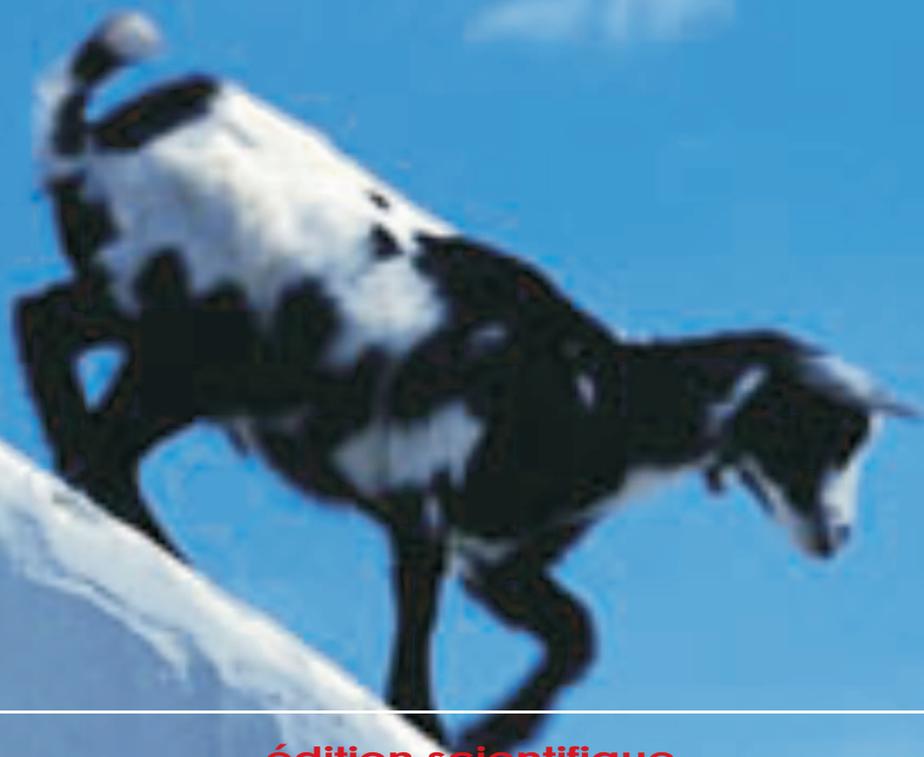


# PHÄNO- UND GENOTYPISCHE CHARAKTERISIERUNG VON *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* AUS ZIEGENKÄSE

UNTER BESONDERER BERÜCKSICHTIGUNG  
DES ENTEROTOXINBILDUNGSVERMÖGENS

**ÖMER AKINEDEN**

**INAUGURAL-DISSERTATION**  
zur Erlangung des Doktorgrades  
beim Fachbereich Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen



**édition scientifique**  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

**Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.**

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2006

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1<sup>st</sup> Edition 2006

© 2006 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, WETTENBERG  
Printed in Germany



**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**  
édition scientifique

GLEIBERGER WEG 4, D-35435 WETTENBERG  
Tel: 06406-4413 Fax: 06406-72757  
Email: VVB-IPS@T-ONLINE.DE

[www.doktorverlag.de](http://www.doktorverlag.de)

Aus dem Institut für Tierärztliche Nahrungsmittelkunde  
Professur für Milchwissenschaften  
der Justus-Liebig-Universität Gießen  
Betreuer: Prof. Dr. Dr. habil. E. Usleber

**Phäno- und genotypische Charakterisierung  
von *Staphylococcus aureus* aus Ziegenkäse  
unter besonderer Berücksichtigung  
des Enterotoxinbildungsvermögens**

INAUGURAL-DISSERTATION  
zur Erlangung des Doktorgrades beim  
Fachbereich Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

**Ömer Akineden**

Tierarzt aus Aksaray/Türkei

Gießen 2006

**Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen**

**Dekan: Prof. Dr. M. Reinacher**

---

**1. Berichterstatter: Prof. Dr. Dr. habil. E. Usleber**

**2. Berichterstatter: Prof. Dr. R. Bauerfeind**

**Tag der mündlichen Prüfung: 13. 01. 2006**

*Meiner Frau Sibel*  
*und*  
*meinen Söhnen Biyan und Miran*



# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	
<b>2</b>	<b>Literaturübersicht</b>	
2.1	Bakteriell bedingte Lebensmittelvergiftungen .....	2
2.2	Charakterisierung von <i>S. aureus</i> .....	4
2.2.1	Taxonomie und Geschichte .....	4
2.2.2	Morphologie .....	5
2.2.3	Biochemische und metabolische Charakteristika .....	5
2.2.4	Bedeutung als Krankheitserreger und Virulenzfaktoren .....	6
2.3	<i>S. aureus</i> als Verursacher von Lebensmittelintoxikationen .....	11
2.4	Staphylokokken Enterotoxine.....	15
2.4.1	Struktur und physikalisch-chemische Eigenschaften .....	15
2.4.2	Biologische und serologische Eigenschaften.....	16
2.4.3.	Toxinbildung in Lebensmitteln.....	19
2.4.4	Rechtliche Regelungen für <i>S. aureus</i> bzw. Enterotoxine in Milch und Milcherzeugnissen .....	21
2.4.5	Nachweis von Staphylokokken-Enterotoxinen .....	24
2.4.5.1	Biologische Methoden .....	24
2.4.5.2	Immunologische Verfahren .....	25
2.4.5.2.1	Immundiffusionsverfahren .....	25
2.4.5.2.2	Umgekehrte passive Latexagglutination.....	26
2.4.5.2.3	Radio- und Enzymimmuntest .....	27
2.4.5.2.4	Weitere immunologische Verfahren.....	28
2.4.6	Nachweis von Enterotoxin-Genen .....	29
<b>3</b>	<b>Material und Methoden</b>	
3.1	Materialien.....	31
3.1.1	Chemikalien und Biochemika.....	31
3.1.2	Lösungen und Puffer.....	32
3.1.3	Nährmedien und Zusätze .....	32

3.1.4	Primer .....	33
3.1.5	Geräte und Verbrauchsmaterial .....	34
3.1.6	Bakterien-Stämme .....	35
3.1.7	Referenzstämme .....	37
<b>3.2</b>	<b>Methoden</b>	
3.2.1	Mikrobiologische Untersuchung von <i>S. aureus</i> .....	37
3.2.1.1	Isolierung und Keimzahlbestimmung .....	38
3.2.1.2	Lagerung der Isolate .....	39
3.2.1.3	Identifizierung und Charakterisierung der Isolate .....	40
3.2.2	Molekularbiologische Identifizierung und Charakterisierung der <i>S. aureus</i> - Isolate .....	42
3.2.2.1	DNA-Extraktion .....	42
3.2.2.2	Durchführung der Polymerasekettenreaktion (PCR).....	42
3.2.2.3	Agarosegelelektrophorese.....	43
3.2.2.4	Ethidiumbromidfärbung .....	44
3.2.2.5	Nachweis von <i>S. aureus</i> -spezifischen Genabschnitten.....	44
3.2.2.6	Nachweis von Virulenz-Genen.....	45
3.2.2.7	Nachweis von Staphylokokken-Enterotoxingenen und weiteren Superantigen-Genen .....	45
3.2.2.8	Multiplex-PCR zum gleichzeitigen Nachweis der Staphylokokken- Enterotoxingene .....	48
3.2.2.9	Analyse der mRNA-Expression mittels Reverse Transkriptions-PCR .....	50
3.2.2.9.1	Präparation der bakteriellen Gesamt-RNA .....	50
3.2.2.9.2	Durchführung der Reverse Transkriptions-PCR .....	51
3.2.3	Nachweis der Enterotoxine mittels Enzymimmuntest.....	52
<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b>	
4.1	Bakteriologie.....	54
4.1.1	Vorkommen Koagulase-positiver Staphylokokken in Ziegenkäse.....	54
4.1.2	Mikrobiologische Charakterisierung der <i>S. aureus</i> -Isolate .....	56
4.2	Charakterisierung der <i>S. aureus</i> -Isolate mittels PCR .....	58

4.2.1	Nachweis <i>S. aureus</i> -spezifischer Genabschnitte .....	58
4.2.2	Nachweis von Staphylokokken-Enterotoxigenen und weiteren Superantigen-Genen mittels PCR .....	63
4.2.3	Multiplex-PCR .....	67
4.2.4	Reverse Transkriptions-PCR .....	70
4.3	Nachweis der Toxinproduktion mittels Enzymimmuntest .....	73
<b>5</b>	<b>Diskussion</b>	
5.1	Phänotypische Charakterisierung der <i>S. aureus</i> -Isolate .....	75
5.2	Genotypische Charakterisierung von <i>S. aureus</i> -Isolaten mittels PCR .....	77
5.2.1	Nachweis <i>S. aureus</i> -spezifischer Genabschnitte .....	77
5.2.2	Nachweis von Staphylokokken-Enterotoxigenen und weiteren Superantigen-Genen mittels PCR .....	79
5.2.3	Multiplex-PCR... ..	81
5.2.4	Reverse Transkriptions-PCR .....	82
5.3	Nachweis der Toxinproduktion mittels Enzymimmuntest .....	83
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung</b> .....	85
<b>7</b>	<b>Summary</b> .....	86
<b>8</b>	<b>Literaturverzeichnis</b> .....	87
<b>9</b>	<b>Danksagung</b> .....	106

## Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 1a:</b> Definierte und potentielle Virulenzfaktoren von <i>S. aureus</i> -Adhesine.....	8
<b>Tabelle 1b:</b> Definierte und potentielle Virulenzfaktoren von <i>S. aureus</i> -Superantigene (nach ALOUF UND MÜLLER-ALOUF, 2003).....	9
<b>Tabelle 1c:</b> Definierte und potentielle Virulenzfaktoren von <i>S. aureus</i> - Invasine (nach PROJAN UND NOVICK, 1997; DINGES ET AL., 2000; KURODA ET AL., 2001).....	9
<b>Tabelle 2:</b> Charakteristische Eigenschaften der Staphylokokkenenterotoxine.....	18
<b>Tabelle 3:</b> Normen der MilchV zum Vorkommen von <i>S. aureus</i> (KBE/ml oder g) in Rohmilch und Käse .....	21
<b>Tabelle 4:</b> Grenzwerte für Koagulase-positive Staphylokokken sowie Staphylokokken-Enterotoxine in Milch und Milcherzeugnissen gemäß dem Verordnungsentwurf der Kommission über mikrobiologische Kriterien für Lebensmittel von 2004. ....	23
<b>Tabelle 5:</b> Kommerziell erhältliche Testkits zum Nachweis von Staphylokokken- Enterotoxinen (modifiziert nach SU UND WONG, 1997).....	28
<b>Tabelle 6:</b> Übersicht über Art und Herkunft der untersuchten Käseproben .....	36
<b>Tabelle 7:</b> Zusammensetzung des Standard-Reaktionsgemisches zur Durchführung der PCR .....	43
<b>Tabelle 8:</b> Nachweis von Virulenzgenen von <i>S. aureus</i> mittels PCR: Übersicht über dabei verwendete Oligonukleotidprimer .....	46
<b>Tabelle 9:</b> Nachweis von Enterotoxingenen von <i>S. aureus</i> mittels PCR: Übersicht über dabei verwendete Oligonukleotidprimer .....	47
<b>Tabelle 10:</b> Verwendete Temperaturprogramme: Im Thermocycler erfolgte zunächst jeweils eine initiale Denaturierung der DNA für 5 min bei 94 °C mit anschließenden, sich unterschiedlich oft wiederholenden Zyklen zur Denaturierung, Primeranlagerung und Polymerisierung. Den Abschluss bildete ein Extensionszyklus für 5 min bei 72 °C .....	48
<b>Tabelle 11:</b> Zusammensetzung des Reaktionsgemisches zur Amplifizierung der klassischen Staphylokokken-Enterotoxingene ( <i>sea</i> , <i>seb</i> , <i>sec</i> , <i>sed</i> und <i>see</i> ) ...	49
<b>Tabelle 12:</b> Zusammensetzung des Reaktionsgemisches zur Amplifizierung der <i>seg</i> -, <i>seh</i> -, <i>sei</i> - und <i>sej</i> -Gene.....	49
<b>Tabelle 13:</b> Zusammensetzung des Reaktionsgemisches zur Durchführung der RT .....	52
<b>Tabelle 14:</b> Vorkommen von Koagulase-positiven Staphylokokken in Käseproben unterschiedlicher Herkunft .....	54
<b>Tabelle 15:</b> Koagulase-positive Staphylokokken (KBE/g) in verschiedenen Käsesorten aus Rohmilch oder pasteurisierter Milch (n = 14).....	55

<b>Tabelle 16:</b> Gruppierung der 487 Staphylokokken-Isolate nach Koloniemorphologie und Koagulasereaktion .....	56
<b>Tabelle 17:</b> Vorkommen von Hämolysinen bei den 64 untersuchten <i>S. aureus</i> -Isolaten (nach der von SKALKA et al. (1979) beschriebenen Methode ermittelt) 57	
<b>Tabelle 18:</b> Übersicht über die PCR-Ergebnisse von 64 <i>S. aureus</i> -Isolaten zum Nachweis <i>S. aureus</i> -spezifischer Genabschnitte .....	59
<b>Tabelle 19:</b> Größe der Amplikons des Koagulase-Gens <i>coa</i> der 64 untersuchten <i>S. aureus</i> -Isolate sowie die Anzahl der „Repeats“ .....	59
<b>Tabelle 20:</b> Größe der Amplikons der X-Region des Protein A-Gens <i>spa</i> und postulierte Anzahl von „Repeats“ der <i>S. aureus</i> -Isolate.....	61
<b>Tabelle 21:</b> Größe der Amplikons der IgG-bindenden Regionen des Protein A-Gens <i>spa</i> sowie der postulierten Anzahl von Repeats der <i>S. aureus</i> -Isolate .....	62
<b>Tabelle 22:</b> Ergebnisse der Überprüfung der verwendeten <i>S. aureus</i> -Enterotoxinreferenzstämme auf Toxinbildung (SEA-SEE) und Toxingene.....	63
<b>Tabelle 23:</b> Nachweis der Gene zur Bildung der Staphylokokkenenterotoxine und <i>tst</i> , <i>eta</i> und <i>etb</i> -Gene bei 64 untersuchten <i>S. aureus</i> -Isolaten.....	64
<b>Tabelle 24:</b> Zuordnung Enterotoxigen-positiver Isolate im Hinblick auf ihre Herkunft.. .....	65
<b>Tabelle 25:</b> Toxingenprofile und Vorkommenshäufigkeit bei <i>S. aureus</i> -Isolaten aus Ziegenkäse (n = 64) .....	66
<b>Tabelle 26:</b> Vergleich der Ergebnisse: Nachweis der Enterotoxingene <i>sea</i> , <i>sec</i> , <i>seg</i> und <i>sei</i> mittels Einzel-PCR und Multiplex-PCR .....	67
<b>Tabelle 27:</b> Vergleich von PCR- und RT-PCR-Ergebnissen zum Nachweis von SEA, SEC, SEM, SEN, SEO und TSST-1 .....	73
<b>Tabelle 28:</b> Vergleich von Enzymimmuntest-, PCR- und RT-PCR-Ergebnissen .....	73

## Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung 1:</b>	Schematische Darstellung der Untersuchungsschritte .....	39
<b>Abbildung 2:</b>	Ergebnisse der Amplifizierung der ISR von vier <i>S. aureus</i> -Isolaten .....	58
<b>Abbildung 3:</b>	Variabilität der Amplifikate des Koagulase-Gens <i>coa</i> von sechs <i>S. aureus</i> -Isolaten .....	60
<b>Abbildung 4:</b>	Typische Amplikons des „clumping factor“-Gens <i>clfA</i> von vier <i>S. aureus</i> -Isolaten .....	60
<b>Abbildung 5:</b>	Typische Amplikons der X-Regionen des Protein A-Gens <i>spa</i> von zehn <i>S. aureus</i> -Isolaten.....	62
<b>Abbildung 6:</b>	Typische Amplikons der IgG-bindenden Regionen des Protein A-Gens <i>spa</i> von acht <i>S. aureus</i> -Isolaten .....	63
<b>Abbildung 7:</b>	Übersicht über die Vorkommenshäufigkeit der einzelnen Enterotoxingene und der <i>tst</i> , <i>eta</i> und <i>etb</i> -Gene bei den 64 untersuchten <i>S. aureus</i> -Isolaten.....	65
<b>Abbildung 8:</b>	Darstellung der Häufigkeitsverteilung der Toxingenprofile .....	66
<b>Abbildung 9:</b>	Typisches Ergebnis der Multiplex-PCR zum gleichzeitigen Nachweis der Gene für <i>sea</i> , <i>seb</i> , <i>sec</i> , <i>sed</i> und <i>see</i> .....	68
<b>Abbildung 10:</b>	Typisches Ergebnis der Multiplex-PCR zum gleichzeitigen Nachweis der <i>seg</i> , <i>seh</i> , <i>sei</i> und <i>sej</i> -Gene.....	69
<b>Abbildung 11:</b>	Typische PCR mit den Oligonukleotidprimern <i>nucA-1</i> und <i>nucA-2</i> zur Kontrolle der DNA-Kontamination in der RNA-Extraktion ohne RT-Schritt.....	70
<b>Abbildung 12:</b>	Typische Amplikons der transkribierten <i>sea</i> -, <i>sec</i> -, <i>tst</i> - und <i>seg</i> -Gene von Enterotoxin-Referenzstämmen mittels RT-PCR .....	71
<b>Abbildung 13:</b>	Typisches Amplikon des transkribierten <i>tst</i> -Gens vom TSST-1-Referenzstamm (161/93) mittels RT-PCR .....	71
<b>Abbildung 14:</b>	Typische Amplikons der transkribierten <i>seg</i> -, <i>sei</i> -, <i>sem</i> -, <i>seo</i> - und <i>sen</i> -Gene von Enterotoxin-Referenzstämmen mittels RT-PCR.....	72

## Verzeichnis der verwendeten wissenschaftlichen Abkürzungen

Abb.	Abbildung
Aqua dest.	Aqua destillata
BHI	Brain-Heart-Infusion
Bp	Basenpaar(e)
cDNA	Komplementäre Desoxyribonucleinsäure
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleosid-5'-triphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EIA	Enzymimmunoassay
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
et al.	et alii (und Mitarbeiter)
g	Gramm
h	hora (Stunde)
IgG	Immunglobulin G
KBE	Kolonie bildende Einheit
kDa	1000 Dalton, Einheit der molekularen Masse
kg	Kilogramm
l	Liter
LMBG	Lebensmittel- und Bedarfsgegenständegesetz
mA	Milliampère
mg	Milligramm
MilchV	Milchverordnung
min	Minute(n)
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mmol/l	Millimol pro Liter
mol	absolute Menge einer Substanz
mRNA	Messenger Ribonucleinsäure
n	bei Berechnung des Mittelwertes die Anzahl der Einzelbeobachtungen
nm	Nanometer
ng	Nanogramm
OD	Optische Dichte
PCR	Polymerase chain reaction
PFGE	Pulsfeldgelelektrophorese
pg	Picogramm

pI	Isoelektrischer Punkt
POD	Peroxidasekonjugat
RNA	Ribonucleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute
rRNA	Ribosomale Ribonucleinsäure
RT	Reverse Transcription
s	Sekunde(n)
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
SE	Staphylokokken-Enterotoxine
SEA, B, ...	<i>Staphylococcus aureus</i> Enterotoxin A, B, ...
subsp.	Subspezies
Tab.	Tabelle
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Unit (Internationale Einheit)
UV	Ultraviolett
v	Volume
v/v	Volume/Volume
%	Prozent
°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
x g	multipliziert mit der Erdbeschleunigung (9,81 m/s <sup>2</sup> )

## 1 EINLEITUNG

*Staphylococcus (S.) aureus* bzw. die von dieser Spezies gebildeten Enterotoxine stellen nach wie vor ein Problem in der Lebensmittelhygiene dar. Auch künftig müssen gemäß dem EU-weit harmonisierten Lebensmittelrecht Käse, für die erhöhte Gehalte an *S. aureus* festgestellt wurden, auf Enterotoxine überprüft werden. Allerdings existieren derzeit nur für fünf Enterotoxine spezifische Nachweise, obwohl nach molekularbiologischen Daten möglicherweise mehr als ein Dutzend verschiedener Toxine existieren.

Ziel der vorliegenden Untersuchung war es, zunächst einen Überblick über eine Belastung der Ziegenkäse aus konventioneller und ökologischer Produktion im Bundesland Hessen mit *S. aureus* unter den Aspekten der Qualitätssicherung und des Verbraucherschutzes und gegebenenfalls über Art und Ausmaß der Kontamination zu gewinnen und an erhobenen Isolaten den Anteil der Toxinbildner bzw. deren Toxinbildungvermögen zu bestimmen. Zu diesem Zweck wurden folgende Untersuchungen vorgesehen: (1) Erfassung des aktuellen Status von Ziegenkäse aus konventioneller sowie ökologischer Produktion auf das qualitative und quantitative Vorkommen von Koagulase-positiven Staphylokokken bzw. *S. aureus*. (2) Ausarbeitung der Routineverfahren zum Nachweis von *S. aureus*-Isolaten sowohl mittels konventioneller Methoden als auch mittels molekularbiologischer Methoden sowie Polymerasekettenreaktion. (3) Nachweis der Toxinbildung der Isolate mit immunchemischen Methoden. (4) Nachweis des für die Toxinbildung codierenden Gens der Isolate mittels Polymerasekettenreaktion. (5) Nachweis der insbesondere „neuen“ Toxingene bzw. der mRNA als Hinweis auf Toxinbildung mittels Reverse Transkriptions-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR). (6) Entwicklung und Evaluierung von Multiplex-PCR-Systemen zum Nachweis der Enterotoxingene. (7) Screening von *S. aureus*-Isolaten auf das Vorkommen der in den letzten Jahren neu beschriebenen Enterotoxingene *seg*, *seh*, *sei*, *sen*, *sem* und *seo* und Vergleich mit jeweiliger Genexpression.

## 2 LITERATURÜBERSICHT

### 2.1 Bakteriell bedingte Lebensmittelvergiftungen

Unter Lebensmittelvergiftungen - oft summarisch auch als Lebensmittelinfektionen bezeichnet - versteht man die als Folge des Verzehrs von Lebensmitteln bedingten Erkrankungen des Menschen. Nach Definition der World Health Organisation (WHO) sind „Lebensmittelinfektionen Krankheiten infektiöser oder toxischer Natur, die tatsächlich oder wahrscheinlich auf den Verzehr von Lebensmitteln oder Wasser zurückgeführt werden können“ (NOTERMANS UND HOOGENBOOM-VERDEGAAL, 1992; AMMON ET AL., 2000; TSCHÄPE, 2000; LOIR ET AL., 2003). Prinzipiell lassen sich bezüglich des Wirk- bzw. Übertragungsmechanismus der Bakterien zwei Gruppen von bakteriell bedingten Lebensmittelvergiftungen unterscheiden: die eigentlichen Lebensmittelinfektionen und die Lebensmittelintoxikationen (KUNZ, 1994).

Bei Lebensmittelinfektionen ist das Lebensmittel Überträger pathogener Bakterien; eine Vermehrung dieser Bakterien im Lebensmittel muss nicht notwendigerweise erfolgen. Bei Überschreitung der Infektionsschwelle kommt es zum Ausbruch der Infektionskrankheit. Diese Schwelle hängt von individuellen Faktoren wie z. B. dem Immunstatus, dem Alter, der Magenacidität u.a. ab. Ein typisches Beispiel dieses Typs sind die Salmonellosen, außerdem Erkrankungen durch *Campylobacter*, *Yersinien*, *Escherichia coli* und Vibrionen. Lebensmittelinfektionen können aber auch durch Viren oder Parasiten ausgelöst werden.

Bei Lebensmittelintoxikationen findet dagegen eine Vermehrung der Bakterien statt, aus deren Stoffwechselprodukten in Verbindung mit chemischen Substanzen des Lebensmittels Toxine biosynthetisiert werden. Die Auslösung der Erkrankung erfolgt nach dem Verzehr des toxinhaltigen Lebensmittels, unabhängig davon, ob lebende Bakterien im Lebensmittel vorhanden sind. Als Erreger kommen u.a. *S. aureus*, *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens* und *Clostridium botulinum* in Betracht. Botulismus tritt zwar sehr selten auf, führt aber zu dramatischen Krankheitsverläufen. Relativ häufig sind Lebensmittelvergiftungen durch die drei anderen genannten Erreger. Man schätzt, dass *Clostridium perfringens* für fünf bis zehn Prozent aller lebensmittelbedingten, bakteriellen Erkrankungen verantwortlich ist (EPIDEMIOLOGISCHES BULLETIN 18/2000). Da die Toxine bereits präformiert im Lebensmittel vorliegen, sind für Intoxikationen prinzipiell kurze Inkubationszeiten von wenigen Stunden typisch (erste Symptome bei Lebensmittel-

vergiftungen durch *Bacillus cereus* und *S. aureus* schon 15 bis 30 Minuten nach Nahrungsaufnahme). In den meisten Fällen sind die Symptome nach spätestens 24 Stunden wieder abgeklungen. Ansonsten ist die Intoxikation anamnestisch und klinisch oft schwer von einer Lebensmittelinfektion zu unterscheiden.

Einige der Lebensmittelinfektionserreger (wie zum Beispiel *Escherichia coli*, *Vibrio cholerae* und Diarrhoe-Toxin-produzierende *B. cereus*) sind auch in der Lage, Toxine zu bilden. Im Unterschied zu den klassischen Lebensmittel-Intoxikationen findet aber die Erregervermehrung und die Toxinbildung aber nicht nur im Lebensmittel, sondern auch im Wirt selbst statt (JÄSCHKE, 2002).

Die Ursachen für Lebensmittelinfektionen und –intoxikationen sind zumeist Herstellungs- und/oder Lagerungsfehler sowie Hygienemängel. Häufig genannte Gründe sind u.a. unzureichende Erhitzung der Speisen, zu lange Aufbewahrungszeiten bei Zimmertemperatur im Anschluss an die Herstellung, Warmhalten bei zu geringen Temperaturen sowie Fehler der Kühlung (SINELL, 1995).

Trotz der großen hygienischen und technologischen Verbesserungen in der letzten Hälfte des 20. Jahrhunderts bei der Herstellung von Lebensmitteln erkrankt auch heute noch etwa jeder zehnte Bundesbürger einmal pro Jahr an einer Lebensmittelinfektion oder -intoxikation (EPIDEMIOLOGISCHES BULLETIN 15/1999). Mit Veränderungen der Ernährungsgewohnheiten und des unmittelbaren Umfelds des Menschen in der modernen Industriegesellschaft sind in den letzten 25 Jahren Verschiebungen im Erregerspektrum bakterieller Lebensmittelvergiftungen zu verzeichnen bzw. werden neue Krankheiten bekannt, beispielsweise durch *Escherichia coli* O157:H7, *B. cereus*, *Vibrio vulnificus* und *Cyclospora cayetanensis* (TAUXE, 2002 UND 1997). Dennoch stellen die klassischen Lebensmittelvergifter, insbesondere enterotoxinogener *S. aureus*, ein fortwährendes Gesundheitsrisiko dar.

## 2.2 Charakterisierung von *S. aureus*

### 2.2.1 Taxonomie und Geschichte

Die Spezies *S. aureus* gehört zur Gattung *Staphylococcus*, die neben den Gattungen *Micrococcus*, *Stomatococcus* und *Planococcus* der Familie der *Micrococcaceae* zugeordnet ist. Diese umfasst grampositive, katalasepositive, aerobe und/oder fakultativ anaerobe Kokken (BLOBEL UND SCHLIESSER, 1994). Neben *S. aureus* sind bislang über 36 Staphylokokken-Spezies bekannt (EUZEBY, 2004), deren Differenzierung anhand struktureller Merkmale der Zellwand sowie physiologischer, biochemischer und molekularer Eigenschaften erfolgt (BLOBEL UND SCHLIESSER, 1994).

Die Rolle von „weintraubenartigen“ Mikrokokken bei Sepsis und Abszessbildung wurde erstmals von Sir Alexander Ogston im Jahr 1883 beschrieben (OGSTON, 1883). OGSTON isolierte diese Keime aus dem Eiter von Furunkeln und Abszessen und benutzte dabei als erster den deskriptiven Namen „Staphylokokken“ (KLOOS ET AL., 1992; LOWY, 1998). ROSENBACH lieferte 1884 die erste taxonomische Klassifizierung der Gattung Staphylokokken und unterteilte sie aufgrund ihrer Koloniefarbe in zwei Arten, *S. aureus* und *S. albus* (KLOOS, 1980). EVANS ET AL. (1955) unterschieden Staphylokokken von Mikrokokken anhand des Glucosefermentationsverhaltens in einem standardisierten Oxidations-Fermentationstest (O/F-Test). In den 60er Jahren des letzten Jahrhunderts wurden dann Staphylokokken und Mikrokokken aufgrund unterschiedlicher DNA-Basenzusammensetzung unterschieden. Der Gehalt an Guanin und Cytosin beträgt bei Staphylokokken-DNA 30 - 39 % und bei Mikrokokken-DNA 63 - 73 % (SILVESTRI UND HILL, 1965; ROSYPAL ET AL., 1966).

*S. aureus* wird von anderen Staphylokokken mittels Koagulasetest differenziert, der 1925 von VON DARANYI entwickelt wurde (KLOOS ET AL., 1980). BAIRD-PARKER teilte die Koagulase-positiven Staphylokokken in die Untergruppen I-IV, wobei *S. aureus* die Untergruppe I repräsentiert und andere Koagulase-positive Staphylokokken die Untergruppen II - IV (BAIRD-PARKER, 1965). In den letzten Jahren wurden molekularbiologische Methoden wie die Polymerasekettenreaktion („polymerase chain reaction“, PCR) zur Identifizierung bzw. Differenzierung dieser Spezies eingesetzt. Somit basiert die Klassifizierung von *Staphylococcus* auch auf der molekularen Charakterisierung, die durch verschiedene Methoden wie Ribotypisierung, Pulsfeld-

gelelektrophorese (PFGE) und PCR analysiert werden kann (KLOOS, 1980; LUDWIG UND SCHLEIFER, 1994; MARTINEAU ET AL., 2001; DRANCOURT UND RAOULT, 2002).

### 2.2.2 Morphologie

Der Ausdruck „*Staphylococcus*“ stammt von dem griechischen Wort „*Staphle*“ (Bündel von Weintrauben) ab und beschreibt die charakteristische Anordnung im mikroskopischen Präparat. *S. aureus* sind grampositive Kokken mit einem Durchmesser von 0,5-1,5 µm. Die Kokken liegen meistens in Haufen zusammen, aber auch einzeln, in Paaren oder kurzen Ketten (BLOBEL UND SCHLIESSER, 1994).

*S. aureus* ist durch schnelles aerobes oder anaerobes Wachstum auf einem breiten Spektrum von Nährmedien charakterisiert. Einzelne Kolonien sind klar abgegrenzt, glatt und konvex mit einem Durchmesser von 1 - 4 mm nach 18 - 24 h Wachstum bei 35 °C. Die klassische goldene Pigmentation, hervorgerufen durch Carotinoide, muss nicht immer vorhanden sein, kann aber bei weiterer Inkubation von 24 - 48 h bei Raumtemperatur sichtbar werden. Die meisten Stämme von *S. aureus* verursachen eine Hämolyse von Schaf-, Pferd- oder humanen Erythrozyten (BLOBEL UND SCHLIESSER, 1994).

### 2.2.3 Biochemische und metabolische Charakteristika

Typische biochemische Merkmale von *S. aureus* sind u.a. die Fähigkeiten, bei hohen Salzkonzentrationen (5 – 15 % NaCl) zu wachsen, Glucose als die hauptsächliche Kohlenstoff- und Energiequelle unter Bildung von Milchsäure abzubauen und karotinoide Pigmente zu bilden. *S. aureus* stellt keine besonderen kulturellen Ansprüche und wächst auf den gewöhnlichen Nährböden, auch unter erhöhten Bebrütungstemperaturen (z.B. 45 °C). Weiterhin produziert *S. aureus* als Pathogenitätsfaktoren bedeutsame extrazelluläre und zellgebundene Produkte, die im weiteren Kapitel näher besprochen werden. Eine ausführliche Darstellung der biochemischen Erkennungsmerkmale von *S. aureus* findet sich in der neunten Auflage von „Bergey’s Manual of Determinative Bacteriology“ (HOLT ET AL., 1994).

#### 2.2.4 Bedeutung als Krankheitserreger und Virulenzfaktoren

*S. aureus* ist ubiquitär verbreitet; sowohl der Mensch als auch Tiere können Staphylokokken auf den Schleimhäuten des Nasen-Rachenraums (KLOOS, 1980) und auf der Haut tragen, ohne dabei Krankheitssymptome zu zeigen. Bei 30 – 50 % der gesunden Menschen konnten Staphylokokken auf den Schleimhäuten des Nasen-Rachenraumes nachgewiesen werden (ARMSTRONG-ESTHER UND SMITH, 1976; GRÄF UND MÖNIUS, 1977). Die Kontaminationswege sind daher vielseitig und oftmals nicht nachzuvollziehen (BERGDOLL, 1989). Nasen- bzw. Rachenabstriche von Lebensmittelhändlern waren bei 36 % bzw. 27 % der untersuchten Personen *S. aureus*-positiv (UNTERMANN, 1972). Ausgehend von der Nase als Primärsitz ist eine Übertragung auf andere Körperstellen, z.B. die Hände, möglich (GRÄF UND MÖNIUS, 1977). Aus der Tatsache, dass „normales“ Händewaschen keinen deutlichen Einfluss auf die Zahl isolierter *S. aureus* hatte, folgerten DEWITT UND KAMPELMACHER (1988), dass diese Mikroorganismen zur residenten Flora gehören.

*S. aureus* ist Ursache für Haut- und Unterhautinfektionen, einschließlich Folliculitis, Furunculosis, Mastitis und Impetigo. Impetigo kann von einer milden Infektion bis zu dem lebensbedrohenden „Scalded Skin Syndrome“ variieren (HUESCA ET AL., 2002). Oft sind *S. aureus* auch Verursacher von postoperativen Wund- oder Katheder-Infektionen. Weitere wichtige *S. aureus*-Infektionen sind Osteomyelitis, Pneumonie, Sepsis, akute Endokarditis, Myocarditis, Pericarditis, Cerebritis, Meningitis und Abszesse (HUESCA ET AL., 2002). Das „Toxic Shock Syndrome“ (TSS) und Lebensmittelvergiftungen sind Toxin-vermittelte Krankheiten (HOLMBERG UND BLAKE, 1984; WIENEKE ET AL., 1993), die im nächsten Kapitel ausführlich besprochen werden.

Bei einer Infektion durch *S. aureus* sind verschiedene Virulenzfaktoren von Bedeutung. Es wird angenommen, dass zu Beginn der Infektion die mit dem Anheften der Bakterien an Zellen oder extrazelluläre Matrix verbundenen Faktoren von entscheidender Bedeutung sind, wohingegen Faktoren, die mit Invasion und Umgehung von Wirtsabwehrmechanismen verbunden sind, erst im weiteren Verlauf der Infektion bedeutsam werden. Einige Virulenzfaktoren haben mehr als eine Funktion. Beispielsweise besitzt das Alpha-Hämolysin zusätzlich zu seiner Fähigkeit, die Invasion durch Lyse von Gewebezellen zu fördern, eine Aktivität gegen menschliche Monocyten und Neutrophile und wird darum auch als „Immune Escape Factor“ bezeichnet (BHAKDI UND TRANUM-JENSEN, 1991). Die

Fibrinogen-bindenden Proteine können sowohl die Haftung von Bakterien ermöglichen als auch als Schutzfaktor vor der Immunabwehr dienen, indem sie die Oberfläche der Bakterien mit Fibrinogen bedecken (WANN ET AL., 2000).

Eine weitere Gruppe von Virulenzfaktoren wird aufgrund funktioneller Gemeinsamkeiten, zusammen mit den pyrogenen Exotoxinen von *Streptococcus pyogenes*, als Superantigene klassifiziert: Dabei handelt es sich um die Staphylokokken-Enterotoxine (SE), das „Toxic Shock Syndrom Toxin 1“ (TSST-1) und die exfoliativen Toxine A und B. Wichtige Eigenschaften dieser Superantigene werden in Kapitel 2.4. näher besprochen.

Insgesamt sind mehr als 40 verschiedene extrazelluläre und zellgebundene Proteine identifiziert (Tabelle 1). Zusätzlich sind in der *S. aureus* Gen-Datenbank mehrere Gene zu finden, von denen aufgrund von Sequenzhomologien zu bekannten Virulenzfaktoren angenommen wird, dass sie ebenfalls Virulenzfaktoren kodieren.

Virulenzfaktoren können, basierend auf ihren biologischen Aktivitäten, in drei funktionelle Kategorien eingeteilt werden: Adhäsine, Superantigene und Invasine. Sie sind in den Tabellen 1a, 1b und 1c aufgeführt.

**Tabelle 1a:** Definierte und potentielle Virulenzfaktoren von *S. aureus* - Adhesine

<b>definierte oder potentielle Virulenzfaktoren</b>	<b>Gene</b>	<b>Bindung und Funktion</b>	<b>Referenzen</b>
Clumping Factor A (ClfA)	<i>clfA</i>	Fibrinogen, Kalzium, Plättchen	MCDEVITT ET AL., 1994 HARTFORD ET AL., 2001 SIBOO ET AL., 2001
Clumping Factor B (ClfB)	<i>clfB</i>	Fibrinogen	NI EIDHIN ET AL., 1998
SdrC	<i>sdrC</i>	unbekannt	JOSEFSSON ET AL., 1998
SdrD	<i>sdrD</i>	Kalzium	JOSEFSSON ET AL., 1998
SdrE / Bbp Knochen-Sialoprotein- bindendes Protein	<i>sdrE/bbp</i>	Knochen- Sialoprotein	JOSEFSSON ET AL., 1998 TUNG ET AL., 2000
Plasmin-sensitives Protein (Pls)	<i>pls</i>	Reduzierung der Adhärenz	SAVOLAINEN ET AL., 2001
Fibronektin bindende Proteine A und B	<i>fnA, fnB</i>	Fibronektin, Fibrinogen	JONSSON ET AL., 1991 MIYAMOTO ET AL., 2001
Kollagen-bindendes Protein	<i>cna</i>	Kollagen	PATTI ET AL., 1994
Staphylokokken-Protein A	<i>spa</i>	Immunglobulin G (Fc-Stück)	UHLÉN ET AL., 1984
Elastin-bindendes Protein	<i>ebps</i>	Elastin	PARK ET AL., 1996
Fibrinogen-bindendes Protein (FbpA)	<i>fbp</i>	Fibrinogen	CHEUNG ET AL., 1995
Major histocompatibility complex class II (MHC II) analoges Protein (Map)/extrazelluläres Adhäsion-Protein (Eap)		Fibronektin, Fibrinogen, Knochen Sialoprotein, Vn, Thrombospondin, Prothrombin, Internalisation	MCGAVIN ET AL., 1993 PALMA ET AL., 1999
vWF-bindendes Protein	<i>vWp</i>	vWF	BJERKETORP ET AL., 2002
Extrazelluläres Fibrinogen-bindendes Protein (Efb)	<i>efb</i>	Fibrinogen	BODEN UND FLOCK, 1992 PALMA ET AL., 1998
Koagulase	<i>coa</i>	Fibrinogen, Prothrombin	BODEN UND FLOCK, 1992
Thrombospondin-bindendes Protein		Thrombospondin	HERMANN ET AL., 1995
Laminin-bindendes Protein		Laminin	LOPES ET AL., 1985
Interzelluläre Adhärenz	<i>icaADBC</i>	Bildung von Biofilmen	CRAMTON ET AL., 2001
Sbi	<i>sbi</i>	Immunglobulin G, Apolipoprotein	ZHANG ET AL., 2000

**Tabelle 1b:** Definierte und potentielle Virulenzfaktoren von *S. aureus* - Superantigene (nach ALOUF und MÜLLER-ALOUF, 2003)

<b>Toxine</b>	<b>Gene</b>	<b>Krankheiten / Funktion</b>
TSST-1	<i>tst</i>	Fieber, Schock
Enterotoxine A - U	<i>sea - seu</i>	Lebensmittelvergiftung (Stimulation von Rezeptoren für das Brechzentrum)
Exfoliatives Toxin A, B	<i>eta, etb</i>	SSSS (Staphylococcal scalded skin syndrome) toxische, epidermale Nekrose

**Tabelle 1c:** Definierte und potentielle Virulenzfaktoren von *S. aureus* - Invasine (nach PROJAN und NOVICK, 1997; DINGES ET AL., 2000; KURODA ET AL., 2001)

<b>Virulenzfaktoren</b>	<b>Gene</b>	<b>Funktion</b>
$\alpha$ -Hämolysin	<i>hla</i>	Membranzerstörung, vollständige Hämolyse
$\beta$ -Hämolysin	<i>hlb</i>	Sphingomyelinase, partielle Hämolyse, Zerstörung von Blutkörperchen
$\gamma$ -Hämolysin	<i>hlgA, hlgC, hlgB</i>	Membranzerstörung
$\delta$ -Hämolysin	<i>hld</i>	Membranzerstörung, vollständige Hämolyse
Phospholipase C	<i>plc</i>	Hydrolytische Enzyme, Gewebeerstörung
Lipase	<i>geh</i>	Hydrolytische Enzyme, Gewebeerstörung
Staphylokinase	<i>sak</i>	Aktiviert Plasminogen
Protease	<i>sspA, sspB</i>	Hydrolytische Enzyme, Gewebeerstörung
Thermonuklease	<i>nuc</i>	Degradation von Wirtsnukleinsäuren

Einige wichtige Virulenzfaktoren werden im Folgenden erörtert:

Die Rolle der freien Koagulase bezüglich der Virulenz von *S. aureus* ist unklar. Da sie jedoch von der Mehrheit der *S. aureus*-Stämme produziert wird und eine biologische Funktion als Prothrombinaktivator hat, gilt sie als ein wahrscheinlicher Virulenzfaktor. Der an der Zellwand gebundene „clumping factor“, ein anderes Fibrinogen-bindendes Protein, zeigt eine signifikante Sequenzenähnlichkeit mit der Koagulase. Über seine Rolle in der Adhärenz sind mehr Einzelheiten bekannt als über die der Koagulase (DICKINSON ET AL., 1995; MOREILLON ET AL., 1995; SIBOO ET AL., 2001).

Die Oberflächenproteine werden bei der Bindung an das Wirtsgewebe benötigt und in der logarithmischen Wachstumsphase während der Zellwandsynthese gebildet. Diese als „Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecules“ oder MSCRAMMs bezeichneten Moleküle (PATTI ET AL., 1994) umfassen Fibronectin-bindende Proteine, Fibrinogen-bindende Proteine, Kollagen-bindende Proteine und den „clumping factor“. Ein anderes Oberflächenprotein, Protein A, wird auch während der Zellwandsynthese produziert und besitzt antiphagozytäre Eigenschaften, die auf der Fähigkeit beruhen, den Fc-Teil von Immunglobulinen zu binden (UHLEN ET AL., 1984).

*S. aureus* produziert weiterhin eine Vielzahl von Exoproteinen, zumeist während der postexponentialen Wachstumsphase. Diese Proteine bauen im Wirtsgewebe die für das Wachstum der Bakterien benötigten Nährstoffe ab und/oder erlauben den Bakterien tiefer in das Wirtsgewebe einzudringen (DINGES ET AL., 2000). Zu den Exoproteinen gehören Hämolsine, Nukleasen, Proteasen, Lipasen, Hyaluronidase und Kollagenase. Alpha-Hämolysin (oder Alphatoxin) hat u.a. eine dermonekrotische und neurotoxische Wirkung auf Säugetierzellen und führt durch die Bildung von Poren in der Zielzellmembran zur Lyse. Insbesondere rote Blutzellen sind dabei betroffen (BHAKDI UND TRANUM-JENSEN, 1991). Beta-Hämolysin dient als Sphingomyelinase und ist für das Phänomen der „hot-cold-lysis“ verantwortlich. Gamma-Hämolysin besteht aus zwei Komponenten und hat neben Erythrozyten-lysierender auch eine leukozytolytische Aktivität. Delta-Hämolysin wird eine Surfactant- und Kanal-bildende Wirkung auf Zellmembranen zugeschrieben (DINGES ET AL., 2000). Die Staphylokinase ist ein Plasminogen-Aktivator (LÄHTEENMÄKI ET AL., 2001). Die Hyaluronidase baut die in der Haut, im Knochen, in der Nabelschnur, im Corpus vitreum des Auges und in synovialer Flüssigkeit vorhandene Hyaluronsäure ab. Einige *S. aureus*-Stämme produzieren zusätzliche Exoproteine, die *in vivo* insbesondere der Umgehung der Wirtsverteidigung dienen. So besitzt die Serinprotease die Fähigkeit, IgG-Antikörper zu inaktivieren bzw. zu spalten (PROKESOVA ET AL., 1992). Eine andere Funktion der Proteasen ist der Schutz vor antibiotischen Peptiden. Vermutlich wirkt das Fettsäure-modifizierende Enzym (FAME) gegen bakterizide Fettsäuren (MORTENSEN ET AL., 1992). Penton-Valentin-Leukozidin (PVL) hat leukozytolytische Aktivität.

Gene für *S. aureus*-Virulenzfaktoren können in Plasmiden, in Bakteriophagen, in Transposonen oder in Pathogenitätsinseln des Chromosoms liegen. Jüngste Sequenzierungen von zwei *S. aureus*-Stämmen zeigten drei neue Kategorien von

Pathogenitätsinseln: TSST-Familieninseln, Exotoxininseln und Enterotoxininseln. Eine beträchtliche Anzahl von neuen mutmaßlichen Virulenzgenen wurde identifiziert (KURODA ET AL., 2001). Viele pathogene Bakterien wie *S. aureus* haben hochkomplexe Signaltransduktionsmechanismen entwickelt, um optimal auf Veränderungen des sie umgebenden Milieus reagieren zu können. Darüber hinaus können unterschiedliche Umweltsignale die Expression bestimmter Gene spezifisch modulieren. Diese Modulatoren können z.B. direkt auf regulatorische Elemente wirken, die die Transkription von verschiedenen Virulenzgenen kontrollieren. Einige Regulatorsysteme wie der „Accessory Gene Regulator“ (*agr*) und „Staphylococcal Accessory Gene Regulator“ (*sar*) sind für die Regulation von Virulenzfaktoren bei Staphylokokken bekannt (ARVIDSON und TEGMARK, 2001). Andere Regulator-Gene und Operons, wie *sae*, *sigB*, *ssrA-ssrB* und *arlS-srlR* (GIRAUDO ET AL., 1997; KULLIK ET AL., 1998; FOURNIER ET AL., 2001; YARWOOD ET AL., 2001) beeinflussen zusätzlich die Regulierung der Virulenzfaktoren.

### 2.3 *S. aureus* als Verursacher von Lebensmittelintoxikationen

*S. aureus* gilt weltweit als einer der wichtigsten Lebensmittelintoxikationserreger (GENIGEORGIS, 1989; BERGDOLL, 1990; NOTERMANS UND HOOGENBOOM-VERDEGAAL, 1992; LOIR ET AL., 2003). Er besitzt insbesondere auf Grund seiner Fähigkeit, hitzestabile Enterotoxine und Enzyme zu produzieren, große klinische Bedeutung (FOSTER UND MCDEVITT, 1994). Sein Vorkommen in Lebensmitteln wird als Indikator für mangelnde hygienische Bedingungen betrachtet (NOTERMANS UND WERNARS, 1991; TRANTER UND BREHM, 1990; OLSEN ET AL., 1995), rechtliche Regelungen für Milch und Milcherzeugnisse sind entsprechend in der Milchverordnung festgelegt.

Erkrankungen durch Staphylokokken-Enterotoxine (SE) stellen eine echte Lebensmittelintoxikation dar und sind in der Regel durch eine akute Gastroenteritis gekennzeichnet. Eins bis sechs Stunden nach der Aufnahme des Toxins kommt es zu einem heftigen, über mehrere Stunden anhaltenden Erbrechen. Auch Durchfälle und Bauchschmerzen sowie gelegentlich leichte Kopfschmerzen oder Muskelkrämpfe und Schwitzen können auftreten. Die Leukozytenzahl kann erhöht sein. Der begleitende allgemeine Erschöpfungszustand und die eventuell einhergehende Kreislaufschwäche (erhöhte Pulsfrequenz, erniedrigter Blutdruck) dauern höchstens eins bis zwei Tage an. Danach tritt eine völlige Restitution

ein. Lediglich in Extremfällen (hohe Toxinmengen bei Kindern, geschwächten Personen mit weiteren Komplikationen) können Todesfälle auftreten (BERGDOLL, 1989).

Einige Staphylokokken-Stämme produzieren nachweisbare Enterotoxin-Mengen nach 24-stündiger Bebrütung bei 30 °C (PEREIRA ET AL., 1991). In mit *S. aureus*-Kulturen beimpftem Anreicherungsmedium sowie in mit *S. aureus* kontaminierten Pilzen war SEA bei 37 °C bereits nach weniger als 3 h nachweisbar (RASOOLY UND RASOOLY, 1998). Um eine Intoxikation auszulösen, müssen ungefähr 10 – 50 ng/g SE in einem Lebensmittel enthalten sein. Vor allem SEA (in ca. 75 % der Fälle) ist an Lebensmittelvergiftungen beteiligt, SEB dagegen nur gelegentlich. Versuche mit Freiwilligen ergaben, dass 0,05 – 0,4 µg SE/kg Körpergewicht, das entspricht 3,5 – 28 µg bei einer Person mit 70 kg, die typischen Symptome auslösen, allerdings können auch Mengen von weniger als 1 µg milde Symptome bei empfindlichen Personen hervorrufen. EVENSON ET AL. (1988) berichten in einer vielzitierten Publikation, dass durchschnittlich sogar schon 94 – 184 ng an SEA ausgereicht hatten, um bei Schulkindern Erbrechen zu provozieren. Die für den Ausbruch verantwortliche Schokoladenmilch enthielt in den untersuchten Packungen zwischen 0,4 und 0,7 ng SEA/ml.

Damit es zu einer Lebensmittelvergiftung durch Staphylokokken-Enterotoxine kommen kann, müssen nach BERGDOLL (1989) drei Bedingungen erfüllt sein: Das beteiligte Lebensmittel muss ein gutes Medium für Staphylokokken darstellen, enterotoxinbildende Stämme müssen vorhanden sein und sie müssen sich in Abhängigkeit von der Temperatur ausreichend lange vermehren, um Toxin produzieren zu können. MOSSEL UND VAN NETTEN (1990) stellten analog fest, dass bei einem Ausbruch einer Staphylokokken-Intoxikation mindestens zwei verursachende Ereignisse bei der Verarbeitung eines Lebensmittels vorhanden sein müssen: eine Kontamination und eine fehlerhafte Behandlung oder Lagerung. Langes ungekühltes Aufbewahren oder Warmhalten von großen Mengen an Speisen bei ungünstigen Temperaturen ist somit ein wichtiger Risikofaktor für den Ausbruch von Lebensmittelvergiftungen in der Gastronomie, bei Veranstaltungen oder in Einrichtungen der Massenverpflegung. In Privathaushalten kann insbesondere mangelnde Hygiene zu Staphylokokken-Intoxikationen führen. Im Bereich der industriellen Verarbeitung spielen vor allem folgende Faktoren eine Rolle: ausreichende Erhitzung natürlich kontaminierter Lebensmittel, Abkühlungsdauer nach

Erhitzen, Rekontamination, Lagerungsdauer und Kühlung (MOSEL UND VAN NETTEN, 1990).

Lebensmittelvergiftungen durch SE nach dem Verzehr von Milcherzeugnissen wurden von einer Vielzahl von Autoren weltweit beschrieben. Erkrankungen, die auf den Verzehr von Konsummilch zurückgeführt werden konnten, kommen allerdings selten vor (TRANTER UND BREHM, 1990). Dies ist vor allem ein Resultat der obligatorischen technologischen Verarbeitungsprozesse, insbesondere der Wärmebehandlungsverfahren und Kühlung, die eine Vermehrung und damit einhergehende Enterotoxinbildung von *S. aureus* normalerweise ausschließen. Dagegen stellt *S. aureus* in Rohmilchkäse unter ungünstigen Bedingungen ein Problem dar. So wurden nach JERMINI ET AL. (1990) 1989 fünf Ausbrüche von *S. aureus*-Intoxikationen in der Schweiz gemeldet, die auf den Genuss von Rohmilchfrischkäse zurückzuführen waren. In Schottland wurde eine *S. aureus*-Intoxikation durch Schafskäse (BONE ET AL., 1989) hervorgerufen. In New York ereignete sich 1981 ein Ausbruch mit 16 Erkrankten, der durch mit *S. aureus* kontaminierten Käse verursacht wurde (ALTEKRUSE ET AL., 1998). Ein Rohmilchkäse, der von einem ökologisch wirtschaftenden Betrieb in der Nähe von Göttingen angeboten wurde, löste bei 30 Konsumenten Vergiftungserscheinungen aus, die auf *S. aureus* zurückgeführt wurden (ANONYM, 1998). Auch in Thüringen wurde 1998 eine *S. aureus*-Intoxikation auf Rohmilchkäse zurückgeführt. Bei Untersuchungen sowohl der Rohmilchkäse als auch eines Einzelgemelkes einer Kuh des Milchviehbetriebes, aus dem die verwendete Rohmilch stammte, und bei Umgebungsuntersuchungen im Herstellerbetrieb wurde der gleiche *S. aureus*-Stamm nachgewiesen (EPIDEMIOLOGISCHES BULLETIN 14/1999).

Die Häufigkeit des Auftretens von *S. aureus*-Intoxikationen differiert in den einzelnen Ländern stark, abhängig von der Geographie und den lokalen Verzehrgeohnheiten (MOSEL UND VAN NETTEN, 1990; LOIR ET AL., 2003). In Deutschland ist die Zahl der gut dokumentierten Fälle eher gering, es kann aber davon ausgegangen werden, dass hier eine hohe Dunkelziffer existiert. In Deutschland wurden in den Jahren 1993 - 1998 insgesamt 933 Ausbrüche von lebensmittelbedingten Erkrankungen gemeldet. Davon wurden insgesamt 26 Ausbrüche (2,8 %) nachgewiesenermaßen von *S. aureus* verursacht (TIRADO UND SCHMIDT, 2002). In 1999 und 2000 wurden lediglich zwei Fälle mit sechs Erkrankten gemeldet (SCHMIDT UND GERVELMEYER, 2003).

Vom Regionalbüro für Europa der World Health Organisation (WHO) wurde 1980, vor dem Hintergrund eines allgemeinen, kontinuierlichen Anstiegs lebensmittelbedingter infektiöser Enteritiden in Europa, ein „Surveillance Programme for Control of Foodborne Infections in Europe“, an dem inzwischen 51 Staaten beteiligt sind, initiiert. Die Zielsetzung ist es, Daten aus einzelnen Ländern zu sammeln und in Bezug auf epidemiologische Zusammenhänge, Ursachen, Trends sowie Vorbeuge- und Bekämpfungsmaßnahmen von Erkrankungen durch Lebensmittel auszuwerten (SCHMIDT UND GERVELMEYER, 2003). In Deutschland erfolgt die Datenerfassung über die Meldung von Lebensmittelinfektionen und -intoxikationen nach § 6 Abs. 1, Punkt 2 Infektionsschutzgesetz (IfSG) und weiterhin über das freiwillige „Zentrale Überwachungsprogramm für Lebensmittelinfektionen und –intoxikationen“ (ZEVALI). Nach Definition des Infektionsschutzgesetzes § 6 Abs. 1, Punkt 2b muss der Verdacht auf oder die Erkrankung an einer mikrobiell bedingten Lebensmittelvergiftung oder einer akuten, infektiösen Gastroenteritis gemeldet werden, wenn zwei oder mehr gleichartige Erkrankungen auftreten, bei denen ein epidemischer Zusammenhang wahrscheinlich ist oder vermutet wird.

## 2.4 Staphylokokken-Enterotoxine

Ein Teil der *S. aureus*-Stämme besitzt das aus lebensmittelhygienischer Sicht wichtigste Pathogenitätsmerkmal, die Enterotoxinbildung in kontaminierten Lebensmitteln (SU UND WONG, 1997; BALABAN UND RASOOLY, 2000; DINGES ET AL., 2000; LOIR ET AL., 2003).

### 2.4.1 Struktur und physikalisch-chemische Eigenschaften

Die Staphylokokken-Enterotoxine sind in Wasser und Salzlösungen leicht lösliche Proteine mit einem Molekulargewicht von 20.000-30.000. Ihr isoelektrischer Punkt liegt zwischen 5,0 und 8,6. Sie stellen einfache Polypeptidketten dar, die einen relativ hohen Gehalt an Lysin, Trypsin, Aspartam- und Glutaminsäure aufweisen. Die Sekundärstruktur stellt sich als Mischung von  $\alpha$ -Helices und  $\beta$ -Faltblättern dar. Kristallographische Studien von Enterotoxinen zeigten, dass die verschiedenen Proteine eine ähnliche dreidimensionale Struktur haben (DINGES ET AL., 2000; SCHLIEVERT ET AL., 2000). Sie sind ellipsoid und besitzen zwei unterschiedlich große Domänen, Domäne A und Domäne B. Die kleinere Domäne B beinhaltet die sogenannte Oligonukleotid-Oligosaccharid-bindende Region (O/B-fold), wie sie auch bei Staphylokokken-Nukleasen und anderen Exotoxinen vorkommt. Die damit verbundenen typischen Bindungsfunktionen wurden allerdings bei SE noch nicht beobachtet. Am Ende der Domäne B befindet sich die für viele SE charakteristische Zystinschleife mit der Disulfidbrücke. Das Verbindungsstück zwischen beiden Domänen setzt sich aus einer Reihe von  $\alpha$ -Helices zusammen. Die größere Domäne A enthält sowohl den Amino- als auch den Carboxylterminus (BOHACH UND SCHLIEVERT, 1989; BOHACH ET AL., 1990; MURZIN, 1993; SCHLIEVERT ET AL., 2000).

*S. aureus*-Enterotoxine weisen generell eine erhebliche Stabilität auf, weshalb sie auch in Lebensmitteln besonders problematisch sind. So sind die Enterotoxine gegenüber den Enzymen des Verdauungstraktes wie Chymotrypsin, Renin und Papain resistent. Erst bei pH-Werten  $\leq 2$  wird SEB durch Pepsin inaktiviert (SCHANTZ ET AL., 1965). Einige bakterielle Proteasen sind jedoch in der Lage, Enterotoxine abzubauen (BERGDOLL, 1989). ROSE ET AL. (1988) stellten eine extrem hohe Stabilität der Staphylokokken-Enterotoxine gegenüber  $\gamma$ -Bestrahlung fest. Unempfindlich sind die Enterotoxine auch gegen Gefriertrocknen (BORJA ET AL., 1972).

Eine weitere und aus lebensmittelhygienischer Sicht besonders bedeutsame Eigenschaft der Enterotoxine ist ihre Hitzestabilität. Im Gegensatz zu den Staphylokokken selbst werden die SE durch die bei der Herstellung und Zubereitung von Lebensmitteln angewendeten Temperaturen nicht inaktiviert (DENNY ET AL., 1971; HERNANDEZ ET AL., 1993). ANDERSON ET AL. (1996) zeigten im Tierversuch mit Katzen, dass SEA sogar nach 28 min bei 121 °C (oder 15 min bei 127 °C) die biologische Aktivität größtenteils behielt. DENNY ET AL. (1966) stellten nur einen Aktivitätsverlust, aber keine vollständige Inaktivierung nach 8 - 11 min bei 121°C anhand eines Bioassay (Katzen, Affen) fest.

#### 2.4.2 Biologische und serologische Eigenschaften

Untersuchungen über SE begannen mit Analysen von *S. aureus*-Stämmen, die in Staphylokokken-Lebensmittelvergiftungen verwickelt waren. So wurden zunächst SEA, SEB und SEC bekannt. In letzter Zeit haben insbesondere Daten, die aus teilweisen oder kompletten Genomsequenzanalysen resultieren, die Identifizierung einiger neuer SE-Typen erlaubt. Diese neuen SE-Typen wurden aufgrund von Sequenzhomologien und strukturellen Ähnlichkeiten mit bekannten SE verglichen (LOIR ET AL., 2003). Als Reinprotein dargestellt und als Toxine identifiziert wurden bisher nur SEA-SEE sowie SEH. SEC wird in drei Unterarten (SEC<sub>1</sub>, SEC<sub>2</sub> und SEC<sub>3</sub>) aufgegliedert, die sich in ihren serologischen Eigenschaften geringfügig unterscheiden (MARR ET AL., 1993). Einige antigene Determinanten sind den drei SEC-Toxinen gemeinsam, so dass jedes SEC-Toxin Kreuzreaktionen mit spezifischen Antikörpern gegen die beiden anderen SEC-Toxine zeigt (REISER ET AL., 1984). In der Literatur sind weitere Varianten von SEC (SEC<sub>canine</sub>, SEC<sub>bovine</sub>, SEC<sub>ovine</sub> und SEC<sub>goat</sub>) beschrieben (BOHACH ET AL., 1990; MARR ET AL., 1993; EDWARDS ET AL., 1997).

Neben den fünf klassischen, hauptserologischen Enterotoxinen SEA bis SEE fand man weitere Enterotoxine (bzw. Toxingene), die als SEG bis SEU bezeichnet werden (KURODA ET AL., 2001; YARWOOD ET AL., 2002; BABA ET AL., 2002; LETERTRE ET AL., 2003b; LOIR ET AL., 2003; OMOE ET AL., 2003; ORWIN ET AL., 2003). SEG<sub>v</sub> wurde als eine Variante von SEG von ABE ET AL. (2000) beschrieben.

Von der Gruppe der sogenannten Staphylokokken-Superantigene besitzen nur die SE emetische Aktivität (HOVDE ET AL., 1994; DINGES ET AL., 2000). Bezüglich der Wirkungsweise der SE beim Auslösen von Lebensmittelvergiftungen wird vermutet, dass die SE einen direkten Effekt auf intestinale Epithelien und auf den Nervus Vagus haben, so dass das emetische Zentrum und der Darmtrakt stimuliert werden (BERGDOLL, 1983; ARBUTHNOTT ET AL., 1990). Eine Zystin-Schleife im Zentrum des Moleküls sowie deren benachbarte Aminosäuren scheinen in Bezug auf die emetische Aktivität der SE eine wichtige Rolle zu spielen (ORWIN ET AL., 2001). SEI fehlt die Zystin-Schleifenstruktur; seine emetische Wirkung ist erheblich niedriger als die anderer SE (MUNSON ET AL., 1998). Auch bei Sequenzanalyse von SEK und SEL konnte keine Zystinschleife nachgewiesen werden (ORWIN ET AL., 2001 und 2003). Untersuchungen mit rekombinantem SEL ergaben ebenfalls keine emetische Aktivität (ORWIN ET AL., 2003).

In Verbindung mit dem Toxin-Schock-Syndrom im Zusammenhang mit klinischen Infektionen wurde die Bildung des mit SEF bezeichneten Toxins beschrieben (BERGDOLL ET AL., 1981). REISER ET AL. (1983) konnten die emetische Wirkung von SEF im Affenfütterungstest als Hauptkriterium der Enterotoxine allerdings nicht bestätigen, so dass dieses Toxin als „Toxic Shock Syndrome Toxin-1“ (TSST-1) bezeichnet wurde. Zwei Varianten von TSST-1 sind bekannt: TSST-1<sub>ovine</sub> und TSST-1<sub>bovine</sub> (HO ET AL., 1989). In Tabelle 2 sind die bis heute beschriebenen Staphylokokkenenterotoxine und ihre charakteristischen Merkmale aufgelistet.

Brauchbare Daten zur minimalen toxischen Dosis für SE existieren derzeit nur für wenige Vertreter dieser Toxingruppe (Tab. 2). Für SEA, SEB und SEC1 wurde eine minimale orale Dosis beim Menschen von  $<1\mu\text{g}/\text{kg}$  angegeben. SED, SEE und SEH sind vergleichsweise weniger toxisch, die emetische Dosis beim Affen liegt bei 10 - 30  $\mu\text{g}/\text{Tier}$ . Die anderen SE sind aufgrund des gegenwärtigen Kenntnisstandes weniger toxisch als SEA. Für zahlreiche neuere, teilweise im Hinblick auf das tatsächliche Vorkommen nur postulierte Toxine liegen keinerlei Angaben vor. Insbesondere für die aufgrund molekularbiologischer Untersuchungen definierten Toxingene *seg* bis *seu* liegen, mit Ausnahme der Gensequenzen, wenige experimentelle Daten vor.

**Tabelle 2:** Charakteristische Eigenschaften der Staphylokokkenenterotoxine

SE-Typ	Molekulargewicht (kDa)	Gengröße (Bp)	Isoelektrischer Punkt	minimale emetische Dosis beim Rhesus Affen $\mu\text{g/kg KGW}$ bzw. $\mu\text{g/Tier}$	Referenz
SEA	27.100	774	7,26	1	SCHANTZ ET AL., 1972
SEB	28.336	801	8,6	1	SCHANTZ ET AL., 1965
SEC1	27.531	801	8,6	1	BOHACH UND SCHLIEVERT, 1987 SCHLIEVERT ET AL., 2000
SEC2	27.589	801	7,0	5-10 $\mu\text{g/Tier}$	AVENA UND BERGDOLL, 1967 BOHACH UND SCHLIEVERT, 1989
SEC3	26.900	801	8,2	5-10 $\mu\text{g/Tier}$	REISER ET AL., 1984
SEC <sub>bovine</sub>	27.618	k.A.	7,6	k.A.	MARR ET AL., 1993
SEC <sub>ovine</sub>	27.517	k.A.	7,6	k.A.	MARR ET AL., 1993
SEC <sub>goat</sub>	27.600	k.A.	7,0	k.A.	MARR ET AL., 1993
SEC <sub>canine</sub>	27.600	720	7,0	10	EDWARDS ET AL., 1997
SED	27.300	777	7,4	5-10	CHANG UND BERGDOLL, 1979
SEE	29.600	774	7,0	10 $\mu\text{g/Tier}$	BORJA ET AL., 1972
SEG	27.042	777	5,7	> 80	MUNSON ET AL., 1998
SEH	25.210	726	5,7	< 30	SU UND WONG, 1995
SEI	24.928	729	k.A.	>150	MUNSON ET AL., 1998
SEJ	28.565 <sup>1</sup>	806	8,65 <sup>1</sup>	k.A.	ZHANG ET AL., 1998
SEK	25.539	729	6,5	k.A.	ORWIN ET AL., 2001
SEL	24.593 <sup>1</sup>	723	8,66 <sup>1</sup>	> 100 nicht emetisch	FITZGERALD ET AL., 2001 ORWIN ET AL., 2003
SEM	24.842 <sup>1</sup>	722	6,24 <sup>1</sup>	k.A.	JARRAUD ET AL., 2001
SEN	26.067 <sup>1</sup>	720	6,97 <sup>1</sup>	k.A.	JARRAUD ET AL., 2001
SEO	26.777 <sup>1</sup>	783	6,55 <sup>1</sup>	k.A.	JARRAUD ET AL., 2001
SEP <sup>2</sup>	k.A.	782	k.A.	k.A.	KURODA ET AL., 2001
SEQ	28.200	728	7,5	> 50 nicht emetisch	ORWIN ET AL., 2003
SER <sup>2</sup>	> 27.000	779	k.A.	k.A.	OMOE ET AL., 2003
SEU <sup>2</sup>	k.A.	785	k.A.	k.A.	LETERTRE ET AL., 2003b

<sup>1</sup> : Molekulargewicht und isoelektrischer Punkt aufgrund der Gengröße bzw. der Gensequenzen postuliert.

<sup>2</sup> : Existenz aufgrund molekularbiologischer Untersuchungen postuliert, Protein (Toxin) bisher noch nicht dargestellt und charakterisiert.

k.A. : keine Angaben

### 2.4.3 Toxinbildung in Lebensmitteln

Die Toxinbildung im Lebensmittel hängt von zwei Voraussetzungen ab, zum einen von der Kontamination mit Enterotoxin-bildendem *S. aureus* und zum anderen von geeigneten Faktoren, die eine Vermehrung auf zur Toxinbildung erforderliche Keimzahl ermöglichen. Diese Faktoren sind nach SINELL (2004) innere Faktoren („intrinsic factors“) wie z.B. Nährstoffgehalt, Wasseraktivität („ $a_w$ - activity of water“), pH-Wert, Redoxpotential und äußere Faktoren („extrinsic factors“) wie z.B. Temperatur, Sauerstoffgehalt der Umgebung, Gaspartialdrücke sowie implizierte Parameter („implicit parameter“) wie z.B. Wechselwirkungen mit anderen Mikroorganismen.

Aufgrund des komplexen Zusammenspiels der Faktoren im Lebensmittel ist der Einfluss einzelner Parameter auf die Toxinbildung im Lebensmittel schwer zu ermitteln. Im Folgenden werden die wichtigen und einfach-messbaren Parameter hier beispielsweise für Käse, näher beschrieben.

*S. aureus* muss sich im Käse mindestens auf ein Niveau von  $10^6$  KBE *S. aureus*/g vermehren, um Enterotoxine in ausreichender Menge zu bilden. Das Vorkommen von Enterotoxinen im Käse wird weniger durch den Verlauf als vielmehr durch die Höhe der Keimzahlen bestimmt. Der Verlauf der *S. aureus*-Keimzahl variiert nach erstem Herstellungstag und Reifungs- bzw. Lagerungsperiode. Die Höhe der Anfangskeimzahlen der Kesselmilch ist von entscheidender Bedeutung für den weiteren Verlauf der Keimzahlen. Je höher die anfängliche *S. aureus*-Zahl, desto größer ist die Wahrscheinlichkeit, dass die einer Vermehrung entgegenwirkenden Einflüsse überwunden werden (SANTOS UND GENIGEORGIS, 1981). Auch ein wichtiger Punkt hinsichtlich der Vermehrung von *S. aureus* in Käse sind die Reifungszeiten. Eine Vermehrung von *S. aureus* wird durch lange Lagerungszeiten begünstigt (ASPERGER, 1991).

Begünstigend für die Entwicklung von *S. aureus* in Käse sind außerdem ungenügende Kühlung oder hohe Wassergehalte des Produktes (ASPERGER, 1991; COENEN, 2000). In Käsesorten mit höheren Wassergehalten stellte COENEN (2000) gegen Ende der Lagerungszeit noch Keimzahlen von  $10^6$  - $10^7$  KBE *S. aureus*/g fest.

Zum anderen verhindert eine kompetitive Hemmung von *S. aureus* durch die Begleitflora in der Milch ein starkes Wachstum dieser Keime und somit eine Toxinbildung (SPECKER, 1996). Bei der Käseherstellung kommt eine Mischung verschiedener Milchsäurebakterien zur Anwendung, die als Starterkultur bezeichnet wird. Diese Bakterien sind in der Lage, aus Laktose Milchsäure zu bilden, was eine Absenkung des pH-Wertes in Käse zur Folge hat. Die entstehenden, niedrigen pH-Werte wirken hemmend auf das Wachstum von *S. aureus*. Ist jedoch die weitere Entwicklung der Milchsäurebakterien z. B. durch Hitze, einen Salzgehalt von 10 - 12 %, Antibiotikarückstände oder Phagenbefall vermindert, resultiert daraus eine ungenügende Säuerung und das Verbleiben von Laktose. Dies kann dann - möglicherweise in Kombination mit dem Fehlen von durch die Starterkulturen eventuell produzierten weiteren antagonistischen Faktoren - auch im späteren Verlauf der Reifung ein vermehrtes Wachsen von *S. aureus* und Produktion von Enterotoxinen zur Folge haben (COENEN, 2000; PSONI, 2003; SINELL, 2004). Konzentration, Aktivität und Zusammensetzung der Starterkultur sind von entscheidender Bedeutung für den Verlauf der *S. aureus*-Keimzahlen im Käse und der damit verbundenen möglichen Bildung von Enterotoxinen.

Die Enterotoxine werden überwiegend in der postexponentiellen Wachstumsphase von *S. aureus* gebildet. Die intrazellulären Faktoren beruhen auf genetischen Grundlagen. Jedes Toxin wird zunächst als Präcursor-Protein einschließlich einer je nach Toxintyp unterschiedlich langen Signalsequenz in der Bakterienzelle gebildet. Nach der Abspaltung dieser Sequenz liegt das Toxin in seiner aktiven Form vor (BETLEY ET AL., 1992; DINGES ET AL., 2000; BALABAN UND RASOOLY, 2000).

Staphylokokken-Enterotoxine werden vor allem von Thermonuklease-positiven Stämmen von *S. aureus* gebildet. Wie hoch der Anteil an Enterotoxinbildnern unter den verschiedenen Stämmen ist, war Gegenstand zahlreicher Untersuchungen. Nach BERGDOLL (1989) können ca. 40 – 50 % der *S. aureus*-Stämme aus Isolaten von gesunden Menschen Enterotoxine bilden. Vereinzelt wurden auch Enterotoxin-bildende Koagulase-negative Staphylokokken bzw. Mikrokokken nachgewiesen (UDO ET AL., 1999; DANIELSSON UND HELLBERG, 1977; OLSVIK ET AL., 1982).

VERNOZY-ROZAND ET AL. (1996) untersuchten aus Ziegenmilch und Ziegenkäse isolierte Koagulase-negative Staphylokokken auf Enterotoxinbildung und stellten fest, dass 10 von

187 Koagulase-negativen Staphylokokken-Isolaten SE produzierten. Über die Enterotoxinbildung von Koagulase-negativen Staphylokokken wurde auch im Zusammenhang mit dem Ausbruch einer Staphylokokken-Lebensmittelvergiftung berichtet (LOTTER UND GENIGEORGIS, 1975; DANIELSON UND HELLBERG, 1977; OLSVIK ET AL., 1982; CRASS UND BERGDOLL, 1986). Enterotoxinbildung wird außerdem für vom Hund und Pferd isolierte *S. intermedius*-Stämme sowie für *S. hyicus* subsp. *hyicus* beschrieben (HOOVER ET AL., 1983; ADESIYUN 1984; FUKUDA ET AL., 1984; BECKER ET AL., 2001). Im Hinblick auf Enterotoxinbildung in Milcherzeugnissen dürften aber *S. aureus* vom Rind bzw. vom Menschen die größte Bedeutung besitzen.

#### 2.4.4 Rechtliche Regelungen für *S. aureus* bzw. Enterotoxine in Milch und Milcherzeugnissen

Basis zur Beurteilung von *S. aureus* in Käse ist die „Verordnung über die Hygiene- und Qualitätsanforderungen an Milch und Erzeugnisse auf Milchbasis“ (Milchverordnung). In dieser Verordnung sind Normen zum Vorkommen von *S. aureus* in Käse aus Rohmilch und thermisierter Milch und in Weichkäse aus wärmebehandelter Milch sowie für *S. aureus* in Rohmilch zur Herstellung von Rohmilcherzeugnissen festgelegt.

Die für diese Arbeit relevanten Normen zum Vorkommen von *S. aureus* in Ziegenkäse sind in Tabelle 3 zusammengefasst.

**Tabelle 3:** Normen der MilchV (2000) zum Vorkommen von *S. aureus* (KBE/ml oder g) in Rohmilch und Käse.

Produkt	Ebene	m	M	n	c
Rohmilch zur Herstellung von Rohmilchprodukten	Sammeln im Erzeugerbetrieb und Anliefern in Be- oder Verarbeitungsbetrieb*	500	2.000	5	2
Käse aus Rohmilch und thermisierter Milch	Stichprobenkontrollen im Be- oder Verarbeitungsbetrieb**	1.000	10.000	5	2
Weichkäse aus wärmebehandelter Milch		100	1.000	5	2
Frischkäse		10	100	5	2

m = Schwellenwert; M = Höchstwert; n = Gesamtzahl untersuchter Proben; c = Anzahl der Proben zwischen m und M; \*: (MilchV Anlage 4 Pkt. 1.3); \*\*: (MilchV Anlage 6, Pkt. 3.3.1.2)

Für das Jahr 2006 ist eine umfassende gemeinschaftsrechtliche und auch nationalrechtliche Neuregelung im Lebensmittelbereich zu erwarten. Der Verordnungsentwurf der Kommission über mikrobiologische Kriterien für Lebensmittel, mit dem der Bereich des Hygienerechts vollständig neu geregelt wird, wird als unmittelbar geltendes Gemeinschaftsrecht im Jahr 2006 verbindlich.

Die Verordnung (EG) Nr. 2073/2005 der Kommission vom 15. November 2005 über mikrobiologische Kriterien für Lebensmittel führt eine große Zahl produktbezogener Einzelrichtlinien zusammen. Auf nationaler Ebene sind als Folge der Neuregelungen umfangreiche Anpassungen der betreffenden Spezialvorschriften (z.B. Fleisch- und Geflügelfleischhygienerecht, Milchverordnung, Fleischhygieneverordnung usw.) erforderlich.

Die künftigen Regelungen für Milch und Milcherzeugnisse, wie sie in der Verordnung der Kommission aufgeführt sind, sind in Tabelle 4 zusammengefasst. Insbesondere ist für diese Arbeit von Bedeutung, dass ab festgestellten *S. aureus*-Keimzahlen von  $>10^5$  KBE/g die Partien auf Staphylokokken-Enterotoxine zu untersuchen sind. Eine Definition, welchen Umfang ein solcher Toxinnachweis haben muss, wird nicht gegeben. Da kommerzielle Proteintests (ELISA und andere Antikörpertests) nur die Toxine A-E erfassen, besteht Unklarheit, inwieweit auch die Toxine neueren -potentiellen- Toxine hier eine Rolle spielen.

**Tabelle 4:** Grenzwerte für Koagulase-positive Staphylokokken sowie Staphylokokken-Enterotoxine in Milch und Milcherzeugnissen gemäß der Verordnung (EG) Nr. 2073/2005 der Kommission vom 15. November 2005 über mikrobiologische Kriterien für Lebensmittel.

Lebensmittelkategorie	Mikroorganismus	Probenahmeplan <sup>1</sup>		Grenze		Analytisches Referenzverfahren <sup>2</sup>	Stufe, für die das Kriterium gilt	Maßnahmen im Fall unbefriedigender Ergebnisse
		n	c	m	M			
Käse aus Rohmilch	Koagulase-positive Staphylokokken	5	2	10 <sup>4</sup> KBE/g	10 <sup>5</sup> KBE/g	EN/ISO 6888-1,2	Zu einem Zeitpunkt während der Herstellung, zu dem die höchste Staphylokokken-Zahl erwartet wird <sup>4</sup>	Verbesserungen in der Herstellungshygiene und bei der Auswahl der Rohstoffe. Sofern Werte >10 <sup>5</sup> KBE/g festgestellt werden, ist die Partie Käse auf Staphylokokken-Enterotoxine zu untersuchen.
Käse aus wärmebehandelter Milch <sup>3</sup> und gereifter Käse aus Milch oder Molke, die einer stärkeren Wärmebehandlung unterzogen wurde als der Wärmebehandlung unterhalb der Pasteurisationstemperatur <sup>3</sup>	Koagulase-positive Staphylokokken	5	2	100 KBE/g	1000 KBE/g	EN/ISO 6888-1,2	Ende des Herstellungsprozesses	Verbesserungen in der Herstellungshygiene. Sofern Werte >10 <sup>5</sup> KBE/g festgestellt werden, ist die Partie Käse auf Staphylokokken-Enterotoxine zu untersuchen.
Nicht gereifter Weichkäse (Frischkäse) aus Milch oder Molke, die einer stärkeren Wärmebehandlung unterzogen wurde als der Wärmebehandlung unterhalb der Pasteurisationstemperatur <sup>3</sup>	Koagulase-positive Staphylokokken	5	2	10 KBE/g	100 KBE/g	EN/ISO 6888-1,2	Ende des Herstellungsprozesses	Verbesserungen in der Herstellungshygiene. Sofern Werte >10 <sup>5</sup> KBE/g festgestellt werden, ist die Partie Käse auf Staphylokokken-Enterotoxine zu untersuchen.

<sup>1</sup>: n = Anzahl der Probeneinheiten der Stichprobe; c = Anzahl der Probeneinheiten, deren Werte zwischen m und M liegen.

<sup>2</sup>: Es ist die neueste Fassung der Norm zu verwenden.

<sup>3</sup>: Ausgenommen Käse, bei denen der Hersteller den zuständigen Behörden nachweisen kann, dass kein Risiko einer Belastung mit Staphylokokken-Enterotoxinen besteht

<sup>4</sup>: Die Zahl der Staphylokokken ist gewöhnlich zwischen 48 und 72 Stunden nach Beginn des Herstellungsprozesses am höchsten.

## **2.4.5 Nachweis von Staphylokokken-Enterotoxinen**

### **2.4.5.1 Biologische Methoden**

Die ersten Nachweismethoden für SE basierten auf dem direkten Nachweis der toxischen Wirkung im Tierversuch wie z.B. bei dem im Jahre 1948 entwickelten Rhesusaffen-Fütterungstest. Die orale Verabreichung der Toxine löst bei dieser Tierart, ähnlich wie bei einer Intoxikation des Menschen, Erbrechen aus (SURGALLA ET AL., 1953; BERGDOLL, 1988). Da Tierversuche jedoch aus ethischen Gründen möglichst ersetzt werden sollten und außerdem hohe Kosten hinsichtlich Anschaffung, Haltung und Fütterung der Affen verursachen, wird dieser Test heute nur noch in Ausnahmefällen und nicht in der Lebensmittelhygiene eingesetzt. Auch aufgrund seiner relativ niedrigen Nachweisempfindlichkeit (5 – 10 mg/Tier) eignet sich der Affenfütterungstest ohnehin nicht für die Routinediagnostik (RASOOLY ET AL., 1997). SCHEUBER ET AL. (1983) beschrieben eine weitere biologische Methode, bei der die spezifische Hautreaktion von sensibilisierten Meerschweinchen nach intradermaler Injektion von SE bewertet wird. Die Nachweisgrenze dieses Verfahrens liegt bei 10 pg SEB, die Versuchsdauer bei 10 - 15 Minuten (TRANTER UND BREHM, 1990).

In einer weiteren biologischen Nachweismethode (HU ET AL., 1999) wird die emetische Reaktion nach oraler Verabreichung von SEA und intraperitonealer Injektion an Spitzmäuse beurteilt. Mit diesem Verfahren wurde eine 50 %-emetische Dosis ( $ED_{50}$ ) von SEA von 32 mg pro kg Körpergewicht (perorale Verabreichung) bzw. 3 mg (intraperitoneal) festgestellt. Eine andere biologische Methode mit Frettchen wurde von WRIGHT ET AL. (2000) beschrieben. Dieses Verfahren kann 5 mg oral verabreichtes SEB innerhalb von  $106 \pm 36$  Minuten nachweisen. Weitere biologische Nachweismethoden wie z.B. der Katzentest, der Froschspermatest oder der Hühnerembryontest sind aufgrund ihrer geringen Spezifität und/oder Sensitivität zum Nachweis von Enterotoxinen ebenfalls nicht mehr geeignet (SOMMERFELD UND TERPLAN, 1975).

In den letzten Jahren wurden auch Zellkulturtests zum Nachweis bestimmter SE entwickelt. HAWRYLUK UND HIRSHFIELD (2002) beschreiben den Nachweis von SEA auf Basis seiner superantigenen Eigenschaften. Bei Vorhandensein von SEA wird in cytotoxischen T-Zellen eine cytotoxische Reaktion gegen bestimmte Zellkulturzellen (Raji-Zellen) induziert, die kolorimetrisch mit dem CytoTox 96 Zelllysisdetektionskit

nachgewiesen wird. Die Nachweisempfindlichkeit des Tests liegt laut Autoren im Picomol-Bereich. Ein weiteres Testsystem basiert auf der typischen T-Zell-proliferativen Wirkung von SEA (RASOOLY ET AL., 1997). Dabei werden Lymphozytenzellkulturen mit SEA-Reintoxin oder mit künstlich mit SEA kontaminierten Lebensmitteln versetzt, zwei bis fünf Tage inkubiert und anschließend die Stärke der T-Zell-Proliferation durch radioaktive oder kolorimetrische Markierung ermittelt. Die Nachweisgrenze liegt bei 1 ng SEA/ml. Nachteilig bei beiden Tests ist allerdings, dass sie beide Superantigenitätseigenschaften nachweisen, die nicht nur SE-spezifisch sind.

#### 2.4.5.2 Immunologische Verfahren

Die immunologischen Verfahren basieren auf der Produktion von spezifischen Antikörpern gegen bestimmte SE. Erste Tests beruhten auf einem Nachweis von Präzipitationsreaktionen von Antigen und Antikörper; später wurden vor allem Methoden entwickelt, die über die Markierung eines Reaktionspartners eine Quantifizierung der ablaufenden Immunreaktionen, und damit der nachzuweisenden Enterotoxine, erlauben. Die wichtigsten Methoden sollen im Folgenden kurz charakterisiert werden:

##### 2.4.5.2.1 Immundiffusionsverfahren

In der einfachen linearen **Immundiffusion** nach OUDIN (1952) wird antiserumhaltiger Agar in einem Röhrchen mit Enterotoxin-haltiger Lösung überschichtet. Im positiven Fall bildet sich eine Präzipitationsfront, deren Absenkungsstrecke im Röhrchen der Enterotoxinmenge proportional ist. Bei der einfachen radialen Diffusion nach MANCHINI ET AL. (1965) werden in eine antiserumhaltige Agarschicht Vertiefungen gestanzt, aus denen das applizierte Enterotoxin radial diffundiert, so dass kreisförmige Präzipitate entstehen. Die Angaben über die Nachweisgrenze variieren von 0,15 µg bis 5 µg Toxin/ml (COLLINS ET AL., 1972; SOMMERFELD UND TERPLAN, 1975). Eine doppelte lineare Diffusion von Antigen und Antikörper findet bei der Methode nach OAKLEY UND FULTHORPE (1953) statt. In einem Röhrchen sind antikörperhaltiger Agar und Kulturfiltrat durch eine neutrale Agarschicht getrennt, in der die Präzipitationslinie von diffundiertem

Antigen und Antikörper zu erkennen ist. Nachweisbar sind Toxinmengen  $> 0,1 \mu\text{g/ml}$  (HALL ET AL., 1965).

Die **radiale Doppeldiffusionsmethode** nach OUCHTERLONY (1948) zum Nachweis von SE in Staphylokokken-Kulturen und Lebensmitteln hat von den Immundiffusionsverfahren die größte Bedeutung erlangt. Dabei werden in eine dünne Schicht neutralen Agars mehrere Vertiefungen ausgestanzt, die ringförmig um eine zentrale Vertiefung angeordnet sind. In die zentrale Vertiefung wird Antiserum gegeben, die äußeren Vertiefungen enthalten Referenztoxin sowie die fraglichen Proben. Nach einer Inkubation von 18 – 24 h werden im positiven Falle Präzipitationslinien sichtbar. Die Nachweisgrenze des Verfahrens liegt bei 5 – 20  $\mu\text{g Toxin/ml}$  (BERGDOLL, 1970).

In der **Elektroimmundiffusion** nach LAURELL (1966) durchwandert das Toxin ein antiserumhaltiges Gel unter dem Einfluss einer elektrischen Spannung. Die Höhe des raketenförmigen Präzipitates ist der Toxinkonzentration proportional. Die Elektroimmundiffusion hat sich auf Grund des hohen Verbrauchs an Antiserum sowie der geringen Eignung zur quantitativen Bestimmung von Toxin im Lebensmittelextrakt nicht durchgesetzt (TRANTER UND BREHM, 1990).

#### 2.4.5.2.2 Umgekehrte passive Latexagglutination

Bei der umgekehrten passiven Latexagglutination („reversed passive latex agglutination“, RPLA) wird eine Suspension von Latexpartikeln (Polystyrol), die mit spezifischen Antikörpern beschichtet sind, zu den zu untersuchenden Lebensmittelextrakten oder Kulturfiltraten in einer Mikrotiterplatte zugegeben. Eine sichtbare Agglutination erfolgt, wenn die entsprechenden Enterotoxintypen in der Probe enthalten sind. Die RPLA-Methode erreicht theoretisch eine Nachweisgrenze von 1,5 ng/ml, weist jedoch bei der Untersuchung von Lebensmittelproben häufig unspezifische Reaktionen auf. RPLA-Tests sind auch kommerziell erhältlich (SHINGAKI ET AL., 1981); die Testdauer für den Nachweis von SEA - SED beträgt 20 - 24 h, die Nachweisgrenze 0,5 ng/ml Lebensmittelextrakt. FUJIKAWA UND IGARASHI (1988) beschrieben eine Verbesserung dieser Methode, mit der bei gleicher Sensitivität SEA-SEE innerhalb von 3 h nachgewiesen werden können. Die Empfindlichkeit dieses SE-RPLA liegt bei 0,25 ng/ml.

### 2.4.5.2.3 Radio- und Enzymimmuntests

**Radioimmunassays** (RIA) für Staphylokokken-Enterotoxine wurden von verschiedenen Autoren beschrieben (JOHNSON ET AL., 1973; MILLER ET AL., 1978; DICKIE UND AKHTAR, 1982). Meist wird zur Markierung des Antigens Jod<sup>125</sup> verwendet. Das Prinzip des Radioimmunoassays beruht darauf, dass markiertes und nicht-markiertes Antigen um die Bindungsstellen der spezifischen Antikörper konkurrieren. Nach der Abtrennung ungebundener Reaktionspartner erfolgt die Messung der Radioaktivität, die umgekehrt proportional zur Enterotoxinmenge in der untersuchten Probe ist. Nachteile bei diesem Verfahren sind der hohe apparative Aufwand, der Verbrauch großer Mengen an hoch aufgereinigten Enterotoxinen sowie die aufwendigen Sicherheitsvorkehrungen aufgrund des Strahlenrisikos. Die Zeitdauer des Verfahrens beträgt 3 – 4 h, die Nachweisgrenze liegt bei ca. 0,5 – 10 ng/g Lebensmittel. Heute sind RIAs zum Nachweis von SE nicht mehr gebräuchlich.

Im Unterschied zum RIA erfolgt beim **Enzymimmunoassay** (EIA) eine Enzymmarkierung der Antigen- oder der Antikörpermoleküle. Das Enzym dient zur Sichtbarmachung der Bindungsreaktionen zwischen Antigenen und Antikörpern nach Abtrennung ungebundener Reaktionspartner durch die Umsetzung eines chromogenen, fluorogenen oder luminogenen Substrats. EIAs zum Nachweis von SE werden meist als nicht-kompetitive Sandwich-Tests durchgeführt. Prinzipiell binden beim Sandwich-EIA an eine Festphase immobilisierte, im Überschuss vorliegende Antikörper das Probenantigen. Mittels enzymmarkierter Antikörper, die an ein zweites Epitop des Antigens binden, wird nach Zugabe des Enzymsubstrats ein Messsignal erzeugt. Die Höhe bzw. Intensität dieses Signals ist direkt proportional zur Antigenkonzentration in der Probe. Kommerzielle Testkits sind bis jetzt für den Nachweis von SEA – SEE entwickelt worden. Die wesentlichen Charakteristika der gebräuchlichsten Testkits sind in der Tabelle 5 dargestellt.

**Tabelle 5:** Kommerziell erhältliche Testkits zum Nachweis von Staphylokokken-Enterotoxinen (modifiziert nach SU UND WONG, 1997)

Bezeichnung	Hersteller	Nachgewiesene Enterotoxine	Nachweisempfindlichkeit (ng/ml)
SE-EIA	Bommeli	A – E (einzeln)	0,1 – 1,0
TECRA SET VIA	Tecra	A – E (pauschal)	1
VIDAS Staph Enterotoxin	bioMerieux	A – E (einzeln)	0,05-0,1
Ridascreen SET A, B, C, D, E	R-Biopharm	A – E (einzeln)	0,2-0,7
Transia-Teströhrchen	Transia	A – E (pauschal)	1
Transia-Plate	Transia	A – E (pauschal)	1
SE-RPLA	Oxoid	A – D (einzeln)	0,5

Außerdem wurden Enzymimmunoassays für den Nachweis von SEH (SU UND WONG, 1996) sowie SEG, SEH und SEI (OMOE ET AL., 2002) beschrieben.

#### 2.4.5.2.4 Weitere immunologische Verfahren

ORDEN ET AL. (1992) beschrieben einen Immunblot zum Nachweis von SE in Kulturfiltraten und Lebensmitteln. Nach Polyacrylamidgelelektrophorese in Anwesenheit von Natriumdodecylsulphat (SDS-PAGE) werden die aufgetrennten Proteine mittels eines elektrischen Feldes auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. Die Membran wird anschließend nacheinander mit spezifischen anti-SE-Antikörpern, mit enzymmarkierten Antikörpern gegen Kaninchen-IgG und einem Substrat inkubiert. Test und Lebensmittelextraktion können im Laufe eines Arbeitstages durchgeführt werden. Die Nachweisgrenze des Verfahrens liegt bei ca. 10 ng/g Lebensmittel.

Ein quantitativer Fluoreszenzimmunoassay zum Nachweis von SEB in Puffer, Blutserum, Urin und einem Lebensmittelextrakt (TEMPELMAN ET AL., 1996) ist als sogenannter Biosensor, mit einer Sonde aus Silikatfasern als Festphase, aufgebaut. Er kann das gesuchte Enterotoxin in den verschiedenen Medien ab einer Konzentration von 0,5 – 10 ng/ml nachweisen. HARTEVELD ET AL. (1997) beschreiben einen biochemischen Sensor für den Nachweis von SEB. Der Nachweis basiert auf polyklonalen Antikörpern (anti-SEB), die Signalmessung erfolgt mittels eines piezoelektrischen Quartz-Kristall-Sensors. Die

Nachweisgrenze liegt bei 0,1 mg/ml. Weitere Biosensor-Systeme, darunter auch kommerzielle Systeme (z.B. RAPTOR, Bioveris) für den Nachweis von SEB wurden von zahlreichen Autoren beschrieben (WADKINS ET AL., 1998; KING ET AL., 1999; ROWE ET AL., 1999; O'BRIEN ET AL., 2000; EWALT ET AL., 2001; KIJEK ET AL., 2000; MUHKIN UND CHATTERJEE, 1997; YANG ET AL., 2002; SLAVIK ET AL., 2002; NAIMUSHIN ET AL., 2002; ANDERSON UND NERURKAR, 2002; DELEHANTY UND LIGLER, 2002; GOLDMAN ET AL., 2004; TAITT ET AL., 2002). KHAN ET AL. (2003) beschreiben einen membrangebundenen Fluoreszenzimmunoassay zum Nachweis von SEB. LAM ET AL. (1999) entwickelten einen kompetitiven Fluoreszenzimmunoassay für den Nachweis von SEA, der zur Detektion ein Kapillarelektrophoresesystem mit Laser-induzierter Fluoreszenzmessung benutzt. Die Kompetitionsreaktion erfolgt bei diesem Test zwischen freiem SEA und Fluorescein-markiertem SEA. Der Nachweisbereich des Tests liegt zwischen 0,3 - 6,5 nmol/l SEA. Ein Schnelltest (lateral flow) zum Nachweis von SEE in Kulturfiltraten wurde von LAKNER (1997) beschrieben. Die Nachweisgrenze lag bei ca. 5 ng/ml.

#### 2.4.6 Nachweis von Enterotoxin-Genen

Durch molekularbiologische Verfahren wie z.B. die Polymerasekettenreaktion („polymerase chain reaction“, PCR) oder die DNA-Hybridisierung ist es möglich, die Enterotoxin-kodierenden Gene einer *S. aureus*-Zelle nachzuweisen.

Die PCR wurde in den 1980er Jahren entwickelt (MULLIS ET AL., 1986) und hat seitdem auch in der Lebensmittelhygiene eine große Verbreitung erlangt. In vielen Untersuchungen wurde die PCR zum Nachweis von Enterotoxingenen eingesetzt (JOHNSON ET AL., 1991; WILSON ET AL., 1991; TSEN UND CHEN, 1992; LARSEN ET AL., 2000; SCHUMACHER-PERDREAU ET AL., 1995; MÄNTYNEN ET AL., 1997; GILLIGAN ET AL., 2000; MCCLAUHLIN ET AL., 2000; CHEN ET AL., 2001; JARRAUD ET AL., 2002; OMOE ET AL., 2002; KLOTZ ET AL., 2003; PADMAPRIYA ET AL., 2003). Durch die Vervielfältigung von DNA werden in den PCR-Verfahren Nachweisgrenzen im Bereich von 0,7 – 100 pg extrahierter DNA aus *S. aureus*-Reinkultur erreicht (JOHNSON ET AL., 1991; WILSON ET AL., 1991; BRAKSTADT ET AL., 1992). In einigen Untersuchungen zum Nachweis von Enterotoxin-kodierenden Genen wird auf die Überprüfung der Spezifität des PCR-Amplifikates verzichtet (JOHNSON ET AL., 1991; SCHUHMACHER-PFERREAU ET AL., 1995). Zur Begründung führen JOHNSON ET AL.

(1991) an, dass die Anlagerungssequenzen der Primer innerhalb der für die Enterotoxine codierenden Gene lagen, die PCR-Amplifikate die erwartete Länge besaßen und die DNA aus Reinkulturen isoliert worden war. Da in den letzten Jahren die Anzahl der mittlerweile bekannten Enterotoxin-Gene drastisch angestiegen ist, wurden Verfahren zum gleichzeitigen Nachweis von mehreren Enterotoxingenen entwickelt („multiplex PCR“) (BECKER ET AL., 1998; SCHMITZ ET AL., 1998; MONDAY UND BOHACH, 1999; MEHROTRA ET AL., 2000; SHARMA ET AL., 2000; LETERTRE ET AL., 2003a; NAJERA-SANCHEZ ET AL., 2003). In Untersuchungen, in denen die Enterotoxingene mittels PCR direkt aus dem Lebensmittel nachgewiesen werden, liegen für die PCR ungünstigere Bedingungen aufgrund der komplex zusammengesetzten Lebensmittel vor. Die Nachweisgrenzen sind daher bei verschiedenen Matrices sehr unterschiedlich. Während im rekonstituierten Magermilchpulver erst  $10^5 - 10^6$  *S. aureus*/ml ein positives Ergebnis ergaben (WILSON ET AL., 1991), lag die Nachweisgrenze für Milch bei 10 KBE *S. aureus*/ml (TSEN UND CHEN, 1992). Bei einer Multiplex-PCR für den Nachweis von enterotoxinogenen *S. aureus* lag die Nachweisgrenze bei 10 KBE *S. aureus*/ml Magermilch und bei 10 KBE *S. aureus*/20 g Käse (TAMARAPU ET AL., 2001). Da durch die PCR direkt aus dem Lebensmittel nicht das die eigentliche Intoxikation auslösende Enterotoxin nachgewiesen wird, werten WILSON ET AL. (1991) den Nachweis der Toxin-kodierenden Gene aus nicht mehr lebensfähigen *S. aureus*-Zellen im Lebensmittel als Hinweis auf ein mögliches Vorkommen von Enterotoxinen.

Ein molekularbiologischer Nachweis Enterotoxin-kodierender Gene ist auch durch das Verfahren der DNA-Hybridisierung möglich. Mit dieser Methode können *S. aureus*-Enterotoxine direkt, ohne vorherige Anreicherung oder Anzucht in Reinkulturen, identifiziert werden. Für die Durchführung wird ein Filter auf einen herkömmlichen selektiven Nährboden aufgelegt und die Bakterien angezchtet. Durch eine gezielte chemische Behandlung wird die DNA aus dem Zellkern freigesetzt und im Anschluss die *S. aureus*-Sonde aufgebracht. Bei der folgenden Hybridisierung bindet die DNA-Sonde an ihr komplementäres Gegenstück (NOTERMANS ET AL., 1988; EWALD ET AL., 1990; NEILL ET AL., 1990; JAULHAC ET AL., 1992).

### 3 MATERIAL UND METHODEN

#### 3.1 MATERIALIEN

##### 3.1.1 Chemikalien und Biochemika

Aqua dest.

Agarose NEEO <sup>®</sup>	(Roth, Karlsruhe, Deutschland, 2267.4)
BBL <sup>™</sup> Coagulase Plasma mit EDTA	(Becton Dickinson, Heidelberg, 240827)
Borsäure	(Merck, Darmstadt, Deutschland, 100160100)
Diethylpyrocarbonat (97 %)	(Sigma, Taufkirchen, Deutschland, D5758)
DNeasy Tissue Kit	(Qiagen, Hilden, Deutschland, 7925469504)
dNTP-Set	(MBI-Fermentas, St. Leon-Roth, Deutschland R01819)
Ethanol (> 99 %)	(Merck, 100983)
Ethidiumbromid-Lösung (10 mg/ml)	(Sigma, E1510)
Lysozym (100.000 U/mg)	(Merck, 105281)
Lysostaphin (1 mg/ml)	(Sigma, 51K4019)
Magnesiumchlorid (25 mmol/l)	(Promega, Mannheim, Deutschland)
Marker Invitrogen 100 bp DNA Ladder	(TECH-LINE, 15628-019)
Marker Gene <sup>®</sup> Ruler 50 Bp Ladder	(MBI Fermentas, SM0371)
Marker Gene <sup>®</sup> Ruler 100 Bp Ladder	(MBI Fermentas, SM0241)
Mercaptoethanol (14,3 mol/l)	(Merck, 1.15433.0100)
Omniscript RT Kit (10)	(Qiagen, 205110)
Orange Loading Dye Solution (6fach)	(MBI Fermentas, R0631)
Proteinase K (25 mg/ml)	(Qiagen, 69509)
RIDASCREEN-SET A, B, C, D, E	(R-Biopharm AG, Darmstadt, Deutschland, R 4101)
RNase-Free DNase Set (50)	(Qiagen)
Rnasin Inhibitor (40 U/μl)	(Promega, N2111)
RNeasy Mini Kit (50)	(Qiagen, 74104)
SeaKem <sup>®</sup> LE Agarose	(Biozym, Hessich-Oldendorf, Deutschland, 840.004)
Staphaurex-Plus Testsystem	(Murex Diagnostics, Burgwedel, Deutschland, ZL33/34)
Taq-Polymerase (5U/μl)	(Promega, M1861)

Toluidinblau O	(Merck, 1.15930.0025)
Triplex II® (EDTA)	(Merck, 1.08417.0250)
Tris-(Hydroxymethyl)-aminomethan	(Roth, 5429.3)
Wasserstoffperoxid-Lösung, 30 %	(Merck, 1.07210.0250)

### 3.1.2 Lösungen und Puffer

Diethylpyrocarbonat-Lösung (0,1 %)	
Ethidiumbromid-Lösung (5 µg/µl)	
Inkubationspuffer (10fach)	(Promega)
Natriumchlorid-Lösung (0,14 mol/l)	
TE-Puffer (Tris-HCl 10 mmol/l, EDTA 1 mmol/l, pH 8,0)	
TAE-Puffer 50-fach [242 g Tris-Basis, 57,1 ml Eisessig (100 %), 100 ml EDTA (0,5 mol/l, pH 8.0)]	
Tris-Puffer (siehe Thermanuklease-Nachweis)	
Wasserstoffperoxid-Lösung, 3 %	

### 3.1.3 Nährmedien und Zusätze

Baird-Parker-Agar	(Merck, 1.05406.0500)
Blutagar (Basis)	(Merck, 1.10886.0500)
Caseinpepton-Sojamehlpepton-Agar	(Merck, 1.05458.05000)
Columbia-Agar (Basis)	(Merck, 1.10455.0500)
DNase Testagar	(Merck, 1.10449.0500)
Eigelb-Tellurit-Emulsion	(Merck, 1.03785.0050)
Hirn-Herz-Bouillon (BHI)	(Merck, 1.10493.0500)
Mannit-Kochsalz-Phenolrot-Agar	(Becton Dickinson, 230650)
Müller-Hinton-Agar	(Merck, 1.05437.0500)
Pepton aus Casein	(Merck, 1.07216.1000)
Plate Count-Agar	(Merck, 1.15338.0500)
Ringerlösung	(Oxoid, 101059-001)

Schafblut defibriniert	(Oxoid, SR 0051 C)
Standard I-Nähragar	(Merck 1.07881.0500)
Standard II-Nähragar	(Merck 1.07883.0500)

### 3.1.4 Primer

Zielgen	Primer	Best. Nr.	Firma
<i>clfA</i> (Clumping factor)	<i>clfA</i> -I	B6845G09	GIBCO-Life Technologies- Invitrogen, Eggenstein- Leopoldshafen, Deutschland
	<i>clfA</i> -II	B6845G10	
<i>coa</i> (Koagulase)	<i>coa</i> -I	4505-4/4	MWG, Ebersberg, Deutschland
	<i>coa</i> -II	4505-3/4	
<i>eta</i> (Exfoliative Toxin A)	ETA-1	0707B	Roth
	ETA-2	0708B	
<i>Etb</i> (Exfoliative Toxin B)	ETB-1	0709B	Roth
	ETB-2	0710B	
<i>fbnA</i> (Fibronektin- bindende Protein A)	<i>fbnA</i> -1	55005159-5028	Qiagen,
	<i>fbnA</i> -2	55005159-5029	
<i>fbnB</i> (Fibronektin- bindende Protein B)	<i>fbnB</i> -1	55005159-5030	Qiagen,
	<i>fbnB</i> -2	55005159-5031	
<i>hla</i> ( $\alpha$ -Hämolysine)	<i>hla</i> -1	55005159-5024	Qiagen
	<i>hla</i> -2	55005159-5025	
<i>hlb</i> ( $\beta$ -Hämolysine)	<i>hlb</i> -1	55005159-5026	Qiagen
	<i>hlb</i> -2	55005159-5027	
<i>nucA</i> (Thermonuklease)	<i>nucA</i> -I	3509-3/4	MWG
	<i>nucA</i> -II	3509-4/4	
<i>Sa442</i> ( <i>S. aureus</i> - spezifischen Abschnitt)	Sa442-1	1507-1/2	MWG
	Sa442-2	1507-2/2	
<i>sea</i> (SEA)	SEA-1	57077-3/4	MWG
	SEA-2	57077-4/4	
<i>seb</i> (SEB)	SEB-1	B1809C07	GIBCO-Life Technologies
	SEB-2	B1809C08	
<i>sec</i> (SEC)	SEC-1	B1809C09	GIBCO-Life Technologies
	SEC-2	B1809C10	
<i>sed</i> (SED)	SED-1	B1809C11	GIBCO-Life Technologies
	SED-2	B1809C12	
<i>see</i> (SEE)	SEE-1	B1809C05	GIBCO-Life Technologies
	SEE-2	B1809C06	
<i>seg</i> (SEG)	SEG-1	B0289C01	GIBCO-Life Technologies
	SEG-2	B0289C02	

<i>seh</i> (SEH)	SEH-1	B0289C03	GIBCO-Life Technologies
	SEH-2	B0289C04	
<i>sei</i> (SEI)	SEI-1	B0289C05	GIBCO-Life Technologies
	SEI-2	B0289C06	
<i>sej</i> (SEJ)	SEJ-1	21-3540-3/6	MWG
	SEJ-2	21-3540-4/6	
<i>sem</i> (SEM)	SEM-1	2357-1/6	MWG
	SEM-2	2357-2/6	
<i>sen</i> (SEN)	SEN-1	2357-3/6	MWG
	SEN-2	2357-4/6	
<i>seo</i> (SEO)	SEO-1	2357-5/6	MWG
	SEO-2	2357-6/6	
<i>spa</i> (IgG-bindende Region des Protein A)	spa-1	4505-1/4	MWG
	spa-2	4505-2/4	
<i>spa</i> (X-Region des Protein A)	spa-III	B0877F12	GIBCO-Life Technologies
	spa-IV	B0877F13	
16S-23S rDNA	STAA-AU-I	57077-1/4	MWG
“intergenic spacer region”	STAA-AU-II	57077-2/4	
23S-DNA	Staur4	B1223E03	GIBCO-Life Technologies
	Staur6	B1223E04	
<i>tst</i> (Toxic shock syndrom toxin-1)	TSST-1	B1809D03	GIBCO-Life Technologies
	TSST-2	B1809D04	
Random Hexamer Primer (Zufallsprimer)		C1181	Promega

### 3.1.5 Geräte und Verbrauchsmaterial

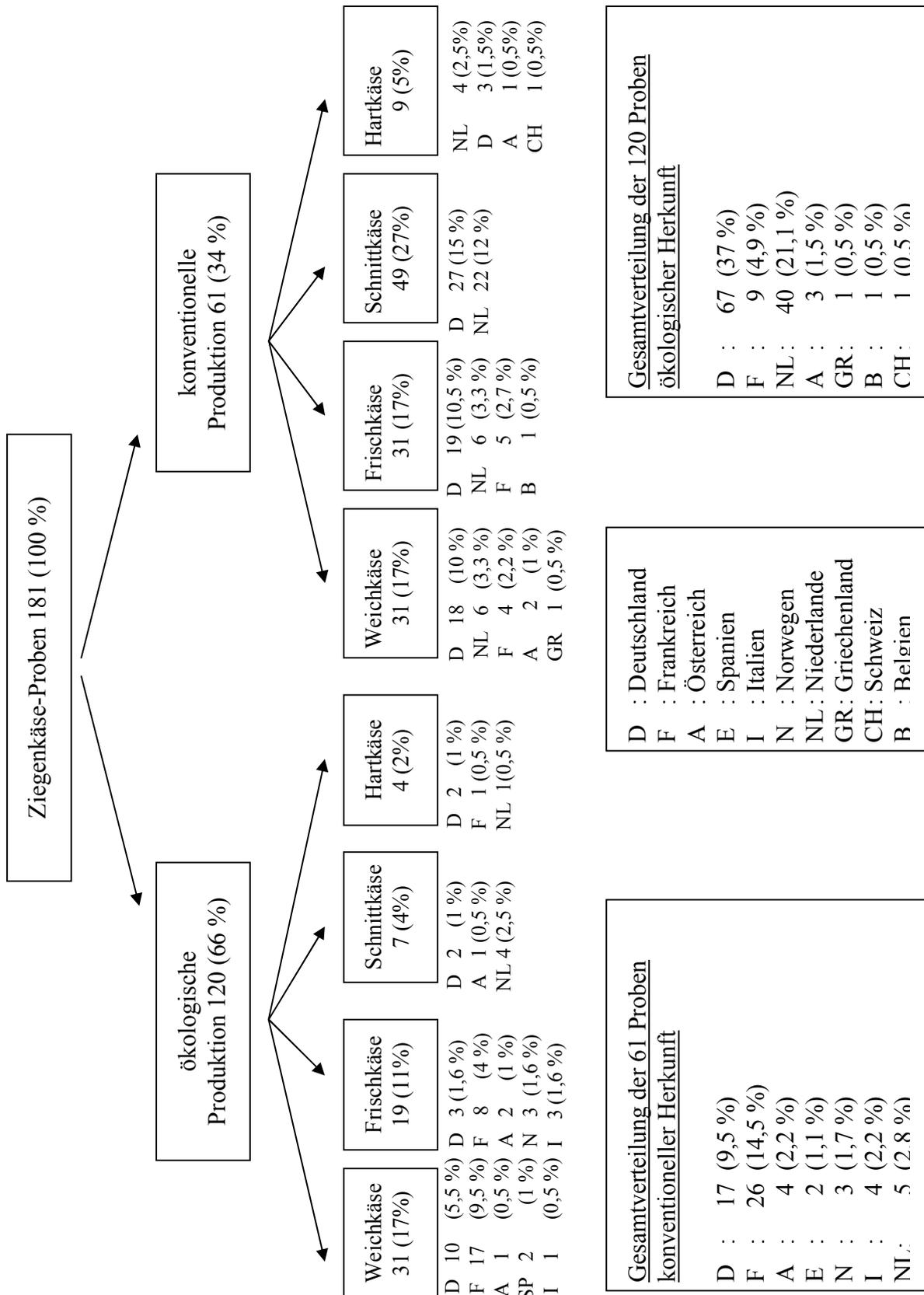
Abzug invent FCS FAFA	(vvrt Laborbau, Deutschland)
Agarclav	(IBS Integra Biosciences)
Autoclav SterVis	(Holzner, Stuttgart, Deutschland)
Brutschrank B20	(Heraeus, 50042313)
Brutschrank B12	(Heraeus, 50042307)
Continent MW 800, Mikrowelle	(Continent, Deutschland CW1109-3)
DNA UV-Cleaner, UVC/T	(Kisker Biotech, Steinfurt, Deutschland)
Dose-it 803	(IBS Integra Biosciences)
GELAIRE BSB4, Arbeitsabzug	(Heraeus Instrumente)
Gel-Doc 2000, Geldokumentationssystem	(BioRad, München, Deutschland)

Gelelektrophorese Power Pac 1000	(BioRad)
Gelkammer	(BioRad)
Heraeus Freeze -80 °C	(Kendro Lab. Products, Hanau, Deutschland)
iCycler	(BioRad)
pH-Meter	(MTW-Inolab, Deutschland)
Reaktionsgefäße (1,5 ml)	(Biozym, 710340)
(0,2 ml)	(Biozym, 710921-6)
(2,0 ml)	(Biozym, 710200)
SONY Videoprinter	(SONY, Tokyo, Japan)
SONY HD II Videoprinterpapier	(SONY)
Sterilfilter 0,2 µm	(Schleicher und Schüll, Dassel)
Stomacher 400 Circulator	(Seward, Norfolk, England)
Technoman, Plattengießer	(Biomedis, Giessen, Deutschland)
Terumo Syringe, Sterilinjektor	(Terumo Europe, Leuven, Belgien)
Thermocycler Techne-Progene	(Thermodux, Wertheim, Deutschland)
Vortex Genie 2	(Scientific Instruments/Merck Eurolabs, Berlin, Deutschland)
Wasserbad Jubalo SW-20c	(Jubalo, Seelbach, Deutschland)
Wasserbäder GFL 1002 und 1003	(MAGV GmbH, Rabenau-Londorf)
Zentrifuge 202MK	(Sigma, Osterode am Harz, Deutschland)
Zentrifuge Biofuge A	(Hereaus Instrumente, Hanau, Deutschland)

### 3.1.6 Bakterien-Stämme

Für die Untersuchungen standen insgesamt 181 Ziegenkäseproben ökologischer oder konventioneller Herkunft von verschiedenen Direktvermarktern und Lebensmittelläden in Hessen zur Verfügung. Tabelle 6 gibt einen Überblick über die Eigenschaften und Herkunft der untersuchten Ziegenkäseproben. Aus diesen Proben wurden im Rahmen der mikrobiologischen Lebensmitteluntersuchung des Instituts für Tierärztliche Nahrungsmittelkunde, Professur für Milchwissenschaften der Justus-Liebig-Universität Gießen, 64 *S. aureus*-Stämme isoliert und für die Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit verwendet.

**Tabelle 6:** Übersicht über Art und Herkunft der untersuchten Käseproben



### 3.1.7 Referenzstämme

Folgende Referenzstämme wurden verwendet: *S. aureus* COWAN I (ATCC 12598), *S. epidermidis* ATCC 14990 und der  $\beta$ -hämolysinbildende *S. aureus* Stamm PERTSCH aus der Stammsammlung der Professur für Milchwissenschaften der Justus-Liebig-Universität Gießen; toxinbildende *S. aureus*-Referenzkulturen 619/93 (SEA), 62/92 (SEB), 1229/93 (SEC), 1644/93 (SED), FRI 918 (SEE), 161/93 (TSST-1), 114/98 (ETA, ETB; freundlicherweise überlassen von Prof. Witte, Robert-Koch-Institut, Werningerode); Ly 990055 (SEG+SEI) und Ly 990552 (SEH; freundlicherweise überlassen von Dr. S. Jarraud, Institut Centre National de Référence des Toxémies Staphylococciques, Faculté de Médecine, Lyon, Frankreich); 2724 (SEJ; freundlicherweise überlassen von Dr. M. Zschöck, Staatliches Medizinal-, Lebensmittel- und Veterinäruntersuchungsamt Mittelhessen, Gießen).

## 3.2 METHODEN

Alle verwendeten Nährmedien sowie Gegenstände, die mit den Proben in Kontakt kamen, wurden autoklaviert bzw. die Lösungen sterilfiltriert. Die verwendeten Gegenstände und sonstigen bakteriell verunreinigten Materialien wurden autoklaviert und anschließend entsorgt oder gereinigt.

### 3.2.1 Mikrobiologische Untersuchung von *S. aureus*

Die Vorbereitung der Ziegenkäseproben für die quantitative Bestimmung von Koagulase-positiven Staphylokokken erfolgte gemäß der amtlichen Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 35 LMBG (Lebensmittel- und Bedarfsgegenständegesetz), Methode L01.00-1. Die Bestimmung und Quantifizierung von *S. aureus* aus Ziegenkäse erfolgte zunächst in Anlehnung an die Methode L01.00-24 „Bestimmung Koagulase-positiver Staphylokokken in Milch und Milchprodukten – Koloniezählverfahren“ nach §35 LMBG. Anschließend wurden zur endgültigen Identifizierung weitere biochemische Merkmale überprüft. Die Untersuchungsschritte sind in Abbildung 1 schematisch dargestellt.

### 3.2.1.1 Isolierung und Keimzahlbestimmung

Zehn Gramm jeder Käseprobe wurden mit je 90 ml Ringerlösung vermischt und bei Raumtemperatur im Stomacher 2 min homogenisiert. Anschließend wurden dezimale Verdünnungsreihen in Ringerlösung hergestellt. Aus der Anschüttelung (Verdünnungsstufe  $10^{-1}$ ) wurden je 0,33 ml auf drei, sowie je 0,1 ml (entspricht Verdünnungsstufe  $10^{-2}$ ) auf zwei Baird-Parker-Agarplatten pipettiert und sofort mit sterilen Spateln verteilt. Das Anlegen weiterer dezimaler Verdünnungsstufen bis  $10^{-4}$  erfolgte nach demselben Verfahren. Die beimpften Platten wurden 48 h bei 37 °C bebrütet und anschließend auf das Vorhandensein von Koagulase-bildenden Staphylokokken kontrolliert. Als typisch wurden dabei Kolonien mit folgenden Merkmalen gewertet: Die Kolonien sind schwarz (Tellurit-Spaltung) und glänzend, und besitzen einen weißen Rand, den eine durchsichtige Zone umgibt (positive Eigelb-Reaktion). Als atypische Kolonien wurden schwarze Kolonien ohne Eigelb-Reaktion oder schwarzgraue bis graue Kolonien mit und ohne Eigelb-Reaktion eingestuft. Die typischen und die atypischen Kolonien wurden getrennt auf beiden Platten einer Verdünnungsstufe gezählt, wobei allerdings nur Platten mit einer Koloniezahl von insgesamt 5 bis zu 150 in die Auswertung kamen.

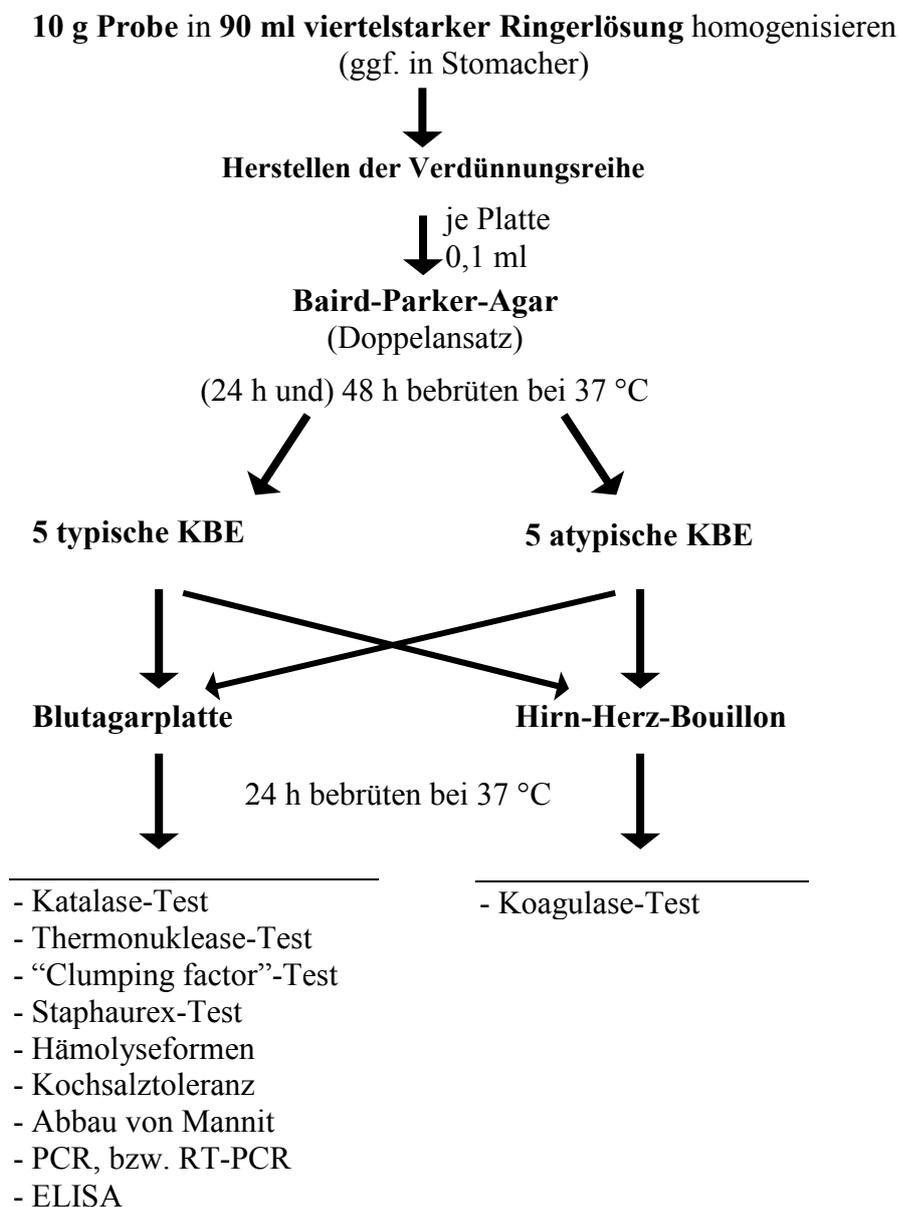
Zur Überprüfung der Koagulasereaktion wurden von den ausgewerteten Platten - sofern möglich - fünf typische und fünf atypische Kolonien in Kulturröhrchen mit je 5 ml Hirn-Herz-Bouillon überimpft und 20 - 24 h bei 37 °C bebrütet. Anschließend wurden 0,1 ml Kulturmaterial mit 0,3 ml Kaninchenplasma in ein steriles Röhrchen gegeben und bei 37 °C inkubiert. Als Positivkontrolle wurde *S. aureus* COWAN I, als Negativkontrolle nicht beimpfte Bouillon verwendet. Als koagulasepositiv wurde eine Verklumpung des Röhrcheninhaltes nach 4 – 6 h (bzw. bei negativem Ergebnis nach Weiterbebrütung bis zu 24 h) zu mehr als Dreiviertel bewertet.

Entsprechend dem prozentualen Anteil der verifizierten Koagulase-positiven, typischen Kolonien aus den zur Bestätigung herangezogenen typischen Kolonien und dem prozentualen Anteil der verifizierten Koagulase-positiven, atypischen Kolonien aus den zur Bestätigung herangezogenen atypischen Kolonien wurde die Menge der insgesamt auf den Baird-Parker-Agarplatten vorhandenen Koagulase-positiven (typischen und atypischen) Kolonien berechnet.

### 3.2.1.2 Lagerung der Isolate

Zur Verwendung in den weiteren Untersuchungen wurde typisches bzw. atypisches Koloniematerial von den Baird-Parker-Agarplatten (3.2.1.1) auf Schafblutagarplatten (Standard I-Nähragar mit Zusatz von 5 % Schafblut) im Drei-Ösen-Ausstrich beimpft und 18 - 24 h bei 37 °C bebrütet. Die Kulturen wurden bis zur weiteren Verwendung anschließend im Kühlschrank gelagert und im Abstand von vier Wochen subkultiviert.

**Abbildung 1:** Schematische Darstellung der Untersuchungsschritte



### 3.2.1.3 Identifizierung und Charakterisierung der Isolate

Mit den frisch subkultivierten Isolaten (3.2.1.2) wurden jeweils als weitere Bestätigungsreaktionen die in Abb. 2 aufgeführten Tests durchgeführt.

#### **Katalase-Test**

Das Nachweisprinzip des Katalase-Tests beruht auf der Spaltung von Wasserstoffperoxid durch das Enzym Katalase. Zur Durchführung wurde jeweils ein Tropfen 3 %ige Wasserstoffperoxid-Lösung auf einen Objektträger gegeben und eine zu testende Kolonie darin verrieben. Eine positive Katalasereaktion stellte sich in Form von Schaumbildung dar.

#### **Nachweis des „Clumping factors“**

Der Nachweis des zellgebundenen „clumping factors“ erfolgte vergleichend als Objektträgertest mit EDTA-Kaninchenplasma sowie mit dem Agglutinationstest „Staphaurex-Plus<sup>®</sup> Testsystem“. Für das Objektträgerverfahren wurden 2-3 Kolonien mit einer sterilen Impföse in einem Tropfen physiologischer Kochsalzlösung (0,14 mol/l NaCl-Lösung) auf einer Seite eines Objektträgers suspendiert. Von dieser Suspension wurde ein Tropfen entnommen und auf der anderen Seite des Objektträgers mit 10 µl Kaninchenplasma verrieben. Die Beurteilung der Reaktion erfolgte bei indirekter Beleuchtung mit Hilfe eines Lichtkastens. Als positive Reaktion wurde eine deutlich erkennbare Agglutination der Bakterien im Plasmotropfen innerhalb von 10 Sekunden gewertet. Die Reaktion galt nur dann als positiv, wenn die Kontrollsuspension der NaCl-Lösung keine Selbstagglutination zeigte.

Mittels des Staphaurex-Plus<sup>®</sup>-Testsystems erfolgte ein gleichzeitiger Nachweis des „clumping factors“ und des Proteins A. Die Durchführung erfolgte nach den Angaben des Herstellers.

#### **Nachweis des Enzyms Thermonuklease**

Der Nachweis der Thermonuklease-Aktivität der Isolate erfolgte nach der amtlichen Methode L 01.00-33 (§35 LMBG). Dazu wurden 5 ml Hirn-Herz-Bouillon (BHI) mit Koloniematerial beimpft und 24 h bei 37 °C bebrütet. Anschließend wurden diese 15 min

bei 500 x g zentrifugiert, der Überstand abgenommen und im Wasserbad bei 100 °C für 15 min erhitzt. Danach wurden ca. 7 µl pro Loch auf Toluidinblau O-DNA-Agar pipettiert. Die Testplatte wurde mit dem Deckel nach oben 4 h (bis zu 24 h bei negativem Ergebnis) bei 37 °C inkubiert. Als positive Reaktion wurde die Bildung von leuchtend rosafarbenen Höfen um die Kolonien des ansonsten blauen Mediums bewertet.

### **Nachweis der Telluritreduktion, Lipolyse und Proteolyse mit dem Baird-Parker-Medium**

Zum Nachweis der Eigenschaften Telluritreduktion, Lipolyse und Proteolyse der Reinkulturen erfolgte die Anzucht der Isolate auf Baird-Parker-Agar (24 - 48 h, 37 °C). Anschließend wurden die Reaktionen, wie bereits in 3.2.1.1 beschrieben, beurteilt.

### **Differenzierung der Hämolyseformen**

Die Differenzierung der unterschiedlichen Hämolyse-Bildung der Isolate erfolgte nach der von SKALKA ET AL. (1979) beschriebenen Methode. Dazu wurde eine Columbia-Blutagar-Platte strichförmig mit der  $\beta$ -Hämolyse bildenden *S. aureus*-Kultur PERTSCH beimpft. Senkrecht hierzu wurden jeweils die zu untersuchenden Isolate strichförmig, bis ca. 5 mm an die  $\beta$ -Hämolyse bildende Kultur heran, ausgestrichen. Die Beurteilung der Hämolyse-Bildung erfolgte nach einer Inkubation von 18-24 h bei 37 °C: Eine  $\alpha$ -Hämolyse stellte sich als eine Zone vollständiger Hämolyse dar, die im Bereich des *S. aureus*- $\beta$ -Hämolyse gehemmt wurde.  $\beta$ -Hämolyse zeigte sich als eine Zone unvollständiger Hämolyse um den Impfstrich.  $\delta$ -Hämolyse stellte sich im Bereich des *S. aureus*- $\beta$ -Hämolyse als CAMP-ähnliche Verbreiterung der Hämolyse sowie um den Impfstrich als schmale, vollständige Hämolyse dar.

### **Kochsalztoleranz und Abbau von Mannit**

Zum Nachweis der Eigenschaften Kochsalztoleranz und Abbau von Mannit unter Säurebildung erfolgte die Anzucht der Isolate auf Mannit-Kochsalz-Phenolrot-Agar bei 37 °C für 18-24 h. Die typische Kochsalztoleranz zeigte sich in einem deutlichen Wachstum der Kulturen, der Abbau von Mannit unter Säurebildung durch einen Farbumschlag des rosa-farbenen Nährbodens nach leuchtend gelb.

### **3.2.2 Molekularbiologische Identifizierung und Charakterisierung der *S. aureus*-Isolate**

#### **3.2.2.1 DNA-Extraktion**

Die Extraktion der bakteriellen DNA erfolgte unter Verwendung eines kommerziellen Kits (DNeasy Tissue-Kit) entsprechend den Angaben des Herstellers. Die DNA wurde hierbei an eine Silica-Säule adsorbiert und nach einem Waschschrift mit Niedrigsalzpuffer bzw. Aqua dest. eluiert.

Die Anzuchtung der Kulturen erfolgte in BHI-Medium für 24 h bei 37 °C. Jeweils 1 ml der BHI-Flüssigkultur wurde in 1,5 ml sterile Reaktionsgefäße überführt und für 10 min bei 4.000 x g zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes wurde das resultierende Bakterien-Sediment zur Zellwandlyse mit 180 µl TE-Puffer und 3 µl Lysostaphin versetzt und anschließend 1 h bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Nach Zugabe von 25 µl Proteinase K (25 mg/ml) und 200 µl AL-Puffer zur Deproteinisierung erfolgte eine weitere Inkubation für 2 h bei 56°C im Wasserbad. Anschließend wurden die Ansätze zur Inaktivierung der Proteinase K 10 min in kochendes Wasser gestellt. Nach einer kurzen Abkühlphase wurden 200 µl Ethanol (96 %) zugesetzt und gemischt. Die vorbereiteten Säulen wurden mit der Probenlösung befüllt und 1 min bei 4.000 x g zentrifugiert. Dann wurde mit 500 µl Waschpuffer (AW 1) gewaschen und wiederum zentrifugiert (1 min, 4.000 x g). Nach der letzten Reinigung mit 500 µl Waschpuffer (AW 2) wurde 3 min zentrifugiert, um die vollständige Entfernung des Waschpuffers zu gewährleisten. Die anschließende Elution erfolgte mittels 200 µl Elutionspuffer (AE), wobei nach einer fünfminütigen Inkubation der Säulenmatrix mit dem Puffer bei Raumtemperatur 1 min bei 4.000 x g zentrifugiert wurde. Der Elutionsschritt wurde mit 100 µl AE-Puffer zur Gewinnung weiterer DNA wiederholt. Die DNA-haltigen Eluate wurden direkt in die PCR eingesetzt oder bei -20 °C aufbewahrt.

#### **3.2.2.2 Durchführung der Polymerasekettenreaktion (PCR)**

Pro PCR-Ansatz wurden jeweils 2,5 µl Proben-DNA in einem Gesamtvolumen von 30 µl Reaktionsgemisch amplifiziert. Zu jeder Untersuchungsserie wurde eine Negativkontrolle

(Aqua dest.) mit überprüft, um eine Kontamination der Reagenzien ausschließen zu können. Als Positivkontrollen dienten entsprechende Referenzstämme. Zur Durchführung der im Weiteren beschriebenen PCR-Ansätze erfolgte standardmäßig die Erstellung des Reaktionsgemisches (Mastermix) mit der in Tabelle 7 angegebenen Zusammensetzung.

**Tabelle 7:** Zusammensetzung des Standard-Reaktionsgemisches zur Durchführung der PCR

<b>Substanz</b>	<b>Volumen je Testansatz</b>
Aqua bidest.	20,0 µl
Inkubationspuffer (10fach)	3,0 µl
MgCl <sub>2</sub> (25 mmol/l)	1,8 µl
dNTP (10 mmol/l) (je Nukleotid)	0,6 µl
Primer I (10 µmol/l)	1,0 µl
Primer II (10 µmol/l)	1,0 µl
<i>Taq</i> -DNA-Polymerase (5 U/µl)	0,1 µl
Gesamt-Volumen pro Probe	27,5 µl

Nach gründlichem Mischen des Reaktionsgemisches wurden 27,5 µl des Ansatzes in ein 0,2 ml Reaktionsgefäß pipettiert und mit je 2,5 µl der nach 3.2.2.1 präparierten DNA vermischt. Anschließend wurden die Ansätze im Thermocycler prozessiert, unter Einhaltung der in den Tabellen 10 angegebenen Temperaturprogramme.

### 3.2.2.3 Agarosegelelektrophorese

Der Nachweis der DNA-Amplifikate erfolgte mittels Gelelektrophorese und anschließender optischer Darstellung. Auf Grund der Größe der zu erwartenden Amplifikate wurde zweiprozentiges Agarosegel verwendet. Dazu wurden 3 g Agarose in 150 ml 1x TAE-Puffer gegeben, im Mikrowellenofen geschmolzen und nach Abkühlung

auf ca. 56 °C die flüssige Agarose in eine Gelwanne mit justiertem Kamm in Flachbettformen gegossen. Nach dem Erstarren der Agarose wurde dann der Kamm sorgfältig entfernt und das Gel in eine mit entsprechendem Laufpuffer gefüllte Gelkammer gelegt. Danach wurden 12 µl des PCR-Produktes mit 3 µl 6x „Orange Loading Dye Solution“ vermischt und auf das Agarosegel aufgetragen. Die Elektrophorese wurde in Gelkammern durchgeführt, als Laufpuffer diente 1x TAE-Puffer. Für die Abschätzung des Molekulargewichts des jeweiligen Amplifikats wurden Molekulargewichtsstandard-Marker von 100 Bp (1 µg/µl) bzw. 50 (1µg/µl) Bp randständig aufpipettiert. Die elektrophoretische Auftrennung der Reaktionsansätze erfolgte bei 120 mA (2,5 h).

#### **3.2.2.4 Ethidiumbromidfärbung**

Zur optischen Darstellung der Fragmente wurden die Gele nach der Gelelektrophorese in einer wässrigen Ethidiumbromid-Lösung (5 µg/ml) 5 min gefärbt. Um den überschüssigen Farbstoff zu entfernen, wurden die Gele durch Schwenken in Aqua dest. für 20 min bei Raumtemperatur entfärbt und anschließend unter UV-Licht bei einer Wellenlänge von 302 nm in GelDoc 2000, Gel-Videodokumentationssystem (BioRad) digital fotografiert. Die Fragmente stellten sich dabei als helle Streifen vor dunklem Hintergrund dar.

#### **3.2.2.5 Nachweis von *S. aureus*-spezifischen Genabschnitten**

Alle *S. aureus*-Isolate wurden auf das Vorkommen einiger *S. aureus*-spezifischer Genabschnitte, nämlich 16S-23S rDNA „intergenic spacer region“ (ISR), 23S rRNA und den *S. aureus*-spezifischen Abschnitt innerhalb der chromosomalen DNA *Sa442* untersucht. Dabei wurde außerdem überprüft, ob die Amplifikate der 16S-23S rDNA „intergenic spacer region“ Größenpolymorphismen aufweisen.

Die Angaben über die verwendeten Oligonukleotid-Primer und die Temperaturprogramme sowie die entsprechenden Referenzen sind in Tabellen 8 und 10 aufgeführt.

### 3.2.2.6 Nachweis von Virulenz-Genen

Im Weiteren wurden alle *S. aureus*-Isolate auf das Vorkommen der Virulenzgene Thermonuklease-Gen *nucA*, X-Region und IgG-bindende Region des Protein A-Gens *spa*, Koagulase-Gen *coa*, „Clumping factor“-Gen *clfA*, Fibronektin A-Gen *fbnA*, Fibronektin B-Gen *fbnB*,  $\alpha$ -Hämolyisin-Gen *hla* und  $\beta$ -Hämolyisin-Gen *hlyB* untersucht. Zudem wurde überprüft, ob die Amplifikate des Koagulase-Gens *coa*, des „Clumping factor“-Gen *clfA*, der X-Region und der IgG-bindenden Region des Protein A-Gens *spa* Größenpolymorphismen aufweisen. Die Angaben über die verwendeten Oligonukleotid-Primer und die Temperaturprogramme sowie die entsprechenden Referenzen sind in Tabellen 8 und 10 aufgeführt.

### 3.2.2.7 Nachweis von Staphylokokken-Enterotoxigenen und weiteren Superantigen-Genen

Alle isolierten *S. aureus*-Stämme wurden außerdem auf das Vorkommen von Enterotoxigenen (*sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *see*, *seg*, *seh*, *sei*, *sej*, *sem*, *sen* und *seo*), Toxic Shock Syndrom Toxin-1 (*tst*)-Gen und exfoliatives Toxin A und B (*eta* und *etb*)-Gene untersucht. Die Angaben über die verwendeten Oligonukleotidprimer und die Temperaturprogramme sowie die entsprechenden Referenzen werden in den Tabellen 8 und 9 bzw. in der Tabelle 10 aufgeführt. Zur Amplifizierung von Abschnitten der *sem*-, *sen*- und *seo*-Gene wurden anhand der von JARRAUD ET AL. (2001) veröffentlichten Gensequenzen (Genbank NCBI-Zugangsnummer AF285760) spezifische Primer für diese Gene mit Hilfe des Computerprogramms OLIGO 4.0 entworfen. Die Durchführung PCR erfolgte nach den unter 3.2.2.2 beschriebenen Angaben.

**Tabelle 8:** Nachweis von Virulenzgenen von *S. aureus* mittels PCR: Übersicht über dabei verwendete Oligonukleotidprimer

Zielgen	Amplikongröße (Bp)	Primer	Primersequenz 5'-3'	Programm*	Referenz
<i>nuc</i>	279	nucA-1	CGGATTGATGGTGATACGGTT	I	BRAKSTAD ET AL., 1992
		nucA-2	AGCCAAAGCCTTGACGAACTAAAGC		
<i>Sa442</i>	120	Sa442-1	AATCTTTGTCGGTACACGATATTCTTCACG	II	MARTINEAU ET AL., 1998
		Sa442-2	CGTAAATTGAGATTTCAGTAGATAATACAACA		
16S-23S rDNA	variabel	STAA-AuI	TCTTCAGAAAGATCGGGAATA	III	FORSMAN ET AL., 1997
		STAA-AuII	TAAGTCAAACGTTAACATACG		
23S rDNA	1250	Staur4	ACGGAGTTACAAAAGGACGAC	IV	STRAUB ET AL., 1999
		Staur6	AGCTCAGCCTTAACGAGTAC		
<i>spa</i> X-Region	variabel	SPAIII	CAAGCACAAAAGAGGAA	V	FRÉNAV ET AL., 1996
		SPAIV	CACCAGGTTTAACGACAT		
<i>spa</i> IgG-bindende Region	variabel	SPA1	CACCTGCTGCAAAATGCTGCG	VI	SEKI ET AL., 1998
		SPA2	GGCTTGTGTGTCTTCCTC		
<i>coa</i>	variabel	coa-I	ATAGAGATGCTGGTACAGG	VI	HOOKEY ET AL., 1998
		coa-II	GCTTCCGATTGTTCCGATGC		
<i>clfA</i>	variabel	<i>clfA</i> -I	GGCTTCAGTGTGTGTAGG	VII	STEFAN ET AL., 2001
		<i>clfA</i> -II	TTTTCAGGGTCAAATAAAGC		
<i>fbnA</i>	1279	FbnA-1	GCGGAGATCAAAGACAA	VIII	BOOTH ET AL., 2001
		FbnA-2	GGTGTGTCGATATCTACC		
<i>fbnB</i>	813	FbnB-1	GGAGAAAGGAATTAAGGCG	VIII	BOOTH ET AL., 2001
		FbnB-2	TGCGAGTTCGCGTGCCG		
<i>hla</i>	535	hla-1	GGTTTAGCCTGGCCTTC	IX	BOOTH ET AL., 2001
		hla-2	CGAACGAGTTCGTGATG		
<i>hlb</i>	833	hlb-1	GCCAAAAGCCGAATCTAAG	IX	BOOTH ET AL., 2001
		hlb-2	GCCATGGGATGTATATGC		
<i>tst</i>	350	TSST-1	ATGGCAGCATCAGCTTGATA	X	JOHNSON ET AL., 1991
		TSST-2	TTTCCAATAAACCACCCGTTT		
<i>eta</i>	119	ETA-1	CTAGTGCATTTGTTATTCAA	X	JOHNSON ET AL., 1991
		ETA-2	TGCATTTGACACCATAGTACT		
<i>etb</i>	200	ETB-1	ACGGCTATATACATTCAAATT	X	JOHNSON ET AL., 1991
		ETB-2	TCCATCGATAAATATACCTAA		

**Tabelle 9:** Nachweis von Enterotoxigenen von *S. aureus* mittels PCR: Übersicht über dabei verwendete Oligonukleotidprimer

Zielgen	Amplikongröße (Bp)	Primer	Primersequenz 5'-3'	Programm*	Referenz
<i>sea</i>	219	SEA-1	AAAGTCCCGATCAATTTATGGCTA	X	TSEN AND CHEN, 1992
		SEA-2	GTAATTAACCGAAGGTTCTGTAGA		
<i>seb</i>	476	SEB-1	TCGCATCAAACTGACAAAACG	X	JOHNSON ET AL., 1991
		SEB-2	GCAGGTACTCTATAAGTGCC		
<i>sec</i>	257	SEC-1	GACATAAAAAGCTAGGAATTT	X	JOHNSON ET AL., 1991
		SEC-2	AAATCGGATTAACATTATCC		
<i>sed</i>	317	SED-1	CTAGTTTGGTAATATCTCCT	X	JOHNSON ET AL., 1991
		SED-2	TAATGCTATATCTTATAGGG		
<i>see</i>	169	SEE-1	TAGATAAGGTTAAAAACAAGC	X	JOHNSON ET AL., 1991
		SEE-2	TAACCTACCGTGGACCCCTTC		
<i>seg</i>	642	SEG-1	AATTATGTGAATGCTCAACCCGATC	X	JARRAUD ET AL., 1999
		SEG-2	AACTTATATGGAACAAAAGGTACTAGTTC		
<i>seh</i>	376	SEH-1	CAATCACATCATATGCGAAAAGCAG	X	JARRAUD ET AL., 1999
		SEH-2	CATCTACCCAAAACATTAGCACC		
<i>sei</i>	577	SEI-1	CTCAAGGTGATATTGGTGTAGG	X	JARRAUD ET AL., 1999
		SEI-2	AAAAAACTTACAGGCAGTCCATCTC		
<i>sej</i>	192	SEJ-1	CATCAGAACTGTTGTTCCGCTAG	XI	MONDAY ET AL., 1999
		SEJ-2	CTGAAATTTTACCATCAAAGGTAC		
<i>sem</i>	471	SEM-1	TCTTAGGAACTATTATGGTAGC	X	In dieser Arbeit
		SEM-2	CCTGCATTAAATCCAGAA		
<i>sen</i>	292	SEN-1	GGAGTTACGATACATGATGG	X	In dieser Arbeit
		SEN-2	ACTCTGCTCCCACTGAAC		
<i>seo</i>	249	SEO-1	TGATGATTATATAAAATAATCGATTTACG	X	In dieser Arbeit
		SEO-2	ATATGTACAGGCAGTATCC		

\* siehe Tabelle 10

**Tabelle 10:** Verwendete Temperaturprogramme: Im Thermocycler erfolgte zunächst jeweils eine initiale Denaturierung der DNA für 5 min bei 94 °C mit anschließenden, sich unterschiedlich oft wiederholenden Zyklen zur Denaturierung, Primeranlagerung und Polymerisierung. Den Abschluss bildete ein Extensionszyklus für 5 min bei 72 °C.

Programm	Zyklen für Amplifizierung	Denaturierung (bei 94 °C)	Primeranlagerung	Polymerisierung (bei 72 °C)
I	30	60 s	55 °C 30 s	90 s
II	30	10 s	55 °C 30 s	30 s
III	30	30 s	55 °C 30 s	30 s
IV	37	40 s	64 °C 60 s	75 s
V	30	60 s	64 °C 60 s	60 s
VI	30	60 s	58 °C 60 s	60 s
VII	35	60 s	57 °C 60 s	60 s
VIII	30	45 s	50 °C 45 s	60 s
IX	30	30 s	50 °C 15 s	30 s
X	30	120 s	55 °C 120 s	60 s
XI	30	60 s	62 °C 60 s	60 s

### 3.2.2.8 Multiplex-PCR zum gleichzeitigen Nachweis der Staphylokokken-Enterotoxingene

Um den Nachweis der insgesamt zwölf untersuchten Staphylokokken-Enterotoxingene zu vereinfachen, wurden Versuche zur Entwicklung einer Multiplex-PCR durchgeführt. Hierbei wurde die Ähnlichkeit der Schmelztemperaturen der Primer, die zum Nachweis der Enterotoxingene verwendet wurden, berücksichtigt. Zur Optimierung der Multiplex-PCR wurden in Vorversuchen die Konzentrationen der Bestandteile des Reaktionsgemisches sowie die Temperaturbedingungen variiert. Als Untersuchungsmaterial wurden hierzu die DNA-Extrakte der Staphylokokken-Enterotoxin-Referenzstämmen verwendet, die in den unter 3.2.2.7 beschriebenen Einzelreaktionen jeweils positiv reagiert hatten. Die Zusammensetzungen der so optimierten Reaktionsgemische sind in den Tabellen 11 und 12 zu entnehmen. Zur Amplifizierung der Staphylokokken-Enterotoxingene wurden zwei Protokolle für die fünf klassischen (SEA-SEE) und die vier neueren Enterotoxingene SEG-SEJ erstellt. Die Durchführung der Multiplex-PCR erfolgte unter Verwendung des in Tabelle 10 angegebenen Temperaturprogramms X.

Alle Isolate von *S. aureus* wurden mit diesem PCR-System untersucht.

**Tabelle 11:** Zusammensetzung des Reaktionsgemisches zur Amplifizierung der klassischen Staphylokokken-Enterotoxingene (*sea*, *seb*, *sec*, *sed* und *see*)

Substanz	Volumen je Testansatz
Aqua dest.	14,9 µl
Inkubationspuffer (10fach)	3,0 µl
MgCl <sub>2</sub> (25 mmol/l)	1,8 µl
dNTP (10 mmol/l) (je Nukleotid)	0,8 µl
Primer:	
SEA-1 (10 µmol/l)	0,6 µl
SEA-2 (10 µmol/l)	0,6 µl
SEB-1 (10 µmol/l)	0,8 µl
SEB-2 (10 µmol/l)	0,8 µl
SEC-1 (10 µmol/l)	0,6 µl
SEC-2 (10 µmol/l)	0,6 µl
SED-1 (10 µmol/l)	0,8 µl
SED-2 (10 µmol/l)	0,8 µl
SEE-1 (10 µmol/l)	0,6 µl
SEE-2 (10 µmol/l)	0,6 µl
<i>Taq</i> -DNA-Polymerase (5 U/µl)	0,2 µl

**Tabelle 12:** Zusammensetzung des Reaktionsgemisches zur Amplifizierung der *seg*-, *seh*-, *sei*- und *sej*-Gene

Substanz	Volumen je Testansatz
Aqua dest.	16,9 µl
Inkubationspuffer (10fach)	3,0 µ
MgCl <sub>2</sub> (25 mmol/l)	1,8 µl
dNTP (10 mmol/l) (je Nukleotid)	0,8 µl
Primer:	
SEG-1 (10 µmol/l)	0,6 µl
SEG-2 (10 µmol/l)	0,6 µl
SEH-1 (10 µmol/l)	0,6 µl
SEH-2 (10 µmol/l)	0,6 µl
SEI-1 (10 µmol/l)	0,6 µl
SEI-2 (10 µmol/l)	0,6 µl
SEJ-1 (10 µmol/l)	0,6 µl
SEJ-2 (10 µmol/l)	0,6 µl
<i>Taq</i> -Polymerase (5U/µl)	0,2 µl

Anschließend wurden alle Isolate mit der so optimierten Multiplex-PCR untersucht.

### 3.2.2.9 Analyse der mRNA-Expression mittels Reverse Transkriptions-PCR

Die Expression der gesuchten mRNA in einem bestimmten *S. aureus*-Isolat wurde mittels Reverse Transkription (RT) der Gesamt-RNA in cDNA mit anschließender spezifischer Polymerasekettenreaktion für SE (sogenannte „two-step RT-PCR“) nachgewiesen. Um eine Degradation der RNA bei der Isolierung zu vermeiden, wurden folgende Vorsichtsmaßnahmen getroffen: Alle verwendeten Glas- und Metallgeräte wurden vor ihrer Benutzung 2 h bei 180 °C im Hitzeschrank inkubiert. Durch diese Hitzebehandlung sollte sichergestellt werden, dass eventuell vorhandene, gegenüber herkömmlichem Autoklavieren unempfindliche RNasen zerstört wurden. Das für diese Experimente hier verwendete Aqua bidest. wurde vor Verwendung mit Diethylpyrocarbonat (DEPC, 0,1 % (v/v)) versetzt und 12 h inkubiert. Anschließend wurde DEPC durch Autoklavieren bei 121°C (20 min, 2 bar) wieder zerstört. Mit dem so behandelten Aqua bidest. wurden Puffer und Lösungen angesetzt. Alle Arbeitsvorgänge (Zugabe von Lösungen, Inkubation, Zentrifugation usw.) wurden, soweit möglich, auf Eis bzw. in Kühlzentrifugen (4 °C) durchgeführt, um eventuell noch vorhandene RNase-Restaktivität zu minimieren.

#### 3.2.2.9.1 Präparation der bakteriellen Gesamt-RNA

Die kulturelle Anzüchtung der Isolate erfolgte in BHI-Medium 10 h bei 37 °C. Je 1 ml des bebrüteten Nährmediums wurde in ein steriles Reaktionsgefäß gegeben und 10 min bei 4.000 x g zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand dekantiert und die Reste des Mediums durch vorsichtiges Absaugen mit einer Pipette entfernt. Das entstandene Bakterienpellet wurde zur Zellwandlyse in 100 µl TE-Puffer mit Zusatz von 3 mg/ml Lysozym und 3 µl Lysostaphin (1 mg/ml) versetzt und bei Raumtemperatur 15 min inkubiert. Nach der Zugabe von 350 µl RLT-Puffer und gründlicher Durchmischung wurde das Reaktionsgemisch 2 min bei 10.000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde mit 250 µl Ethanol (> 96 %) versetzt und der Ansatz (=Lysat) gründlich gemischt.

Die bakterielle Gesamt-RNA wurde mit Hilfe eines kommerziellen Testkits (RNeasy Mini-Kit) entsprechend den Herstellerangaben isoliert.

Das gesamte Lysat (ca. 700  $\mu$ l) wurde auf eine RNeasy-Säule aufgetragen und 15 s bei 8.000 x *g* zentrifugiert. Zum Waschen wurde 350  $\mu$ l Puffer RW1 in die Säule pipettiert und diese 15 s bei 6.000 x *g* zentrifugiert. Anschließend wurden 80  $\mu$ l DNase-I-Mischung (2,5 Kunitz-Einheiten/ $\mu$ l) auf die RNeasy-Säule pipettiert und für 15 min bei Raumtemperatur (20–30 °C) inkubiert. Erneut wurden 350  $\mu$ l Puffer RW1 in die RNeasy-Säule pipettiert und für 15 s bei 6.000 x *g* zentrifugiert. Anschließend wurde 500  $\mu$ l Puffer RPE in die RNeasy-Säule zum Waschen pipettiert und 15 s bei 6.000 x *g* zentrifugiert. Dieser Schritt wurde wiederholt und zum Trocknen der RNeasy-Säule 2 min bei 10.000 x *g* zentrifugiert. Für die Elution wurde 50  $\mu$ l RNase-freies Wasser direkt auf die RNeasy-Säule pipettiert und für 1 min bei 10.000 x *g* zentrifugiert. Die RNA-haltigen Eluate wurden bei -80 °C gelagert.

#### **3.2.2.9.2 Durchführung der Reverse Transkriptions-PCR**

Zum Ausschluss einer Kontamination der RNA-Präparationen mit chromosomaler DNA, die die Ergebnisse der RT-PCR verfälscht hätte, wurde zunächst eine PCR mit den Oligonukleotidprimern nucA-1 und nucA-2 unter Verwendung des in Tabelle 10 angegebenen Temperaturprogramms I durchgeführt. Bei negativem Ergebnis erfolgte die reverse Transkribierung.

Reverse Transkribierung der RNA zu cDNA erfolgte standardmäßig unter Verwendung sogenannter Zufallsprimer (Random Hexamer Primer) und eines kommerziellen Systems (Omniscript™ RT Kit) entsprechend den Herstellerangaben.

Zunächst wurden je Transkribierungsansatz 1,0  $\mu$ l des Extraktes der Gesamt-RNA, 3,0  $\mu$ l RNase-freies Wasser und 1,0  $\mu$ l Zufallsprimer zusammengemischt und 10 min bei 70 °C zur Denaturierung der RNA inkubiert. Anschließend wurden (auf Eis) 15  $\mu$ l eines RT-Reaktionsgemisches zugegeben, das sich wie in Tabelle 13 angegeben zusammensetzte.

**Tabelle 13:** Zusammensetzung des Reaktionsgemisches zur Durchführung der RT

<b>Substanz</b>	<b>Volumen je Testansatz</b>
RNase-freies Wasser	9,0 µl
Reaktionspuffer (5fach)	2 µl
dNTP Mix (je 5 mmol/l)	2,0 µl
Rnasin Inhibitor (40 U/µl)	1,0 µl
RT Polymerase (4 U/µl)	1,0 µl

Anschließend wurde dieser Reaktionsansatz zur Primeranlagerung zunächst für 5 min bei 25 °C inkubiert. Die cDNA-Synthese erfolgte anschließend bei 42 °C für 60 min, gefolgt von einem Denaturierungsschritt für 2 min bei 94 °C. Die so erhaltene cDNA diente nun als „template“ in den folgenden spezifischen PCR-Reaktionen zum Nachweis von SE-Genen bzw. wurde bis zur jeweiligen Verwendung bei –20 °C gelagert.

Zum Nachweis eines spezifischen SE-Transkripts wurde die in 3.2.2.2 beschriebene PCR angewendet. Die Amplifizierung der cDNA erfolgte unter Verwendung von 2,5 µl des unter 3.2.2.9.2 erhaltenen cDNA-Ansatzes mit den in Tabelle 9 aufgeführten Primern. Die PCR-Bedingungen für diese Primerpaare (Annealingtemperatur, MgCl<sub>2</sub>-Konzentration, Anzahl der Zyklen usw.) entsprachen dem für DNA unter 3.2.2.2 beschriebenen Protokoll. Der Nachweis der PCR-Produkte erfolgte wie in 3.2.2.3 beschrieben.

### **3.2.3 Nachweis der Enterotoxine mittels Enzymimmuntest**

Der Nachweis der Staphylokokken-Enterotoxine SEA, SEB, SEC, SED und SEE erfolgte mit Hilfe eines kommerziellen Sandwich-Enzymimmuntests (RIDASCREEN, SE-EIA, „enzyme immunoassay“). Für die Untersuchung wurden 33 Toxingen-positive sowie mehrere (n = 6) Toxingen-negative Isolate ausgewählt. Zunächst wurden die zu untersuchenden Isolate jeweils in 10 ml flüssiger BHI-Bouillon über Nacht bei 37 °C bebrütet. Anschließend wurde jeder Kulturansatz zentrifugiert (10 min, 6.000 x g) und der Überstand steril filtriert.

Zur Durchführung des EIA gemäß den Angaben des Herstellers wurden BHI-Kulturfiltrate in die Kavitäten der Mikrotiterstreifen einpipettiert und inkubiert. Nach einem Waschschrift erfolgte die Zugabe eines Enzym-(POD)-konjugierten Anti-SE-Antikörpergemisches. Nach Inkubation dieses Antikörpergemisches wurde wiederum gewaschen, und Substrat- (Harnstoffperoxid) sowie Chromogenlösung (Tetramethylbenzidin) zugegeben. Nach Zugabe des Stopp-Reagenzes (Schwefelsäure 1 mol) wurden die Mikrotiterstreifen bei 450 nm photometrisch ausgewertet. Anhand der gemessenen Absorptionswerte für Proben und SE-Standards wurde die SE-Konzentration semiquantitativ abgeschätzt. Die qualitative Auswertung der Ergebnisse (positiv-negativ) erfolgte nach Herstellerangaben mittels Grenzwertberechnung: Als Grenzwert wird der Mittelwert der Extinktionen der Negativkontrollen plus 0,15 Extinktionseinheiten festgelegt. Proben über dem Grenzwert werden als positiv bewertet.

Zur Ermittlung der den SE-positiven Kulturfiltraten zugrunde liegenden Keimzahlen wurde zusätzlich der Gehalt der pro ml Ansatz enthaltenen Staphylokokken mittels Spatellplattenverfahren (nach der amtlichen Methode L 01.00-57 § 35 LMBG) bestimmt. Hierzu wurde für jedes Isolat aus der BHI-Bouillon eine Verdünnungsreihe angefertigt und je 0,1 ml der Verdünnungsstufen im Doppelansatz auf einen nicht selektiven Nährboden (Plate Count-Agar) ausgespatelt und bebrütet (72 h bei 30 °C). Zur Auszählung wurden diejenigen Platten verwendet, die zwischen 10 und 300 Kolonien aufwiesen sowie die nächsthöhere Verdünnungsstufe.

Die Keimzahl je ml wird nach folgender Zahlenwertgleichung berechnet:

$$c = \frac{\Sigma C}{n_1 \cdot 1 + n_2 \cdot 0,1} \cdot d$$

*c*: Keimzahl je ml (Anzahl der koloniebildenden Einheiten)

$\Sigma C$ : Summe der Kolonien aller Platten

*n*<sub>1</sub>: Anzahl der Platten der niedrigsten Verdünnung

*n*<sub>2</sub>: Anzahl der Platten der nächsthöheren Verdünnung

*d*: Faktor der niedrigsten ausgewerteten Verdünnung

## 4 ERGEBNISSE

### 4.1 Bakteriologie

#### 4.1.1 Vorkommen Koagulase-positiver Staphylokokken in Ziegenkäse

Bei der mikrobiologischen Untersuchung der 181 Ziegenkäseproben wurden insgesamt in 14 Fällen (7,7 %) Koagulase-positive Staphylokokken (Nachweisgrenze  $10^1$  KBE/g) mittels Untersuchung nach der Methode L.01.00-1 und L01.00-24 der amtlichen Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 35 LMBG nachgewiesen. Das Vorkommen von Koagulase-positiven Staphylokokken in Bezug auf die Herkunft der Käseproben ist in Tabelle 14 dargestellt. In Käse aus konventioneller Herstellung wurden deutlich häufiger Koagulase-positive Staphylokokken nachgewiesen als in solchen aus deklariert ökologischer Erzeugung.

**Tabelle 14:** Vorkommen von Koagulase-positiven Staphylokokken in Käseproben unterschiedlicher Herkunft

Herkunft der Käse	Nachweis Koagulase-positiver Staphylokokken n (%)
Aus konventioneller Herstellung (n = 61)	8 (13,1)
Deklariert als aus ökologischer Erzeugung (n = 120)	6 (5)
Σ (n = 181)	14 (7,7)

Tabelle 15 gibt einen Überblick über die Keimzahlbereiche (KBE/g) für Koagulase-positive Staphylokokken in positiven Käseproben. In zwei Proben wurde die in MilchV Anlage 6 für betriebliche Eigenkontrollen zulässige Keimzahl überschritten, wobei in diesem Zusammenhang *S. aureus* als Nachweis für mangelnde Hygiene zu sehen ist.

**Tabelle 15:** Koagulase-positive Staphylokokken (KBE/g) in verschiedenen Käsesorten aus Rohmilch oder pasteurisierter Milch (n = 14)

<b>Herkunft</b>	<b>Proben-Nr.</b>	<b>Käsesorte</b>	<b>aus Rohmilch / pasteurisierter Milch</b>	<b>KBE/g</b>	<b>Bewertung nach MilchV</b>
konventionell (n = 8)	A32-F	<b>Frischkäse</b>	<b>Pasteurisiert</b>	<b>3,1 x 10<sup>3</sup></b>	<b>&gt;M</b>
	13-F	Frischkäse	Rohmilch	3,0 x 10 <sup>1</sup>	>m
	A26-F	<b>Frischkäse</b>	<b>Rohmilch</b>	<b>9,1 x 10<sup>2</sup></b>	<b>&gt;M</b>
	1-W	Weichkäse	Rohmilch	4,8 x 10 <sup>2</sup>	<m
	A53-W	<b>Weichkäse</b>	<b>Pasteurisiert</b>	<b>1,1 x 10<sup>3</sup></b>	<b>&gt;M</b>
	A59-W	<b>Weichkäse</b>	<b>Pasteurisiert</b>	<b>3,0 x 10<sup>4</sup></b>	<b>&gt;M</b>
	A60-S	<b>Halbfester Schnittkäse</b>	<b>Pasteurisiert</b>	<b>3,3 x 10<sup>4</sup></b>	<b>&gt;M</b>
	8-S	<b>Halbfester Schnittkäse</b>	<b>Pasteurisiert</b>	<b>8,6 x 10<sup>5</sup></b>	<b>&gt;M</b>
ökologisch (n = 6)	A44-F	<b>Frischkäse</b>	<b>Rohmilch</b>	<b>1,3 x 10<sup>5</sup></b>	<b>&gt;M</b>
	A49-W	Weichkäse	Pasteurisiert	1,6 x 10 <sup>2</sup>	>m
	A44-W	Weichkäse	Rohmilch	5,3 x 10 <sup>1</sup>	<m
	V50-S	Ziegengouda	Rohmilch	5,0 x 10 <sup>1</sup>	<m
	V57-S	Ziegenschnittkäse	Rohmilch	8,0 x 10 <sup>1</sup>	<m
	V85-S	Ziegengouda	Pasteurisiert	3,8 x 10 <sup>1</sup>	<m

Frischkäse darf nur aus wärmebehandelter Milch hergestellt werden, Ausnahme hiervon stellt die Direktvermarktung dar. Die hier untersuchten Proben stammten aus Direktvermarktung. Im Bezug auf den Grenzwert M = 100 KBE/g für Frischkäse im Be- und Verarbeitungsbetrieb (MilchV Anlage 6) wurde bei drei Frischkäsen (zwei konventioneller Herkunft, einer ökologischer Herkunft) der Grenzwert überschritten, bei einem weiteren Frischkäse konventioneller Herkunft wurde der Schwellenwert (m = 10 KBE/g) überschritten. Bei zwei Weichkäsen aus wärmebehandelter Milch (konventioneller Herkunft) wurde der Grenzwert M = 1.000 KBE/g ebenfalls überschritten, bei einem Käse aus wärmebehandelter Milch und ökologischer Produktion lag die Keimzahl unter dem Grenzwert, allerdings knapp über dem Schwellenwert von m = 100 KBE/g. Bei zwei Weichkäsen aus Rohmilch lagen die Keimzahlen unter dem Grenzwert M = 10.000 KBE/g; auch der Schwellenwert von m = 1.000 KBE/g wurde unterschritten. Dies galt ebenfalls für einen Ziegenrohmilchgouda ökologischer Herkunft sowie einen Ziegenrohmilchschnittkäse ökologischer Herkunft.

Für zwei konventionell hergestellte halbfeste Schnittkäse aus pasteurisierter Milch lagen die Keimzahlen bei  $3,3 \times 10^4$  bzw.  $8,6 \times 10^5$  KBE/g, für einen ökologisch hergestellten Ziegenkouada aus pasteurisierter Milch bei  $3,8 \times 10^1$  KBE/g.

#### 4.1.2 Mikrobiologische Charakterisierung der *S. aureus*-Isolate

Insgesamt wurden für die Bestätigungsreaktionen 487 Isolate aus den 181 untersuchten Käseproben herangezogen. Tabelle 16 gibt einen Überblick über die Zahl der morphologisch typischen bzw. atypischen Kolonien und das jeweilige Ergebnis bezüglich der Koagulasereaktion.

**Tabelle 16:** Gruppierung der 487 Staphylokokken-Isolate nach Koloniemorphologie und Koagulasereaktion

Morphologie	Koagulase-positive Staphylokokken		Koagulase-negative Staphylokokken	
	Isolate (n)	isoliert aus n Käseproben	Isolate (n)	isoliert aus n Käseproben
<b>typische Kolonien</b>	17	4	45	15
<b>atypische Kolonien</b>	47	10	378	76
<b>Σ</b>	64	14	423	91

Bei der morphologischen Differenzierung (3.2.1.1) zeigte sich, dass 27,4 % ( $n = 17$ ) der 62 Isolate mit typischer Koloniemorphologie eine positive Koagulase-Reaktion aufwiesen, wohingegen von den 425 Isolaten mit atypischer Koloniemorphologie lediglich 11 % ( $n = 47$ ) Koagulase-positiv reagierten.

Somit zeigten insgesamt 64 Isolate eine positive Koagulase-Reaktion. Bei allen 64 Koagulase-positiven Isolaten handelte es sich um grampositive, unregelmäßig angeordnete, katalasepositive Kokken. Auf dem Staphylokokkenmedium nach Baird-Parker wuchsen alle Isolate aufgrund von Telluritreduktion als kleine, schwarze, glänzende, gewölbte Kolonien mit einem Durchmesser von 1-5 mm, 17 der Isolate waren von einem klaren Hof

umgeben („typische Kolonien“); bei diesen hatte sowohl eine Proteolyse als auch eine Lipolyse stattgefunden.

Die Überprüfung weiterer Merkmale ergab, dass alle Isolate Mannit vergärten, Kochsalztoleranz aufwiesen und Thermo-nuklease-positiv waren. Lipolytische bzw. proteolytische Eigenschaften wurden nur für 17 Isolate festgestellt, wobei diese Isolate bei der morphologischen Differenzierung typischer Kolonien identifiziert waren.

Aufgrund dieser Ergebnisse wurden diese 64 Isolate als *S. aureus* identifiziert.

Bei der Überprüfung auf Hämolsine zeigten sich folgende Ergebnisse: Bei dreizehn der untersuchten Stämme war lediglich die typischerweise durch  $\alpha$ -Hämolsin bewirkte Hämolyse deutlich zu erkennen. Eine reine  $\beta$ -Hämolsin-Wirkung zeigte sich bei zehn der untersuchten Isolate. Der größte Teil der *S. aureus*-Isolate ( $n = 32$ ) zeigte eine Kombination aus  $\alpha$ -Hämolsin- und  $\beta$ -Hämolsin-Wirkung. Das  $\delta$ -like-Hämolsin wurde bei fünf Stämmen festgestellt, bei vier Stämmen war keine Hämolsin-Wirkung festzustellen. Die Aufteilung der unterschiedlichen Hämolsine ist in Tabelle 17 zusammengefasst dargestellt.

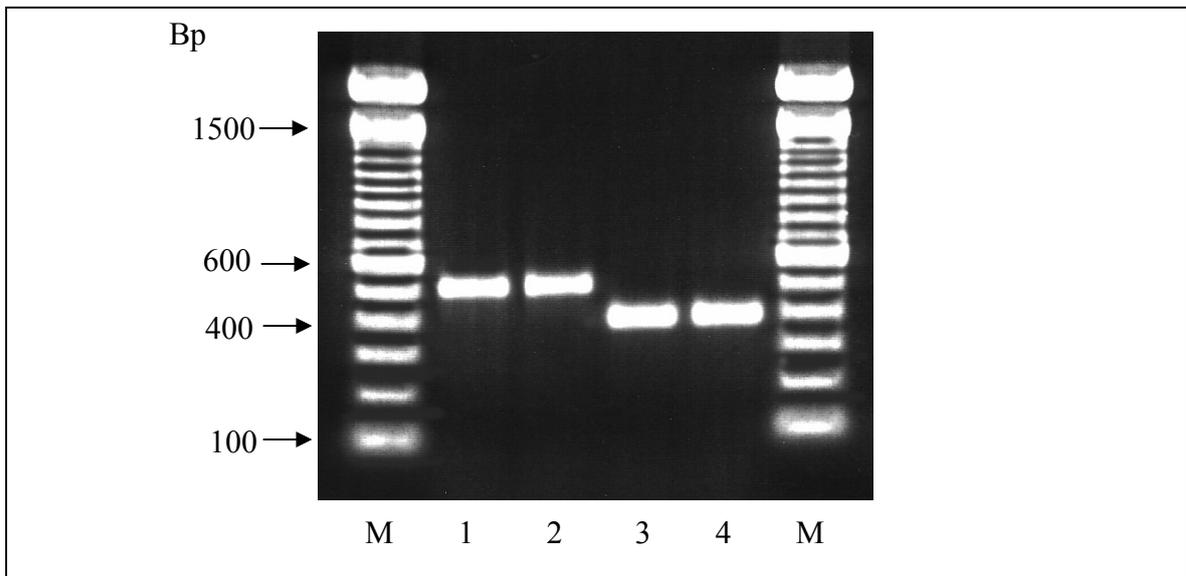
**Tabelle 17:** Vorkommen von Hämolsinen bei den 64 untersuchten *S. aureus*-Isolaten (nach der von SKALKA ET AL. (1979) beschriebenen Methode ermittelt)

Hämolsinbildung	Vorkommenshäufigkeit	
	n Isolate	% Isolate
nur $\alpha$ - Hämolsin	13	20,3
nur $\beta$ -Hämolsin	10	15,6
$\alpha$ + $\beta$ -Hämolsin	32	50
$\delta$ -like-Hämolsin	5	7,8
keine Hämolsin-Bildung	4	6,3

## 4.2 Charakterisierung der *S. aureus*-Isolate mittels Polymerasekettenreaktion (PCR)

### 4.2.1 Nachweis *S. aureus*-spezifischer Genabschnitte

Die Amplifizierung des *S. aureus*-spezifischen Abschnitts der 16S-23S rDNA „intergenic spacer region“ (ISR) mit den in 3.2.2.5 beschriebenen Oligonukleotidprimern und Temperaturprogrammen ergab für 48 Isolate nach gelelektrophoretischer Auswertung ein Amplikon mit der erwarteten einheitlichen Größe von 420 Bp, für 11 Isolate wurde ein Amplikon der Größe 520 Bp ermittelt. Bei 5 Isolaten wurde keine Amplifizierung erreicht (Tab. 19 und Abb. 2).



**Abbildung 2:** Ergebnisse der Amplifizierung der ISR von vier *S. aureus*-Isolaten (1 und 2 = 520 Bp, 3 und 4 = 420 bp, M = Marker, Invitrogen 100 bp DNA Ladder)

Die Mehrzahl der als speziesspezifisch für *S. aureus* angesehenen getesteten Gensequenzen war in allen Isolaten nachweisbar (Tab. 18). Lediglich das  $\beta$ -Hämolysin-Gen (*hly*) war in 5 Isolaten nicht nachweisbar, diese Isolate waren auch phänotypisch negativ für  $\beta$ -Hämolysin. Das Fibronektin-Gen *fibB* war nur bei wenigen Isolaten nachweisbar.

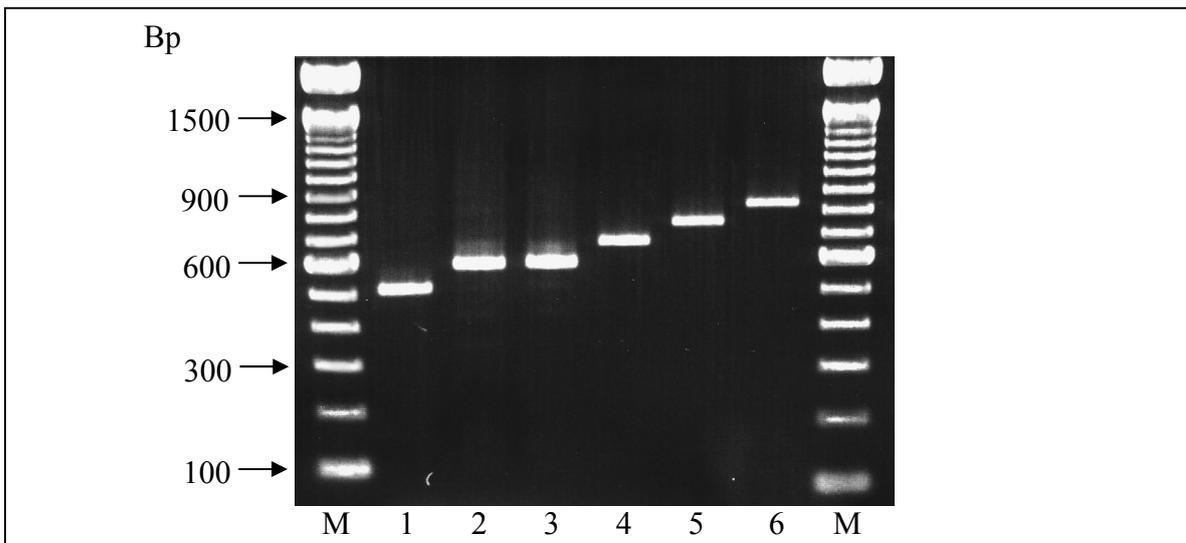
**Tabelle 18:** Übersicht über die PCR-Ergebnisse von 64 *S. aureus*-Isolaten zum Nachweis *S. aureus*-spezifischer Genabschnitte

<b><i>S. aureus</i>-spezifische Genabschnitte</b>	<b>Anzahl (n) der positiven Stämme</b>	<b>Größe des Amplikons (Bp)</b>
23S rRNA	64 (100 %)	1270
<i>S. aureus</i> -spezifischer Genabschnitt „Genom“ (Sa442)	64 (100 %)	442
Thermonuklease-Gen <i>nucA</i>	64 (100 %)	279
$\alpha$ -Hämolysin-Gen <i>hla</i>	64 (100 %)	535
$\beta$ -Hämolysin-Gen <i>hly</i>	59 (92 %)	833
Fibronektin A-Gen <i>fbaA</i>	64 (100 %)	1279
Fibronektin B-Gen <i>fbaB</i>	9 (14 %)	813

Der Nachweis des Koagulase-Gens *coa* war zwar in allen Isolaten positiv, ergab aber zahlreiche Genpolymorphismen (Tab. 19, Abb. 3).

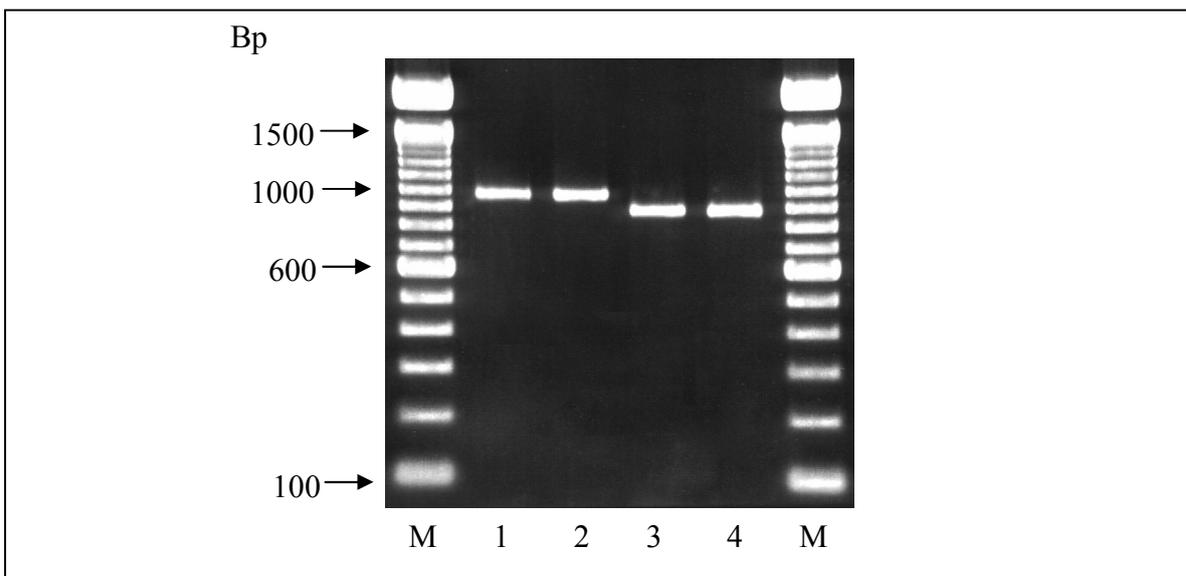
**Tabelle 19:** Größe der Amplikons des Koagulase-Gens *coa* der 64 untersuchten *S. aureus*-Isolate sowie die Anzahl der „Repeats“

<b>Anzahl Isolate</b>	<b>Größe des Amplikons (Bp)</b>	<b>Anzahl (n) der „Repeats“</b>
2 (3,1 %)	520	4
13 (20,3 %)	600	5
26 (40,6 %)	680	6
13 (20,3 %)	780	7
10 (15,6 %)	840	8



**Abbildung 3:** Variabilität der Amplifikate des Koagulase-Gens *coa* von sechs *S. aureus*-Isolaten (1 = 520 Bp, 2 und 3 = 600 Bp, 4 = 680 Bp, 5 = 780 Bp, 6 = 840 Bp, M = Marker, Invitrogen 100 bp DNA Ladder)

Fast alle Isolate (93,7 %) waren darüber hinaus positiv für das „clumping factor“-Gen *clfA*, wobei alle Isolate im „clumping factor“-Test positiv waren. Hier ergab die Mehrzahl (58 Isolate) ein Amplikon von 1000 Bp, lediglich 2 Isolate ergaben Amplifikate mit einer abweichenden Größe von 940 Bp (Abb. 4).

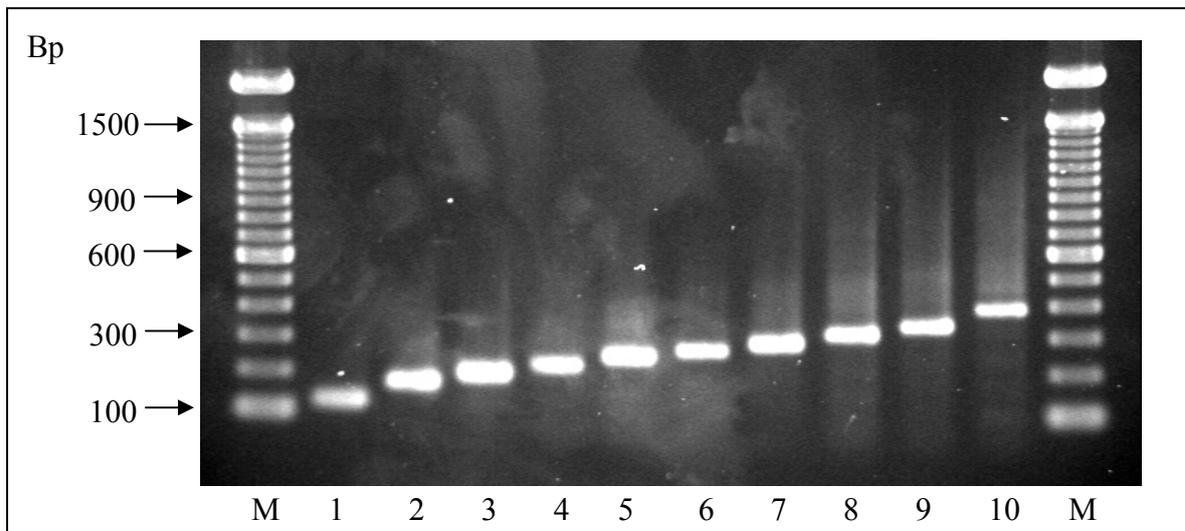


**Abbildung 4:** Typische Amplikons des „clumping factor“-Gens *clfA* von vier *S. aureus*-Isolaten (1 und 2 = 1000 Bp; 3 und 4 = 940 Bp; M = Marker, Invitrogen 100 bp DNA Ladder)

Die X-Region des Protein A-Gens *spa* war in allen Isolaten nachweisbar, wobei hier deutliche Größenunterschiede der Amplifikate festgestellt wurden. Diese konnten einer entsprechenden Anzahl von sogenannten „Repeats“ zugeordnet werden (Tab. 20, Abb. 5). Die IgG-bindenden Regionen des Protein A-Gens *spa* waren ebenfalls in allen Isolaten nachweisbar. Auch hier ergaben sich, wie für die X-Region, unterschiedliche Repeats-Zahlen und damit Amplifikate unterschiedlicher Größe (Tab. 21, Abb. 6).

**Tabelle 20:** Größe der Amplikons der X-Region des Protein A-Gens *spa* und postulierte Anzahl von „Repeats“ der *S. aureus*-Isolate

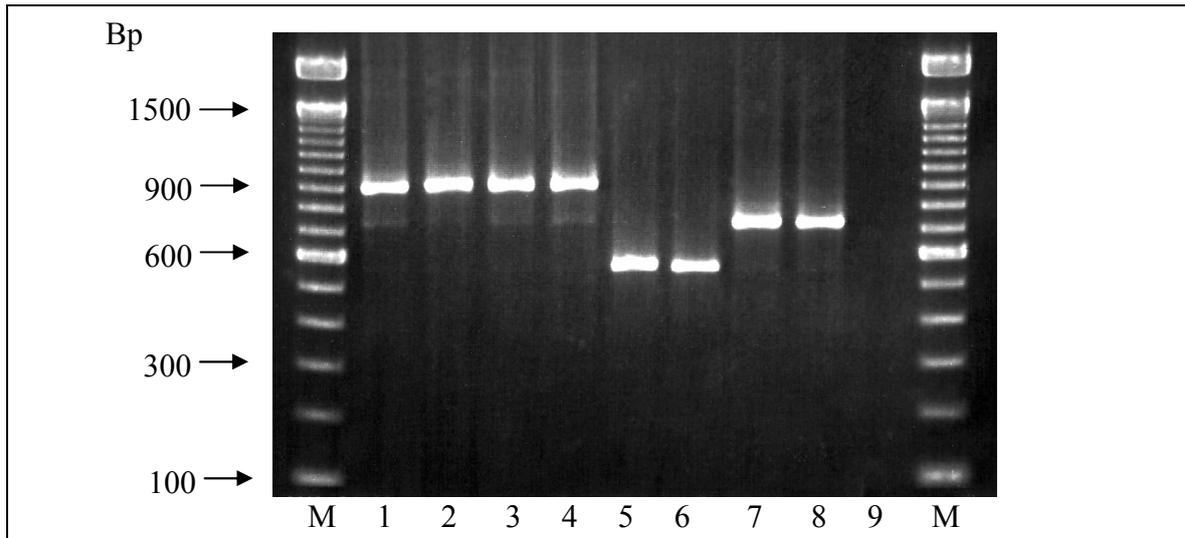
Anzahl (%) Isolate (n = 64, 100 %)	Größe des Amplikons (Bp)	Anzahl der „Repeats“
10 (15,6 %)	120	3
11 (17,1 %)	170	5
4 (6,3 %)	190	6
2 (3,1 %)	220	7
4 (6,3 %)	240	8
3 (4,7 %)	270	9
5 (7,8 %)	290	10
13 (20,3 %)	320	11
7 (11 %)	340	12
5 (7,8 %)	390	14



**Abbildung 5:** Typische Amplikons der X- Regionen des Protein A-Gens *spa* von zehn *S. aureus*-Isolaten (1 = 120 Bp, 2 = 170 Bp, 3 = 190 Bp, 4 = 220 Bp, 5 = 240 Bp, 6 = 270 Bp, 7 = 290 Bp, 8 = 320, 9 = 340 Bp, 10 = 390 Bp, M = Marker, Invitrogen 100 Bp DNA Ladder)

**Tabelle 21:** Größe der Amplikons der IgG-bindenden Regionen des Protein A-Gens *spa* sowie der postulierten Anzahl von Repeats der *S. aureus*-Isolate

Anzahl (%) Isolate	Größe des Amplikons (Bp)	Anzahl der „Repeats“
55 (85,9 %)	920	5
5 (7,8 %)	750	4
4 (6,3 %)	580	3



**Abbildung 6:** Typische Amplikons der IgG-bindenden Regionen des Protein A-Gens *spa* von acht *S. aureus*-Isolaten (1 bis 4 = 920 Bp; 5 und 6 = 580 Bp; 7, 8 = 750 Bp; 9 = Leerwert, M = Marker, Invitrogen 100 bp DNA Ladder)

#### 4.2.2 Nachweis von Staphylokokken-Enterotoxigenen und weiteren Superantigen-Genen mittels PCR

Die Ergebnisse des Nachweises der Enterotoxigene *sea* - *seo* sowie der Gene für TSST-1 (*tst*), ETA (*eta*) und ETB (*etb*) in den Referenzstämmen ist in Tabelle 22 zusammengestellt.

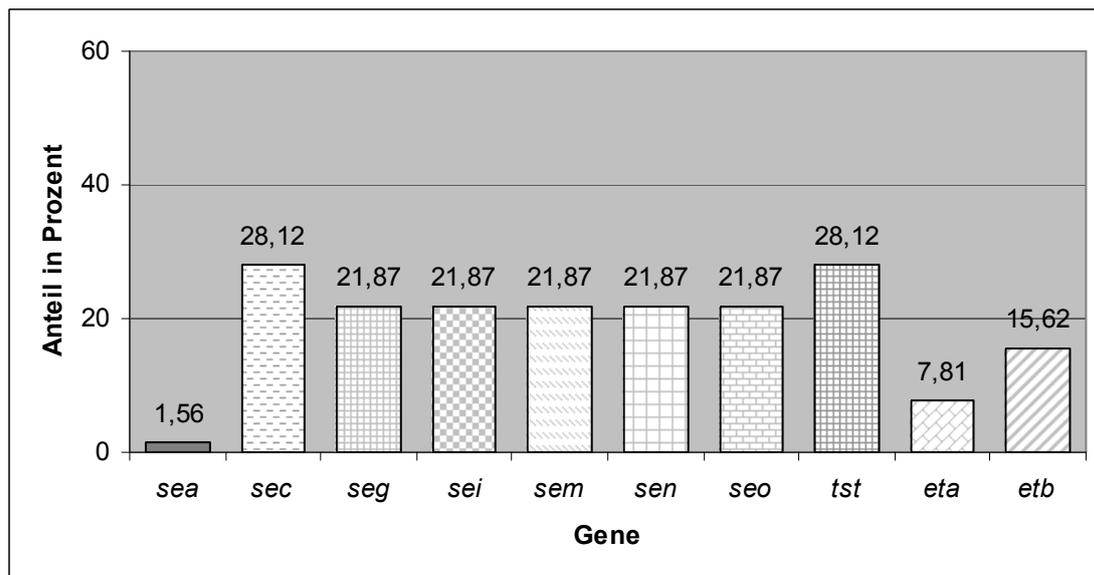
**Tabelle 22:** Ergebnisse der Überprüfung der verwendeten *S. aureus*-Enterotoxin-Referenzstämmen auf Toxinbildung (SEA-SEE) und Toxingene

Referenzstamm-Nr.	Toxinbildung (nach Quellenangabe)	Toxingene
619/93	(SEA)	<i>sea, seh</i>
62/92	(SEB)	<i>seb, seg, sei, sem, sen, seo</i>
1229/93	(SEC)	<i>sec, seg, sei, sem, sen, seo</i>
1634/93	(SED)	<i>sed, sej, seg, sei, sem, sen, seo</i>
FRI 918/93	(SEE)	<i>see, tst</i>
Ly 990055	(SEG + SEI)	<i>seg, sei, sem, sen, seo</i>
Ly 990552	(SEH)	<i>seh, sea</i>
2724	(SEJ)	<i>sej, sed</i>
161/93	(TSST-1)	<i>tst, seh, seg, sei, sem, sen</i>
114/92	(ETA+ETB)	<i>eta, etb, seg, sei, sem, sen, seo</i>

Die Überprüfung der 64 Isolate von *S. aureus* aus Ziegenkäse auf Enterotoxingene ergab für 33 Isolate (51,6 %) positive Nachweise für ein oder mehrere Toxingene. Für die „klassischen“ Enterotoxine SEA- SEC wurden jedoch lediglich die Toxingene *sea* und *sec* nachgewiesen. Der Anteil dieser toxinogenen Isolate (n = 19) lag, bezogen auf die Gesamtzahl der Isolate, bei lediglich 29,6 %. Weitere 22 % der Isolate waren ausschließlich für die „neueren“ Enterotoxingene positiv, wobei in allen diesen Isolaten mehrere Gene gleichzeitig nachweisbar waren. Rund 8 % der Proben wiesen zwar keine Enterotoxingene, jedoch das Gen für das exfoliative Toxin B auf. In 40 % der Isolate wurden keine Toxingene nachgewiesen (Tab. 23, Abb. 7).

**Tabelle 23:** Nachweis der Gene zur Bildung der Staphylokokkenenterotoxine und *tst*, *eta* und *etb*-Gene bei 64 untersuchten *S. aureus*-Isolaten

Nachgewiesenes Toxingen	positive Isolate		Isolate stammend aus n Käseproben
	Anzahl	%	
<i>sea</i>	1	1,56	1
<i>sec</i>	18	28,12	4
<i>seg</i>	14	21,87	4
<i>sei</i>	14	21,87	4
<i>sem</i>	14	21,87	4
<i>sen</i>	14	21,87	4
<i>seo</i>	14	21,87	4
<i>tst</i>	18	28,12	4
<i>eta</i>	5	7,81	1
<i>etb</i>	10	15,62	2



**Abbildung 7:** Übersicht über die Vorkommenshäufigkeit der einzelnen Enterotoxingene und der *tst*, *eta* und *etb*-Gene bei den 64 untersuchten *S. aureus*-Isolaten

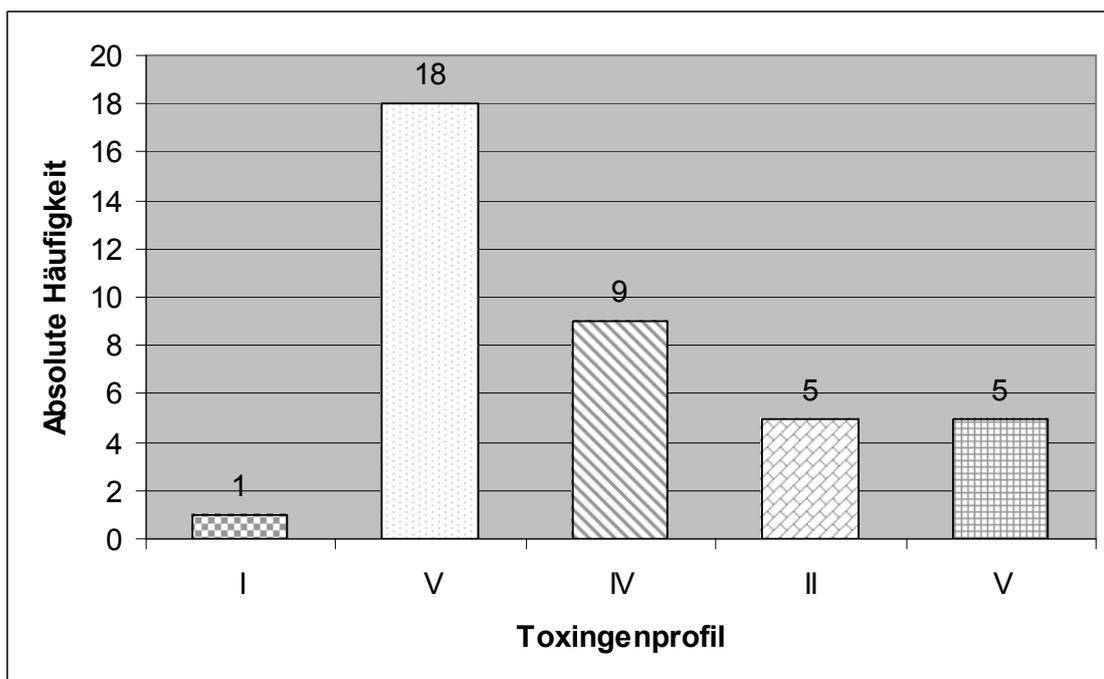
**Tabelle 24:** Zuordnung Enterotoxigenen-positiver Isolate im Hinblick auf ihre Herkunft

Käseprobe-Nr.	KBE/g	Anzahl Isolate	Isolate identisch	nachgewiesene Enterotoxingene
A32-F	$3,1 \times 10^3$	5	ja	-
13-F	$3,0 \times 10^1$	5	ja	<i>etb</i>
A26-F	$9,1 \times 10^2$	5	ja	-
1-W	$4,8 \times 10^2$	5	ja	-
A53-W	$1,1 \times 10^3$	5	ja	<i>seg</i> , <i>sei</i> , <i>sem</i> , <i>sen</i> , <i>seo</i> , <i>eta</i> , <i>etb</i>
A59-W	$3,0 \times 10^4$	5	ja	<i>sec</i> , <i>tst</i>
A60-S	$3,3 \times 10^4$	5	ja	<i>sec</i> , <i>tst</i>
8-S	$8,6 \times 10^5$	5	nein	<i>sea</i> (n=1) - (n=4)
V44-F	$1,3 \times 10^5$	5	ja	-
A49-W	$1,6 \times 10^2$	5	ja	<i>sec</i> , <i>tst</i>
A44-W	$5,3 \times 10^1$	6	nein	<i>seg</i> , <i>sei</i> , <i>sem</i> , <i>sen</i> , <i>seo</i> (n=4) - (n=2)
V50-S	$5,0 \times 10^1$	1	ja	<i>seg</i> , <i>sei</i> , <i>sem</i> , <i>sen</i> , <i>seo</i>
V57-S	$8,0 \times 10^1$	4	ja	<i>seg</i> , <i>sei</i> , <i>sem</i> , <i>sen</i> , <i>seo</i>
V85-S	$3,8 \times 10^1$	3	ja	<i>sec</i> , <i>tst</i>

Im Hinblick auf die Herkunft der 64 *S. aureus*-Isolate aus insgesamt 14 positiven Ziegenkäseproben zeigte sich, dass die Isolate aus jeder Probe zumeist identische Enterotoxigen-Profile aufwiesen. Aufgrund der Verteilung der einzelnen Toxingene konnten die Isolate fünf verschiedenen Enterotoxinprofilen zugeordnet werden (Tab. 25), die mit in Abbildung 8 aufgeführter Häufigkeit vertreten waren.

**Tabelle 25:** Toxingenprofile und Vorkommenshäufigkeit bei *S. aureus*-Isolaten aus Ziegenkäse (n = 64)

Toxingenprofil	Nachgewiesene Toxingene	Isolate		Probenanzahl
		n	%	n
I	<i>sea</i>	1	1,56	1
II	<i>seg + sei + sem + sen + seo + eta + etb</i>	5	7,81	1
III	<i>etb</i>	5	7,81	1
IV	<i>seg + sei + sem + sen + seo</i>	9	14,06	3
V	<i>sec + tst</i>	18	28,12	4
0	keine Toxingene	26	40,62	6



**Abbildung 8:** Darstellung der Häufigkeitsverteilung der Toxingenprofile (vgl. Tab. 25)

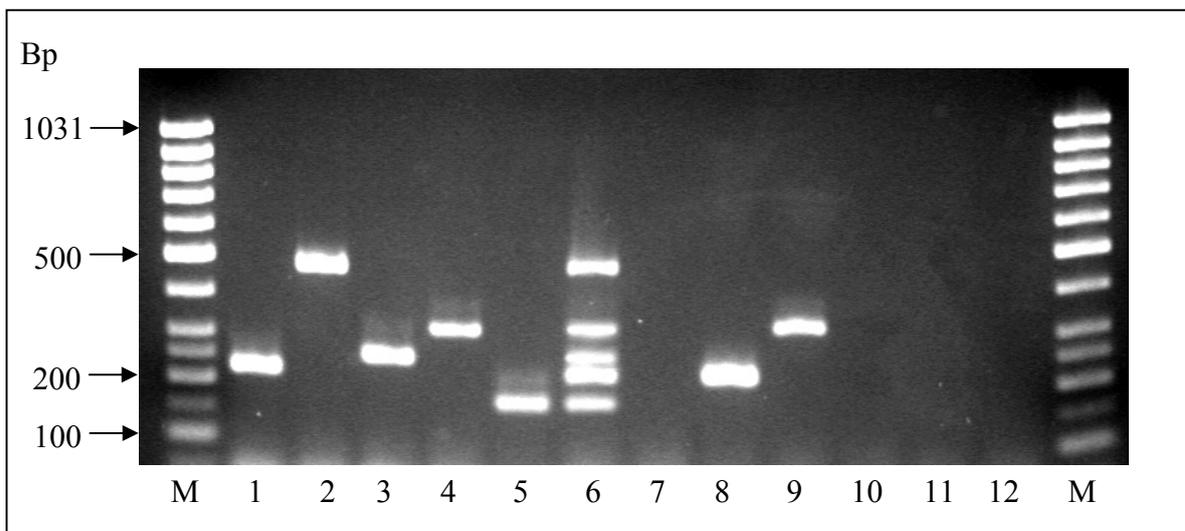
### 4.2.3 Multiplex-PCR

Die beiden Multiplex-PCR-Protokolle sowohl für die klassischen (*sea*, *seb*, *sec*, *sed* und *see*) als auch für die „neuen“ Enterotoxingene (*seg*, *seh*, *sei* und *sej*) wurden mit den verschiedenen Referenzstämmen (n = 10) optimiert. Hier wurden mittels optimierter Multiplex-PCR reproduzierbar übereinstimmende Ergebnisse zur Einzel-PCR erzielt. Die Abbildungen 9 und 10 zeigen die Ergebnisse des gleichzeitigen Nachweises der beiden Gruppen von Enterotoxingenen mittels Multiplex-PCR.

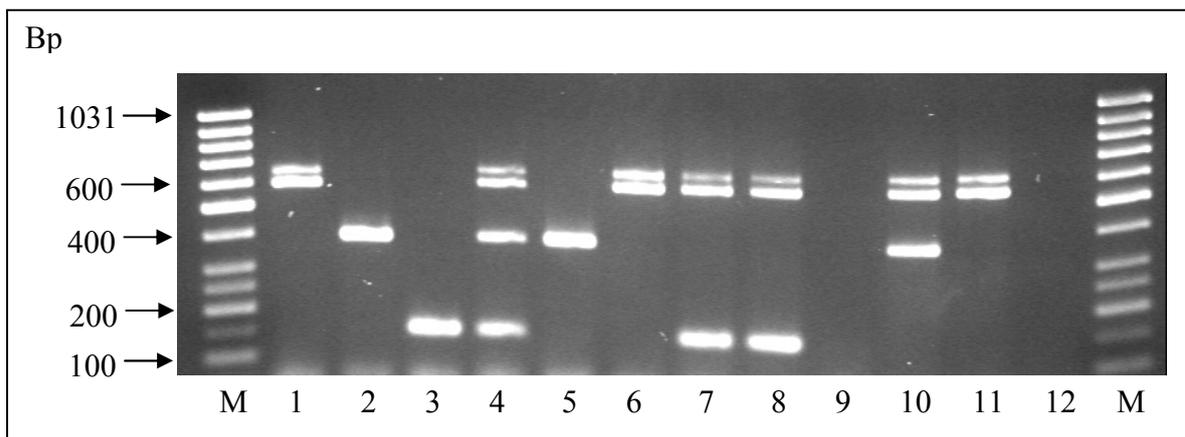
Die Ergebnisse der Isolate aus Ziegenkäse mit den beiden Multiplex-PCR-Systemen stimmten mit denjenigen der Einzelnachweise überein. Falschpositive Ergebnisse oder falschnegative Ergebnisse wurden nicht festgestellt. Allerdings fehlten in den Isolat aus Ziegenkäse die Enterotoxingene *seb*, *sed*, und *see*, so dass diesbezüglich keine Daten erhoben werden konnten. Die Ergebnisse der Multiplex-PCR und der Einzelnachweise sind in Tabelle 26 zusammengefasst.

**Tabelle 26:** Vergleich der Ergebnisse: Nachweis der Enterotoxingene *sea*, *sec*, *seg* und *sei* mittels Einzel-PCR und Multiplex-PCR

Anzahl (n) der getesteten Isolate	n positive Einzel-PCR Ergebnisse				n positive Multiplex-PCR Ergebnisse			
	<i>sea</i>	<i>sec</i>	<i>seg</i>	<i>sei</i>	<i>sea</i>	<i>sec</i>	<i>seg</i>	<i>sei</i>
1	1				1			
14			14	14			14	14
18		18				18		



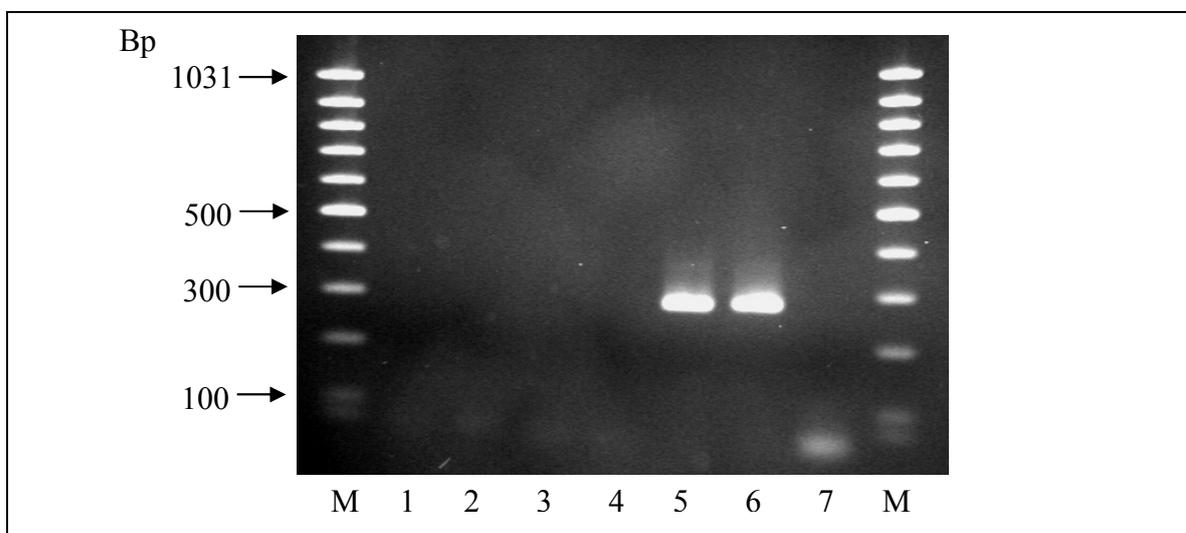
**Abbildung 9:** Typisches Ergebnis der Multiplex-PCR zum gleichzeitigen Nachweis der Gene für *sea*, *seb*, *sec*, *sed* und *see*. 1 = Amplikon (216 Bp) des *sea*-Gens von SEA-Referenzstamm (619/93); 2 = Amplikon (478 Bp) des *seb*-Gens von SEB-Referenzstamm (62/92); 3 = Amplikon (257 Bp) des *sec*-Gens von SEC-Referenzstamm (1229/93); 4 = Amplikon (317 Bp) des *sed*-Gens von SED-Referenzstamm (1644/93); 5 = Amplikon (169 Bp) des *see*-Gens von SEE-Referenzstamm (FRI 918); 6 = Amplikons des DNA-Gemisches von den SEA, SEB, SEC, SED und SEE Referenzstämmen, 7, 10 und 11 = kein Amplikon, SEG+I-, TSST- und ETA+B-Referenzstämmen; 8 = Amplikon (216 Bp) des *sea*-Gens von SEH-Referenzstamm (Ly 990552); 9 = Amplikon (317 Bp) des *sed*-Gens von SEJ-Referenzstamm (2724); 12 = Leerwert, M = Marker, Gene<sup>®</sup> Ruler 50 Bp Ladder)



**Abbildung 10:** Typisches Ergebnis der Multiplex-PCR zum gleichzeitigen Nachweis der *seg*, *seh*, *sei* und *sej*-Gene. (1 = Amplikon (642 Bp) des *seg*-Gens und (577 Bp) *sei*-Gen von SEG+I-Referenzstamm (Ly 990055); 2 = Amplikon (407 Bp) des *seh*-Gens von SEH-Referenzstamm (Ly 990552); 3 = Amplikon (190 Bp) des *sej*-Gens von SEJ-Referenzstamm (2724); 4 = Amplikons des DNA-Gemisches von den SEG+SEI-, SEH- und SEJ-Referenzstämmen; 5 = Amplikon (407 Bp) des *seh*-Gens vom SEA-Referenzstamm (619/93); 6 = Amplikon (642 Bp) des *seg*-Gens und (577 Bp) *sei*-Gen von SEB-Referenzstamm (62/92); 7 und 8 = Amplikon (642 Bp) des *seg*-Gens, (577 Bp) *sei*-Gen und (190 Bp) des *sej*-Gens von SED-Referenzstamm (1644/93); 9 = kein Amplikon von SEE-Referenzstamm (FRI 918); 10 = Amplikon (642 Bp) des *seg*-Gens, des (577 Bp) *sei*-Gens und (407 Bp) des *seh*-Gens von TSST-1 Referenzstamm (161/93); 11 = Amplikon (642 Bp) des *seg*-Gens und des (577 Bp) *sei*-Gens von ETA+ETB-Referenzstamm (114/98); 12 = Leerwert; M = Marker, Gene<sup>®</sup>Ruler 50 Bp Ladder)

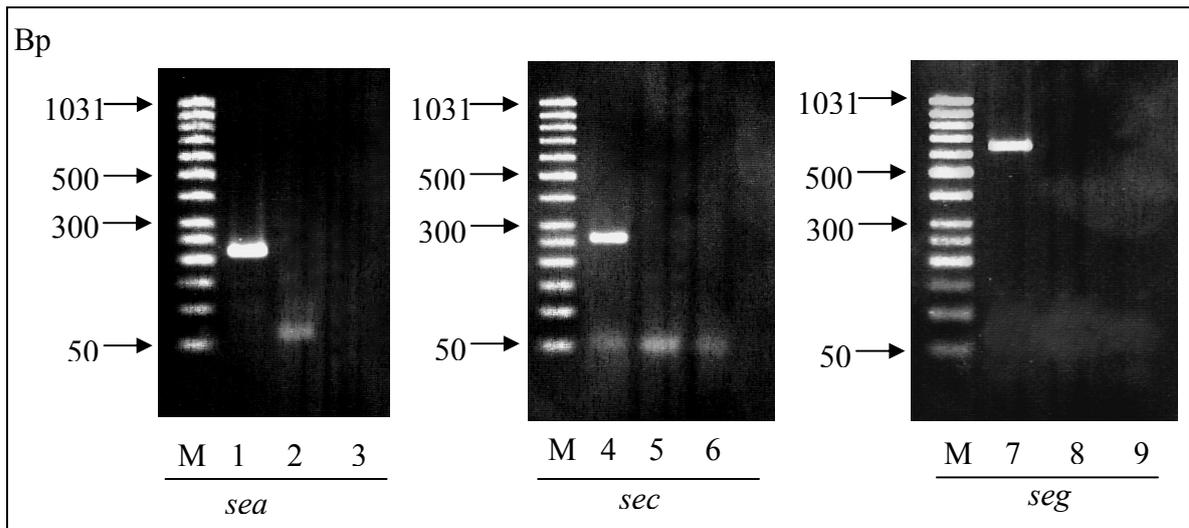
#### 4.2.4 Reverse Transkriptions-PCR

Durch Überprüfung der RNA-Eluate (3.2.2.9.1) auf Amplifikation chromosomaler DNA mittels PCR (Primer nucA-1 und nucA-2) konnte in allen für die RT-PCR eingesetzten Kulturextrakten eine Kontamination ausgeschlossen werden. In Abbildung 11 sind beispielhaft typische Ergebnisse dieser Überprüfung für vier RNA-Eluate von Referenzstämmen dargestellt.

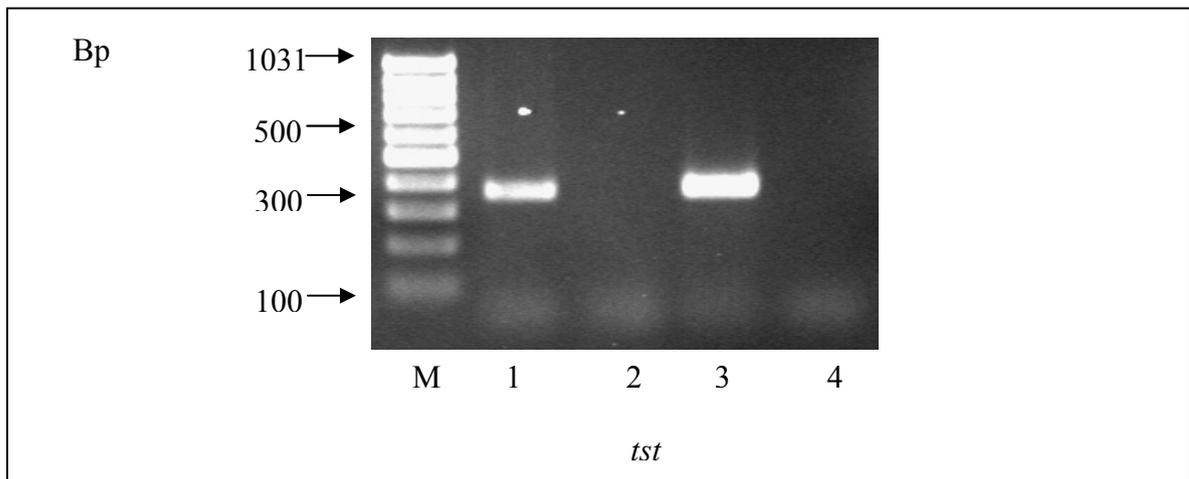


**Abbildung 11:** Typische PCR mit den Oligonukleotidprimern nucA-1 und nucA-2 zur Kontrolle der DNA-Kontamination in der RNA-Extraktion ohne RT-Schritt (1 = RNA ohne RT-Schritt von SEA-Referenzstamm (619/93); 2 = RNA ohne RT-Schritt von SEC-Referenzstamm (1229/93); 3 = RNA ohne RT-Schritt von TSST-1 Referenzstamm (161/93); 4 = RNA ohne RT-Schritt von SEG+I-Referenzstamm (Ly 990055); 5 und 6 = DNA des Kontrollstamms (Amplikon (279 Bp) des *nucA*-Gens); 7 = Leerwert; M = Marker, Gene<sup>®</sup>Ruler 100 Bp Ladder)

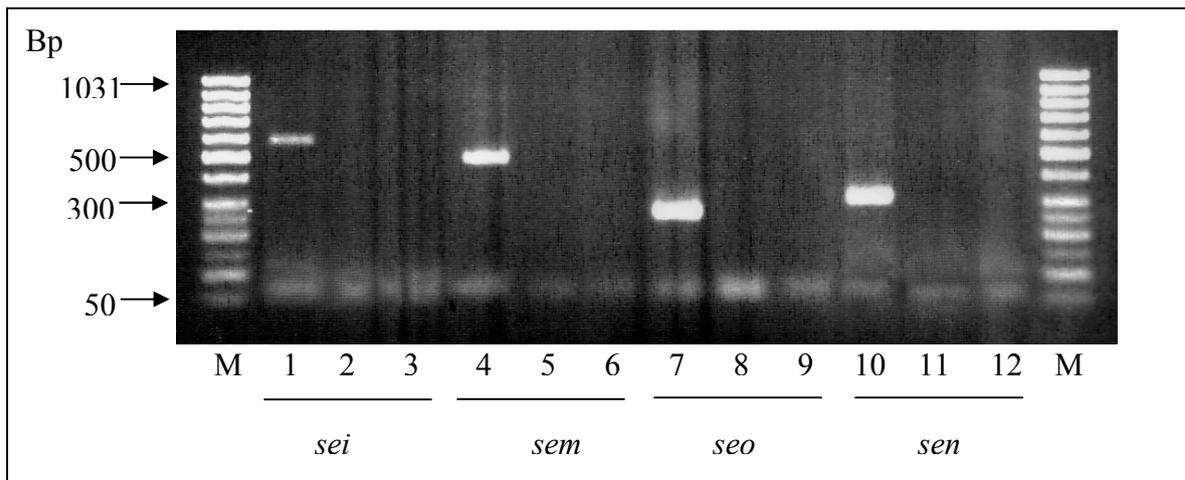
Die Etablierung der RT-PCR erfolgte zunächst unter Verwendung der Referenzstämme. Nach der Amplifizierung mit den in Tabelle 8 beschriebenen Enterotoxigen-spezifischen Primern in der PCR (3.2.2.2) konnten bei den Enterotoxinreferenzstämmen stets die erwarteten DNA-Amplifikate für *sea*, *sec*, *seg*, *sei*, *sem*, *sen*, *seo* und *tst* mit der erwarteten Größe nachgewiesen werden. In den Abbildungen 12, 13 und 14 sind jeweils typische Ergebnisse der gelelektrophoretischen Darstellung der Amplifikation nach RT-PCR die Enterotoxin-Referenzstämme dargestellt.



**Abbildung 12:** Typische Amplikons der transkribierten *sea*-, *sec*-, *tst*- und *seg*-Gene von Enterotoxin-Referenzstämmen mittels RT-PCR (1 = cDNA von SEA-Referenzstamm (619/93); 2 = RNA ohne RT-Schritt, SEA-Referenzstamm (619/93); 3 = Leerwert; 4 = cDNA, SEC-Referenzstamm (1229/93); 5 = RNA ohne RT-Schritt, SEC-Referenzstamm (1229/93); 6 = Leerwert; 7 = cDNA von SEG + SEI-Referenzstamm (990055); 8 = RNA ohne RT-Schritt, SEG+SEI-Referenzstamm (Ly 990055); 9 = Leerwert; M = Marker, Gene<sup>®</sup>Ruler 50 Bp Ladder)



**Abbildung 13:** Typisches Amplikon des transkribierten *tst*-Gens vom TSST-1 Referenzstamm (161/93) mittels RT-PCR. (1 = cDNA von TSST-1-Referenzstamm (161/93); 2 = RNA ohne RT-Schritt von TSST-1 Referenzstamm (161/93); 3 = DNA von TSST-1-Referenzstamm (161/93); 4 = Leerwert; M = Marker, Gene<sup>®</sup>Ruler 100 Bp Ladder)



**Abbildung 14:** Typische Amplikons der transkribierten *seg-*, *sei-*, *sem-*, *seo-* und *sen-* Gene von Enterotoxin-Referenzstämmen mittels RT-PCR. (1, 4, 7 und 10 = cDNA von SEG + SEI-Referenzstamm (Ly 990055); 2, 5, 8 und 11 = RNA ohne RT-Schritt von SEG + SEI-Referenzstamm (Ly 990055); 3, 6, 9 und 12 = Leerwerte; M = Marker, Gene<sup>®</sup>Ruler 50 Bp Ladder)

Der Vergleich der Ergebnisse der RT-PCR mit derjenigen der DNA-PCR ergab mit Ausnahme des *seo*-Gens eine völlige Übereinstimmung beider Methoden. Bei allen 14 für die Gene *seg*, *sei*, *sem*, *sen* und *seo* positiven Isolate konnten die Transkripte für die *seg*-, *sei*-, *sem*- und *sen*-Gene mit der erwarteten Größe nach der Amplifikation mit den in Tabelle 8 beschriebenen Enterotoxigen-spezifischen Primern in der RT-PCR mittels Gelelektrophorese nachgewiesen werden. Neun dieser 14 Isolate erwiesen sich auch als positiv bezüglich des *seo*-Transkripts, für fünf Isolate allerdings konnte kein Transkript für das *seo*-Gen nachgewiesen werden, obwohl diese Isolate mit der PCR das *seo*-Gen aufwiesen. Alle fünf Isolate stammten aus einer Käseprobe (A53-W). Das Transkript für das *sea*-Gen wurde mit der erwarteten Größe bei dem *sea*-Gen-positiven Isolat in der RT-PCR nachgewiesen. Für den Nachweis der Transkripte von *sec*- und *tst*-Gene waren exemplarisch nur 7 *sec*- und *tst*-Gen positive Isolate ausgewählt worden, in allen Fällen wurden die Transkripte für die *sec*- und *tst*-Gene nachgewiesen. Als Negativkontrollen wurden hier Enterotoxinogen-negative Isolate untersucht; hier wurden keine der untersuchten Transkripte nachgewiesen. In Tabelle 27 sind die RT-PCR- und Einzel-PCR-Ergebnisse der untersuchten Stämme vergleichend dargestellt.

**Tabelle 27:** Vergleich von PCR- und RT-PCR-Ergebnissen zum Nachweis von SEA, SEC, SEM, SEN, SEO und TSST-1

Anzahl der Isolate (n)	nachgewiesene Enterotoxingene	nachgewiesene Transkriptgene
1	<i>sea</i>	<i>sea</i>
7	<i>sec</i> <i>tst</i>	<i>sec</i> <i>tst</i>
9	<i>seg</i> <i>sei</i> <i>sem</i> <i>sen</i> <i>seo</i>	<i>seg</i> <i>sei</i> <i>sem</i> <i>sen</i> <i>seo</i>
5	<i>seg</i> <i>sei</i> <i>sem</i> <i>sen</i> <i>seo</i>	<i>seg</i> <i>sei</i> <i>sem</i> <i>sen</i> -
4	keine	keine

#### 4.3 Nachweis der Toxinproduktion mittels Enzymimmuntest

Der Vergleich der mittels Enzymimmuntest festgestellten Toxinbildung (SEA, SEC) mit den PCR bzw. RT-PCR-Ergebnissen ergab eine völlige Übereinstimmung der Ergebnisse. Für die „neuen“ Enterotoxingene konnte mit Ausnahme von *seo* in allen Fällen eine Transkription nachgewiesen werden (Tab. 28).

**Tabelle 28:** Vergleich von Enzymimmuntest-, PCR- und RT-PCR-Ergebnissen

Anzahl der Isolate	nachgewiesene Enterotoxine A - E	nachgewiesene Enterotoxingene	nachgewiesene Transkriptgene
1	SEA	<i>sea</i>	<i>sea</i>
7	SEC	<i>sec, tst</i>	<i>sec, tst</i>
11	SEC	<i>sec, tst</i>	*
9	-	<i>seg, sei, sem, sen, seo</i>	<i>seg, sei, sem, sen, seo</i>
5	-	<i>seg, sei, sem, sen, seo</i>	<i>seg, sei, sem, sen</i>
6	-	-	-

- = nicht nachweisbar; \* = nicht untersucht;

25 weitere Isolate, für die keine Enterotoxingene nachweisbar waren, wurden nicht mittels Enzymimmuntest und RT-PCR untersucht.

## 5 DISKUSSION

Die von *S. aureus* produzierten Enterotoxine gelten weltweit als eine der häufigsten Ursachen von Lebensmittelintoxikationen. Die wichtigsten Kontaminationsquellen für Käse sind an Mastitis erkrankte Tiere sowie die Haut und Schleimhaut des Menschen. Werden nach einer Kontamination keine Verfahren zur Reduzierung der Keimzahl durchgeführt, besteht im Lebensmittel unter bestimmten geeigneten Bedingungen die Möglichkeit, dass die zur Bildung einer eventuell gesundheitsgefährdenden Enterotoxinkonzentration erforderliche Keimzahl von ca.  $10^6$  KBE je ml bzw. je g erreicht wird (SINELL, 2004).

Alle in dieser Arbeit untersuchten Käseproben ( $n = 181$ ) wiesen weniger als  $10^6$  KBE/g für *S. aureus* auf, einige wenige Proben waren dennoch erheblich kontaminiert. Verglichen mit der Situation bei Kuhmilchkäse war aber die Belastungshäufigkeit und -höhe relativ gering. Grenzwertüberschreitungen im Sinne der Milchverordnung wurden nur für sieben Proben festgestellt. Dies ist in Übereinstimmung mit den Ergebnissen anderer Untersucher, die ebenfalls eine vergleichsweise geringe Belastung von Ziegenkäse mit *S. aureus* nachwiesen. Dennoch war die in dieser Arbeit festgestellte Keimzahl, insbesondere in einigen Frischkäsen, nicht als vernachlässigbar einzustufen.

Die Bestimmung der Zahl Koagulase-positiver Staphylokokken bzw. *S. aureus* wurde nach den Methoden der amtlichen Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 35 LMBG durchgeführt, wobei vom ETGP-Agar nach BAIRD-PARKER (1962) isolierte typische und atypische Kolonien zunächst im Koagulase-Test untersucht wurden. Weil HARVEY UND GILMOUR (1985) sowie OTSUKA ET AL. (1992) darauf hinwiesen, dass die positive Eigelbreaktion bei Verwendung von BAIRD-PARKER-Agar als alleiniges Kriterium für die Identifizierung von *S. aureus* nicht ausreicht, wurden in der hier vorliegenden Untersuchung entsprechend der Methode nach § 35 LMBG auch die Eigelb-negativen Kolonien, sofern sie morphologisch wie Staphylokokken aussahen, als sogenannte atypische Kolonien zur Bestätigung mit herangezogen. Aus den vorliegenden Ergebnissen zu entnehmen, wiesen relativ viele atypische Kolonien eine positive Koagulase-Reaktion auf. Die Bedeutung der weitergehenden Untersuchung auch atypischer Kolonien zeigt sich

auch in den Untersuchungen von MIWA ET AL. (2001), die Eigelb-negative enterotoxinogene *S. aureus*-Stämme bei einer Lebensmittelvergiftung isolierten.

Aufgrund der eigenen Ergebnisse war das Vorhandensein von Enterotoxinen in positiven Käseproben zwar unwahrscheinlich, da ein Wert von  $10^6$  Staphylokokken je Gramm nicht erreicht wurde. Da aber die Möglichkeit einer weiteren Vermehrung nicht auszuschließen ist, sind zumindest Keimzahlen von  $>10^3$  KBE/g nicht unkritisch zu sehen.

### 5.1 Phänotypische Charakterisierung der *S. aureus*-Isolate

Die Bestätigung Koagulase-positiver Isolate als *S. aureus* erfolgte durch einen positiven Katalase-Test, „clumping factor“ (CF)-Test, Staphaurex-Test und TNase-Test.

Die Tatsache, dass fast alle Isolate CF-positiv waren, könnte damit zusammenhängen, dass zumindest ein Teil dieser Isolate nicht caprinen, sondern humanen Ursprungs war und erst während der Be- und Verarbeitung in den Käse gelangte. Normalerweise dürfte daher die Durchführung des relativ einfachen Klumpungstests zur Bestätigung von *S. aureus* ausreichen. Der Nachweis des CF auf dem Objektträger stellt gegenüber dem Koagulase-Test eine wesentlich einfacher durchführbare Methode zur Identifizierung von *S. aureus* dar (CADNESS-GRAVES ET AL., 1943). Der CF gilt als taxonomisches Kriterium für *S. aureus* (KLOOS UND SCHLEIFER, 1986), aber nicht alle *S. aureus*-Stämme, besonders diejenigen bovinen Ursprungs, sind CF positiv. Da ein hoher Prozentsatz von Koagulase-positiven *S. aureus*-Stämmen des Menschen allerdings gleichzeitig CF positiv ist (DUTHIE, 1954; GROSSGEBAUER ET AL., 1968; HAJEK UND MARSALEK, 1969), wurde in der Routinediagnostik der zeitaufwendigere Koagulase-Nachweis z.T. durch den Objektträger-„clumping factor“-Test ersetzt. Für die aus Milch und Milchprodukten isolierten Stämme existieren unterschiedliche Angaben über das Vorkommen des CF. Während STUMPF (1988) bei 98,4 – 100 % der Koagulase-positiven Staphylokokken den „clumping factor“ nachgewiesen hat, geben andere Autoren diesen Anteil mit 44 – 66 % an (BECKER ET AL., 1989; HUMMEL ET AL., 1992; MÜLLER ET AL., 1993). Daher sollte bei der Verwendung des CF als diagnostisches Kriterium eine Überprüfung der CF-negativen Stämme im Koagulase-Test obligat sein (BECKER ET AL., 1987).

Seit einiger Zeit werden im Handel Testsysteme auf der Grundlage der Latex- oder Hämagglutination zum Nachweis des CF angeboten. Als vorteilhaft wird deren leichtere Auswertbarkeit angesehen (BECKER ET AL., 1987). In den eigenen Untersuchungen wurde daher der CF-Test zusätzlich mit einem kommerziellen Nachweisverfahren, „Staphaurex-Plus“ Testsystem, durchgeführt. Dieses Verfahren ermöglicht den gleichzeitigen Nachweis des CF und des Protein A und verwendet Latexpartikel, die mit Fibrinogen bzw. IgG beschichtet sind. VAN GRIETHUYSEN ET AL. (2001) untersuchten die Spezifität unterschiedlicher Testkits zur Identifizierung von *S. aureus* und stellten fest, dass mit dem in der vorliegenden Untersuchung verwendeten „Staphaurex-Plus Testsystem“ *S. aureus* mit 98,7 %iger Genauigkeit entdeckt werden konnte.

Eine weitere Möglichkeit der Bestätigung der Isolate als *S. aureus* erfolgte anhand des Nachweises der Thernonuklease (TNase) mit Hilfe des Fertignährmediums DNase-Testagar. Bei allen isolierten Stämmen konnte in den vorliegenden Untersuchungen eine positive Reaktion festgestellt werden. Die Fähigkeit zur TNase-Bildung gilt als ein sehr stabiles Merkmal von *S. aureus*. Diese Vorgehensweise beruht auf der Tatsache, dass 98-100 % der aus Milch und Milchprodukten isolierten Koagulase-positiven Staphylokokken ebenfalls TNase bilden (BECKER ET AL., 1989). Dieser Sachverhalt wurde auch in der vorliegenden Arbeit bestätigt. Der Nachweis der TNase-Bildung kann somit neben der Koagulase-Bildung als eines der Hauptkriterien zur Identifizierung *S. aureus*-verdächtiger Isolate angesehen werden. Die Fähigkeit, TNase zu bilden, ist aber nicht nur auf die Spezies *S. aureus* beschränkt, sondern konnte auch bei den Spezies *S. intermedius*, *S. hyicus* subsp. *hyicus*, *S. delphini* und *S. schleiferi* subsp. *coagulans* nachgewiesen werden (SCHLEIFER UND KLOOS, 1975; JASPER ET AL., 1985).

Als weiteres charakteristisches Merkmal wurde die Bildung von Hämolytinen untersucht. Nach ELEK UND LEVY (1950) ist die Bildung von Hämolytinen bei fast allen pathogenen Staphylokokkenarten nachweisbar. Dreizehn (20,3 %) der in der vorliegenden Arbeit untersuchten Isolate zeigten auf Schafblutagar eine  $\alpha$ -Hämolyse, zehn (15,6 %) Isolate wiesen eine  $\beta$ -Hämolyse auf. Nach JONSSON ET AL. (1985) gehört das  $\alpha$ -Hämolytin zu den bedeutendsten Virulenzfaktoren von *S. aureus* und kommt bei Tierisolaten häufig gemeinsam mit dem  $\beta$ -Hämolytin vor. Dieser Sachverhalt konnte bei 32 (50 %) der untersuchten Isolate der vorliegenden Untersuchung beobachtet und somit bestätigt

werden. In den vorliegenden Untersuchungen zeigten fünf Isolate (7,8 %) nach der ursprünglich von SKALKA ET AL. (1979) beschriebenen Methode eine  $\delta$ -Hämolyse. Das  $\delta$ -Toxin von *S. aureus* hat sehr starke Oberflächenaktivität und auf biologischen Membranen detergentähnliche Wirkung (MARKS UND VAUGHAN, 1950; SOMERVILLE ET AL., 2003). Die verbliebenen vier Isolate (6,3 %) zeigten keine Hämolysinbildung. Die in der vorliegenden Arbeit aufgeführten Nachweise der Hämolysine basieren auf Untersuchungsergebnissen mit Blutagarplatten. Laut CLYNE ET AL. (1992) hemmen die in Blutagarplatten möglicherweise enthaltenen sulfonierten Polymere (Agar, Heparin, Dextran-Sulfat) bzw. Lipide (Phospholipide, Fettsäuren und Cholesterol) das  $\gamma$ -Hämolysin, weshalb sein Vorkommen hier nicht überprüft werden konnte.

## 5.2 Genotypische Charakterisierung von *S. aureus*-Isolaten mittels PCR

### 5.2.1 Nachweis *S. aureus*-spezifischer Genabschnitte

Eine PCR-vermittelte Identifizierung einer Bakterienspezies ist durch molekulare Analysen bestimmter Abschnitte des bakteriellen Genoms möglich. Die Entwicklung molekulargenetischer Techniken wie die *in-vitro* Amplifikation und Klonierung von Nukleinsäurefragmenten sowie deren Sequenzierung ermöglicht heute eine kulturunabhängige Identifizierung und Charakterisierung der Bakterien auf molekularer Ebene. Seit den grundlegenden Arbeiten von CARL WOESE (1987) werden vor allem ribosomale RNAs (rRNA) oder die kodierenden Gene für eine phylogenetische Klassifizierung bzw. molekulare Typisierung von Mikroorganismen eingesetzt. Aufgrund ihrer zentralen Bedeutung in der Nukleinsäuretranslation sind diese Moleküle ubiquitär verbreitet und besitzen eine weitgehend konservierte Struktur. In der Primärstruktur wechseln sich stark konservierte Bereiche, die bei nahezu allen Organismen identisch sind, mit weniger stark oder kaum konservierten, variablen Bereichen ab, die meist ausreichende Sequenzunterschiede aufweisen, um einzelne Spezies zu unterscheiden. Man verwendet Oligonukleotidprimer stark konservierter Bereiche der rRNA-Gene. Dies erlaubt die PCR-Amplifikation der rRNA-Gene nahezu aller Vertreter der Bakterien. Eine Amplifizierung von rRNA-spezifischen Genabschnitten zur PCR-vermittelten Identifizierung von Staphylokokkenspezies unter Verwendung von speziesspezifischen Oligonukleotidprimern wurde bereits von SARUTA ET AL. (1995) und JAFFE ET AL. (2000) beschrieben. Die

einzelnen für 16S, 23S und 5S rRNA kodierenden Gene werden häufig durch eine nichtkodierende „spacer region“ getrennt. Die rRNA-Gene sind für alle Organismen überlebenswichtig und im Reich der Bakterien hoch konserviert (AMANN ET AL., 1995).

In der vorliegenden Arbeit erwies sich das von STRAUB ET AL. (1999) beschriebene PCR-vermittelte Identifizierungsverfahren zur Amplifizierung des 23S rRNA-Gens für *S. aureus*-Isolate aus Käse als einsetzbar. Als weitere Möglichkeit zur molekularen Identifizierung von *S. aureus* mittels PCR erwies sich ein Bereich der rDNA zwischen dem 16S rRNA- und dem 23S rRNA-Gen (ISR). Die DNA der ISR variiert innerhalb nahe verwandter Bakterienspezies in ihrer Größe und Sequenz weit ausgeprägter als das angrenzende 16S rRNA- bzw. das 23S rRNA-Gen (FORSMAN ET AL., 1997; SARUTA ET AL., 1997). Dies konnte auch in den eigenen Untersuchungen an einigen Isolaten festgestellt werden, bei denen keine Amplifizierung mit diesen Primern möglich war (vgl. 4.2.1). Weitere Zielregionen für die PCR-vermittelte Identifizierung der *S. aureus*-Isolate der vorliegenden Arbeit stellten das von MARTINEAU ET AL. (1998) beschriebene, für *S. aureus*-spezifische chromosomale Fragment Sa442 und das „clumping factor“- Gen *clfA* dar, wobei bei der Amplifizierung des *clfA* Gens Größenpolymorphismen festgestellt werden. Da beide verwendeten Oligonukleotidprimer auf einer konstanten Region des Gens ansetzen, könnte diese Variation aufgrund einer Deletion eines Genabschnitts entstanden sein. AKINEDEN ET AL. (2001) verwendeten bei der Untersuchung von 103 *S. aureus*-Isolaten von Rindermastitiden ebenso die genannten *clfA*-spezifischen Oligonukleotidprimer und erhielten ebenfalls Amplikongrößen von 940 und 1000 Bp. STEPHAN ET AL. (2001) hingegen fanden bei allen 34 untersuchten *S. aureus*-Stämmen eine einheitliche Amplikongröße des *clfA*-Gens von 1000 Bp.

Als weitere geeignete Möglichkeit zur PCR-vermittelten Identifizierung der *S. aureus*-Isolate erwies sich das Thermonuklease-Gen (BRAKSTAD ET AL., 1992). Wie bei BRAKSTAD ET AL. (1992) sowie KIM ET AL. (2001) und BARSKI ET AL. (1996) beschrieben, ergaben die PCR-Analysen der vorliegenden Untersuchungen für alle Isolate ein einheitliches Amplikon. Auch WILSON ET AL. (1991) verwendeten das *nuc*-Gen zum Nachweis von *S. aureus* in Magermilch. HEIN ET AL. (2001) entwickelten eine Real-Time-PCR zum quantitativen Nachweis von *S. aureus* in Käse basierend auf der Amplifikation des Thermonuklease-Gens *nuc*.

Bei der im weiteren Verlauf der vorliegenden Untersuchungen durchgeführten Amplifizierung des Koagulase-Gens *coa* und des Protein A-kodierenden Gens *spa* war konsistent für die *S. aureus*-Isolate aus Ziegenkäse und sowohl für die Identifizierung als auch aufgrund der festgestellten Genpolymorphismen für die Genotypisierung von *S. aureus*-Isolaten einsetzbar. Die Ergebnisse der genotypischen Überprüfungen (Gene für Koagulase, Protein A, Fibronectin-bindende Proteine A und B) entsprachen den Angaben anderer Untersuchungen (HOOKEY ET AL., 1998; FRÉNEY ET AL., 1996; AKINEDEN ET AL., 2001; BOOTH ET AL., 2001).

Der genotypische Nachweis der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Hämolysingene scheint in der Praxis relativ wenig Aussagekraft zu besitzen wie die festgestellten, deutlichen Diskrepanzen zwischen dem Nachweis von *hla* bzw. *hly* und dem tatsächlichen Hämolyseverhalten nahelegen. Dies wurde für *S. aureus*-Hämolysine auch von anderen Autoren berichtet (O'REILLY ET AL., 1990; CABRAL, 2003).

### **5.2.2 Nachweis von Staphylokokken-Enterotoxigenen und weiteren Superantigen-Genen mittels PCR**

Die Möglichkeiten zum direkten Nachweis von *S. aureus*-Enterotoxinen beschränken sich derzeit auf die Toxine SEA-SEE, da nur für diese Proteine Enzymimmuntests verfügbar sind. Die Tatsache, dass mittels PCR recht einfach Genpolymorphismen feststellbar sind, während die Isolierung der entsprechenden Proteine sowie die Produktion spezifischer Antikörper sehr aufwändig und teuer ist, hat in den letzten Jahren dazu geführt, dass zahlreiche neue Enterotoxingene beschrieben wurden, über deren Expression bzw. die Relevanz der entsprechenden Proteine nur wenig oder nichts bekannt ist. Die praktische Bedeutung dieser Enterotoxingene für die Lebensmittelhygiene ist daher weitgehend unklar. Prinzipiell wären diese neuen Proteine jedoch, sollten sie tatsächlich in Lebensmitteln vorkommen, sowohl lebensmittelrechtlich als auch toxikologisch von Interesse. Da keine Proteinnachweise existieren, sollte in dieser Arbeit über die mRNA geprüft werden, inwieweit mit einer Proteinexpression zu rechnen ist.

Ein grundsätzliches Merkmal der hier untersuchten Isolate von *S. aureus* war, dass jeweils alle Isolate aus einer Käseprobe praktisch identische Eigenschaften aufwiesen. Demzufolge kann davon ausgegangen werden, dass wahrscheinlich in jeder Käseprobe nur ein Klon die Gesamtzahl der festgestellten *S. aureus* dominierte.

Anhand der PCR-Ergebnisse konnten den Isolaten fünf verschiedene Toxingeneprofile zugeordnet werden, wobei auffiel, dass das Toxingenprofil V (*sec* und *tst*) sehr häufig war. Aus den Untersuchungen von FITZGERALD ET AL. (2001) geht hervor, dass das gemeinsame Auftreten der beiden Toxingene *sec* und *tst* auf das Vorhandensein der mutmaßlichen Pathogenitätsinsel SaPI<sub>bov</sub> zurückzuführen ist, welche die Gene *tst* und *sec*-bovine, sowie das Enterotoxin-ähnliche Gen *sel* beinhaltet. Der für *tst*-kodierende Abschnitt dieser Pathogenitätsinsel stimmt laut FITZGERALD ET AL. (2001) in der Sequenz mit der bereits 1998 von LINDSAY ET AL. beschriebenen Staphylokokken-Pathogenitätsinsel SaPII überein. Diese beinhaltet die Gene *tst* und *ent*, die von einem 10.234 kb großen Bereich getrennt sind. Während TSST in Lebensmitteln bedeutungslos ist, bestätigte sich auch in dieser Arbeit, dass SEC in Milcherzeugnissen eine herausragende Stellung einnimmt.

Weitere 14 % bzw. 7,8 % der Isolate entfielen auf die Toxinprofile IV bzw. II, wobei jeweils das gemeinsame Auftreten der Gene *seg*, *sei*, *sem*, *sen* und *seo* festzustellen war. Abgesehen von den bei Toxingenprofil II liegenden Genen *eta* und *etb*, schien daher auch ein Zusammenhang zwischen den Genen *seg*, *sei*, *sem*, *sen* und *seo* zu bestehen. JARRAUD ET AL. (2001) stellten im Rahmen von Sequenzanalysen fest, dass *seg*, *sei*, *sen* (ehemals *sek*), *seo* (ehemals *sel*) und *sem* gemeinsam auf einem Operon liegen und bezeichneten dies als „enterotoxin gene cluster“ (*egc*). Innerhalb der neu beschriebenen Enterotoxine G bis U scheint insbesondere der *egc*-Komplex von besonderer Bedeutung zu sein, obwohl hierzu bislang nur wenige Untersuchungen vorliegen. Der *egc*-Komplex wurde als ein Element der Genominsel nSab beschrieben (BABA ET AL., 2002). Die Gene *seg*, *sei*, *sem*, *sen* und *seo* traten, wie aufgrund des gemeinsamen Vorkommens dieser Gene auf einer Pathogenitätsinsel zu erwarten, in den vorliegenden Untersuchungen immer gemeinsam auf. Dies bestätigt die Untersuchungsergebnisse von JARRAUD ET AL. (1999 UND 2001), die feststellten, dass die Gene für die postulierten Enterotoxine SEG, SEI, SEM, SEN und SEO bei *S. aureus*-Stämmen gemeinsam auf einem 3,2-Kb großen DNA Fragment liegen. Laut JARRAUD ET AL. (2001) ist der *egc*-Komplex vermutlich infolge von Mutationen

(Duplikationen und crossing-over) entstanden. Bislang konnten die Enterotoxine aufgrund ihrer Basen- bzw. ihrer Aminosäuresequenz in zwei Gruppen eingeteilt werden. Zu der ersten Gruppe gehören SEA, SEE, SEJ, SED, und SEH, zu der zweiten Gruppe SEB und SEC (JARRAUD ET AL., 2001). Die Enterotoxine SEG und SEI konnten keiner dieser beiden Gruppen zugeordnet werden, wobei SEG allerdings nähere Verwandtschaft zu SEB und SEC zeigte, SEI dagegen Ähnlichkeiten mit SEM, SEN (ehemals SEK) und SEO (ehemals SEL) aufwies (MUNSON ET AL., 1998; JARRAUD ET AL., 2001; MCCORMICK, 2001).

Dieser gehäufte, dominierende Nachweis der Enterotoxingene *seg*, *sei*, *sem*, *sen*, *seo* in den Isolaten aus Ziegenkäse zeigte den hier noch bestehenden Klärungsbedarf bezüglich der tatsächlichen Genexpression.

### 5.2.3 Multiplex-PCR

Um den Arbeitsaufwand beim routinemäßigen Nachweis der Enterotoxingene zu reduzieren, wurde versucht, eine Multiplex-PCR für möglichst viele Toxingene zu entwickeln. Aufgrund der Schwierigkeit bei der Schaffung von optimalen Reaktionsbedingungen für alle Primer kann es vorkommen, dass einzelne Zielsequenzen bei der Amplifikation bevorzugt oder benachteiligt werden, so dass das mittels einer Multiplex-PCR gewonnene Produkt prinzipiell keiner aussagekräftigen, quantitativen Analyse unterzogen werden kann, was jedoch in Bezug auf die in dieser Arbeit interessierende, qualitative Fragestellung von untergeordneter Bedeutung war.

Mit den beiden Multiplex-PCR-Protokollen, die auf zwei Einzelamplifikationen beruhte, wurden alle Enterotoxin-Referenzstämme sowie alle 64 *S. aureus*-Isolate, welche zuvor in die Einzel-PCRs einbezogen worden waren, erneut analysiert. Die Multiplex-PCRs erzielten dabei eine vollständige Übereinstimmung mit den Ergebnissen der Einzel-PCRs in Bezug auf die neun Toxingene. Daher kann davon ausgegangen werden, dass die Sensitivität der Multiplex-PCRs für einen breiteren Einsatz ausreichen würde, bei erheblich geringeren Materialkosten und reduziertem Arbeitsaufwand.

Auch andere Autoren berichteten über den Einsatz der Multiplex-PCR zum Nachweis von Enterotoxigenen, wie z. B. TAMARAPU ET AL. (2001), die eine Multiplex-PCR für den schnelleren Nachweis von enterotoxigenen *S. aureus* in Milchprodukten entwickelten. Sie verwendeten das Thermonuklease codierende Gen *nuc* und das Enterotoxin C codierende Gen *sec* in der Multiplex-PCR. NAJERA-SANCHEZ ET AL. (2003) untersuchten enterotoxinogene *S. aureus* Isolate aus Fleisch und Milchprodukten und entwickelten zwei Multiplex-PCRs zum gleichzeitigen Nachweis der Staphylokokkenenterotoxigene A bis E. Mit der von MEHROTRA ET AL. (2000) beschriebenen Multiplex-PCR konnten gleichzeitig die Enterotoxigene A bis E in *S. aureus*-Isolaten - wie in der vorliegenden Arbeit - in einem Reaktionsansatz nachgewiesen werden.

Mit den hier beschriebenen, neuen Multiplex-PCRs kann erstmals der gleichzeitige Nachweis der klassischen und der neuen Enterotoxigene geführt werden. Diese Methode könnte im Hinblick auf ein Enterotoxin-Screening in Verdachtsproben von Interesse sein.

#### 5.2.4 Reverse Transkriptions-PCR

Ein direkter Enterotoxin-Nachweis mit immunchemischen Methoden ist für die neuen potentiellen „Enterotoxine“ G bis U zur Zeit kommerziell nicht erhältlich, weshalb die RT-PCR in den vorliegenden Untersuchungen als Methode zum Nachweis der Genexpression verwendet wurde. Damit sind zwar keine definierten Aussagen zur „Produktivität“ eines Isolates möglich, jedoch kann im Gegensatz zur DNA-PCR zumindest die tatsächliche Bildung des entsprechenden Proteins als wahrscheinlich angesehen werden. Bisher wurde diese Technik erst sporadisch für einzelne Toxingene eingesetzt (OMOE ET AL., 2002; JARRAUD ET AL., 1999). In dieser Arbeit gelang es dagegen erstmals, eine RT-PCR für fast alle bekannten Toxingene (*sea-see*, *seg*, *sei*, *sem*, *sen*, *seo*) zu entwickeln und zu etablieren.

Die genomische DNA und die mRNA der Enterotoxine sind mit der RT-PCR nicht zu unterscheiden. Weil zudem RNA-Präparationen geringe Mengen genomischer DNA enthalten, musste zunächst ein DNase-Verdau vor der eigentlichen RT-PCR durchgeführt werden. Die vollständige DNA-Elimination wurde mit einer Kontrollreaktion nachgewiesen. Zu den weiteren Kontrollen gehörte eine Negativkontrolle zum Anschluss

DNA-Kontamination der Reagenzien und eine Positivkontrolle zur Funktionsprüfung der PCR. Die der RT-PCR zum Nachweis der Expression von Toxingenen zugrunde liegenden Reaktionen sind zwar prinzipiell gut beschrieben und verifiziert. Dennoch nahm die Etablierung der Methode einen großen Teil der vorliegenden Arbeit ein, da jeder einzelne Arbeitsschritt optimiert werden musste, damit aus den geringen vorliegenden Probenmengen aussagekräftige Ergebnisse erzielt werden konnten. Im Rahmen der Optimierung erwiesen sich die DNase-Behandlung und die Reverse Transkription als kritische Schritte, während die eigentliche PCR relativ leicht zu etablieren war. Zur Überprüfung, ob die RT-PCR die richtigen Amplifikate nachwies, wurden diese mit der in jeder PCR mitgelaufenen DNA-Probe des jeweiligen Referenzstammes verglichen.

Die Ergebnisse der RT-PCR zeigten, dass mit Ausnahme von *seo* alle nachgewiesenen „Toxingene“ auch tatsächlich exprimiert wurden. Eine quantitative Aussage zur Menge an gebildetem Protein war aus oben erwähnten Gründen nicht möglich. Dennoch zeigen die Ergebnisse, dass neben den klassischen Enterotoxinen SEA-SEE auch mit „neuen“ Proteinen in Ziegenkäse gerechnet werden muss. Ob diese Proteine tatsächlich Toxin-Eigenschaften aufweisen, bedarf weiterer Klärung. Die Methodik der RT-PCR könnte zur Auswahl geeigneter Stämme im Hinblick auf Proteinisolierung und Antikörperproduktion hilfreich sein.

### 5.3 Nachweis der Toxinproduktion mittels Enzymimmuntest

Zusätzlich zum PCR-vermittelten Nachweis von Enterotoxingenen lieferte der Nachweis der klassischen Enterotoxine (SEA bis SEE) aus Kulturüberstand von Isolaten, bei denen Enterotoxingene nachweisbar waren, weitergehende Ergebnisse. Die Überprüfung auf Enterotoxine ist laut Anlage 6 Nr. 3.3.1.2 der MilchV nach einer Überschreitung des Höchstwertes „M“ für Käse aus Rohmilch und thermisierter Milch sowie Weichkäse aus wärmebehandelter Milch vorgeschrieben. Obwohl zur Bildung von Enterotoxinen *S. aureus*-Keimgehalte von mindestens  $10^6$  KBE/g erforderlich sind, kann der Nachweis von Keimzahlen ab  $10^5$  KBE/g als Warnsignal für ein möglicherweise enterotoxinhaltiges Lebensmittel gewertet werden. Dieser Wert wurde zwar in keiner Probe überschritten, es wurden jedoch in zwei Proben erhöhte Keimzahlen festgestellt. Bei fünf Isolaten aus einer

dieser Proben wurde keine Enterotoxinbildung (A-E) nachgewiesen, wohingegen bei einem Isolat aus der zweiten Probe Enterotoxin A nachgewiesen werden konnte. Bei weiteren vier Isolaten aus derselben Probe war kein Enterotoxin festzustellen. Einige weitere Proben schienen aufgrund des relativ niedrigen Keimgehalts ( $3,0 \times 10^4$  KBE/g bzw.  $3,3 \times 10^4$  KBE/g) hinsichtlich Enterotoxine unbedenklich; die darin nachgewiesenen *S. aureus* erwiesen sich aber als deutliche SEC-Produzenten. Fehler bei der Lagerung dieser Käse hätten möglicherweise eine rasche Keimvermehrung und damit Enterotoxinbildung zur Folge gehabt.

Insgesamt lagen die in den eigenen Untersuchungen festgestellten Inzidenzen enterotoxinogener *S. aureus* in Ziegenkäse (29,6 %) etwas unter den vergleichbaren Angaben aus der Literatur, die sich in einem Bereich zwischen 30,5 % und 61,2 % bewegen (HOLECKOVA ET AL., 2002; FOTTA ET AL., 2000; TSEN ET AL., 1998; ROSEC ET AL., 1997; OLSVIK ET AL., 1981). Ein wesentlicher Unterschied zwischen Käsen verschiedener Herstellungsarten bezüglich des Toxingens-Spektrums der isolierten *S. aureus* wurde nicht festgestellt.

## 6 ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit wurden 181 Ziegenkäseproben aus dem Handel (Hessen) auf eine Kontamination mit *Staphylococcus (S.) aureus* untersucht. In insgesamt 14 Proben (7,7 %) wurde *S. aureus* nachgewiesen. Aus diesen Proben wurden 64 Isolate von *S. aureus* ausgewählt. Diese wurden unter Berücksichtigung kultureller, biochemischer und molekularbiologischer Aspekte phäno- und genotypisch charakterisiert. Mittels Enzymimmuntest wurde Enterotoxinbildung bei 29,6 % der Isolate nachgewiesen, dabei wurde Staphylokokken-Enterotoxin C am häufigsten nachgewiesen. Die Überprüfung auf Enterotoxingene ergab für 33 Isolate (51,6 %) positive Nachweise für ein oder mehrere Toxingene. Dabei trugen nur 29,6 % aller Isolate die Toxingene *sea* und *sec*. Weitere 22 % der Isolate waren ausschließlich für die „neueren“ Enterotoxingene *seg*, *sei*, *sem*, *sen*, *seo* positiv, wobei in allen diesen Isolaten mehrere Toxingene gleichzeitig nachweisbar waren. In 48,4 % der Isolate wurden keine Toxingene nachgewiesen.

Für den qualitativen Nachweis der Enterotoxingene wurde eine Multiplex-PCR entwickelt. Die Sensitivität der Multiplex-PCR war bei erheblich geringeren Materialkosten und reduziertem Arbeitsaufwand ausreichend zum Nachweis der Enterotoxingene *sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *see*, *seg*, *seh*, *sei*, *sej*. Mit dieser Methode gelang der gleichzeitige Nachweis der klassischen und der neuen Enterotoxingene. Ein Vergleich der Ergebnisse mit der Einzel-PCR ergab eine vollständige Übereinstimmung im Bezug auf die neun getesteten Toxingene.

Da ein kommerzieller Enterotoxin-Nachweis-Test für die neuen beschriebenen, potentiellen „Enterotoxine“ G bis U zur Zeit nicht erhältlich ist, wurde eine RT-PCR-Methodik zum Nachweis der Genexpression entwickelt. In dieser Arbeit gelang es erstmals, eine RT-PCR für fast alle bekannten Toxingene *sea-see*, *seg*, *sei*, *sem*, *sen*, *seo* zu entwickeln und zu etablieren. Die Ergebnisse der RT-PCR zeigten, dass mit Ausnahme von *seo* alle nachgewiesenen „Toxingene“ auch tatsächlich von den getesteten *S. aureus*-Isolaten exprimiert wurden. Diese weisen darauf hin, dass neben den klassischen Enterotoxinen SEA-SEE auch mit „neuen“ Proteinen (Enterotoxinen?) in Ziegenkäse gerechnet werden muss. Ob diese Proteine tatsächlich Toxin-Eigenschaften aufweisen, bedarf weiterer Klärung. Im Gegensatz zur DNA-PCR kann zumindest die tatsächliche Bildung des entsprechenden Proteins als wahrscheinlich angesehen werden. Die Methodik der RT-PCR könnte zur Auswahl geeigneter Stämme im Hinblick auf Proteinisolierung und Antikörperproduktion hilfreich sein.

## 7 SUMMARY

In this study, 181 goat cheese samples collected from retail outlets in Hesse (Germany) were examined for a contamination with *Staphylococcus (S.) aureus*. *S. aureus* was identified in 14 samples (7.7 %), and 64 isolates were selected from these samples. Further pheno- and genotypical characterization of the isolates was achieved on the basis of their cultural, biochemical and molecular-biological properties. Enterotoxin production was detected by Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) in 29.6 % of isolates; staphylococcal enterotoxin type C was the most frequent one. After Polymerase Chain Reaction (PCR) analysis, 33 isolates (51.6 %) were found positive for one or more enterotoxin genes, but only 29.6 % of the isolates carried the conventional toxin genes *sea* und *sec*. Another 22 % of the isolates were exclusively positive for the „newer“ enterotoxingenes *seg*, *sei*, *sem*, *sen*, *seo*, which all contained more than one of these toxin genes. In 48.4 % of the isolates, none of the enterotoxin genes was identified.

A multiplex PCR method was developed for the qualitative determination of enterotoxin genes. The method was cost-effective and sensitive enough for the determination of enterotoxin genes *sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *see*, *seg*, *seh*, *sei*, and *sej*. By this technique, it was possible to simultaneously detect both the classical and the newer enterotoxin genes. The results obtained by this method were consistent with those obtained by the single-gene PCR method regarding to the nine tested enterotoxin genes.

Since a commercial test for the protein determination of the potential "toxins" G to U is not available on the market, a Reverse Transcription (RT)-PCR technique was developed for the determination of gene expression. In this work, for the first time a RT-PCR for almost all known toxin genes (*sea-see*, *seg*, *sei*, *sem*, *sen*, *seo*) was developed. The results of the RT-PCR demonstrated that, except of *seo*, all other "toxin genes" were actually expressed by *S. aureus* isolates. Therefore, beside the classical enterotoxins SEA-SEE, the "new" proteins (enterotoxins?) may also occur in goat cheese. Further studies are required to demonstrate the toxic properties of these proteins. In contrast to the DNA-PCR, by this method is possible to estimate the true production of the respective proteins. The RT-PCR technique could be helpful in the selection of suitable strains for protein isolation and antibody production.

**8 LITERATURVERZEICHNIS**

- ABE, J., Y. ITO, M. ONIMARU, T. KOHSAKA UND T. TAKEDA (2000):** Characterization and distribution of a new enterotoxin-related superantigen produced by *Staphylococcus aureus*. *Microbiol. Immunol.* **44**, 79-88.
- ADESIYUN, A. A., S. R. TATINI UND D. G. HOOVER (1984):** Production of enterotoxin(s) by *Staphylococcus hyicus*. *Vet. Microbiol.* **9**, 487-495.
- AKINEDEN, Ö., C. ANNEMÜLLER, A. A. HASSAN, C. LÄMMLER, W. WOLTER UND M. ZSCHÖCK (2001):** Toxin genes and other characteristics of *Staphylococcus aureus* isolates from milk of cows with mastitis. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* **8**, 959-964.
- ALOUF, J. E. UND H. MÜLLER-ALOUF (2003):** Staphylococcal and streptococcal superantigens: molecular, biological and clinical aspects. *Int. J. Med. Microbiol.* **292**, 429-440.
- ALTEKRUSE, S. F., B. B. TIMBO, J. C. MOWBRAY, N. H. BEAN UND M. E. POTTER (1998):** Cheese-associated outbreaks of human illness in the United States, 1973 to 1992: sanitary manufacturing practices protect consumers. *J. Food Prot.* **61**, 1405-1407.
- AMANN, R. I., W. LUDWIG UND K. H. SCHLEIFER (1995):** Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol. Rev.* **59**, 143-169.
- AMMON, A., K. SCHMIDT UND J. BRÄUNIG (2000):** Lebensmittelinfektionen in Deutschland. *Bundesgesundheitsbl. Gesundheitsforsch-Gesundheitsschutz* **43**, 751-757.
- AMTLICHE SAMMLUNG VON UNTERSUCHUNGSVERFAHREN NACH § 35 DES LEBENSMITTEL- UND BEDARFSGEGENSTÄNDEGESETZ (LMBG):** Untersuchung von Lebensmitteln Loseblattsammlung, Hrsg: Beuth Verlag in der jeweils letzten gültigen Fassung.
- AMTSBLATT DER EUROPÄISCHEN GEMEINSCHAFTEN (1992):** Richtlinie 92/46/EWG des Rates vom 16. Juni 1992 mit Hygienevorschriften für die Herstellung und Vermarktung von Rohmilch, wärmebehandelter Milch und Erzeugnissen auf Milchbasis. *Amtsblatt der Europäischen Gemeinschaften*, 35, Nr. L 268/1 - L 268/32.
- ANDERSON, G. P., UND N. L. NERURKAR (2002):** Improved fluoroimmunoassays using the dye Alexa Fluor 647 with the RAPTOR, a fiber optic biosensor. *J Immunol Methods.* **271**, 17-24.
- ANDERSON, G. P., K. D. KING, K. L. GAFFNEY UND L. H. JOHNSON (2000):** Multi-analyte interrogation using the fiber optic biosensor. *Biosens. Bioelectron.* **14**, 771-777.
- ANDERSON, J. E., R. R. BELLMAN UND S. DOORES (1996):** Persistence of serological and biological activities of staphylococcal enterotoxin A in canned mushrooms. *J. Food Prot.* **59**, 1292-1299.
- ANONYM (1998):** Käse-Vergiftung. Käse war schon beim Hersteller verdorben. *Göttinger Tageblatt* vom 16.06.1998.

- ARBUTHNOTT, J. P., D. C. COLEMAN UND J. S. DE AZEVEDO (1990):** Staphylococcal toxins in human disease. *Soc. Appl. Bacteriol. Symp.* **19**, 101-107.
- ARMSTRONG-ESTHER, C. A. UND J. E. SMITH (1976):** Carriage patterns of *Staphylococcus aureus* in a healthy non-hospital population of adults and children. *Annal. Human Biol.* **3**, 221-227.
- ARVIDSON, S. UND K. TEGMARK (2001):** Regulation of virulence determinants in *Staphylococcus aureus*. *Int. J. Med. Microbiol.* **291**, 159-170.
- ASPERGER, H. (1991):** Zur Bedeutung des Kriteriums *Staphylococcus aureus* in Käse. *Milchwirtschtl. Ber.* **108**, 138-144.
- AVENA, R. M., M. S. BERGDOLL (1967):** Purification and some physicochemical properties of enterotoxin C, *Staphylococcus aureus* strain 361. *Biochemistry.* **6**, 1474-1480.
- BABA, T., F. TAKEUCHI, M. KURODA, H. YUZAWA, K. AOKI, A. OGUCHI, Y. NAGAI, N. IWAMA, K. ASANO, T. NAIMI, H. KURODA, L. CUI, K. YAMAMOTO UND K. HIRAMATSU (2002):** Genome and virulence determinants of high virulence community-acquired MRSA. *Lancet* **359**, 1819-1827.
- BAIRD-PARKER, A. C. (1962):** An improved diagnostic and selective medium for isolating coagulase-positive staphylococci. *J. Appl. Bacteriol.* **25**, 12-19.
- BAIRD-PARKER, A. C. (1965):** The Classification of Staphylococci and Micrococci from World-wide Sources. *J. Gen. Microbiol.* **38**, 363-387.
- BALABAN, N. UND A. RASOOLY (2000):** Staphylococcal enterotoxins. *Int. J. Food Microbiol.* **61**, 1-10.
- BARSKI, P., L. PIECHOWICZ, J. GALIŃSKI UND J. KUR (1996):** Rapid assay for detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* using multiplex PCR. *Mol. Cell Probes.* **10**, 471-475.
- BECKER, H., G. TERPLAN UND K. J. ZAADHOF (1987):** Zur Charakterisierung von *Staphylococcus aureus*-Stämmen des Rindes unter besonderer Berücksichtigung des Klumpungsfaktors. *Arch. Lebensmittelhyg.* **38**, 12-19.
- BECKER, H., K. GANG-STILLER UND G. TERPLAN (1989):** Characterization of *Staphylococcus aureus* strains isolated from raw milk with special reference to the clumping factor. *Netherlands Milk Dairy J.* **43**, 355-366.
- BECKER, K., B. KELLER, C. VON EIFF, M. BRUCK, G. LUBRITZ, J. ETIENNE UND G. PETERS (2001):** Enterotoxigenic potential of *Staphylococcus intermedius*. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**, 5551-5557.
- BECKER, K., R. ROTH UND G. PETERS (1998):** Rapid and specific detection of toxigenic *Staphylococcus aureus*: use of two multiplex PCR enzyme immunoassays for amplification and hybridization of staphylococcal enterotoxin genes, exfoliative toxin genes und toxic shock syndrome toxin 1 gene. *J. Clin. Microbiol.* **36**, 2548-2553.
- BERGDOLL, M. S. (1970):** Staphylococcal enterotoxins. *In: Montie, T. C. (edt.), Microbial Toxins, Vol. 3, Academic Press, New York and London, pp. 265-326.*

- BERGDOLL, M. S. (1983):** Enterotoxins. *In: Staphylococci and Staphylococcal Infections* (Easman, C. S. F. and Adlam, C. eds.). Academic Press, London, UK, pp. 559-598.
- BERGDOLL, M. S. (1988):** Monkey feeding test for staphylococcal enterotoxin. *Methods Enzymol.* **165**, 324-333.
- BERGDOLL, M. S. (1989):** *Staphylococcus aureus*. *In: Doyle, M.P., Foodborne bacterial pathogens*, M. Dekker, Inc., New York and Basel, pp. 463-523.
- BERGDOLL, M. S. (1990):** Analytical methods for *Staphylococcus aureus*. *Int. J. Food Microbiol.* **10**, 91-99.
- BERGDOLL, M. S., B. A. CRASS, R. F. REISER, R. N. ROBBINS UND J. P. DAVIS (1981):** A new staphylococcal enterotoxin, enterotoxin F, associated with toxic-shock-syndrome *Staphylococcus aureus* isolates. *Lancet* **8228**, 1017-1021.
- BETLEY, M. J., D. W. BORST UND L. B. REGASSA (1992):** Staphylococcal enterotoxins, toxic shock syndrome toxin and streptococcal pyrogenic exotoxins: a comparative study of their molecular biology. *Chem. Immunol.* **55**, 1-35.
- BHAKDI, S. UND J. TRANUM-JENSEN (1991):** Alpha-toxin of *Staphylococcus aureus*. *Microbiol. Rev.* **55**, 733-751.
- BJERKETORP, J., M. NILSSON, A. LJUNGH, J. I. FLOCK, K. JACOBSSON UND L. FRYKEBERG (2002):** A novel von Willebrand factor binding protein expressed by *Staphylococcus aureus*. *Microbiology* **148**, 2037-2044.
- BLOBEL, H. UND T. SCHLIESSER (1994):** Staphylokokken-Infektionen und -Enterotoxine. *Handbuch der bakteriellen Infektionen bei Tieren, Band II/1*, Gustav Fischer Verlag, Jena, Stuttgart.
- BODEN, M. K. UND J. I. FLOCK (1992):** Evidence for three different fibrinogen-binding proteins with unique properties from *Staphylococcus aureus* strain Newman. *Microb. Pathog.* **12**, 289-298.
- BOHACH, G. A. UND P. M. SCHLIEVERT (1987):** Nucleotide sequence of the staphylococcal enterotoxin C1 gene and relatedness to other pyrogenic toxins. *Mol. Gen. Genet.* **209**, 15-20.
- BOHACH, G. A. UND P. M. SCHLIEVERT (1989):** Conservation of the biologically active portions of the staphylococcal enterotoxins C1 and C2. *Infect. Immun.* **57**, 2249-2252.
- BOHACH, G. A., D. J. FAST, R. D. NELSON UND P. M. SCHLIEVERT (1990):** Staphylococcal and streptococcal pyrogenic toxins involved in toxic shock syndrome and related illness. *Crit. Rev. Microbiol.* **17**, 251-272.
- BONE, F. J., D. BOGIE UND S. C. MORGEN-JONES (1989):** Staphylococcal food poisoning from sheep milk cheese. *Epidemiol. Infec.* **103**, 449-458.
- BOOTH, M. C., L. M. PENCE, P. MAHASRESHTI, M. C. CALLEGAN UND M. S. GILMORE (2001):** Clonal associations among *Staphylococcus aureus* isolates from various sites of infection. *Infect. Immun.* **69**, 345-352.

- BORJA, C. R., E. FANNING, I. Y. HUANG UND M. S. BERGDOLL (1972):** Purification and some physicochemical properties of staphylococcal enterotoxin E. *J. Biol. Chem.* **247**, 2456-2463.
- BRAKSTAD, O. G., K. AASBAKK UND J. A. MAELAND (1992):** Detection of *Staphylococcus aureus* by polymerase chain reaction amplification of the *nuc* gene. *J. Clin. Microbiol.* **30**, 1654-1660.
- CABRAL, K. (2003):** Phäno- und Genotypisierung von *Staphylococcus aureus*, isoliert von Rindermastitiden aus dem Bundesstaat Sao Paulo, Brasilien. *Vet. Med. Diss. Gießen.*
- CADNESS-GRAVES, B., R. WILLIAMS, G. J. HARPER UND A. A. MILES (1943):** Slide-test for coagulase-positive staphylococci. *Lancet I*, 736-738.
- CHANG, H. C. UND M. S. BERGDOLL (1979):** Purification and some physicochemical properties of staphylococcal enterotoxin D. *Biochemistry* **18**, 1937-1942.
- CHEN, T. R., M. H. HSIAO, C. S. CHIOU UND H. Y. TSEN (2001):** Development and use of PCR primers for the investigation of C1, C2 and C3 enterotoxin types of *Staphylococcus aureus* strains isolated from food-borne outbreaks. *Int. J. Food Microbiol.* **71**, 63-70.
- CHEUNG, A. I., S. J. PROJAN, R. E. EDELSTEIN UND V. A. FISCHETTI (1995):** Cloning, expression, and nucleotide sequence of a *Staphylococcus aureus* gene (*fbpA*) encoding a fibrinogen-binding protein. *Infect. Immun.* **63**, 1914-1920.
- CLYNE, M., T. H. BIRKBECK UND J. P. ARBUTHNOTT (1992):** Characterization of staphylococcal gamma-lysin. *J. Gen. Microbiol.* **38**, 923-930.
- COENEN, C. (2000):** Untersuchungen zum Vorkommen und zur Risikoeinschätzung pathogener Keime in Rohmilch und Rohmilchprodukten aus der Direktvermarktung. *Vet. Med. Diss. FU Berlin.*
- COLLINS, W. S., J. F. METZGER UND A. D. JOHNSON (1972):** A rapid solid phase radioimmunoassay for staphylococcal B enterotoxin. *J. Immunol.* **108**, 852-856.
- CRAMTON, S. E., M. ULRICH, F. GÖTZ UND G. DÖRING (2001):** Anaerobic conditions induce expression of polysaccharide intercellular adhesin in *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. *Infect. Immun.* **69**, 4079-4085.
- CRASS, B. A. UND M. S. BERGDOLL (1986):** Involvement of staphylococcal enterotoxins in nonmenstrual toxic shock syndrome. *J. Clin. Microbiol.* **23**, 1138-1139.
- DANIELSSON, M. L. UND B. HELLBERG (1977):** The biochemical activity of enterotoxin and non-enterotoxin producing staphylococci. *Acta. Vet. Scand.* **18**, 266-273.
- DELEHANTY, J. B. UND F. S. LIGLER (2002):** A microarray immunoassay for simultaneous detection of proteins and bacteria. *Anal. Chem.* **74**, 5681-5687.
- DENNY, C. B., J. Y. HUMBER UND C. W. BOHRER (1971):** Effect of toxin concentration on the heat inactivation of staphylococcal enterotoxin A in beef bouillon and in phosphate buffer. *Appl. Microbiol.* **21**, 1064-1066.
- DENNY, C. B., P. L. TAN UND C. W. BOHRER (1966):** Heat inactivation of staphylococcal enterotoxin A. *J. Food Sci.* **31**, 762-767.

- DEWITT, J. C. UND E. H. KAMPELMACHER (1988):** Some aspects of bacterial contamination of hands of workers in food service establishments. *Zentralbl. Bakteriolog. Mikrobiol. Hyg. [B]*. **186**, 45-54.
- DICKIE, N. UND S. M. AKHTAR (1982):** Improved radioimmunoassay of Staphylococcal enterotoxin a. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **65**, 180-184.
- DICKINSON, R. B., J. A. NAGEL, D. MCDEVITT, T. J. FOSTER, R. A. PROCTOR UND S. L. COOPER (1995):** Quantitative comparison of clumping factor- and coagulase mediated *Staphylococcus aureus* adhesion to surface-bound fibrinogen under flow. *Infect. Immun.* **63**, 3143-3150.
- DINGES, M. M., P. M. ORWIN UND P. M. SCHLIEVERT (2000):** Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. *Clin. Microbiol. Rev.* **13**, 16-34.
- DRANCOURT, M. UND D. RAOULT (2002):** *rpoB* gene sequence-based identification of *Staphylococcus* species. *J. Clin. Microbiol.* **40**, 1333-1338.
- DUTHIE, E. S. (1954):** Evidence for two forms of staphylococcal coagulase. *J. Gen. Microbiol.* **10**, 427-436.
- EDWARDS, V. M., J. R. DERINGER, S. D. CALLANTINE, C. F. DEOBALD, P. H. BERGER, V. KAPUR, C. V. STAUFFACHER UND G. A. BOHACH (1997):** Characterization of the canine type C enterotoxin produced by *Staphylococcus intermedius* pyoderma isolates. *Infect. Immun.* **65**, 2346-2352.
- ELEK, S. D. UND E. LEVY (1950):** Distribution of haemolysins in pathogenic and non-pathogenic staphylococci. *J. Path. Bact.* **LXII**, 541-554.
- EPIDEMIOLOGISCHES BULLETIN (14/1999):** Zur Lebensmittelintoxikation durch *Staphylococcus aureus*. Robert Koch Institut.
- EPIDEMIOLOGISCHES BULLETIN (15/1999):** Zur Situation bei wichtigen Infektionskrankheiten im Jahr 1998. Teil 1: Darminfektionen (Gastroenteritiden). Robert Koch Institut.
- EPIDEMIOLOGISCHES BULLETIN (18/2000):** Gastroenteritis-Ausbruch verursacht durch *Clostridium perfringens*. Robert Koch Institut.
- EUZÉBY, J. P. (2004):** List of Bacterial Names with Standing in Nomenclature <http://www.bacterio.cict.fr>
- EVANS, J. B., W. L. BRADFORD JR. UND C. F. NIVEN JR. (1955):** Comments concerning the taxonomy of the genera *Micrococcus* and *Staphylococcus*. *International Bulletin of Bacteriological Nomenclature and Taxonomy* **5**, 61-66.
- EVENSON, M. L., M. W. HINDS, R. S. BERNSTEIN UND M. S. BERGDOLL (1988):** Estimation of human dose of staphylococcal enterotoxin A from a large outbreak of staphylococcal food poisoning involving chocolate milk. *Int. J. Food Microbiol.* **7**, 311-316.
- EWALD, S., C. J. HEUVELMAN UND S. NOTERMANS (1990):** The use of DNA probes for confirming enterotoxin production by *Staphylococcus aureus* and micrococci. *Int. J. Food Microbiol.* **11**, 251-257.

- EWALT, K. L., R. W. HAIGIS, R. ROONEY, D. ACKLEY UND M. KRIHAK (2001):** Detection of biological toxins on an active electronic microchip. *Anal. Biochem.* **289**, 162-172.
- FITZGERALD, J. R., S. R. MONDAY, T. J. FOSTER, G. A. BOHACH, P. J. HARTIGAN, W. J. MEANEY UND C. J. SMYTH (2001):** Characterization of a putative pathogenicity island from bovine *Staphylococcus aureus* encoding multiple superantigens. *J. Bacteriol.* **183**, 63-70.
- FORSMAN, P., A. TISSALA-TIMISJÄRVI UND T. ALATOSSAVA (1997):** Identification of staphylococcal and streptococcal causes of bovine mastitis using 16S-23S rRNA spacer regions. *Microbiol.* **143**, 3491-3500.
- FOSTER, T. J. UND D. MCDEVITT (1994):** Surface-associated proteins of *Staphylococcus aureus*: their possible roles in virulence. *FEMS Microbiol. Lett.* **118**, 199-205.
- FOTTA, M., J. FEDERIČOVÁ, J. GONDOL', V. KALINÁČOVÁ UND B. HOLEČKOVÁ (2000):** Occurrence of enterotoxigenic strains of *Staphylococcus aureus*. *Slov. Vet. Čas.* **25**, 291-293.
- FOURNIER, B., A. KLIER UND G. RAPOPORT (2001):** The two-component system ArlS-ArlR is a regulator of virulence gene expression in *Staphylococcus aureus*. *Mol. Microbiol.* **41**, 247-261.
- FRENAY, H. M., A. E. BUNSCHOTEN, L. M. SCHOOLS, W. J. VAN LEEUWEN, C. M. VANDENBROUCKE-GRAULS, J. VERHOEF UND F. R. MOOI (1996):** Molecular typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* on the basis of protein A gene polymorphism. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **15**, 60-64.
- FUJIKAWA, H. UND H. IGARASHI (1988):** Rapid latex agglutination test for detection of staphylococcal enterotoxins A to E that uses high-density latex particles. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**, 2345-2348.
- FUKUDA, S., H. TOKUNO, H. OGAWA, M. SASAKI, T. KISHIMOTO, J. KAWANO, A. SHIMIZU UND S. KIMURA (1984):** Enterotoxigenicity of *Staphylococcus intermedius* strains isolated from dogs. *Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg [A]*. **258**, 360-367.
- GENIGEORGIS, C. A. (1989):** Present state of knowledge on staphylococcal intoxication. *Int. J. Food Microbiol.* **9**, 327-360.
- GILLIGAN, K., M. SHIPLEY, B. STILES, T. L. HADFIELD UND M. S. IBRAHIM (2000):** Identification of *Staphylococcus aureus* enterotoxins A and B genes by PCR-ELISA. *Mol. Cell Probes.* **14**, 71-78.
- GIRAUDO, A. T., A. L. CHEUNG UND R. NAGEL (1997):** The *sae* locus of *Staphylococcus aureus* controls exoprotein synthesis at the transcriptional level. *Arch. Microbiol.* **168**, 53-58.
- GOLDMAN, E. R., A. R. CLAPP, G. P. ANDERSON, H. T. UYEDA, J. M. MAURO, I. L. MEDINTZ UND H. MATTOUSSI (2004):** Multiplexed toxin analysis using four colors of quantum dot fluororeagents. *Anal. Chem.* **76**, 684-688.
- GRÄF, W. UND W. MÖNIUS (1977):** Staphylokokkenübertragung von Nase auf Hand und Brille, ein Hospitalismusproblem. *Zbl. Bakt. Hyg. 1. Abt. Orig. B* **164**, 127-137.

- GROSSGEBAUER, K., B. SCHMIDT UND H. LANGMAACK (1968):** Lysozyme production as an aid for identification of potentially pathogenic strains of staphylococci. *Appl. Microbiol.* **16**, 1745-1747.
- HAJEK, V. UND E. MARSALEK (1969):** A study of staphylococci isolated from the upper respiratory tract of different animal species. *Zentralbl. Bakteriolog. [Orig.]* **212**, 60-73.
- HALL, H. E., R. ANGELOTTI UND K. H. LEWIS (1965):** Detection of the staphylococcal enterotoxins in food. *Health Lab. Sci.* **2**, 179-191.
- HARTEVELD, J. L., M. S. NIEUWENHUIZEN UND E. R. WILS (1997):** Detection of staphylococcal enterotoxin B employing a piezoelectric crystal immunosensor. *Biosens Bioelectron.* **12**, 661-667.
- HARTFORD, O. M., WANN, E. R., HOOK, M. UND T. J. FOSTER (2001):** Identification of residues in the *Staphylococcus aureus* fibrinogen-binding MSCRAMM clumping factor A (ClfA) that are important for ligand binding. *J. Biol. Chem.* **276**, 2466-2473.
- HARVEY, J. UND A. GILMOUR (1985):** Application of current methods for isolation and identification of staphylococci in raw bovine milk. *J. Appl. Bacteriol.* **59**, 207-221.
- HAWRYLUK, T. UND I. HIRSHFIELD (2002):** A superantigen bioassay to detect staphylococcal enterotoxin A. *J. Food Prot.* **65**, 1183-1187.
- HEIN, I., A. LEHNER, P. RIECK, K. KLEIN, E. BRANDL UND M. WAGNER (2001):** Comparison of different approaches to quantify *Staphylococcus aureus* cells by real-time quantitative PCR and application of this technique for examination of cheese. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**, 3122-3126.
- HERNANDEZ, F. J., J. GOYACHE, J. A. ORDEN, J. L. BLANCO, A. DOMENECH, G. SUAREZ UND E. GOMEZ-LUCIA (1993):** Repair and enterotoxin synthesis by *Staphylococcus aureus* after thermal shock. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**, 1515-1519.
- HERRMANN, M., S. J. SUCHARD, L. A. BOXER, F. A. WALDVOGEL UND P. D. LEW (1995):** Thrombospondin binds to *Staphylococcus aureus* and promotes staphylococcal adherence to surfaces. *Infect. Immun.* **59**, 279-288.
- HO, G., W. H. CAMPBELL UND E. CARLSON (1989):** Ovine-associated *Staphylococcus aureus* protein with immunochemical similarity to toxic shock syndrome toxin 1. *J. Clin. Microbiol.* **27**, 210-212.
- HOLEČKOVÁ, B., E. HOLODA, M. FOTTA, V. KALINÁČOVÁ, J. GONDOL' UND J. GROLMUS (2002):** Occurrence of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in food. *Ann. Agric. Environ. Med.* **9**, 179-182.
- HOLMBERG, S. D. UND P. A. BLAKE (1984):** Staphylococcal food poisoning in the United States. New facts and old misconceptions. *JAMA* **251**, 487-489.
- HOLT, J. G., KRIEG, N. R., SNEATH, P. H. A. STALEY, J. T. UND S. T. WILLIAMS (1994):** *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. (Editor William R. Hensyl). Williams & Wilkins, Baltimore, Maryland, USA. 9<sup>th</sup> edition. ISBN: 0-683-00603-7.
- HOOKEY, J. V., J. F. RICHARDSON UND B. D. COOKSON (1998):** Molecular typing of *Staphylococcus aureus* based on PCR restriction fragment length polymorphism and DNA sequence analysis of the coagulase gene. *J. Clin. Microbiol.* **36**, 1083-1089.

- HOOVER, D. G., S. R. TATINI UND J. B. MALTAIS (1983):** Characterization of staphylococci. *Appl. Environ. Microbiol.* **46**, 649-660.
- HOVDE, C. J., J. C. MARR, M. L. HOFFMANN, S. P. HACKETT, Y. I. CHI, K. K. CRUM, D. L. STEVENS, C. V. STAUFFACKER UND G. A. BOHACH (1994):** Investigation of the role of the disulphide bond in the activity and structure of staphylococcal enterotoxin C1. *Mol. Microbiol.* **13**, 897-909.
- HU, D. L., K. OMOE, H. SHIMURA, K. ONO, S. SUGII UND K. SHINAGAWA (1999):** Emesis in the shrew mouse (*Suncus murinus*) induced by peroral and intraperitoneal administration of staphylococcal enterotoxin A. *J. Food Prot.* **62**, 1350-1353.
- HUESCA, M., R. PERALTA, D. N. SAUDER, A. E. SIMOR UND M. J. MCGAVIN (2002):** Adhesion and virulence properties of epidemic Canadian methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain 1: identification of novel adhesion functions associated with plasmin-sensitive surface protein. *J. Infect. Dis.* **185**, 1285-96.
- HUMMEL, R., L. A. DEVRIESE UND G. LEHMANN (1992):** Characteristics of bovine *Staphylococcus aureus* with special regard to clumping factor activity. *Zentralbl. Bakteriol.* **276**, 487-492.
- ISO 6888-1 (1999)** „Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the enumeration of coagulase-positive staphylococci (*Staphylococcus aureus* and other species) - Part 1: Technique using Baird-Parker agar medium.
- JAFFE, R. I., J. D. LANE, S. V. ALBURY UND D. M. NIEMEYER (2000):** Rapid extraction from and direct identification in clinical samples of methicillin-resistant staphylococci using the PCR. *J. Clin. Microbiol.* **38**, 3407-3412.
- JARRAUD, S., G. COZON, F. VANDENESCH, M. BES, J. ETIENNE UND G. LINA (1999):** Involvement of enterotoxins G and I in staphylococcal toxic shock syndrome and staphylococcal scarlet fever. *J. Clin. Microbiol.* **37**, 2446-2449.
- JARRAUD, S., M. A. PEYRAT, A. LIM, A. TRISTAN, M. BES, C. MOUGEL, J. ETIENNE, F. VANDENESCH, M. BONNEVILLE UND G. LINA (2001):** *egc*, a highly prevalent operon of enterotoxin gene, forms a putative nursery of superantigens in *Staphylococcus aureus*. *J. Immunol.* **166**, 669-677. Erratum (2001): **66**, 4259.
- JARRAUD, S., C. MOUGEL, J. THIOULOUSE, G. LINA, H. MEUGNIER, F. FOREY, X. NESME, J. ETIENNE UND F. VANDENESCH (2002):** Relationships between *Staphylococcus aureus* genetic background, virulence factors, *agr* groups (alleles) and human disease. *Infect. Immun.* **70**, 631-641.
- JÄSCHKE, A., M. LITTMANN UND C. HÜLSSE (2002):** Lebensmittelbedingte Gastroenteritiden. *Ars. Medici.* **2**, 76-80.
- JASPER, D. E., F. INFANTE UND J. D. DELLINGER (1985):** Relationships among the results of coagulase, staphylococcal toxin, and thermonuclease tests on staphylococci from cow milk. *J. Clin. Microbiol.* **21**, 582-584.
- JAULHAC, B., M. BES, N. BORNSTEIN, Y. PIEMONT, Y. BRUN UND J. FLEURETTE (1992):** Synthetic DNA probes for detection of genes for enterotoxins A, B, C, D, E and for TSST-1 in staphylococcal strains. *J. Appl. Bacteriol.* **72**, 386-392.

- JERMINI, M. F. G., F. DOMENICONI, F. BISSIG UND M. JÄGGLI (1990):** Hygienische Risiken durch Formaggini aus kleingewerblicher Produktion im Kanton Tessin: Enterotoxinogene *S. aureus*- und *E. coli*-Stämme. Mitt. Gebiete Lebensm. Hyg. **81**, 633-654.
- JOHNSON, H. M., J. A. BUKOVIC UND P. E. KAUFFMANN (1973):** Staphylococcal enterotoxin A and B: solid-phase radioimmunoassay in food. Appl. Microbiol. **26**, 309-313.
- JOHNSON, W. M., S. D. TYLER, E. P. EWAN, F. E. ASHTON, D. R. POLLARD UND K. R. ROZEE (1991):** Detection of genes for enterotoxins, exfoliative toxins, and toxic shock syndrome toxin 1 in *Staphylococcus aureus* by the polymerase chain reactions. J. Clin. Microbiol. **29**, 426-430.
- JONSSON, K., C. SIGNÄS, H. P. MÜLLER UND M. LINDBERG (1991):** Two different genes encode fibronectin-binding proteins in *Staphylococcus aureus*. The complete nucleotide sequence and characterization of the second gene Eur. J. Biochem. **202**, 1041-1048.
- JONSSON, P., M. LINDBERG, I. HARALDSSON UND T. WADSTROM (1985):** Virulence of *Staphylococcus aureus* in a mouse mastitis model: studies of alpha hemolysin, coagulase and protein A as possible virulence determinants with protoplast fusion and gene cloning. Infect. Immun. **49**, 765-769.
- JOSEFSSON, E., K. W. MCCREA, D. NI EIDHIN, D. O'CONNELL, J. COX, M. HÖÖK UND T. J. FOSTER (1998):** Three new members of the serine-aspartate repeat protein multigene family of *Staphylococcus aureus*. Microbiology **144**, 3387-3395.
- KHAN, A. S., C. J. CAO, R. G. THOMPSON UND J. J. VALDES (2003):** A simple and rapid fluorescence-based immunoassay for the detection of staphylococcal enterotoxin B. Mol. Cell Probes **17**, 125-126.
- KIJEK, T. M., C. A. ROSSI, D. MOSS, R. W. PARKER UND E. A. HENCHAL (2000):** Rapid and sensitive immunomagnetic-electrochemiluminescent detection of staphylococcal enterotoxin B. J. Immunol. Methods **236**, 9-17.
- KIM, C. H., M. KHAN, D. E. MORIN, W. L. HURLEY, D. N. TRIPATHY, M. KEHRLI JR., A. O. OLUOCH UND I. KAKOMA (2001):** Optimization of the PCR for detection of *Staphylococcus aureus nuc* gene in bovine milk. J. Dairy Sci. **84**, 74-83.
- KING, K. D., G. P. ANDERSON, K. E. BULLOCK, M. J. REGINA, E. W. SAASKI UND F. S. LIGLER (1999):** Detecting staphylococcal enterotoxin B using an automated fiber optic biosensor. Biosens. Bioelectron. **14**, 163-170.
- KLOOS, W. E. (1980):** Natural populations of the genus *Staphylococcus*. Annu. Rev. Microbiol. **34**, 559-592.
- KLOOS, W. E. UND K. H. SCHLEIFER (1986):** Genus IV. *Staphylococcus* Rosenbach 1884 In: Sneath, P. H. A., N. S. Mair, M. E. Sharpe und J. G. Holt, Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2, Williams and Wilkins, Baltimore, USA, pp. 1013-1035.
- KLOOS, W. E., K. H. SCHLEIFER UND F. GÖTZ (1992):** The genus *Staphylococcus*. P. 1369-1420. In Balows A. Trüper H.G., Dworkin M. et al. (eds): The Prokaryotes. 2<sup>nd</sup> Ed. Springer-Verlag, New York.

- KLOTZ, M., S. OPPER, K. HEEG UND S. ZIMMERMANN (2003):** Detection of *Staphylococcus aureus* enterotoxins A to D by real-time fluorescence PCR assay. J. Clin. Microbiol. **41**, 4683-4687.
- KULLIK, I., P. GIACHINO UND T. FUCHS (1998):** Deletion of the alternative sigma factor sigmaB in *Staphylococcus aureus* reveals its function as a global regulator of virulence genes. J. Bacteriol. **180**, 4814-4820.
- KUNZ, B. (1994):** Grundriss der Lebensmittel-Mikrobiologie. 2., überarb. u. erw. Aufl. Behr Verlag, Hamburg. ISBN 3-86022-111-6.
- KURODA, M., T. OHTA, I. UCHIYAMA, T. BABA, H. YUZAWA, I. KOBAYASHI, L. CUI, A. OGUCHI, K. AOKI, Y. NAGAI, J. LIAN, T. ITO, M. KANAMORI, H. MATSUMARU, A. MARUYAMA, H. MURAKAMI, A. HOSOYAMA, Y. MIZUTANI-UI, N. K. TAKAHASHI, T. SAWANO, R. INOUE, C. KAITO, K. SEKIMIZU, H. HIRAKAWA, S. KUHARA, S. GOTO, J. YABUZAKI, M. KANEHISA, A. YAMASHITA, K. OSHIMA, K. FURUYA, C. YOSHINO, T. SHIBA, M. HATTORI, N. OGASAWARA, H. HAYASHI UND K. HIRAMATSU (2001):** Whole genome sequencing of meticillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Lancet **357**, 1225-1240.
- LÄHTEENMÄKI, K., P. KUUSELA UND T. K. KORHONEN (2001):** Bacterial plasminogen activators and receptors. FEMS Microbiol. Rev. **25**, 531-552.
- LAKNER, M. (1997):** Entwicklung und Anwendung von immunchromatographischen Tests zum Nachweis von Staphylokokken-Enterotoxin E. Vet. Med. Diss. München
- LAM, M. T., Q. H. WAN, C. A. BOULET UND X. C. LE (1999):** Competitive immunoassay for staphylococcal enterotoxin A using capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection. J. Chromatogr. A. **20**, 545-553.
- LARSEN, H. D., A. HUDA, N. H. ERIKSEN UND N. E. JENSEN (2000):** Differences between Danish bovine and human *Staphylococcus aureus* isolates in possession of superantigens. Vet. Microbiol. **76**, 153-162.
- LAURELL, C. B. (1966):** Quantitative estimation of proteins by electrophoresis in agarose gel containing antibodies. Anal. Biochem. **15**, 45-52.
- LETERTRE, C., S. PERELLE, F. DILASSER UND P. FACH (2003a):** Detection and genotyping by real-time PCR of the staphylococcal enterotoxin genes *sea* to *sej*. Mol. Cell Probes **17**, 139-147.
- LETERTRE, C., S. PERELLE, F. DILASSER UND P. FACH (2003b):** Identification of a new putative enterotoxin SEU encoded by the *egc* cluster of *Staphylococcus aureus*. J. Appl. Microbiol. **95**, 38-43.
- LINDSAY, J. A., A. RUZIN, H. F. ROSS, N. KUREPINA UND R. P. NOVICK (1998):** The gene for toxic shock toxin is carried by a family of mobile pathogenicity islands in *Staphylococcus aureus*. Mol. Microbiol. **29**, 527-543.
- LOIR, Y. L., K. BARON UND M. GAUTIER (2003):** *Staphylococcus aureus* and food poisoning. Genet. Mol. Res. **2**, 63-76.
- LOPES, J. D., M. D. REIS UND R. R. BRENTANI (1985):** Presence of laminin receptors in *Staphylococcus aureus*. Science **229**, 275-277.

- LOTTER, L. P. UND C. A. GENIGEORGIS (1975):** Deoxyribonucleic acid base composition and biochemical properties of certain coagulase-negative enterotoxigenic cocci. *Appl. Microbiol.* **29**, 152-158.
- LOWY, F. D. (1998):** *Staphylococcus aureus* infections. *N. Engl. J. Med.* **339**, 520-532.
- LUDWIG, W. UND K. H. SCHLEIFER (1994):** Bacterial phylogeny based on 16S and 23S rRNA sequence analysis. *FEMS Microbiol. Rev.* **15**, 155-173.
- MANCHINI, G., A. O. CARBONARA UND J. F. HEREMANS (1965):** Immunochemical quantitation of antigens by single radial immunodiffusion. *Immunochem.* **2**, 235-254.
- MÄNTYNEN, V., S. NIEMELÄ, S. KAIJALAINEN, T. PIHONEN UND K. LINDSTRÖM (1997):** MPN-PCR-quantification method for staphylococcal enterotoxin c1 gene from fresh cheese. *Int. J. Food Microbiol.* **36**, 135-143.
- MARKS, J. UND A. C. T. VAUGHAN (1950):** Staphylococcal  $\delta$ -Haemolysin. *J. Path. Bact.* **LXII**, 597-615.
- MARR, J. C., J. D. LYON, J. R. ROBERSON, M. LUPHER, W. C. DAVIS UND G. A. BOHACH (1993):** Characterization of novel type C staphylococcal enterotoxins: biological and evolutionary implications. *Infect. Immun.* **61**, 4254-4262.
- MARTINEAU, F., F. J. PICARD, D. KE, S. PARADIS, P. H. ROY, M. OUELLETTE UND M. G. BERGERON (2001):** Development of a PCR assay for identification of staphylococci at genus and species levels. *J. Clin. Microbiol.* **39**, 2541-2547.
- MARTINEAU, F., F. J. PICARD, P. H. ROY, M. OUELLETTE UND M. G. BERGERON (1998):** Species-specific and ubiquitous-DNA-based assays for rapid identification of *Staphylococcus aureus*. *J. Clin. Microbiol.* **36**, 618-623.
- MCCORMICK, J. K., J. M. YARWOOD UND P. M. SCHLIEVERT (2001):** Toxic shock syndrome and bacterial superantigens: An Update. *Annu. Rev. Microbiol.* **55**, 77-104.
- MCDEVITT, D., P. FRANCOIS, P. VAUDAUX UND T. J. FOSTER (1994):** Molecular characterization of the clumping factor (fibrinogen receptor) of *Staphylococcus aureus*. *Mol. Microbiol.* **11**, 237-248.
- MCGAVIN, M. H., D. KRAJEWSKA-PIETRASIK, C. RYDEN UND M. HOOK (1993):** Identification of a *Staphylococcus aureus* extracellular matrix-binding protein with broad specificity. *Infect. Immun.* **61**, 2479-2485.
- MCLAUHLIN, J., G. L. NARAYANAN, V. MITHANI UND G. O'NEILL (2000):** The detection of enterotoxins and toxic shock syndrome toxin genes in *Staphylococcus aureus* by polymerase chain reaction. *J. Food Prot.* **63**, 479-488.
- MEHROTRA, M., G. WANG UND W. M. JOHNSON (2000):** Multiplex PCR for detection of genes for *Staphylococcus aureus* enterotoxins, exfoliative toxins, toxic shock syndrome toxin 1, and methicillin resistance. *J. Clin. Microbiol.* **38**, 1032-1035.
- MILCHVERORDNUNG (2000):** Verordnung über Hygiene - und Qualitätsanforderungen an Milch und Erzeugnisse auf Milchbasis in der Fassung der Bekanntmachung vom 20.7.2000. Fassung vom 20.7.2000 im Bundesgesetzblatt I, Nr. 36 vom 31.7.2000, S. 1178.

- MILLER, B. A., R. F. REISER UND M. S. BERGDOLL (1978):** Detection of staphylococcal enterotoxins A, B, C, D, and E in foods by radioimmunoassay, using staphylococcal cells containing protein A as immunoadsorbent. *Appl. Environ. Microbiol.* **36**, 421-426.
- MIWA, N., A. KAWAMURA, T. MASUDA UND M. AKIYAMA (2001):** An outbreak of food poisoning due to egg yolk reaction-negative *Staphylococcus aureus*. *Int. J. Food Microbiol.* **64**, 361-366.
- MIYAMOTO Y. J., E. R. WANN, T. FOWLER, E. DUFFIELD, M. HOOK UND B. W. MCINTYRE (2001):** Fibronectin binding protein A of *Staphylococcus aureus* can mediate human T lymphocyte adhesion and coactivation. *J. Immunol.* **166**, 5129-5138.
- MONDAY, S. R. UND G. A. BOHACH (1999):** Use of multiplex PCR to detect classical and newly described pyrogenic toxin genes in staphylococcal isolates. *J. Clin. Microbiol.* **37**, 3411-3414.
- MOREILLON, P., J. M. ENTENZA, P. FRANCIOLI, D. MCDEVITT, T. J. FOSTER, P. FRANCOIS UND P. VAUDAUX (1995):** Role of *Staphylococcus aureus* coagulase and clumping factor in pathogenesis of experimental endocarditis. *Infect. Immun.* **63**, 4738-4743.
- MORTENSEN, J. E., T. R. SHRYOCK UND F. A. KAPRAL (1992):** Modification of bactericidal fatty acids by an enzyme of *Staphylococcus aureus*. *J. Med. Microbiol.* **36**, 293-298.
- MOSSEL, D. A. UND P. VAN NETTEN (1990):** *Staphylococcus aureus* and related staphylococci in foods: ecology, proliferation, toxinogenesis, control and monitoring. *Soc. Appl. Bacteriol. Symp. Ser.* **19**, 23-145.
- MUKHIN, D. N. UND S. CHATTERJEE (1997):** A receptor-based immunoassay to detect *Staphylococcus enterotoxin B* in biological fluids. *Anal. Biochem.* **245**, 213-217.
- MÜLLER, E., S. TAKEDA, H. SHIRO, D. GOLDMANN UND G. B. PIER. (1993):** Occurrence of capsular polysaccharide/adhesin among clinical isolates of coagulase-negative staphylococci. *J. Infect. Dis.* **168**, 1211-1218.
- MULLIS, K., F. FALOONA, S. SCHARF, R. SAIKI, G. HORN UND H. ERLICH (1986):** Specific Enzymatic Amplification of DNA In Vitro: The Polymerase Chain Reaction. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **51**, 263-273.
- MUNSON, S. H., M. T. TREMAINE, M. J. BETLEY UND R. A. WELCH (1998):** Identification and characterization of staphylococcal enterotoxin types G and I from *Staphylococcus aureus*. *Infect. Immun.* **66**, 3337-3348.
- MURZIN, A. G. (1993):** OB (oligonucleotide/oligosaccharide binding)-fold: common structural and functional solution for non-homologous sequences. *EMBO J.* **12**, 861-867.
- NAIMUSHIN, A. N., S. D. SOELBERG, D. K. NGUYEN, L. DUNLAP, D. BARTHOLOMEW, J. ELKIND, J. MELENDEZ UND C. E. FURLONG (2002):** Detection of *Staphylococcus aureus* enterotoxin B at femtomolar levels with a miniature integrated two-channel surface plasmon resonance (SPR) sensor. *Biosens. Bioelectron.* **17**, 573-584.

- NAJERA-SANCHEZ, G., R. MALDONADO-RODRIGUEZ, P. R. OLVERA UND L. M. DE LA GARZA (2003):** Development of two multiplex polymerase chain reactions for the detection of enterotoxigenic strains of *Staphylococcus aureus* isolated from foods. *J. Food Prot.* **66**, 1055-1062.
- NEILL, R. J., G. R. FANNING, F. DELAHOZ, R. WOLFF UND P. GEMSKI (1990):** Oligonucleotide probes for detection and differentiation of *Staphylococcus aureus* strains containing genes for enterotoxins A, B, and C and toxic shock syndrome toxin 1. *J. Clin. Microbiol.* **28**, 1514-1518.
- NI EIDHIN, D., S. PERKINS, P. FRANCOUS, P. VAUDAUX, M. HÖÖK UND T. J. FOSTER (1998):** Clumping factor B (ClfB), a new surface-located fibrinogen-binding adhesin of *Staphylococcus aureus*. *Mol. Microbiol.* **30**, 245-257.
- NOTERMANS, S. UND K. WERNARS (1991):** Immunological methods for detection of foodborne pathogens and their toxins. *Int. J. Food Microbiol.* **12**, 91-102.
- NOTERMANS, S. UND A. HOOGENBOOM-VERDEGAAL (1992):** Existing and emerging foodborne diseases. *Int. J. Food Microbiol.* **15**, 197-205.
- NOTERMANS, S., K. J. HEUVELMAN UND K. WERNARS (1988):** Synthetic enterotoxin B DNA probes for detection of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* strains. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**, 531-533.
- O'REILLY, M. B., B. N. KREISWIRTH UND T. J. FOSTER (1990):** Molecular and a nonexpressed  $\alpha$ -toxin gene (*hla*) of clinical isolates of *Staphylococcus aureus* In: Novick, R. P., *Molecular Biology of the Staphylococci*, VCH Publishers Inc., New York, pp. 439-443.
- OAKLEY, C. L. UND A. J. FULTHORPE (1953):** Antigenic analysis of diffusion. *J. Path. Bacteriol.* **65**, 49-60.
- O'BRIEN, T., L. H. 3RD JOHNSON, J. L. ALDRICH, S. G. ALLEN, L. T. LIANG, A. L. PLUMMER, S. J. KRAK UND A. A. BOIARSKI (2000):** The development of immunoassays to four biological threat agents in a bidiffractive grating biosensor. *Biosens. Bioelectron* **14**, 815-828.
- OGSTON, A. (1883):** Micrococcus poisoning. *J. Anat. Physiol. (London)*. **17**, 24-58.
- OLSEN, J. E., S. AABO, W. HILL, S. NOTERMANS, K. WERNARS, P. E. GRANUM, T. POPOVIC, H. N. RASMUSSEN UND O. OLSVIK (1995):** Probes and polymerase chain reaction for detection of food-borne bacterial pathogens. *Int. J. Food Microbiol.* **28**, 1-78.
- OLSVIK, O., K. FOSSUM UND B. P. BERDAL (1982):** Staphylococcal enterotoxin A, B, and C produced by coagulase-negative strains within the family Micrococcaceae. *Acta. Pathol. Microbiol. Immunol. Scand. [B]*. **90**, 441-444.
- OLSVIK, O., B. P. BERDAL, K. FOSSUM UND T. OMLAND (1981):** Enterotoxin production by *Staphylococcus aureus* related to the origin of the strains. *Acta. Pathol. Microbiol. Scand. [B]*. **89**, 423-426.

- OMOE, K., D. HU, A. NAKANE UND K. SHINAGAWA (2003):** Identification and characterization of a new staphylococcal enterotoxin-related putative toxin encoded by two kinds of plasmids. *Infect. Immun.* **71**, 6088-6094.
- OMOE, K., M. ISHIKAWA, Y. SHIMODA, D. L. HU, S. UEDA UND K. SHINAGAWA (2002):** Detection of *seg*, *seh*, and *sei* genes in *Staphylococcus aureus* isolates and determination of the enterotoxin productivities of *S. aureus* isolates Harboring *seg*, *seh*, or *sei* genes. *J. Clin. Microbiol.* **40**, 857-862.
- ORDEN, J. A., J. GOYACHE, J. HERNANDEZ, A. DOMENECH, G. SUAREZ UND E. GOMEZ-LUCIA (1992):** Detection of enterotoxins and TSST-1 secreted by *Staphylococcus aureus* isolated from ruminant mastitis. Comparison of ELISA and immunoblot. *J. Appl. Bacteriol.* **72**, 486-489.
- ORWIN, P. M., D. Y. LEUNG, H. L. DONAHUE, R. P. NOVICK UND P. M. SCHLIEVERT (2001):** Biochemical and biological properties of Staphylococcal enterotoxin K. *Infect. Immun.* **69**, 360-366. Erratum in: **166**, 4259.
- ORWIN, P. M., J. R. FITZGERALD, D. Y. LEUNG, J. A. GUTIERREZ, G. A. BOHACH UND P. M. SCHLIEVERT (2003):** Characterization of *Staphylococcus aureus* enterotoxin L. *Infect. Immun.* **71**, 2916-2919.
- OTSUKA, G., F. UMEKI, M. SEKI, M. YOSHIDA, A. YOSAI UND M. TAKESHI (1992):** Evaluation of biological character and pathogenicity of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine quarter milk. *Milchwissenschaft* **47**, 423-426.
- OUCHTERLONY, O. (1948):** In vitro method for the testing the toxin production capacity of diptheria bacteria. *Acta Path. Microbiol. Scand.* **25**, 186-191.
- LOUDIN, J. (1952):** Specific precipitation on gels and its application to immunochemical analysis. *Meth. Med. Res. Chicago* **3**, Bd. 5.
- PADMAPRIYA, B. P., A. RAMESH, A. CHANDRASHEKAR UND M. C. VARADARAJ (2003):** Staphylococcal accessory gene regulator (*sar*) as a signature gene to detect enterotoxigenic staphylococci. *J. Appl. Microbiol.* **95**, 974-981.
- PALMA, M., HAGGAR, A. UND J. I. FLOCK (1999):** Adherence of *Staphylococcus aureus* is enhanced by an endogenous secreted protein with broad binding activity. *J. Bacteriol.* **181**, 2840-2845.
- PALMA, M., M. D. WADE, M. FLOCK UND J. I. FLOCK. (1998):** Multiple binding sites in the interaction between an extracellular fibrinogen-binding protein from *Staphylococcus aureus* and fibrinogen. *J. Biol. Chem.* **273**, 13177-13181.
- PARK, P. W., J. ROSENBLUM, W. R. ABRAMS, J. ROSENBLUM UND R. P. MECHAM (1996):** Molecular cloning and expression of the gene for elastin-binding protein (*ebpS*) in *Staphylococcus aureus*. *J. Biol. Chem.* **271**, 15803-15809.
- PATTI, J. M., B. L. ALLEN, M. J. MCGAVIN UND M. HOOK (1994):** MSCRAMM-mediated adherence of microorganisms to host tissues. *Annu. Rev. Microbiol.* **48**, 585-617.
- PEREIRA, J. L., S. P. SALZBERG UND M. S. BERGDOLL (1991):** Production of staphylococcal enterotoxin D in foods by low-enterotoxin-producing staphylococci. *Int. J. Food Microbiol.* **14**, 19-25.

- PROJAN, S. J. UND R. P. NOVICK (1997):** The molecular basis of pathogenicity. P. 55-83. In: Crossley K.B., Archer G.L., (ed) The staphylococci in human disease. Churchill Livingstone, New York.
- PROKESOVA, L., B. POTUZNIKOVA, J. POTEPA, J. ZIKAN, J. RADL, L. HACHOVA, K. BARAN, Z. PORWIT-BOBR UND C. JOHN (1992):** Cleavage of human immunoglobulins by serine proteinase from *Staphylococcus aureus*. Immunol. Lett. **31**, 259-265.
- PSONI, L., N. TZANETAKIS UND E. LITOPOULOU-TZANETAKI (2003):** Microbiological characteristics of Batzos, a traditional Greek cheese from raw goat's milk. Food Microbiology **20**, 575-582.
- RASOOLY, A. UND R. S. RASOOLY (1998):** Detection and analysis of Staphylococcal enterotoxin A in food by Western immunoblotting. Int. J. Food Microbiol. **41**, 205-212.
- RASOOLY, L., N. R. ROSE, D. B. SHAH UND A. RASOOLY (1997):** In vitro assay of *Staphylococcus aureus* enterotoxin A activity in food. Appl. Environ. Microbiol. **63**, 2361-2365.
- REISER, R. F., R. N. ROBBINS, G. P. KHOE UND M. S. BERGDOLL (1983):** Purification and some physicochemical properties of toxic-shock toxin. Biochemistry **22**, 3907-3912.
- REISER, R. F., R. N. ROBBINS, A. L. NOLETO, G. P. KHOE UND M. S. BERGDOLL (1984):** Identification, purification, and some physicochemical properties of staphylococcal enterotoxin C3. Infect. Immun. **45**, 625-630.
- ROSE, S. A., N. K. MODI, H. S. TRANTER, N. E. BAILEY, M. F. STRINGER UND P. HAMBLETON (1988):** Studies on the irradiation of toxins of *Clostridium botulinum* and *Staphylococcus aureus*. J. Appl. Bacteriol. **65**, 223-229.
- ROSEC, J. P., J. P. GUIRAUD, C. DALET UND N. RICHARD (1997):** Enterotoxin production by staphylococci isolated from foods in France. Int. J. Food Microbiol. **35**, 213-221.
- ROSYPAL, S., A. ROSYPALOVA UND J. HOREJS (1966):** The classification of micrococci and staphylococci based on their DNA base composition and adansonian analysis. J. Gen. Microbiol. **44**, 281-292.
- ROWE, C. A., S. B. SCRUGGS, M. J. FELDSTEIN, J. P. GOLDEN UND F. S. LIGLER (1999):** An array immunosensor for simultaneous detection of clinical analytes. Anal. Chem. **71**, 433-439. Erratum in: 2003, 75, 1225.
- SANTOS, E. C. DOS UND C. GENIERGEORGIS (1981):** Survival and growth of *Staphylococcus aureus* in commercially manufactured Bazilian minas cheese. J. Food Prot. **44**, 172-176.
- SARUTA, K., S. HOSHINA UND K. MACHIDA (1995):** Genetic identification of *Staphylococcus aureus* by polymerase chain reaction using single-base-pair mismatch in 16S ribosomal RNA gene. Microbiol. Immunol. **39**, 839-844.
- SARUTA, K., T. MATSUNAGA, M. KONO, S. HOSHINA, S. IKAWA, O. SAKAI UND K. MACHIDA (1997):** Rapid identification and typing of *Staphylococcus aureus* by nested PCR amplified ribosomal DNA spacer region. FEMS Microbiol. Lett. **146**, 271-278.
- SAVOLAINEN, K., L. PAULIN, B. WESTERLUND-WIKSTRÖM, T. J. FOSTER, T. K. KORHONEN UND P. KUUSELA (2001):** Expression of *pls*, a gene closely associated with

- the *mecA* gene of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, prevents bacterial adhesion in vitro. *Infect. Immun.* **69**, 3013-3020.
- SCHANTZ, E. J., W. G. ROESSLER, J. WAGMAN, L. SPERO, D. A. DUNNERY UND M. S. BERGDOLL (1965): Purification of staphylococcal enterotoxin B. *Biochemistry* **4**, 1011-1016.
- SCHANTZ, E. J., W. G. ROESSLER, M. J. WOODBURN, J. M. LYNCH, H. M. JACOBY, S. J. SILVERMAN, J. C. GORMAN UND L. SPERO (1972): Purification and some chemical and physical properties of staphylococcal enterotoxin A. *Biochemistry* **11**, 360-366.
- SCHUBER, P. H., H. MOSSMANN, G. BECK UND D. K. HAMMER (1983): Direct skin test in highly sensitized guinea pigs for rapid and sensitive determination of staphylococcal enterotoxin B. *Appl. Environ. Microbiol.* **46**, 1351-1356.
- SCHLEIFER, K. H. UND W. E. KLOOS (1975): A simple test system for the separation of staphylococci from micrococci. *J. Clin. Microbiol.* **1**, 337-338.
- SCHLIEVERT, P. M., L. M. JABLONSKI, M. ROGGIANI, I. SADLER, S. CALLANTINE, D. T. MITCHELL, D. H. OHLENDORF UND G. A. BOHACH (2000): Pyrogenic toxin superantigen site specificity in toxic shock syndrome and food poisoning in animals. *Infect. Immun.* **68**, 3630-3634.
- SCHMIDT, K. UND A. GERVELMEYER (2003): Surveillance Programme for control of Foodborne Infections and Intoxications in Europe, WHO, 8th Report. [http://www.bgvv.de/cms/detail.php?template=internet\\_de\\_index\\_js](http://www.bgvv.de/cms/detail.php?template=internet_de_index_js).
- SCHMITZ, F. J., M. STEIERT, H. V. TICHY, B. HOFMANN, J. VERHOEF, H. P. HEINZ, K. KÖHRER UND M. E. JONES (1998): Typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from Düsseldorf by six genotypic methods. *J. Med. Microbiol.* **47**, 341-351.
- SCHUMACHER-PERDREAU, F., A. AKATOVA UND G. PULVERER (1995): Detection of staphylococcal enterotoxin B and toxic shock syndrome toxin: PCR versus conventional methods. *Zentralbl. Bakteriol.* **282**, 367-371.
- SEKI, K., J. SAKURADA, H. K. SEONG, M. MURAI, H. TACHI, H. ISHII UND S. MASUDA (1998): Occurrence of coagulase serotype among *Staphylococcus aureus* strains isolated from healthy individuals-special reference to correlation with size of protein-A gene. *Microbiol. Immunol.* **42**, 407-409.
- SHARMA, N. K., C. E. REES UND C. E. DODD (2000): Development of a single-reaction multiplex PCR toxin typing assay for *Staphylococcus aureus* strains. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**, 1347-1353.
- SHINGAKI, M., H. IGARASHI, H. FUJIKAWA, H. USHIODA, T. TERAYAMA UND S. SAKAI (1981): Study on reversed passive latex agglutination for the detection of staphylococcal enterotoxins A-C. *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. Publ. Hlth.* **32**, 128-131.
- SIBOO, I. R., A. L. CHEUNG, A. S. BAYER UND P. M. SULLAM (2001): Clumping factor A mediates binding of *Staphylococcus aureus* to human platelets. *Infect. Immun.* **69**, 3120-3127.

- SILVESTRI, L. G. UND L. R. HILL (1965):** Agreement Between Deoxyribonucleic Acid Base Composition and Taxometric Classification of Gram-Positive Cocci. *J. Bacteriol.* **90**, 136-410.
- SINELL, H. J. (1995):** Control of food-borne infections and intoxications. *Int. J. Food Microbiol.* **25**, 209-217.
- SINELL, H. J. (2004):** Einführung in die Lebensmittelhygiene, 4. neubearb. Aufl., Verlag Parey, Berlin, ISBN 3830440952.
- SKALKA, B., J. SMOLA UND J. PILLICH (1979):** A simple Method of detecting staphylococcal Hemolysins. *Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. A.* **245**, 283-286.
- SLAVIK, R., J. HOMOLA UND E. BRYNDA (2002):** A miniature fiber optic surface plasmon resonance sensor for fast detection of Staphylococcal enterotoxin B. *Biosens. Bioelectron.* **17**, 591-595.
- SOMERVILLE, G. A., A. COCKAYNE, M. DURR, A. PESCHEL, M. OTTO UND J. M. MUSSER (2003):** Synthesis and deformylation of *Staphylococcus aureus* delta-toxin are linked to tricarboxylic acid cycle activity. *J. Bacteriol.* **185**, 6686-6694.
- SOMMERFELD, P. UND G. TERPLAN (1975):** Methoden zum Nachweis von Staphylokokkenenterotoxinen. *Arch. Lebensmittelhyg.* **26**, 128-137.
- SPECKER, M. (1996):** Untersuchungen zum Vorkommen von Listerien, Salmonellen, Campylobacter und Staphylokokken in Rohmilch im Land Brandenburg. *Vet. Med. Diss. Berlin.*
- STEPHAN, R., C. ANNEMÜLLER, A. A. HASSAN UND C. LÄMMLER (2001):** Characterization of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine mastitis in north-east Switzerland. *Vet. Microbiol.* **2051**, 1-10.
- STRAUB, J. A., C. HERTEL UND W. P. HAMMES (1999):** A 23S rDNA-targeted polymerase chain reaction-based system for detection of *Staphylococcus aureus* in meat starter cultures and dairy products. *J. Food Prot.* **62**, 1150-1156.
- STUMPF, H. J. (1988):** Untersuchungen über die Bedeutung koagulase-positiver und koagulase-negativer Staphylokokken für die mastitis des Rindes. *Vet. Med. Diss., der Justus Liebig Universität Giessen.*
- SU, Y. UND A. C. L. WONG (1995):** Identification and purification of a new staphylococcal enterotoxin, H. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**, 1438-1443.
- SU, Y. UND A. C. L. WONG (1996):** Detection of staphylococcal enterotoxin H by an enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Food Prot.* **59**, 327-330.
- SU, Y. UND A. C. L. WONG (1997):** Current perspectives on detection of staphylococcal enterotoxins. *J. Food Prot.* **60**, 195-202.
- SURGALLA, M. J., M. S. BERGDOLL UND G. M. DACK (1953):** Some observations on the assay of staphylococcal enterotoxin by the monkey-feeding test. *J. Lab. Clin. Med.* **41**, 782-788.

- TAITT, C. R., G. P. ANDERSON, B. M. LINGERFELT, M. J. FELDSTEIN UND F. S. LIGLER (2002):** Nine-analyte detection using an array-based biosensor. *Anal. Chem.* **74**, 6114-6120.
- TAMARAPU, S., J. L. MCKILLIP UND M. DRAKE (2001):** Development of a multiplex polymerase chain reaction assay for detection and differentiation of *Staphylococcus aureus* in dairy products. *J. Food Prot.* **64**, 664-668.
- TAUXE, R. V. (1997):** Emerging foodborne diseases: an evolving public health challenge. *Emerg. Infect. Dis.* **3**, 425-434.
- TAUXE, R. V. (2002):** Emerging foodborne pathogens. *Int. J. Food Microbiol.* **78**, 31-41.
- TEMPELMAN, L. A., K. D. KING, G. P. ANDERSON UND F. S. LIGLER (1996):** Quantitating staphylococcal enterotoxin B in diverse media using a portable fiber-optic biosensor. *Anal. Biochem.* **233**, 50-57.
- TIRADO, C. UND K. SCHMIDT (2002):** Surveillance Programme for control of Foodborne Infections and Intoxications in Europe, WHO, 7th Report. [http://www.bgvv.de/cms/detail.php?template=internet\\_de\\_index\\_js](http://www.bgvv.de/cms/detail.php?template=internet_de_index_js).
- TRANTER, H. S. UND R. D. BREHM (1990):** Production, purification and identification of the staphylococcal enterotoxins. *Soc. Appl. Bacteriol. Symp. Ser.* **19**, 109-122.
- TSCHÄPE, H. (2000):** Lebensmittelbedingte Infektionskrankheiten durch Bakterien, Bundesgesundheitsbl. Gesundheitsforsch-Gesundheitsschutz **43**, 758-769.
- TSEN, H. Y. UND T. R. CHEN (1992):** Use of the polymerase chain reaction for specific detection of type A, D and E enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in foods. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **37**, 685-690. Erratum in: **38**, 708.
- TSEN, H. Y., G. K. YU, K. C. WANG, S. J. WANG, M. Y. CHANG UND L. Y. LIN (1998):** Comparison of the enterotoxigenic types, toxic shock syndrome toxin I (TSST-1) strains and antibiotic susceptibilities for enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* strains isolated from food and clinical samples. *Food Microbiol.* **15**, 33-41.
- TUNG, H., B. GUSS, U. HELLMAN, L. PERSSON, K. RUBIN UND C. RYDEN (2000):** A bone sialoprotein-binding protein from *Staphylococcus aureus*: a member of the staphylococcal Sdr family. *Biochem. J.* **345**, 611-619.
- UDO, E. E., M. A. AL-BUSTAN, L. E. JACOB UND T. D. CHUGH (1999):** Enterotoxin production by coagulase-negative staphylococci in restaurant workers from Kuwait City may be a potential cause of food poisoning. *J. Med. Microbiol.* **48**, 819-823.
- UHLÉN, M., B. GUSS, B. NILSSON, S. GATENBECK, L. PHILIPSON UND M. LINDBERG (1984):** Complete sequence of the staphylococcal gene encoding protein A. *J. Biol. Chem.* **259**, 1695-1702.
- UNTERMANN, F. (1972):** Zum Vorkommen von Enterotoxin-bildenden Staphylokokken bei Menschen. (Occurrence of enterotoxin producing staphylococci in man). *Zentralbl. Bakteriol. [Orig. A]*. **222**, 18-26.
- VERORDNUNG (EG) NR. 2073/2005 DER KOMMISSION ÜBER MIKROBIOLOGISCHE KRITERIEN FÜR LEBENSMITTEL (2005):** Kommission der Europäischen Gemeinschaft, Brüssel, Amtsblatt der Europäischen Union 22.12.2005; L 338/1.

- VAN GRIETHUYSEN, A., M. BES, J. ETIENNE, R. ZBINDEN UND J. KLUYTMANS (2001):** International multicenter evaluation of latex agglutination tests for identification of *Staphylococcus aureus*. *J. Clin. Microbiol.* **39**, 86-89.
- VERNOZY-ROZAND, C., C. MAZUY, G. PREVOST, C. LAPEYRE, M. BES, Y. BRUN UND J. FLEURETTE (1996):** Enterotoxin production by coagulase-negative staphylococci isolated from goats' milk and cheese. *Int. J. Food Microbiol.* **30**, 271-280.
- WADKINS, R. M., J. P. GOLDEN, L. M. PRITSIOLAS UND F. S. LIGLER (1998):** Detection of multiple toxic agents using a planar array immunosensor. *Biosens. Bioelectron* **13**, 407-415.
- WANN, E. R., S. GURUSIDDAPPA UND M. HOOK (2000):** The fibronectin-binding MSCRAMM FnbpA of *Staphylococcus aureus* is a bifunctional protein that also binds to fibrinogen. *J. Biol. Chem.* **275**, 13863-13871.
- WIENEKE, A. A., D. ROBERTS UND R. J. GILBERT (1993):** Staphylococcal food poisoning in the United Kingdom, 1969-90. *Epidemiol. Infect.* **110**, 519-531.
- WILSON, I. G., J. E. COOPER UND A. GILMOUR (1991):** Detection of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in dried skimmed milk: use of the polymerase chain reaction for amplification and detection of staphylococcal enterotoxin genes entB and entC1 and the thermonuclease gene *nuc*. *Appl Environ Microbiol.* **57**, 1793-1798.
- WOESE, C. R. (1987):** Bacterial evolution. *Microbiol. Rev.* **51**, 221-271.
- WRIGHT, A, P. L. ANDREWS UND R. W. TITBALL (2000):** Induction of emetic, pyrexia, and behavioral effects of *Staphylococcus aureus* enterotoxin B in the ferret. *Infect. Immun.* **68**, 2386-2389.
- YANG, J. M., J. BELL, Y. HUANG, M. TIRADO, D. THOMAS, A. H. FORSTER, R. W. HAIGIS, P. D. SWANSON, R. B. WALLACE, B. MARTINSONS UND M. KRIHAK (2002):** An integrated, stacked microlaboratory for biological agent detection with DNA and immunoassays. *Biosens. Bioelectron* **17**, 605-618.
- YARWOOD, J. M., J. K. MCCORMICK UND P. M. SCHLIEVERT (2001):** Identification of a novel two-component regulatory system that regulates virulence factors of *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* **183**, 1113-1123.
- YARWOOD, J. M., J. K. MCCORMICK, M. L. PAUSTIAN, P. M. ORWIN, V. KAPUR UND P. M. SCHLIEVERT (2002):** Characterization and expression analysis of *Staphylococcus aureus* pathogenicity island 3. Implications for the evolution of staphylococcal pathogenicity islands. *J. Biol. Chem.* **277**, 13138-13147.
- ZHANG, L., A. A. ROSANDER, K. JACOBSSON, M. LINDBERG UND L. FRYKBERG (2000):** Expression of staphylococcal protein Sbi is induced by human IgG. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **28**, 211-218.
- ZHANG, S., J. J. IANDOLO UND G. C. STEWART (1998):** The enterotoxin D plasmid of *Staphylococcus aureus* encodes a second enterotoxin determinant (*sej*). *FEMS Microbiol. Lett.* **168**, 227-233.

## 9 DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Professur für Milchwissenschaften für ihre Hilfsbereitschaft und die freundliche Zusammenarbeit bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Herrn Prof. Dr. Dr. habil. Ewald Usleber möchte ich an dieser Stelle für die freundliche Überlassung des Themas, seine stets gewährte Unterstützung und die zahlreichen wertvollen Anregungen während der Anfertigung der Arbeit danken.

Insbesondere bedanke ich mich bei der Frau Dr. Barbara Kratzheller, Frau Dr. A. Renz-Schauen, Frau Dr. Cornelia Jäger und Herrn Dr. Ulrich Groß für die freundschaftliche Unterstützung bei der Korrektur und die wertvoller Vorschläge zur Verbesserung des Manuskripts. Weiterhin bedanke ich mich auch bei Frau Dr. Elisabeth Schneider für die freundschaftliche Hilfsbereitschaft und Durchsicht des Manuskripts.

Mein Dank gilt ebenso allen Mitarbeitern der Professur für Milchwissenschaften, die mich im Rahmen dieser Arbeit mit ihrer Hilfsbereitschaft bei allen anfallenden Problemen, insbesondere Dr. A.A. Hassan, Dr. V. Curtui, C. Eichmann, D. Klotz, C. Seidler, C. Kress, B. Kerp und A. Schaus-Frühauf.

Mein herzlichster Dank gilt meiner Frau Dr. Sevil Aslan-Akineden, die mich während des Entstehens dieser Arbeit immer wieder ermutigt und unterstützt hat.

*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

VVB LAUFERSWEILER VERLAG  
GLEIBERGER WEG 4  
D-35435 WETTENBERG

Tel: +49-(0)6406-4413 Fax: -72757  
redaktion@doktorverlag.de  
www.doktorverlag.de

ISBN 3-8359-5005-3



9 783835 950054