J. Food Prot. 67, 60-63.

Edelson-Mammel, S.G., Porteous, M.K., Buchanan, R.L., 2005. Survival of *Enterobacter sakazakii* in a dehydrated powdered infant formula. J. Food Prot. 68, 1900-1902.

Edwards, R. A., Schifferli, D. M., Maloy, S. R., 2000. A role of *Salmonella* fimbriae in intraperitoneal infections. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A, 97, 1258-1262.

**EFSA, European Food Safety Authority,** 2012. The community summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in the European Union in 2010.

Ehling-Schulz, M., Fricker, M., Scherer, S., 2004. *Bacillus cereus*, the causative agent of an emetic type of food-borne illness. Mol. Nutr. Food Res. 48, 479-487.

**Ehling-Schulz, M., Messelhäusser, U.,** 2013. *Bacillus* "next generation" diagnostics: moving from detection toward subtyping and risk-related strain profiling. Front. Microbiol. 4, 1-8.

Ehrmann, M.A., Müller, M.R.A., Vogel, R.F., 2003. Molecular analysis of sourdough reveals *Lactobacillus mindensis* sp. nov.. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 53, 7-13.

Fagerlund, A., Ween, O., Lund, T., Hardy, S.P., Granum, P.E., 2004. Genetic and functional analysis of the cytK family of genes in *Bacillus cereus*. Microbiol., 150, 2689-2697.

**Fagerlund, A., Lindbäck, T., Storset, A.K., Granum, P.E., Hardy, S.P.,** 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. Microbiol. 154, 693-704.

**FAO und WHO**, 2004. *Enterobacter sakazakii* and other microorganism in powdered infant formula: Meeting report: 2004.

Farmer, J.J., Asbury, M.A., Hickman, F.W., Brenner, D.J., 1980. Enterobacter sakazakii – a new species of Enterobacteriaceae isolated from clinical specimens. Int. J. Syst. Bacteriol. 30, 569-584.

Fernández-No, I.C., Guarddon, M., Böhme, K., Cepeda, A., Calo-Mata, P., Barros-Velázquez, J., 2011. Detection and quantification of spoilage and pathogenic *Bacillus cereus, Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis* by real-time PCR. Food Microbiol. 28, 605-610.

**Fricker, M., Messelhäußer, U., Busch, U., Scherer, S., Ehling-Schulz, M.,** 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.

Fricker, M., Reissbrodt, R., Ehling-Schulz, M., 2008. Evaluation of standard and new chromogenic selective plating media for isolation and identification of *Bacillus cereus*. Int. J. Food Microbiol. 121, 27-34.

**Friedemann, M.,** 2008. Gesundheitliches Gefährdungspotential von *Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter* spp. nov.) in Säuglingsnahrung. Bundesgesundheitsblatt-Gesundheitsforschung-Gesundheitsschutz 51, 664-674.

**Friedemann, M.,** 2009. Epidemiology of invasive neonatal *Cronobacter* (*Enterobacter sakazakii*) infections. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 28, 1297-1304.

Galán, J. E., Curtiss, R., III., 1989. Cloning and molecular characterization of genes whose products allow *Salmonella* Typhimurium to penetrate tissue culture cells. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 86, 6383-6387.

**Galán, J. E., Curtiss, R., III.,** 1991. Distribution of the *invA*, *-B*, *-C*, and *-D* Genes of *Salmonella typhimurium* among other *Salmonella* serovars: *invA* mutants of *Salmonella typhi* are deficient for entry into mammalian cells. Infect. Immun. 59, 2901-2908.

**Galán, J.E., Ginocchio, C., Costeas, P.** 1992. Molecular and functional characterization of the *Salmonella* invasion gene *invA*: homology of InvA to members of a new protein family. J. Bacteriol. 174, 4338-4349.

Garrity, G. M., Brenner, D. J., Krieg, N. R., Staley, J. T., 2005. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Springer. Second edition, volume 2.

**Gicová, A., Oriesková, M., Oslanecová, L., Drahovská, H., Kaclíková, E.,** 2013. Identification and characterization of *Cronobacter* strains isolated from powdered infant foods. Lett. Appl. Microbiol. 1447.

**Gorski, L., Liang, A. S.,** 2010. Effect of enrichment medium on real-time detection of *Salmonella enterica* from lettuce and tomato enrichment cultures. J. Food Prot. 73, 1047-1056.

**Gracias, K.S., McKillip, J.L.,** 2011. Triplex PCR-based detection of enterotoxigenic *Bacillus cereus* ATCC 14579 in nonfat dry milk. J. Basic Microbiol. 51, 147-152.

**Granum, P.E., Lund, T.,** 1997. *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins. FEMS Microbiol. Lett. 157, 223-228.

Guibourdenche, M., Roggentin, P., Mikoleit, M., Fields, P. I., Bockemühl, J., Grimont, P. A. D., Weill, F. X. (2010). Supplement 2003-2007 (No. 47) to the white-kauffmann-le minor scheme. Res. Microbiol. 161, 26-29.

Guinebretière. M.H., Auger, S., Galleron, N., Contzen, M., De Sarrau, B., De Buyser, M.L., Lamberet, G., Fagerlund, A., Granum, P.E., Lereclus, D., De Vos, P., Nguyen-The, C., Sorokin, A., 2013. *Bacillus cytotoxicus* sp. nov. is a novel thermotolerant species of the *Bacillus cereus* Group occasionally associated with food poisoning. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 63, 31-40.

**Gurtler, J.B, Beuchat, L.R.,** 2007. Inhibition of growth of *Enterobacter sakazakii* in reconstituted infant formula by the lactoperoxidase system. J. Food Prot. 70, 2104-2110.
**Hall, T.A.,** 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucleic Acids Symposium 41, 95-98.

Harper, N.M., Getty, K.J.K., Schmidt, K.A., Nutsch, A.L., Linton, R.H., 2011. Comparing the mannitol-egg yolk-Polymyxin agar plating method with the three-tube most-probable-number method for enumeration of Bacillus cereus spores in raw and high temperature, short-time pasteurized milk. J. Food Prot. 74, 461-464.

Healy, B., Cooney, S., O'Brien, S., Iversen, C., Whyte, P., Nally, J., Callanan, J.J., Fanning, S., 2010. *Cronobacter (Enterobacter sakazakii)*: an opportunistic foodborne pathogen. Foodborne Pathog. Dis.7, 339-350.

**Heller, K.J.,** 2006. Mikrobiologie der Dauermilcherzeugnisse. In: Weber, H. (Hrsg.), Mikrobiologie der Lebensmittel - Milch und Milchprodukte, 2. Auflage, S. 419-442 Behr's Verlag, Hamburg.

Holzapfel, B. und Wickert, L., 2007. Die quantitative Real-Time-PCR (qRT-PCR). Biol. Unserer Zeit 37.

Hoorfar, J., Ahrens, P., Radström, P., 2000. Automated 5' nuclease PCR assay for identification of *Salmonella enterica*. J. Clin. Microbiol. 38, 3429-3435.

Hoorfar, J., Malorny, B., Abdulmawjood, A., Cook, N., Wagner, M., Fach, P., 2004. Practical considerations in design of internal amplification controls for diagnostic PCR assays. J. Clin. Microbiol. 42, 1863-1868.

Hoque, A., Ahmed, T., Shahidullah, M., Hossain, A., Mannan, A., Noor, K., Nahar, K., Ilias, M., Ahmed, D., 2010. Isolation and molecular identification of *Cronobacter* spp. from powdered infant formula (PIF) in Bangladesh. Int. J. Food Microbiol. 142, 375-378.

**Hyeon, J.Y., Park, C., Choi, I.S., Holt, P.S., Seo, K.H.,** 2010. Development of multiplex real-time PCR with internal amplification control for simultaneous detection of *Salmonella* and *Cronobacter* in powdered infant formula. Int. J. Food Microbiol. 144, 177-181.

**Iversen, C., Forsythe, S.J.,** 2003. Risk profile of *Enterobacter sakazakii*, an emergent pathogen associated with infant milk formula. Trends Food Sci. Technol. 14, 443-454.

**Iversen, C., Forsythe, S.J.,** 2004. Isolation of *Enterobacter sakazakii* and other *Enterobacteriaceae* from powdered infant formula milk and related products. Food Microbiol. 21, 771-777.

**Iversen, C., Forsythe, S.J.,** 2007. Comparison of media for the isolation of Enterobacter sakazakii. Appl. Environ. Microbiol. 73, NO. 1. 48-52.

**Iversen, C., Lane, M., Forsythe, S.J.,** 2004. The growth profile, thermotolerance and biofilm formation of *Enterobacter sakazakii* grown in infant formula milk. Lett. Appl. Microbiol. 38, 378-382.

**Iversen, C., Waddington, M., Farmer III, J.J., Forsythe, S.J.,** 2006. The biochemical differentiation of *Enterobacter sakazakii* genotypes. BMC Microbiol. 6, 94.

Iversen, C., Lehner, A., Mullane, N., Bidlas, E., Cleenwerck, I., Marugg, J., Fanning, S., Stephan, R., Joosten, H., 2007a. The taxonomy of *Enterobacter sakazakii*: proposal of a new genus *Cronobacter* gen. nov. and descriptions of *Cronobacter sakazakii* comb. nov. *Cronobacter sakazakii* subsp. *sakazakii*, comb. nov., *Cronobacter sakazakii* subsp. *malonaticus* subsp. nov., *Cronobacter turicensis* sp. nov., *Cronobacter muytjensii* sp. nov., *Cronobacter dublinensis* sp. nov. and *Cronobacter* genomospecies I. BMC Evol. Biol. 7, 64. Iversen, C., Lehner, A., Mullane, N., Marugg, J., Fanning, S., Stephan, R., Joosten, H., 2007b. Identification of "*Cronobacter*" spp. (*Enterobacter sakazakii*). J. Clin. Microbiol. 45, 3814-3816.

Iversen, C., Druggan, P., Schumacher, S., Lehner, A., Feer, C., Gschwend, K., Joosten, H., Stephan, R., 2008a. Development of a novel screening method for the isolation of "*Cronobacter*" spp. (*Enterobacter sakazakii*). Appl. Environ. Microbiol. 74, 2550-2553.

Iversen, C., Mullane, N., McCardell, B., Tall, B. D., Lehner, A., Fanning, S., Stephan R., Joosten, H., 2008b. Cronobacter gen. nov., a new genus to accommodate the biogroups of *Enterobacter sakazakii*, and proposal of a new genus *Cronobacter* gen. nov. and descriptions of *Cronobacter sakazakii* comb. nov., *Cronobacter sakazakii* subsp. sakazakii, comb. nov., *Cronobacter sakazakii* subsp. *malonaticus* subsp. nov., *Cronobacter turicensis* sp. nov., *Cronobacter muytjensii* sp. nov., *Cronobacter dublinensis* sp. nov. and *Cronobacter* genomospecies and of three subspecies, *Cronobacter dublinensis* subsp. nov. and *Cronobacter dublinensis* subsp. *lactaridi* subsp. nov.. Int. J. Sys. Evol. Microbiol. 58, 1442-1447.

Jacobs, C., Braun, P., Hammer, P., 2011. Reservoir and routes of transmission of *Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter* spp.) in a milk powder-producing plant. J. Dairy Sci. 94, 3801-3810.

Jaradat, Z.W., Ababneh, Q.O., Saadoun, I.M., Samara, N.A., Rashdan, A.M., 2009. Isolation of *Cronobacter* spp. (formerly *Enterobacter sakazakii*) from infant food, herbs and environmental samples and the subsequent identification and confirmation of the isolates using biochemical, chromogenic assays, PCR and 16S rRNA sequencing. BMC Microbiol. 9, 225-236.

**Jasson, V., Baert, L., Uyttendaele, M.,** 2011. Detection of low numbers of healthy and sub-lethally injured *Salmonella enterica* in chocolate. Int. J. Food Microbiol. 145, 488-491.

Joosten, H., Marugg, J., Stephan, R., Klijn, A., Jackson, T., Iversen, C., 2008. A rapid and reliable alternative to ISO 21528-1:2004 for detection of *Enterobacteriaceae*. Int. J. Food Microbiol. 125, 344-346.

**Joseph, S., Forsythe, S.J.,** 2011. Predominance of *Cronobacter sakazakii* sequence type 4 in neonatal infections. Emerg. Infect. Dis. 17, 1713-1715.

**Joseph, S., Forsythe, S.J.,** 2012. Insights into the emergent bacterial pathogen *Cronobacter* spp., generated by multilocus sequence typing and analysis. Front. Microbiol. 3, 397.

Jiménez, G., Urdiain, M., Cifuentes, A., López-López, A., Blanch, A.R., Tamames, J., Kämpfer, P., Kolstø, A.B., Ramón, D., Martínez, J.F., Codoner, F.M, Rosselló-Móra, R., 2013. Description of *Bacillus toyonensis* sp. nov., a novel species of the *Bacillus cereus* group, and pairwise genome comparisons of the species of the group by means of ANI calculations. Sys. Appl. Microbiol. 36, 383-391.

Kaclíková, E., Turcovský, I., 2011. A method for the detection of *Cronobacter* strains in powdered milk-based foods using enrichment and real-time PCR. J. Food Nutr. Res. 50, 118-124.

Kandhai, M.C., Heuvelink, A.E., Reij, M.W., Beumer, R.R., Dijk, R., van Tilburg, J.J.H.C., van Schothorst, M., Gorris, L.G.M., 2010. A study into the occurrence of *Cronobacter* spp. in the Netherlands between 2001 and 2005. Food Control 21, 1127-1136.

Kang, E.S., Yong, S.N., Kwang, W.H., 2007. Rapid detection of *Enterobacter* sakazakii using TaqMan real-time PCR assay. J. Microbiol. Biotechnol. 17, 516-519.

**Kessler, H.G. (Hrsg.),** 1996. Trocknen - Instantisieren. Lebensmittel- und Bioverfahrenstechnik - Molkereitechnologie, S. 265-302, Verlag A. Kessler, München.

**Kielwein, G. (Hrsg.),** 1994. Beeinflussung von Milch und Erzeugnissen aus Milch durch Mikroben. Leitfaden der Milchkunde und Milchhygiene, 3. Auflage, S. 72-96, Blackwell Wissenschafts-Verlag, Berlin.

Kim, K., Kim, K.P., Choi, J., Lim, J.A., Lee, J., Hwang, 662 S., Ryu, S., 2010. Outer membrane proteins A (OmpA) and X (OmpX) are essential for basolateral invasion of *Cronobacter sakazakii*. Appl. Environ. Microbiol. 76, 5188-5198.

**Kim, S.A., Rhee, M.S.,** 2011. A new cost-effective, selective and differential medium for the isolation of *Cronobacter* spp.. J. Microbiol. Methods 85, 149-154.

Kontanis, E.J., Reed, F.A., 2006. Evaluation of real-time PCR amplification efficiencies to detect PCR inhibitors. J. Forensic Sci. 51, 795-804.

Kotiranta, A., Lounatmaa, K., Haapasalo, M., 2000. Epidemiology and pathogenesis of *Bacillus cereus* infections. Microbes Infect. 2, 189-198.

Krascsenicsová, K., Piknová, L., Kaclíková, E., Kuchta, T., 2008. Detection of *Salmonella enterica* in food using two-step enrichment and real-time polymerase chain reaction. Lett. Appl. Microbiol. 46, 483-487.

Lechner, S., Mayr R., Francis, K.P., Prüß, B M., Kaplan, T., Wießner-Gunkel, E., Stewart, G.S.A.B., Scherer, S., 1998. *Bacillus weihenstephanensis* sp. nov. is a new psychrotolerant species of the *Bacillus cereus* group. Int. J. Sys. Bacteriol. 48, 1373-1382.

Lehner, A., Stephan, R., 2004. Microbiological, epidemiological, and food safety aspects of *Enterobacter sakazakii*. J. Food Prot. 67, 2850-2857.

Lehner, A., Tasara, T., Stephan, R., 2004. 16S rRNA gene based analysis of Enterobacter sakazakii strains from different sources and development of a PCR assay for identification. BMC Microbiol. 4, 43.

Lehner, A., Riedel, K., Eberl, L., Breeuwer, P., Diep, B., Stephan, R., 2005. Biofilm formation, extracellular polysaccharide production, and cell-to cell signaling in various Enterobacter sakazakii strains: aspects promoting environmental persistence. J. Food Microbiol. 68, 2287-2294.

Lehner, A., Nitzsche, S., Breeuwer, P., Diep, B., Thelen, K., Stephan, R., 2006. Comparison of two chromogenic media and evaluation of two molecular based identification systems for *Enterobacter sakazakii* detection. BMC Microbiol. 6, 15.

Lereclus, D., Agaisse, H., Gominet, M., Salamitou, S., Sanchis, V., 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.

Leuschner, R.G.K., Bew, J., Boughtflower, M.P, 2004. A collaborative study to evaluate qualitatively powdered baby food validation samples artificially contaminated with *Salmonella anatum*. International J. Food Microbiol. 97, 43-51.

Li, Y., Cao, L., Zhao, J., Cheng, Q., Lu, F., Bie, X., Lu, Z., 2012. Use of *rpoB* gene sequence analysis for phylogenetic identification of *Cronobacter* species. J. Microbiol. Methods 88, 316-318.

**Li, B., Chen, J.Q.,** 2013. Development of a sensitive and specific qPCR assay in conjunction with propidium monoazide for enhanced detection of live *Salmonella* spp. in food. BMC Microbiol. 13, 273.

Liu, Y., Cai, X., Zhang, X., Gao, Q., Yang, X., Zheng, Z., Luo, M., Huang, X., 2006a. Real time PCR using TaqMan and SYBR Green for detection of *Enterobacter sakazakii* in infant formula. J. Microbiol. Methods 65, 21-31.

Liu, Y., Gao, Q., Zhang, X., Hou, Y., Yang, J., Huang, X., 2006b. PCR and oligonucleotide array for detection of *Enterobacter sakazakii* in infant formula. Mol. Cell. Probes 20, 11-17.

Luna, V., King, D.S., Gulledge, J., Cannons, A.C., Amuso, P.T., Cattani, J., 2007. Susceptibility of *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus mycoides*, *Bacillus pseudomycoides* and *Bacillus thuringiensis* to 24 antimicrobials using Sensititrew automated microbroth dilution and Etestw agar gradient diffusion methods. J. Antimicrob. Chemother. 60, 555-567.

Lund, T., De Buyser, M.L., Granum, P.E., 2000. A new cytotoxin from *Bacillus cereus* that may cause necrotic enteritis. Mol. Microbiol. 38, 254-261.

Malorny, B., Hoorfar, J., Bunge, C., Helmuth, R., 2003. Multicenter validation of the analytical accuracy of *Salmonella* PCR: towards an international standard. Appl. Environ. Microbiol. 69, 290-296.

Malorny, B., Paccassoni, E., Fach, P., Bunge, C., Martin, A., Helmuth, R., 2004. Diagnostic real-time pcr for detection of *Salmonella* in food. Appl. Environ. Microbiol. 70, 7046-7052.

Malorny, B., Wagner, M., 2005. Detection of *Enterobacter sakazakii* strains by real time PCR. J. Food Prot. 68, 1623-1627.

Malorny, B., Anderson, A., Huber, I., 2007. *Salmonella* real-time PCR-Nachweis. Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit 2, 149-156.

Mann, E., Hein, I., Mester, P., Stessl, B., Rossmanith, P., Wagner, M., Dzieciol, M., 2013. A robust and poisson validated quantitative 5<sup>c</sup> nuclease TaqMan® real-time PCR assay targeting *fimA* for the rapid detection of *Salmonella* spp. in food. Food Anal. Methods 6, 991-995.

Margot, H., Stephan, R., O'Mahony, E., Iversen, C., 2013. Comparison of rapid cultural methods for the detection of *Salmonella* species. Int. J. Food Microbiol. 163, 47-50.

Martínez-Blanch, J.F., Sánchez, G., Garay, E., Aznar, R., 2009. Development of a real-time PCR assay for detection and quantification of enterotoxigenic members of *Bacillus cereus* group in food samples. Int. J. Food Microbiol. 135, 15-21.

Martínez-Blanch, J.F., Sánchez, G., Garay, E., Aznar, R., 2011. Detection and quantification of viable *Bacillus cereus* in food by RT-qPCR. Eur. Food Res. Technol. 232, 951-955.

Masood, N., Moore, K., Farbos, A., Hariri, S., Paszkiewicz, K., Dickins, B., McNally, A., Forsythe, S., 2013. Draft genome sequences of three newly identified species in the genus *Cronobacter*, *C. helveticus* LMG23732<sup>T</sup>, *C. pulveris* LMG24059, and *C. zurichensis* LMG23730<sup>T</sup>. Genome Announc. 1.

Mattick, K.L., Jorgensen, F., Legan, J.D., Cole, M.B., Porter, J., Lappin-Scott, H.M., Humphrey, T.J., 2000. Survival and filamentation of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis PT4 and *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT104 at low water activity. Appl. Environ. Microbiol. 66, 1274-1279.

McCabe, E.M, Burgess, C.M., O'Regan, E., McGuinness, S., Barry, T., Fanning, S., Duffy, D., 2011. Development and evaluation of DNA and RNA real-time assays for food analysis using the *hilA* gene of *Salmonella enterica* subspecies *enterica*. Food Microbiol. 28, 447-456.

**McKillip**, **J.L.**, 2000. Prevalence and expression of enterotoxins in *Bacillus cereus* and other *Bacillus* spp., a literature review. Antonie van Leeuwenhoek 77, 393-399.

Membré, J., Leporq, B., Vialette, M., Mettler, E., Perrier, L., Thuault, D., Zwietering, M., 2005. Temperature effect on bacterial growth rate: quantitative microbiology approach including cardinal values and variability estimates to perform growth simulations on/in food. Int. J. Food Microbiol. 100, 179-186.

Miled, R.B., Neves, S., Baudouin, N., Lombard, B., Depperrois, V., Colin P., Besse, N.G., 2010. Impact of pooling powdered infant formula samples on bacterial evolution and *Cronobacter* detection. Int. J. Food Microbiol. 138, 250-259.

**Minami, J., Soejima, T., Yaeshima, T., Iwatsuki K.,** 2012. Direct real-time PCR with ethidium monoazide: a method for the rapid detection of viable *Cronobacter sakazakii* in powdered infant formula. J. Food Prot. 75, 1572-1579.

Mollet, C., Drancourt, M., Raoult, D., 1997. *rpoB* sequence analysis as a novel basis for bacterial identification. Mol. Microbiol. 26, 1005-1011.

**Mullane, N.R., Whyte, P., Wall, P.G., Qinn, T., Fanning, S.,** 2007. Application of pulsed-field gel electrophoresis to characterize and trace the prevalence of *Enterobacter sakazakii* in an infant formula processing facility. Int. J. Food Microbiol. 116, 73-81.

Mullane, N.R., Healy, B., Meade, J., Whyte, P., Wall, P.G. Fanning, S., 2008. Dissemination of *Cronobacter* spp. (*Enterobacter sakazakii*) in a powdered milk protein manufacturing facility. Appl. Environ. Microbiol.74, 5913-5917.

Muytjens, H.L., Van der Ros-Van de Repe, I.J., Van Druten, H.A.M., 1984. Enzymatic profiles of *Enterobacter sakazakii* and related species with special reference to the  $\alpha$ -glucosidase reaction and reproducibility of the test system. J. Clin. Microbiol. 20, 684-686. **Muytjens, H.L., Roelofs-Willemse, H., Jaspar, G.H.J.,** 1988. Quality of powdered substitutes for breast milk with regard to members of the family *Enterobacteriaceae*. J. Clin. Microbiol. 26, 743-746.

Nair, M.K.M., Venkitanarayanan, K.S., 2006. Cloning and sequencing of the *ompA* gene of *Enterobacter sakazakii* and development of an *ompA*-targeted PCR for rapid detection of *Enterobacter sakazakii* in infant formula. Appl. Environ. Microbiol. 72, 2539-2546.

Nair, M.K.M., Venkitanarayanan, K.S., 2007. Role of bacterial OmpA and host cytoskeleton in the invasion of human intestinal epithelial cells by *Enterobacter sakazakii*. Pediatr. Res.62, No. 6.

Nakamura, L.K., 1998. *Bacillus pseudomycoides* sp. nov.. Int. J. Sys. Bacteriol. 48, 1031-1035.

Nam, H.M., Srinivasan, V., Gillespie, B.E., Murinda, S.E., Oliver, S.P., 2005. Application of SYBR green real-time PCR assay for specific detection of *Salmonella* spp. in dairy farm environmental samples. Int. J. Food Microbiol. 102, 161-171.

Naranjo, M., Denayer, S., Botteldoorn,N., Delbrassinne, L., Veys, J., Waegenaere, J., Sirtaine, N., Driesen, R.B., Sipido, K.R., Mahillon, J., Dierick, K., 2011. Sudden death of a young adult associated with *Bacillus cereus* food poisoning. J. Clin. Microbiol. 49, 4379-4381.

Nazarowec-White, M., Farber, J.M. 1997. Incidence, survival, and growth of *Enterobacter sakazakii* in infant formula. J. Food Prot. 60, 226-230.

Nazarowec-White, M., Farber, J.M. 1999. Phenotypic and genotypic typing of food and clinical isolates of *Enterobacter sakazakii*. J. Med. Microbiol. 48, 559-567.

Norberg, S., Stanton, C., Ross, R.P., Hill, C., Fitzgerald, G.F., Cotter, P.D., 2012. *Cronobacter* spp. in powdered infant formula. J. Food Prot. 75, 607-620.

O'Brien, S., Healy, B., Negredo, C., Anderson, W., Fanning, S., Iversen, C., 2009a. Prevalence of *Cronobacter* species (*Enterobacter* sakazakii) in follow-on infant formulae and infant drinks. Lett. Appl. Microbiol. 48, 536-541.

**O'Brien, S., Healy, B., Negredo, C., Fanning, S., Iversen, C.,** 2009b. Evaluation of a new one-step enrichment in conjunction with a chromogenic medium for the detection of *Cronobacter* spp. (*Enterobacter sakazakii*)in powdered infant formula. J. Food Prot.72, 1472-1475.

**Oliwa-Stasiak, K., Kolaj-Robin, O., Adley, C.C.,** 2011. Development of real-time PCR assays for detection and quantification of *Bacillus cereus* group species: differentiation of *B. weihenstephanensis* and rhizoid *B. pseudomycoides* isolates from milk. Appl. Environ. Microbiol. 77, 80-88.

**Oren, A., Garrity, G. M.**, 2013. List of new names and new combinations previously effectively, but not validly, published. Int. J. Sys. Evol. Microbiol. 63, 3931-3934.

Paananen, A., Mikkola, R., Sareneva, T., Matikainen, S., Hess, M., Andersson, M., Julkunen, I., Salkinoja-Salonen, M.S., Timonen, T., 2002. Inhibition of human natural killer cell activity by cereulide, an emetic toxin from *Bacillus cereus*. Clin. Exp. Immunol. 129, 420-428.

Pena, W.E.L., de Andrade, N.J., Soares, N.F.F., Alvarenga, V.O., Junior, S.R., Granato, D., Zuniga, A.D.G., de Souza Sant'Ana, A., 2014. Modeling *Bacillus cereus* adhesion on stainless steel surface as affected by temperature, pH and time. Int. Dairy J. 34, 153-158.

Pochop, J., Kačániová, M., Hleba, L., Lejková, J., Fikselová, M., Kunová, S., Kluz, M., 2011. The StepOne real-time polymerase chain reaction detection of *Salmonella* sp. *Salmonella enterica* ser. *typhimurium* and *enteritidis* in milk and meat. J. Environ. Sci. Health Part B 46, 697-702.

**Podolak, R., Enache, E., Stone, W., Black, D.G., Elliott, P.H.,** 2011. Sources and risk factors for contamination, survival, persistence, and heat resistance of *Salmonella* in low-moisture foods. J. Food Prot. 73, 1919-1936.

**Prüß, B.M., Dietrich, R., Nibler, B., Märtlbauer, E., Scherer, S.,** 1999. The hemolytic enterotoxin HBL is broadly distributed among species of the *Bacillus cereus* group. Appl. Environ. Microbiol. 65, 5436-5442.

Rahn, K., De Grandis, S. A., Clarke, R. C., McEwen, S. A., Galán, J. E., Ginocchio, C., Curtiss III, R., Gyles, C. L., 1992. Amplification of an *invA* gene sequence of *Salmonella typhimurium* by polymerase chain reaction as a specific method of detection of *Salmonella*. Mol. Cell. Probes 6, 271-279.

**Reekmans, R., Stevens, P., Vervust, T., De Vos, P.,** 2008. An alternative real-time PCR method to detect the *Bacillus cereus* group in naturally contaminated food gelatine: a comparison study. Lett. Appl. Microbiol. 48, 97-104.

**Reich, F., König, R., von Wiese, W., Klein, W.,** 2010. Prevalence of *Cronobacter* spp. in a powdered infant formula processing environment. Int. J. Food Microbiol. 140, 214-217.

**Reyesa, J.E., Bastíasa, J.M., Gutieírreza, M.R., Rodríguez, M.O.,** 2007. Prevalence of *Bacillus cereus* in dried milk products used by chilean school feeding program. Food Microbiol. 24, 1-6. **Rossen, L., Norskov, P., Holmstrom, K., Rasmussen, O.F.,** 1992. Inhibition of PCR by components of food samples, microbial diagnostic assays and DNA-extraction solutions. Int. J. Food Microbiol. 17, 37-45.

Ruan, J., Li, M., Liu, Y.P., Li, Y.Q., Li, Y.X., 2013. Rapid and sensitive detection of *Cronobacter* spp. (previously *Enterobacter* sakazakii) in food by duplex PCR combined with capillary electrophoresis-laser-induced fluorescence detector. J. Chromatogr. B 921-922, 15-20.

Sanger, F., Nicklen, F., Coulson, A.R., 1977. DNA sequencing with chainterminating inhibitors. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 74, 5463-5467.

Sánchez-Vargas, F.M., Abu-El-Haija; M.A., Gómez-Duarte, O.G., 2011. Salmonella infections: An update on epidemiology, management, and prevention. Travel Med. Infect. Dis. 9, 263-277.

Santos, R.F.S., da Silva, N., Amstalden Junqueira, V.C., Kajsik, M., Forsythe, S., Pereira, J.L., 2013. Screening for *Cronobacter* species in powdered and reconstituted infant formulas and from equipment used in formula preparation in maternity hospitals. Ann. Nutr. Metab. 63, 62-68.

Schoeni, J.L., und Lee Wong, A.C., 2005. *Bacillus cereus* food poisoning and its toxins. J. Food Prot. 68, 636-648.

**Seo, K.H., Brackett, R.E.,** 2005. Rapid, specific detection of *Enterobacter sakazakii* in infant formula using a real-time PCR assay. J. Food Prot. 68, 59-63.

Shaheen, R., Andersson, M.A., Apetroaie, C., Schulz, A., Ehling-Schulz, M., Ollilainen, V.M., Salkinoja-Salonen, M.S., 2006. Potential of selected infant food formulas for production of *Bacillus cereus* emetic toxin, cereulide. Int. J. Food Microbiol. 107, 287-294.

Shaker, R., Osaili, T., Al-Omary, W., Jaradat, Z., Al-Zuby, M., 2007. Isolation of *Enterobacter sakazakii* and other *Enterobacter* sp. from food and food production environments. Food Control 18, 1241-1245.

Solano, C., García, B., Valle, J., Berasain, C., Ghigo, J.M., Gamazo, C., Lasa, I., 2002. Genetic analysis of *Salmonella enteritidis* biofilm formation: critical role of cellulose. Mol. Microbiol. 43, 793-808.

Soler, M., Ruiz-Rueda, O., Lopez-Siles, M., Calvo, L., Kaclikova, E., Garcia-Gil, J.L., 2012. A new validated real-time PCR-based method for the specific and fast detection of *Cronobacter* spp. in infant formula. Food Anal. Methods 5, 179-187.

**Sonbol, H., Joseph, S., McAuley, C.M., Craven, H.M., Forsythe, S.J.**, 2013. Multilocus sequence typing of *Cronobacter* spp. from powdered infant formula and milk powder production factories. Int. Dairy J. 30, 1-7.

**Spreer, E. (Hrsg.),** 2011. Dauermilcherzeugnisse; Molke und Molkeverwertung. Technologie der Milchverarbeitung, 10. Auflage, S. 397-454, Behr's Verlag, Hamburg.

**Stenfors Arnesen, L.P., Fagerlund, A., Granum, P.E.,** 2008. From soil to gut: *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins. FEMS Microbiol. Rev. 32, 579-606.

**Stephan, R.,** 1996. Randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) assay for genomic fingerprinting of *Bacillus cereus* isolates. Int. J. Food Microbiol. 31, 311-316.

**Sterr, Y., Weiss, A., Schmidt, H.,** 2009. Evaluation of lactic acid bacteria for sourdough fermentation of amaranth. Int. J. Food Microbiol. 136, 75–82.

**Stoeckel, M., Westermann, A.C., Atamer, Z., Hinrichs, J.,** 2013. Thermal inactivation of *Bacillus cereus* spores in infant formula under shear conditions. Dairy Sci. Technol. 93, 163-175.

**Stoop, B., Lehner, A., Iversen, C., Fanning, S., Stephan, R.,** 2009. Development and evaluation of *rpoB* based PCR systems to differentiate the six proposed species within the genus *Cronobacter*. Int. J. Food Microbiol. 136, 165-168.

Thorsen, L., Hansen, B.M., Nielsen, K.F., Hendriksen, N.B., Phipps, R.K., Budde, B.B., 2006. Characterization of emetic *Bacillus weihenstephanensis*, a new cereulide-producing bacterium. Appl. Environ. Microbiol. 72, 5118-5121.

**Townsend, S., Caubilla Barron, J., Loc-Carrillo, C., Forsythe, S.,** 2007. The presence of endotoxin in powdered infant formula milk and the influence of endotoxin and *Enterobacter sakazakii* on bacterial translocation in the infant rat. Food Microbiol. 24, 67-74.

**Tschäpe, H., Bockemühl, J.,** 2002. Lebensmittelübertragene Salmonellose in Deutschland. Bundesgesundheitsbl.-Gesundheitsforsch.-Gesundheitsschutz 45, 491-496.

Ueda, S., Yamaguchi, M., Iwase, M., Kuwabara, Y., 2013. Detection of emetic *Bacillus cereus* by real-time PCR in foods. Biocontrol Sci. 18, 227-232.

Vilas-Bôas, G.T., Peruca, A.P.S., Arantes, O.M.N., 2007. Biology and taxonomy of *Bacillus cereus*, *Bacillus anthracis*, and *Bacillus thuringiensis*. Can. J. Microbiol. 53, 673-687.

Wang, X., Zhu, C., Xu, X., Zhou, G., 2012. Real-time PCR with internal amplification control for the detection of *Cronobacter* spp. (*Enterobacter sakazakii*) in food samples. Food Control 25, 144-149.

**Weber, H. (Hrsg.),** 2010.Wasserentzug, Mikrobiologie der Lebensmittel, Grundlagen, 9. Auflage, S. 421, Behr's Verlag, Hamburg.

Wehrle, E., Didier, A., Moravek, M., Dietrich, R., Märtlbauer, E., 2010. Detection of *Bacillus cereus* with enteropathogenic potential by multiplex real-time PCR based on SYBR green I. Mol. Cell. Probes 24, 124-130.

Werle, E., Schneider, C., Renner, M., Völker, M., Fiehn, W., 1994. Convenient single-step, one tube purification of PCR products for direct sequencing. Nucleic Acids Res. 22, 20.

Williams, J.G.K., Kubelik, A.R., Livak, K.J., Rafalski, J.A., Tingey, S.V., 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acids Res. 18, 6531-6535.

Yan, Q.Q., Condell, O., Power, K.; Butler, F., Tall, B.D., Fanning, S., 2012. *Cronobacter* species (formerly known as *Enterobacter sakazakii*) in powdered infant formula: a review of our current understanding of the biology of this bacterium. J. Appl. Microbiol. 113, 1-15.

Yang, I.C., Yang-Chih Shih, D., Huang, T.P., Huang, Y.P., Wang, J.Y., Pan, T.M., 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., Yang-Chih Shih, D., Wang, J.Y., Pan, T.M., 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.

Ye, Y., Li, H., Wu, Q., Zhang, J., Lu, Y., 2014. The *Cronobacter* spp. in milk and dairy products: detection and typing. Int. J. Dairy Technol. 66.

Zhang, G., Brown, E.W., Hammack, T.S., 2013. Comparison of different preenrichment broths, egg: preenrichment broth ratios, and surface disinfection for the detection of *Salmonella enterica* spp. *enterica* serovar Enteritidis in shell eggs. Poultry Sci. 92, 3010-3016.

Zhang Z., Wang, L., Xu, H., Aguilar, Z.P., Liu, C., Gan, B., Xiong, Y., Lai, W., Xu, F., Wie, H., 2014. Detection of non-emetic and emetic *Bacillus cereus* by propidium monoazide multiplex PCR (PMA-mPCR) with internal amplification control. Food Control 35, 401-406.

Zhou, Y., Wu, Q., Xu, X., Yang, X., Ye, Y., Zhang, J., 2008. Development of an immobilization and detection method of *Enterobacter sakazakii* from powdered infant formula. Food Microbiol. 25, 648-652.

## **Danksagung**

## Herzlich bedanken möchte ich mich bei

Herrn Prof. Dr. Herbert Schmidt für die Überlassung des Themas und die Möglichkeit der Bearbeitung und Anfertigung der Doktorarbeit im Fachgebiet Lebensmittelmikrobiologie des Institutes für Lebensmittelwissenschaft und Biotechnologie.

Herrn Prof. Dr. Jörg Hinrichs für die freundliche Übernahme des Zweitgutachtens.

Herrn Prof. Dr. Martin Lössner, Herr Dr. Jochen Klumpp und Frau Jenna Denyes vom Institut für Lebensmittelwissenschaften, Ernährung und Gesundheit der ETH Zürich für die erfolgreiche Projektkooperation.

Frau Dipl.-Ing. Dr. Agnes Weiss für die hervorragende fachliche Unterstützung, die engagierte Betreuung der Arbeit und Motivation.

dem Forschungskreis der Ernährungsindustrie e.V. (FEI), der das Projekt mit der AiF-Nr. 16756N förderte.

allen Mitarbeitern des Fachgebietes Lebensmittelmikrobiologie für die nette Atmosphäre und vielen gemeinsamen Stunden.

meiner Familie, die immer an mich geglaubt und mich unterstützt hat.

Ein ganz besonderer Dank gilt meinem geliebten Mann Claudio. Herzlichen Dank für all Deine Unterstützung und Geduld in jeglicher Hinsicht.





## Eidesstattliche Versicherung gemäß § 7 Absatz 7 der Promotionsordnung der Universität Hohenheim zum Dr. rer. nat.

1. Bei der eingereichten Dissertation zum Thema "Entwicklung und Validierung schneller und selektiver Verfahren zum Nachweis von *Salmonella enterica*, *Cronobacter* spp. und *Bacillus cereus* in Milcherzeugnissen" handelt es sich um meine eigenständig erbrachte Leistung.

2. Ich habe nur die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und mich keiner unzulässigen Hilfe Dritter bedient. Insbesondere habe ich wörtlich oder sinngemäß aus anderen Werken übernommene Inhalte als solche kenntlich gemacht.

3. Ich habe nicht die Hilfe einer kommerziellen Promotionsvermittlung oder -beratung in Anspruch genommen.

4. Die Bedeutung der eidesstattlichen Versicherung und der strafrechtlichen Folgen einer unrichtigen oder unvollständigen eidesstattlichen Versicherung sind mir bekannt.

Die Richtigkeit der vorstehenden Erklärung bestätige ich: Ich versichere an Eides Statt, dass ich nach bestem Wissen die reine Wahrheit erklärt und nichts verschwiegen habe.

Ort und Datum

Unterschrift