

VANESSA ISABELLE HEINRICH

**Vergleichende Untersuchungen zur
Speziesdifferenzierung und –identifizierung von
Cronobacter-Isolaten verschiedener Herkunft**



Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Grades eines
Dr. med. vet.
beim Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen



édition scientifique 
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Die rechtliche Verantwortung für den gesamten Inhalt dieses Buches liegt ausschließlich bei dem Autor dieses Werkes.

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 2017

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.

1st Edition 2017

© 2017 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



édition linguistique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

STAUENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

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

**Vergleichende Untersuchungen zur
Speziesdifferenzierung und –identifizierung von
Cronobacter-Isolaten verschiedener Herkunft**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines

Dr. med. vet.

beim Fachbereich Veterinärmedizin

der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

VANESSA ISABELLE HEINRICH

Tierärztin aus Berlin

Gießen 2017

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

Dekan: Prof. Dr. Dr. h. c. Martin Kramer

Gutachter: Prof. Dr. Dr. habil. Ewald Usleber

Gutachter: Prof. Dr. Rolf Bauerfeind

Tag der Disputation: 26. Juni 2017

Meinen Eltern und Großeltern

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

HEINRICH, V., Ö. AKINEDEN und E. USLEBER (2013):

Speziesdifferenzierung von *Cronobacter*-Isolaten unterschiedlicher Herkunft.

54. Arbeitstagung des Arbeitsgebietes Lebensmittelhygiene der Deutschen

Veterinärmedizinischen Gesellschaft e.V. in Garmisch-Partenkirchen, 24.09. – 27.09.2013,

Abstracts S. 80.

AKINEDEN, Ö., V. HEINRICH, M. GROSS und E. USLEBER (2017):

Reassessment of *Cronobacter* spp. originally isolated as *Enterobacter sakazakii* from infant food.

Food Microbiology 65 (2017) 44-50

INHALTSVERZEICHNIS

Inhaltsverzeichnis	I
Tabellenverzeichnis	IV
Abbildungsverzeichnis	VII
Abkürzungsverzeichnis	VIII
1 EINLEITUNG	1
2 LITERATURÜBERSICHT	3
2.1 <i>Cronobacter</i> spp.	3
2.1.1 Taxonomie und Nomenklatur.....	3
2.1.2 Morphologie, kulturelle und biochemische Eigenschaften	6
2.1.3 Biofilmbildung und Tenazität	7
2.1.4 Pathogenitätsmechanismen und Virulenzfaktoren	8
2.1.5 Vorkommen von <i>Cronobacter</i> spp.	10
2.1.5.1 Vorkommen in der Umwelt und in Lebensmitteln.....	10
2.1.5.2 Vorkommen in Säuglingsnahrungsmitteln.....	12
2.1.6 Klinische Bedeutung	16
2.1.7 Rechtliche Einordnung.....	17
2.1.8 Nachweis und Identifizierung von <i>Cronobacter</i> spp.	18
2.1.8.1 Kultureller Nachweis von <i>Cronobacter</i> spp.....	18
2.1.8.2 Identifizierung von <i>Cronobacter</i> spp. mittels API® 20 E / ID 32 E Testsystemen	22
2.1.8.3 Identifizierung und Differenzierung mittels MALDI-TOF MS	23
2.1.8.4 Biotypisierung und biochemische Eigenschaften	24
2.1.8.5 PCR-Nachweis von <i>Cronobacter</i> spp.	28
2.1.8.5.1 Identifizierung von <i>Cronobacter</i> spp. auf Genusebene	28
2.1.8.5.2 Differenzierung von <i>Cronobacter</i> spp. auf Speziesebene.....	29
2.1.8.5.3 Kommerzielle PCR-Methoden	30
2.1.8.6 Genotypisierungsmethoden	30
2.1.8.6.1 Sequenzanalyse	30
2.1.8.6.2 Multilokus-Sequenztypisierung (MLST)	31

2.1.8.6.3	Pulsfeld-Gelelektrophorese (PFGE).....	33
3	MATERIAL UND METHODEN	35
3.1	Materialien	35
3.1.1	Probenmaterial	35
3.1.2	Chemikalien, Nährmedien und Reagenzien	37
3.1.3	Laborgeräte und Verbrauchsmaterialien	39
3.1.4	Bakterien-Typ- bzw. Referenzstämme.....	43
3.2	Methoden.....	44
3.2.1	Konservierung und Lagerung der Isolate	44
3.2.2	Identifizierung mittels MALDI-TOF MS	44
3.2.3	Biochemische Charakterisierung.....	46
3.2.4	Molekularbiologische Charakterisierung	51
3.2.4.1	Extraktion der bakteriellen DNA	51
3.2.4.2	Ansetzen der gebrauchsfertigen Primer	52
3.2.4.3	Durchführung der Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	54
3.2.4.4	Gelelektrophorese und optische Darstellung der PCR-Produkte	56
3.2.5	Sequenzanalyse des <i>rpoB</i> -Gens	57
3.2.5.1	Primer zur Amplifikation des <i>rpoB</i> -Gens	59
3.2.5.2	Durchführung der PCR.....	59
3.2.5.3	Reinigung der DNA-Amplifikate.....	60
3.2.5.4	Sequenzierung und Auswertung der DNA-Amplifikate	61
3.2.6	Multilokus-Sequenztypisierung (MLST)	61
3.2.6.1	Primer zur Amplifikation und Sequenzierung der sieben Housekeeping-Gene von <i>Cronobacter</i> spp.....	61
3.2.6.2	Durchführung der PCR.....	63
3.2.6.3	Reinigung der DNA-Amplifikate.....	64
3.2.6.4	Sequenzierung und Auswertung der DNA-Amplifikate	64
3.2.7	Makrorestriktionsanalyse von <i>Cronobacter</i> spp.	65
3.2.7.1	Vorbereitung der Makrorestriktionsanalyse.....	66
3.2.7.2	Gelelektrophorese und optische Darstellung der DNA-Fragmente	67
4	ERGEBNISSE	69
4.1	Ergebnisse der MALDI-TOF MS	69

4.2	Ergebnisse der biochemischen Charakterisierung.....	69
4.3	Ergebnisse der Spezies-spezifischen PCR unter Verwendung des <i>rpoB</i> -Gens	72
4.4	Gegenüberstellung der Identifizierungsergebnisse der biochemischen Untersuchungen und der Spezies-spezifischen PCR	76
4.5	Ergebnisse der Sequenzanalyse des <i>rpoB</i> -Gens.....	76
4.6	Gegenüberstellung der Identifizierungsergebnisse der biochemischen Untersuchungen, der Spezies-spezifischen PCR und der partiellen <i>rpoB</i> -Gen Sequenzanalyse.....	79
4.7	Ergebnisse der MLST.....	81
4.8	Ergebnisse der Makrorestriktionsanalyse.....	83
5	DISKUSSION	92
5.1	Identifizierung mittels MALDI-TOF MS	93
5.2	Biochemische Charakterisierung.....	95
5.3	Molekularbiologische Charakterisierung	96
5.4	Sequenzanalyse des <i>rpoB</i> -Gens	97
5.5	Multilokus-Sequenztypisierung (MLST)	99
5.6	Makrorestriktionsanalyse	101
5.7	Schlussfolgerung	103
6	ZUSAMMENFASSUNG	106
7	SUMMARY	109
8	LITERATURVERZEICHNIS	112
9	ANHANG	132

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1:	Taxonomische Einteilung von <i>Cronobacter</i> spp.....	5
Tabelle 2:	RASFF Meldungen zu <i>Cronobacter</i> -Nachweisen in Säuglingsnahrung 2008 bis 2013	14
Tabelle 3:	Methoden zum kulturellen Nachweis von <i>Cronobacter</i> spp. (angelehnt an FAO/WHO, 2006).....	21
Tabelle 4:	Biotypisierung von <i>Cronobacter</i> spp. (Zusammengestellt nach FARMER et al., 1980; IVERSEN et al., 2006, 2008a; STEPHAN et al., 2007, 2008; JOSEPH et al., 2012a) unter Berücksichtigung der derzeit (Juni 2017) gültigen Taxonomie.....	26
Tabelle 5:	PCR-Verfahren zum Nachweis von <i>Cronobacter</i> spp.	28
Tabelle 6:	Übersicht über die in der MLST verwendeten Housekeeping-Gene (BALDWIN et al., 2009).....	32
Tabelle 7:	PFGE-Protokoll für die Genotypisierung von <i>Cronobacter</i> -Isolaten (BRENGI et al., 2012)	34
Tabelle 8:	Übersicht der Herkunft der verwendeten <i>Cronobacter</i> -Isolate.....	36
Tabelle 9:	Aufstellung der verwendeten Typ- bzw. Referenzstämme	43
Tabelle 10:	Bewertungszahlen des MALDI-Biotyper und deren Bedeutung (Bruker Daltonik GmbH, Bremen).....	45
Tabelle 11:	Verwendete Kontrollstämme für die Biotypisierung und ihre Reaktionen....	50
Tabelle 12:	Übersicht über die in dieser Arbeit eingesetzten Oligonukleotidprimer zur Amplifizierung der Spezies-spezifischen Abschnitt des <i>rpoB</i> -Gens von <i>Cronobacter</i> spp.	53
Tabelle 13:	Zusammensetzung des Reaktionsgemisches (Mastermix) zur Durchführung der PCR.....	54
Tabelle 14:	Temperatur-Zeit-Profil zur DNA-Amplifikation	55
Tabelle 15:	Annealing-Temperaturen der Spezies-spezifischen Oligonukleotidprimer ...	55

Tabelle 16: Übersicht zur Auswertung der Ergebnisse der Spezies-spezifischen <i>rpoB</i> -PCR	56
Tabelle 17: GenBank-Nummern der verwendeten <i>rpoB</i> -Gen Sequenzen der <i>Cronobacter</i> -Typstämme.....	58
Tabelle 18: Oligonukleotidprimer für die Amplifikation eines Genabschnitts zur Sequenzierung des <i>rpoB</i> -Gens (MOLLET et al., 1997).....	59
Tabelle 19: Temperatur-Zeit-Profil zur DNA-Amplifikation des <i>rpoB</i> -Gens (MOLLET et al., 1997).....	60
Tabelle 20: Übersicht der verwendeten Oligonukleotidprimer für die Amplifizierung der sieben Housekeeping-Gene von <i>Cronobacter</i> spp. (BALDWIN et al., 2009).....	62
Tabelle 21: Übersicht der verwendeten Oligonukleotidprimer für die Sequenzierung der sieben Housekeeping-Gene von <i>Cronobacter</i> spp. (BALDWIN et al., 2009).....	63
Tabelle 22: Temperatur-Zeit-Profil zur DNA-Amplifikation der sieben Housekeeping-Gene angelehnt an BALDWIN et al. (2009).....	64
Tabelle 23: Zusammensetzung des Reaktionsgemisches zur Restriktion für die PFGE...	67
Tabelle 24: PFGE-Programm für <i>Cronobacter</i> spp.	68
Tabelle 25: Übersicht der biochemischen Spezieszuordnung.....	70
Tabelle 26: Biotypenverteilung der einzelnen Spezies	70
Tabelle 27: Übersicht der Speziesidentifizierung mittels Spezies-spezifischer PCR unter Verwendung des <i>rpoB</i> -Gens.....	72
Tabelle 28: Übersicht der positiven PCR-Ergebnisse der Spezies-spezifischen Primerpaare	73
Tabelle 29: Vergleichende Darstellung der Isolate mit übereinstimmenden Identifizierungsergebnissen.....	79
Tabelle 30: Vergleichende Darstellung der Isolate mit unterschiedlichen Identifizierungsergebnissen	80
Tabelle 31: Ergebnisse der MLST.....	82

Tabelle 32: Übersicht der mittels Makrorestriktionsanalyse untersuchten Isolate.....	86
Tabelle 33: Ergebnisübersicht der untersuchten Isolate.....	132

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Speziesverteilung der Isolate in Abhängigkeit von der Herkunft aus verschiedenen Lebensmitteln bzw. anderen Probenmaterialien..... 70

Abbildung 2: Typische Amplikons (514 Bp) des *C. sakazakii*-spezifischen Abschnitts des *rpoB*-Gens unter Verwendung der Oligonukleotidprimer Csakf und Csakr 72

Abbildung 3: Typische Amplikons (251 Bp) des *C. malonaticus*-spezifischen Abschnitts des *rpoB*-Gens unter Verwendung der Oligonukleotidprimer Cmalr und Cmalr 73

Abbildung 4: Typische Amplikons (628 Bp) des *C. turicensis*-spezifischen Abschnitts des *rpoB*-Gens unter Verwendung der Oligonukleotidprimer Cturf und Cturr 73

Abbildung 5: Typische Amplikons (330 Bp) des *C. muytjensii*-spezifischen Abschnitts des *rpoB*-Gens unter Verwendung der Oligonukleotidprimer Cmuyf und Cmuyr 74

Abbildung 6: Dendrogrammanalyse (Neighbour-Joining Tree) der *rpoB*-Gen Sequenzen von ausgewählten Isolaten (n=26), *Cronobacter*-Typstämmen (n=9), *Siccibacter* (*S.*) *turicensis*, *Franconibacter* (*F.*) *helveticus* und *F. pulveris* 77

Abbildung 7: Verschiedene Restriktionsmuster von Isolaten (n=9) aus deutscher Säuglingsnahrung nach Verdau der genomischen DNA mit der Restriktionsendonuklease *XbaI* 83

Abbildung 8: Verschiedene Restriktionsmuster von Isolaten aus indonesischer (n=2, Spur 1 und 2) und deutscher (n=7, Spur 3 bis 9) Säuglingsnahrung nach Verdau der genomischen DNA mit der Restriktionsendonuklease *XbaI* 84

Abbildung 9: Dendrogrammanalyse der *XbaI*-Makrorestriktionsmuster ausgewählter *C. sakazakii*-Isolate 87

Abbildung 10: Dendrogrammanalyse der *XbaI*-Makrorestriktionsmuster ausgewählter *C. malonaticus*-Isolate..... 89

Abbildung 11: Dendrogrammanalyse der *XbaI*-Makrorestriktionsmuster ausgewählter *C. turicensis*-Isolate aus verschiedenen Probenpackungen mit unterschiedlichen Restriktionsmustern. 90

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

API® 20 E	Analytic Profile Index 20 <i>Enterobacteriaceae</i>
API® ID 32 E	Analytic Profile Index Identification 32 <i>Enterobacteriaceae</i>
Aqua dest.	Aqua destillata, destilliertes Wasser
ATCC	American Type Culture Collection
Bp	Basenpaar(e)
BSA	Bovine Serum Albumine
BVL	Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit
bzw.	beziehungsweise
C.	<i>Cronobacter</i>
ca.	circa
CASO	Caseinpepton-Sojamehlpepton
CDC	Centers for Disease Control and Prevention
cfu	colony forming units, Kolonie bildende Einheiten
CHEF	Clamped Homogeneous Electric Fields
CSB	<i>Cronobacter</i> Screening Broth
dest.	destilliert
DFI-Agar	Druggan-Forsythe-Iversen-Agar
d.h.	das heißt
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphate
DSMZ	Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen
dt.	deutsch
D-Wert	dezimale Reduktionszeit
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EEB	<i>Enterobacteriaceae</i> Enrichment Broth, <i>Enterobacteriaceae</i> Anreicherungsbouillon nach MOSSEL
EFSA	European Food Safety Authority, Europäische Behörde für Lebensmittelsicherheit
EG	Europäische Gemeinschaft
E.	<i>Enterobacter</i>
ESE	<i>Enterobacter sakazakii</i> Enrichment Broth
ESIA®-Agar	<i>Enterobacter sakazakii</i> Isolation Agar
ESPM	<i>Enterobacter sakazakii</i> Plating Medium

ESSB	<i>Enterobacter sakazakii</i> Selective Broth
ESSM	<i>Enterobacter sakazakii</i> Screening Medium
et al.	et alii, und andere
EU	Europäische Union / endotoxin units
<i>F.</i>	<i>Franconibacter</i>
f-AFLP	fluorescent amplified fragment-length polymorphism
FAO	Food and Agriculture Organisation, Welternährungsorganisation
FDA	Food and Drug Administration
g	Gramm
h	Stunde
H ₂ S	Schwefelwasserstoff
HBMEC	human brain microvascular endothelial cells
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
ICMSF	International Commission on Microbiological Specifications for Food
Ino	myo-Inositol
ISO	International Organization for Standardization
JLU	Justus-Liebig-Universität
k. A.	keine Angaben
Kb	Kilobase
KbE	Kolonie bildende Einheiten
l	Liter
LMG	Laboratorium voor Microbiologie, Gent, Belgien
LMU	Ludwig-Maximilians-Universität München
log	Logarithmus
LPS	Lipopolysaccharide
mA	Milliampere
MALDI-TOF MS	Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation-Time Of Flight Mass Spectrometry, Matrix-unterstützte Laserdesorptions-Ionisations-Flugzeit-Massenspektrometrie
MEGA	Molecular Evolutionary Genetics Analysis
mg	Milligramm
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
mDFI-Agar	modifizierter Druggan-Forsythe-Iversen-Agar
min	Minuten
ml	Milliliter
MLSA	Multilokus-Sequenz-Analyse

MLST	Multilokus-Sequenztypisierung
mLST	modified Lauryl Sulfate Tryptose Broth, modifizierte Laurylsulfat-Trypton-Bouillon, mit 0,5 M NaCl und 10 mg/l Vancomycin
mM	Millimolar
mmol	Millimol
Mot	Motilität, Beweglichkeit
MPa	Megapascal
MPN	Most Probable Number-Technik
MR	Methylrot
n	Anzahl n
N ₂	molekularer Stickstoff
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NCTC	National Collection of Type Cultures
n.i.	nicht identifizierbar
nm	Nanometer
NO ₂	Nitrit
NO ₃	Nitrat
Nr.	Nummer
ODC	Ornithin-Decarboxylase
<i>omps</i>	outer membrane proteins
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase Chain Reaction, Polymerase-Kettenreaktion
PFGE	Pulsed Field Gel Electrophoresis, Pulsfeld-Gelelektrophorese
pmol	Pikomol
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
RASFF	Rapid Alert System for Food and Feed, europäisches Schnellwarnsystem für Lebensmittel und Futtermittel
RFLP	Restriktions-Fragmentlängen-Polymorphismus
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
RT-PCR	Real-Time-PCR
<i>S.</i>	<i>Siccibacter</i>
sec	Sekunden
SIM	Sulphide Indole Motility
spp.	Spezies (Plural)
subsp.	Subspezies (Singular)
TAE	TRIS-Acetat-EDTA

Taq	Thermus aquaticus
TBE	TRIS-Borat-EDTA
TE	TRIS-EDTA
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Unit (Internationale Einheit)
u.a.	unter anderem
UPGMA	Unweighted pair group method with arithmetic mean
USA	Vereinigte Staaten von Amerika
UV	Ultraviolett
V/cm	Volt pro Centimeter
VO	Verordnung
VP	Voges-Proskauer
VRBG	Violet Red Bile Glucose Agar, Kristallviolett-Neutralrot-Galle-Agar
WHO	World Health Organization, Weltgesundheitsorganisation
z.B.	zum Beispiel
z-Wert	dezimale Reduktionstemperatur
%	Prozent
Σ	Summe
°C	Grad Celsius
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
μm	Mikrometer
μmol	Mikromol
α	Alpha
β	Beta
∞	unendlich

1 EINLEITUNG

Cronobacter spp. (früher *Enterobacter sakazakii*) sind fakultativ anaerobe, peritrich begeißelte, gramnegative Stäbchenbakterien aus der Familie *Enterobacteriaceae*. Sie sind opportunistische Krankheitserreger, die vor allem bei Neugeborenen und Säuglingen, aber auch bei immungeschwächten und älteren Menschen schwere Allgemeinerkrankungen hervorrufen können. Zu den typischen Manifestationen einer *Cronobacter*-Infektion zählen unter anderem Meningitis, Septikämie und nekrotisierende Enterokolitis (LAI et al., 2001). *Cronobacter* spp. sind in der Umwelt und in Lebensmitteln pflanzlicher und tierischer Herkunft weit verbreitet. Die wichtigste Infektionsquelle für die Erkrankungen bei Säuglingen stellt jedoch vor allem kontaminierte pulverförmige Säuglingsnahrung dar (FAO/WHO, 2004; FRIEDEMANN, 2008). Deshalb sind *Cronobacter* spp. gemäß Verordnung (EG) Nr. 2073/2005 der Kommission vom 15. November 2005 über mikrobiologische Kriterien für Lebensmittel, geändert durch die Verordnungen (EG) Nr. 1441/2007 und Nr. 365/2010, als Lebensmittelsicherheitskriterium definiert. *Cronobacter* spp. dürfen in 30 x 10 g getrockneter Säuglingsanfangsnahrung und getrockneten diätetischen Lebensmitteln für besondere medizinische Zwecke, die für Säuglinge unter sechs Monaten bestimmt sind, nicht nachweisbar sein.

Die ehemalige Spezies *Enterobacter sakazakii* wurde aufgrund neuer genetischer und biochemischer Erkenntnisse taxonomisch in die neue Gattung *Cronobacter* überführt (IVERSEN et al., 2008a). Nach mehreren weiteren Reklassifizierungen enthält die Gattung *Cronobacter* derzeit (Juni 2017) sieben Spezies: *Cronobacter* (*C.*) *sakazakii*, *C. malonicus*, *C. turicensis*, *C. mytjensii*, *C. dublinensis* mit drei Subspezies (*C. dublinensis* subsp. *dublinensis*, *C. dublinensis* subsp. *lausannensis*, *C. dublinensis* subsp. *lactaridi*), *C. condimenti*, *C. universalis* (IVERSEN et al., 2008a; BALDWIN et al., 2009; JOSEPH et al., 2012a; STEPHAN et al., 2014).

Aufgrund dieser neuen Klassifizierung, aber auch wegen möglicher Unterschiede bezüglich der pathogenen Eigenschaften, gewinnt die Speziesdifferenzierung innerhalb der Gattung *Cronobacter* immer mehr an Bedeutung. Inwieweit eine solche Differenzierung tatsächlich von praktischer Relevanz ist, insbesondere für den Nachweis von *Cronobacter* spp. in Säuglingsnahrungsmitteln, kann derzeit noch nicht abgeschätzt werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden am Institut für Tierärztliche Nahrungsmittelkunde, Professur für Milchwissenschaften der Justus-Liebig-Universität Gießen, insgesamt 259 *Cronobacter*-Isolate aus unterschiedlicher Herkunft differenziert. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Variabilität und relative Häufigkeit verschiedener *Cronobacter*-Spezies in Säuglingsnahrungsmitteln sowie einigen anderen Lebensmitteln des deutschen Marktes und des Produktionsumfeldes von Säuglingsnahrung herstellenden Betrieben zu untersuchen und die Häufigkeitsverteilung der einzelnen Spezies darzustellen. Zudem sollten die verschiedenen Differenzierungsmöglichkeiten untereinander verglichen und auf ihre Routinetauglichkeit geprüft werden.

2 LITERATURÜBERSICHT

2.1 *Cronobacter* spp.

2.1.1 Taxonomie und Nomenklatur

Im Jahr 1929 wird erstmals in der Literatur ein aus einer Blutkultur isolierter, gelb-pigmentierter *Enterobacter cloacae* (*E. cloacae*) beschrieben (PANGALOS, 1929). Erst wenige Jahrzehnte später werden diese „gelb-pigmentierten *E. cloacae*“ in Zusammenhang mit Erkrankungen gebracht (URMENYI & FRANKLIN, 1961; JØKER et al., 1965).

Erste Hinweise, dass „gelb-pigmentierte *E. cloacae*“ nicht zu der Spezies *E. cloacae* gehören, kamen 1972. Mittels DNA-DNA-Hybridisierung konnte festgestellt werden, dass der Verwandtschaftsgrad von gelb-pigmentierten und nicht-pigmentierten *E. cloacae*-Stämmen nur bis zu 50% beträgt (BRENNER et al., 1974). Auch das Wachstum von *E. cloacae*-Stämmen auf CASO-Agar (Caseinpepton-Sojamehlpepton-Agar) zeigte zwei verschiedene Phänotypen im Zusammenhang mit der An- oder Abwesenheit von gelbem Pigment (STEIGERWALT et al., 1976). Im Jahr 1977 zeigten BRENNER et al. (1977), dass die Differenzierung zwischen pigmentbildenden *E. cloacae* und nicht-pigmentbildenden *E. cloacae* auf Basis der Säureproduktion aus D-Sorbit (die Fähigkeit D-Sorbitol zu fermentieren) und verzögerter DNaseproduktion (extrazellulär) möglich ist.

Im Hinblick auf die phäno- und genotypischen Unterschiede wurde der „gelb-pigmentierte *E. cloacae*“ im Jahr 1980 als eigenständige Spezies *Enterobacter sakazakii* (*E. sakazakii*) klassifiziert (FARMER et al., 1980). Der Name *E. sakazakii* wurde zu Ehren des japanischen Tierarztes und Mikrobiologen Riichi Sakazaki gewählt. Diese Neuklassifizierung durch FARMER et al. (1980) basiert auf Unterschieden in der DNA-DNA-Hybridisierung, biochemischen Reaktionen, der Produktion von gelbem Pigment und der Empfindlichkeit gegenüber verschiedenen Antibiotika. Da man innerhalb der neuen Spezies 15 Biotypen unterscheiden konnte, hatten bereits FARMER et al. (1980) vermutet, dass es sich in Wirklichkeit um mehrere Spezies handeln könnte und zugleich

die Hypothese aufgestellt, dass die Etablierung einer neuen Gattung erforderlich sein könnte.

Basierend auf partieller 16S rDNA-Sequenzanalyse wurden durch die Untersuchung von 189 *E. sakazakii*-Stämmen die 15 Biotypen vier genomischen, heterogenen Clustern zugeordnet und elf weitere Subtypen und ein weiterer Biotyp mit drei Subtypen eingeführt (IVERSEN et al., 2006). Im Jahr 2007 konnten mittels f-AFLP (fluorescent amplified fragment-length polymorphism), Ribotypisierung, DNA-DNA-Hybridisierung und Gensequenzierung der 16S rRNA weitere genetische Unterschiede festgestellt werden und die Reklassifizierung und Einführung der Gattung *Cronobacter* wurde vorgeschlagen (IVERSEN et al., 2007a). Der Name *Cronobacter* leitet sich aus der griechischen Mythologie ab. Der Titan Cronos (dt. Kronos, röm. Saturn) fraß seine Kinder, die späteren olympischen Götter. Die Namensgebung spielt auf die Tatsache an, dass *Cronobacter* vor allem bei Säuglingen zu oft tödlichen Infektionskrankheiten führt.

Eine genauere Zuordnung der Biotypen zu den jeweiligen Spezies erfolgte im Jahr 2008. Danach gehören die Biotypen 1 bis 4, 7, 8, 11 und 13 zu *C. sakazakii*, Biotyp 5, 9 und 14 zu *C. malonaticus*, Biotyp 15 zu *C. mytjensii* und Biotyp 16 zu *C. turicensis*, wobei zwei Stämme dieser Gruppe separiert als *C. genomospecies* 1 geführt werden. Die Biotypen 6, 10 und 12 zählen zu der Spezies *C. dublinensis*, die in die Subspezies *C. dublinensis* subsp. *dublinensis* (Biotyp 12), *C. dublinensis* subsp. *lausannensis* (Biotyp 10) und *C. dublinensis* subsp. *lactaridi* (Biotyp 6) eingeteilt werden (IVERSEN et al., 2008a).

Bei einer Neubewertung einiger *Cronobacter*-Stämme mittels phänotypischer Charakterisierung, 16S rRNA-Gensequenzierung und Multilokus-Sequenz-Analyse (MLSA) wird eine neue Spezies, *C. condimenti* beschrieben und *C. universalis* ersetzt die Spezies *C. genomospecies* 1 (JOSEPH et al., 2012a). Bei weiteren Untersuchungen mittels MLSA kam es zur Reklassifizierung von drei *Enterobacter* (E.) Spezies (*E. turicensis*, *E. helveticus* und *E. pulveris*) in die Gattung *Cronobacter* (BRADY et al., 2013). STEPHAN et al. (2014) nahmen die letzten drei Spezies jedoch kurz darauf wieder aus der Gattung *Cronobacter* heraus und reklassifizierten sie als zu den neuen Gattungen *Franconibacter* (F.) und *Siccibacter* (S.) zugehörig.

Die Gattung *Cronobacter* gehört zu der Familie der *Enterobacteriaceae*. Derzeit (Juni 2017) umfasst sie somit sieben Spezies und drei Subspezies. Eine Übersicht der neuen taxonomischen Einteilung ist in Tabelle 1 dargestellt.

Tabelle 1: Taxonomische Einteilung von *Cronobacter* spp.

Taxon	Bezeichnung	Referenz
Familie	<i>Enterobacteriaceae</i>	
Gattung	<i>Cronobacter</i>	IVERSEN et al., 2008a
Spezies	<i>C. sakazakii</i>	
Spezies	<i>C. malonaticus</i>	
Spezies	<i>C. turicensis</i>	
Spezies	<i>C. mytjensii</i>	
Spezies	<i>C. dublinensis</i>	
Subspezies	<i>C. dublinensis</i> subsp. <i>dublinensis</i>	
Subspezies	<i>C. dublinensis</i> subsp. <i>lausamensis</i>	
Subspezies	<i>C. dublinensis</i> subsp. <i>lactaridi</i>	
Spezies	<i>C. condimentii</i>	JOSEPH et al., 2012a
Spezies	<i>C. universalis</i>	

Die Einteilung einiger *Cronobacter*-Spezies in Serotypen wird in verschiedenen Studien beschrieben (MULLANE et al., 2008a; JARVIS et al., 2011; SUN et al., 2011; 2012; Blažková et al., 2015). Die Serotypeneinteilung basiert auf unterschiedlichen O (Oberflächen)-Antigenen, die als Bestandteil von Lipopolysacchariden in der äußeren Membran von gramnegativen Bakterien lokalisiert sind. Für das Genus *Cronobacter* sind derzeit (Juni 2017) 24 Serotypen bekannt (Blažková et al., 2015). Für *C. sakazakii* sind sieben Serotypen (MULLANE et al., 2008a; JARVIS et al., 2011; SUN et al., 2011; Blažková et al., 2015), für *C. turicensis* fünf Serotypen, für *C. malonaticus* vier Serotypen, für *C. dublinensis* drei Serotypen, für *C. mytjensii* und *C. universalis* jeweils zwei Serotypen und für *C. condimentii* ein Serotyp beschrieben (JARVIS et al., 2011; SUN et al., 2012; Blažková et al., 2015).

2.1.2 Morphologie, kulturelle und biochemische Eigenschaften

Cronobacter spp. sind fakultativ anaerobe, peritrich begeißelte, gramnegative Stäbchen mit einer Größe von etwa 3 µm x 1 µm (IVERSEN et al., 2007a).

Zu den biochemischen Eigenschaften gehören eine negative Oxidase-Reaktion, eine positive Katalase-Reaktion, die Hydrolyse von Äsculin und Arginin, die Säurebildung durch Fermentation aus D-Glucose, D-Sucrose, D-Raffinose, D-Melibiose, D-Cellobiose, D-Mannitol, D-Mannose, L-Rhamnose, L-Arabinose, D-Xylose, D-Trehalose, Galacturonat und D-Maltose, sowie eine positive L-Ornithin und n-Dekarboxylase-Reaktion (IVERSEN et al., 2007a; LEHNER et al., 2013). Die Acetoinproduktion (Voges-Proskauer Test, API® 20 E, BioMerieux) ist bei 91% der Stämme positiv (LEHNER et al., 2013). Eine weitere charakteristische Eigenschaft von *Cronobacter* spp. stellt die α-Glucosidase-Aktivität dar. Sie ermöglicht eine schnelle und sichere Differenzierung zwischen *Cronobacter*- und *Enterobacter*-Spezies (MUYTJENS et al., 1984).

Beim Wachstum auf festen Nährböden lassen sich zwei verschiedene Kolonietypen unterscheiden. Kolonietyp A ist entweder trocken oder mukös, mit einer konvexen oder konkaven, gummiartigen Oberfläche, die sich nur schlecht mit einer Öse vom Agar abnehmen lässt. Kolonietyp B hingegen ist von weicher, schleimiger Konsistenz und lässt sich leicht mit der Öse vom Agar abnehmen (FARMER et al., 1980). Bei Subkultivierung wurde gezeigt, dass sich Typ A in Typ B umwandeln kann und beide Kolonietypen in einer Kultur auftreten können (FARMER et al., 1980). Hinsichtlich der Virulenzeigenschaften sind keine Unterschiede zwischen diesen beiden Kolonietypen bekannt (NAZAROWEC-WHITE & FARBER, 1997a). Das Wachstum in flüssigen Nährmedien erfolgt sehr schnell und eine große Menge an Sediment wird produziert (FARMER et al., 1980). Minimale und maximale Wachstumstemperaturen werden mit 2,2 °C und 48,9 °C angegeben (KANDHAI et al., 2006).

Zu den charakteristischen Merkmalen von *Cronobacter* spp. zählte lange Zeit auch die Produktion des gelben Pigments. Bei einer Bebrütungstemperatur von 25 °C für 48 h ist sie am deutlichsten ausgeprägt. In wenigen Fällen ist sie jedoch nur schwer erkennbar oder nicht vorhanden und sollte daher nicht als alleiniges Differenzierungskriterium genutzt

werden (FARMER et al., 1980). In Untersuchungen von IVERSEN & FORSYTHE (2007) produzierten 2% der geprüften *Cronobacter*-Stämme kein gelbes Pigment.

2.1.3 Biofilmbildung und Tenazität

Die Fähigkeit zur Biofilmbildung spielt besonders im Hinblick auf die Wirksamkeit von Reinigungs- und Desinfektionsmaßnahmen eine Rolle. Voraussetzung für die Bildung von Biofilmen ist die Produktion von extrazellulären polymeren Substanzen, Zellulosefasern und Curli-Fimbrien (ZOGAJ et al., 2003; HARTMANN et al., 2010), wobei die Zellulosefasern eine extrazelluläre Komponente in Biofilmen darstellen (LEHNER et al., 2005). Das Anheften an verschiedene Oberflächen wie Silikon, Latex, Polycarbonat, Polyvinylchlorid und in geringerem Ausmaß auch an Edelstahl und Glas ist dadurch möglich (IVERSEN et al., 2004c, LEHNER et al., 2005). In einer Studie von KIM et al. (2006) über die Anheftungsfähigkeit und Biofilmbildung an Edelstahl und Ernährungs sonden zeigte sich, dass Temperatur und Nährstoffangebot eine entscheidende Rolle spielen. Neben dem Vorhandensein von Zellulose und extrazellulärer DNA zeigten HARTMANN et al. (2010), dass auch intakte Flagellen für die Biofilmbildung von Bedeutung sind.

Cronobacter spp. besitzen eine hohe Tenazität gegenüber Hitze, Trockenheit (CAUBILLA-BARRON & FORSYTHE, 2007) und osmotischem Stress (BREEUWER et al., 2003; EDELSON-MAMMEL et al., 2005; RIEDEL & LEHNER, 2007). Eine Überlebensfähigkeit von 24 Monaten (IVERSEN & FORSYTHE, 2003) bzw. 30 Monaten in Säuglingsfertignahrung auf Milchpulverbasis (CAUBILLA-BARRON & FORSYTHE, 2007) sind dokumentiert. Weitere Untersuchungen zur Hitzetoleranz wurden u.a. von NAZAROWEC-WHITE & FARBER (1997b), BREEUWER et al. (2003) und IVERSEN et al. (2004c) durchgeführt. Dabei lag die optimale Wachstumstemperatur in rekonstituierter Säuglingsnahrung zwischen 37 °C und 43 °C (IVERSEN et al., 2004c). Die dezimalen Reduktionszeiten (D-Wert) für Hitzebehandlungen werden bei $D_{54\text{ °C}}$ mit Werten zwischen $10,2 \pm 3,56$ min und $16,4 \pm 0,67$ min und bei $D_{62\text{ °C}}$ mit Werten zwischen $0,2 \pm 0,13$ min und $0,4 \pm 0,08$ min angegeben (IVERSEN et al., 2004c). Basierend auf dem $D_{60\text{ °C}}$ -Wert von 1,1 min und

einem z-Wert von 5,7 °C wurde für die Kurzzeitpasteurisierung bei 71,7 °C über 15 s eine Reduktion der Keimzahl um 21-log Stufen berechnet. Im Vergleich zu den D-Werten anderer *Enterobacteriaceae* erwiesen sich *Cronobacter* spp. als verhältnismäßig hitzetolerante Organismen dieser Gruppe (NAZAROWEC-WHITE & FARBER, 1997b).

EDELSON-MAMMEL & BUCHANAN (2004) führten ebenfalls Versuche zur Hitzetoleranz in rekonstituierter Säuglingsnahrung durch. Hierbei konnte zwischen den zwölf untersuchten Stämmen deutlich zwischen zwei Gruppen unterschieden werden. Die $D_{58\text{ °C}}$ -Werte lagen bei sechs Stämmen zwischen $30,5 \pm 0,1$ s und $47,9 \pm 1,0$ s, bei sechs weiteren Stämmen zwischen $307,8 \pm 6,7$ s und $591,9 \pm 49,9$ s. Weitere Untersuchungen dieser Stämme ergaben, dass ein bestimmtes Protein bei diesen sechs resistenten Stämmen nachweisbar war, dessen Sequenz als Biomarker vorgeschlagen wurde (WILLIAMS et al., 2005).

GONZÁLES et al. (2006) untersuchten die Keimdichte in rekonstituierter Säuglingsnahrung unter Hochdruckbedingungen. Dabei beobachteten sie, dass innerhalb einer Minute bei einem Druck von 600 MPa und 25 °C eine Keimreduktion von 3 bis 6,84 log Stufen erreicht wurde.

2.1.4 Pathogenitätsmechanismen und Virulenzfaktoren

Der Begriff Pathogenität bezeichnet die Fähigkeit von Mikroorganismen, Krankheiten auszulösen. Der Auslöser einer Krankheit hängt von den sogenannten Virulenzfaktoren ab, die sowohl Strukturelemente, wie z.B. Zellwandkomponenten, oder auch Stoffwechselprodukte, wie z.B. Exotoxine eines Mikroorganismus sein können. Über die Pathogenitätsmechanismen und mögliche Virulenzfaktoren bei *Cronobacter* spp. ist bisher wenig bekannt (LEHNER et al., 2013).

Die Adhäsionsfähigkeit und Invasivität von *Cronobacter* spp. wurde in mehreren Studien untersucht (MANGE et al., 2006; MOHAN NAIR & VENKITANARAYANAN, 2007; TOWNSEND et al., 2008; KIM & LOESSNER, 2008; MOHAN NAIR et al., 2009; SCHAUER et al., 2015). An den drei humanen Zelllinien HEp-2 (Humane Epitheliumzellen Typ 2), Caco-2 (Humane epitheliale colorektale Adenokarzinomzellen / Carcinoma Colon) und HBMEC (human brain microvascular endothelial cells) konnte die

Adhäsionsfähigkeit von *Cronobacter* spp. nachgewiesen werden (MANGE et al., 2006). Dabei konnte die Ausbildung von zwei verschiedenen Adhäsionsmustern, zum einen eine diffuse Anheftung, zum anderen eine Bildung von Bakterienhaufen, festgestellt werden. Nach MANGE et al. (2006) ist die Fähigkeit zur Adhäsion von *Cronobacter* spp. zum Großteil wahrscheinlich nicht durch Fimbrien bedingt. TOWNSEND et al. (2008) zeigten, dass sich *Cronobacter* spp. an Caco-2-Zellen anheften und in diese eindringen können. Außerdem konnte die Invasion von zerebralen Kapillarendothelzellen von Ratten nachgewiesen werden. Einige Stämme von *Cronobacter* spp. sind in der Lage, bis zu 48 Stunden in Makrophagen (U937) zu überleben und sich zu vermehren (TOWNSEND et al., 2008). SCHAUER et al. (2015) zeigten für *C. turicensis*, dass durch gegen das O-Antigen gerichtete monoklonale Antikörper die Adhäsionsfähigkeit bei Caco-2-Zellen nicht beeinträchtigt, jedoch die Invasion des Erregers signifikant gehemmt wurde.

Bei der Überwindung der Intestinal- und Blut-Hirn-Schranke spielen Transmembranproteine (Porine), sogenannte *omps* (outer membrane proteins), eine entscheidende Rolle. MITTAL et al. (2009) zeigten, dass die Expression von *ompA* sowohl für die Kolonisation im Gastrointestinaltrakt als auch für das Überleben von *Cronobacter* spp. im Blut erforderlich ist. Auch die Überwindung der Blut-Hirn-Schranke und die Fähigkeit der Invasion von HBMEC-Zellen ist von der Expression von *ompA* abhängig (SINGAMSETTY et al., 2008; MITTAL et al., 2009). Durch die Bindung von *ompA* an Fibronectin wird die Invasion von HBMEC-Zellen ermöglicht (MOHAN NAIR et al., 2009). In einer Studie von KIM et al. (2010) wird die Beteiligung eines weiteren Porins (*ompX*) als Virulenzfaktor dargestellt.

Lipopolysaccharide (LPS) sind hitzestabile Endotoxine, die bei allen gram-negativen Bakterien in der äußeren Membran der Zellwand lokalisiert sind. Das Vorhandensein von Endotoxinen kann die Durchlässigkeit der Darmwand für Mikroorganismen erhöhen und somit die bakterielle Invasion fördern. Zudem können die Toxine die Blut-Hirn-Schranke überwinden und zu noch gravierenderen Schädigungen führen (TOWNSEND et al., 2007). TOWNSEND et al. (2007) untersuchte die Endotoxingehalte von 75 Proben Säuglingsfertignahrung auf Milchpulverbasis aus verschiedenen Ländern. Dabei lagen die Endotoxinkonzentrationen zwischen 40 und $5,5 \times 10^4$ EU (endotoxin units) pro Gramm Säuglingsfertignahrung. In einem darauffolgenden Tierversuch mit neugeborenen Ratten konnten, nach der intraperitonealen Injektion von gereinigtem *Escherichia coli* LPS und anschließender Verfütterung von phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) mit einer hohen

Dosis von *Cronobacter* spp. (10^8 cfu pro 10 μ PBS), Erreger in verschiedenen Organen sowie in der Zerebrospinalflüssigkeit nachgewiesen werden (TOWNSEND et al., 2007).

Neben den in der äußeren Membran vorhandenen Endotoxinen sind einige *Cronobacter* spp. auch in der Lage Exotoxine zu produzieren. In einer Studie von PAGOTTO et al. (2003) konnte die Bildung eines Enterotoxins nachgewiesen werden. RAGHAV & AGGARWAL (2007) führten weitere Untersuchungen im Hinblick auf die biochemischen Eigenschaften dieses Enterotoxins durch und konnten die höchste Aktivität bei einem pH-Wert von 6 und eine Hitzestabilität bei 90 °C über 30 min. beobachten.

Zusätzlich zum Enterotoxinnachweis führte PAGOTTO et al. (2003) verschiedene Zytotoxizitätsversuche an unterschiedlichen Zelllinien (CHO - Chinese Hamster Ovary, Vero – Zelllinie aus Nierenzellen und Y-1 Zellen) durch. Dabei wurden zytotoxische Effekte bei allen Zellkulturen beobachtet. Außerdem konnte festgestellt werden, dass ein Isolat sowohl Enterotoxin bildete als auch zytotoxisch auf die Zelllinien CHO, Vero und Y-1 wirkte, wobei andere Isolate nur das Enterotoxin bildeten (PAGOTTO et al., 2003).

2.1.5 Vorkommen von *Cronobacter* spp.

2.1.5.1 Vorkommen in der Umwelt und in Lebensmitteln

Das natürliche Habitat von *Cronobacter* spp. ist noch nicht bekannt, sie kommen aber in der Umwelt und in Lebensmitteln weit verbreitet vor. Diverse physiologische Fähigkeiten, wie z.B. Pigmentbildung, Biofilmbildung und Austrocknungsresistenz deuten darauf hin, dass es sich um pflanzenassoziierte Keime handelt (SCHMID et al., 2009; LEHNER et al., 2013).

Cronobacter spp. konnten bisher aus verschiedenen Lebensmitteln pflanzlicher und tierischer Herkunft nachgewiesen werden. Die höchste Kontaminationshäufigkeit wurde in pflanzlichen Lebensmitteln festgestellt. Die Mehrzahl der positiven Proben tierischer Lebensmittel enthielten pflanzliche Zusatzstoffe (TURCOVSKÝ et al., 2011). Auch andere Autoren berichten über das Vorkommen von *Cronobacter* spp. sowohl in frischen Obst- und Gemüsesorten als auch in getrockneten pflanzlichen Lebensmitteln, wie

Getreide, Kräutern und Gewürzen (KIM & BEUCHAT, 2005; IVERSEN et al., 2004b; JARADAT et al., 2009; CHON et al., 2012; HOCHÉL et al., 2012).

Als potentiell mit *Cronobacter* spp. kontaminierte Lebensmittel tierischen Ursprungs werden Rohmilch (LAFARGE et al., 2004), Milcherzeugnisse wie z.B. Käse (LECLERCQ et al., 2002; IVERSEN et al., 2004b; CHAVES-LÓPEZ et al., 2006), Speiseeis (KRAEMER, 2008), Fleischerzeugnisse wie z.B. Hackfleisch und Fleischbrät (LECLERCQ et al., 2002), Fisch (LIU et al., 2006) sowie Eier (GURTLER et al., 2005, HOCHÉL et al., 2012) genannt. In Straußeneiern konnten *Cronobacter* spp. sowohl im Eiweiß als auch im Dotter nachgewiesen werden (CABASSI et al., 2004). Der Nachweis von *Cronobacter* spp. in Mineralwasserquellen (MOSSO et al., 1994) und im Trinkwasser (LECLERCQ et al., 2001) ist ebenfalls beschrieben.

In der Umwelt scheint *Cronobacter* spp. häufig vorzukommen. So konnten *Cronobacter* spp. aus der Produktionsumgebung verschiedener lebensmittelherstellender Betriebe (Milchpulver, Gewürze, Schokoladen-, Getreide-, Nudel- und Kartoffelprodukte) und aus Staubsaugerbeutelinhalt privaten Haushalte nachgewiesen werden (KANDHAI et al., 2004; MULLANE et al., 2008b). Bei der Aufklärung von durch *Cronobacter* spp. bedingten nosokomialen Erkrankungen wurden kontaminierte Bedarfsgegenstände, die zur Zubereitung von Säuglingsfertiernahrung (Rührlöffel, Mixer und Flaschenwärmer) oder zur anschließenden Geschirreinigung (Abwaschbürste) genutzt wurden, gefunden (MUYTJENS et al., 1983; NORIEGA et al., 1990; BAR-OZ et al., 2001; BLOCK et al., 2002).

Tiere können als Vektoren für eine Übertragung von *Cronobacter* spp. fungieren und ein Reservoir für diese Erreger darstellen. Von der Hautoberfläche von Stuben- (*Musca domestica*) und Stallfliegen (*Stomoxys calcitrans*) und aus dem Verdauungstrakt von mexikanischen Fruchtfliegen (*Anastrepha ludens*) und Stallfliegenlarven konnten *Cronobacter* spp. isoliert werden (KUZINA et al., 2001; HAMILTON et al., 2003; MRAMBA et al., 2006; PAVA-RIPOLL et al., 2012). Aber nicht nur Insekten sind als Träger von *Cronobacter* spp. beschrieben worden. GAKUYA et al. (2001) untersuchten z.B. Antibiotikaresistenzen von aus Ratten isolierten *Cronobacter* spp. aus Afrika.

Im Zusammenhang mit Erkrankungen wurden *Cronobacter* spp. aus einer Vielzahl klinischer Proben aus Blut, Knochenmark, Liquor, Speichel, Respirationstrakt, Urin, Stuhl,

Haut, Wundexsudat, Augensekret, Ohr und Brustabszess isoliert (FARMER et al., 1980; IVERSEN & FORSYTHE, 2003).

2.1.5.2 Vorkommen in Säuglingsnahrungsmitteln

Aus lebensmittelhygienischer Sicht spielt das Vorkommen von *Cronobacter* spp. in pulverförmiger Säuglingsanfangsnahrung eine wichtige Rolle. Nach Angaben der FAO/WHO (2004) sind pulverförmige Säuglingsanfangsnahrungen in 50-80% der Fälle von durch *Cronobacter* spp. verursachten Erkrankungen als Quelle und auch als Vehikel identifiziert worden. Ein eindeutiger kausaler Zusammenhang zwischen dem Konsum von Säuglingsfertignahrung und Erkrankungen wurde in mehreren Studien nachgewiesen (MUYTJENS et al., 1983; SIMMONS et al., 1989; CLARK et al., 1990; VAN ACKER et al., 2001; CDC, 2002; BLOCK et al., 2002; COIGNARD et al., 2006).

Mikrobiologische Untersuchungen zum Vorkommen von *Cronobacter* spp. in Säuglingsfertignahrungsmitteln zeigten weltweit bis zu 22,7% positive Proben (FDA, 2003). Untersuchungen zu aus Deutschland stammenden Säuglingsnahrungsmitteln wurden unter anderem von MUYTJENS et al. (1988), KRESS et al. (2005), SANJAO (2008) und KURZ (2009) durchgeführt. Die Vorkommenshäufigkeit von *Cronobacter* spp. in Säuglingsfertignahrungsmitteln aus Deutschland lag zwischen 2,97% (SANJAO, 2008) und 50% (MUYTJENS et al., 1988). Allerdings muss berücksichtigt werden, dass bei den Untersuchungen die Probenanzahl stark variierte. MUYTJENS et al. (1988) untersuchten zehn Proben aus Deutschland, von denen fünf (50%) mit *Cronobacter* spp. kontaminiert waren. KRESS et al. (2005) untersuchten 224 Proben, von denen sich 42 (18,8%) als kontaminiert erwiesen. SANJAO (2008) berichtete von einer Kontaminationsrate in Trockenmilchpulver von 2,97%. KURZ (2009) konnte in 21 (13,8%) von 152 untersuchten Proben *Cronobacter* spp. nachweisen.

Die ab 2005 zu verzeichnende Zunahme der Meldungen im europäischen Schnellwarnsystem für Lebens- und Futtermittel (RASFF) über *Cronobacter* spp. kontaminierter Säuglingsnahrung war nach FRIEDEMANN (2008) vor allem auf die Umsetzung der EU-VO Nr. 2073/2005 zurückzuführen. Tabelle 2 zeigt eine Übersicht

gemeldeter Daten von *Cronobacter* spp. kontaminierter Säuglingsnahrung und anderen Lebensmitteln im Zeitraum von 2008 bis 2013 (RASFF).

Die letzte Rückrufaktion von Säuglingsnahrung in Deutschland aufgrund eines *Cronobacter*-Nachweises war im Juli 2012. Die Firma Milupa in Friedrichsdorf rief Säuglingsmilchpulver „Aptamil pre Anfangsnahrung“ zurück, da während einer Routinekontrolle im Herstellerbetrieb eine Kontamination mit *Cronobacter sakazakii* festgestellt wurde (MILUPA NUTRICIA GMBH, 2012). Die derzeit (Juni 2017) aktuellste Rückrufaktion, bezogen auf eine Kontamination mit *Cronobacter* spp., fand im Juni 2016 in der Schweiz statt. Dort wurde eine mikrobiologische Belastung durch *Cronobacter* spp. in Säuglingsanfangsnahrung festgestellt (BLV, 2016).

Tabelle 2: RASFF Meldungen zu *Cronobacter*-Nachweisen in Säuglingsnahrung 2008 bis 2013

Jahr	Produkt	Ursprungs- land	meldender Staat	Schnell- warnungs-Nr.
2008	Kindernahrung	Schweiz	Spanien	2008/0452
2009	Säuglingsnahrung auf Reisbasis	Türkei	Polen	2009/CDE
	Bio-7-Korn-Säuglingsnahrung	Spanien	Spanien	2009/1649
	Säuglingsnahrung mit Reis	Türkei	Polen	2009/BQM
	Säuglingsnahrung mit Reis	Türkei	Polen	2009/BMN
	Reismehl	Spanien	Italien	2009/0605
	Säuglingsanfangsnahrung	Österreich	Slowenien	2009/0335
	Säuglingsnahrung	Polen	Polen	2009/0260
	Säuglingsanfangsnahrung	Frankreich	Frankreich	2009/0199
2010	Säuglingsnahrung auf Reisbasis	Türkei	Polen	AUD/2010
2011	Milchpulver für Folgemilch	Belgien	Belgien	540/2011
2012	Milchpulver	Belgien	Belgien	0222/2012
	Reis-Cerealien	Israel	Zypern	2012/ASW
	Säuglingsnahrung	Niederlande	Niederlande	1739/2012

Die Kontamination von pulverförmiger Säuglingsnahrung kann auf mehreren Wegen erfolgen. Zum einen intrinsisch, z.B. durch die Zugabe von kontaminierten getrockneten Zusatzstoffen (wie Vitaminen oder Mineralien) nach der Pasteurisierung oder aber extrinsisch, d.h. während des Verpackungs- oder Zubereitungsprozesses (MULLANE et al., 2006; FRIEDEMANN, 2008).

Bei der Herstellung von Säuglingsnahrungsmitteln können drei verschiedene Techniken eingesetzt werden: Nassmixprozess, Trockenmixprozess oder eine Kombination aus beiden Verfahren. Beim Nassmixprozess werden zunächst alle Zutaten in flüssiger Form miteinander vermischt und dann wärmebehandelt (pasteurisiert oder sterilisiert).

Anschließend werden die gemischten Zutaten getrocknet (Sprühtrocknung) und schließlich mit filtrierter Luft gekühlt. Beim Trockenmixprozess werden die bereits getrockneten Zutaten miteinander vermischt, ohne dass eine weitere Wärmebehandlung erfolgt. Im Fall des kombinierten Prozesses werden ausgewählte Zutaten mit dem Nassmixprozess hergestellt und weitere Zutaten entweder vor, während oder nach der Sprühtrocknung in das Basispulver gemischt (EFSA, 2004). Hinsichtlich einer bakteriellen Kontamination stellt der Nassmixprozess das sicherste Verfahren dar (EFSA, 2004). Der Eintrag von *Cronobacter* spp. durch nicht wärmebehandelte Zutaten, wie z.B. Stärke, Laktose, Vitamine oder Mineralstoffe ist besonders beim Trockenmixprozess und auch beim kombinierten Herstellungsverfahren möglich (EFSA, 2004; FAO/WHO, 2004; MULLANE et al., 2006). Eine weitere Eintragsmöglichkeit (in Form einer Rekontamination) bietet das Produktionsumfeld, welches als Reservoir für *Cronobacter* spp. dienen kann. Insbesondere Feuchtigkeitsquellen, wie Kondens- und Reinigungswasser oder Luftfilter sind kritisch zu sehen, weil dort eine Vermehrung der eventuell vorhandenen Erreger möglich ist (FAO/WHO, 2006; MULLANE et al., 2008b).

Da pulverförmige Säuglingsnahrung somit im Normalfall kein steriles Produkt darstellt, sind hygienische Maßnahmen bei der Rekonstitution der Säuglingsnahrung und bei der Lagerung der rekonstituierten Säuglingsnahrung essentiell (DRUDY et al., 2006b). Die Weltgesundheitsorganisation (WHO) veröffentlichte einen Leitfaden für die korrekte Zubereitung von kommerzieller Säuglingsnahrung (WHO/FAO, 2007). Die Zubereitung soll mit heißem Wasser > 70 °C erfolgen. Sobald die Nahrung auf Trinktemperatur abgekühlt ist, soll diese innerhalb von zwei Stunden verabreicht werden. Reste in Trinkflaschen sollen nicht wiederverwendet, sondern entsorgt werden. Zubereitete Säuglingsnahrung, die nicht sofort verwendet wird, soll schnell abgekühlt und bei maximal 5 °C im Kühlschrank für maximal 24 h gelagert werden. Der anschließende Aufwärmvorgang darf nicht mehr als 15 Minuten beanspruchen. Während des gesamten Zubereitungsprozesses ist auf eine gute Hygiene (Hände, Gerätschaften, Geschirr) zu achten. Insbesondere Löffel, Mixer oder Flaschenwärmer können eine Infektionsquelle darstellen (NORIEGA et al., 1990; BAR-OZ et al., 2001; BLOCK et al., 2002).

2.1.6 Klinische Bedeutung

Im Jahr 1958 wurden die ersten beiden Fälle von neonataler Meningitis mit Todesfolge, verursacht durch *Cronobacter* spp. (damals noch *Enterobacter cloacae*), beschrieben (URMENYI & FRANKLIN, 1961). Ein weiterer Fall von neonataler Meningitis wurde 1965 in Dänemark dokumentiert, wobei der Säugling nach Antibiotikabehandlung mit mentalen Schädigungen überlebte (JØKER et al., 1965). Seit 1958 wurden weltweit ca. 120 Fälle von *Cronobacter* spp. bedingten Infektionen bei Säuglingen und Kindern im Alter bis zu 3 Jahre dokumentiert (FAO/WHO, 2008). Allerdings muss hierbei berücksichtigt werden, dass besonders im Hinblick auf neonatale Diarrhoen von einer hohen Dunkelziffer auszugehen ist. Zuletzt wurden im Jahr 2011 in den USA vier *Cronobacter* spp. bedingte Infektionen bei Säuglingen dem CDC (Centers for Disease Control and Prevention) gemeldet (CDC, 2011), seitdem sind keine Fälle mehr beschrieben worden. Die jährliche Inzidenz invasiver *Cronobacter* spp.-Infektionen liegt laut Angaben des „U.S. FoodNet survey 2002“ bei 1 pro 100.000 Säuglingen, bei 8,7 pro 100.000 Neugeborenen mit einem geringem (< 2500 g) Geburtsgewicht und bei 1 pro 10.660 Neugeborenen mit sehr geringem (< 1500 g) Geburtsgewicht (FAO/WHO, 2004 und 2006; STOLL et al., 2004).

Cronobacter spp. sind fakultativ pathogene Keime, die prinzipiell in allen Altersgruppen Erkrankungen hervorrufen können (LAI et al., 2001; FAO/WHO, 2004). Das höchste Infektionsrisiko haben jedoch Säuglinge, d.h. Menschen im ersten Lebensjahr. Zu den Hochrisikogruppen zählen Frühgeborene (Geborene vor Vollendung der 37. Schwangerschaftswoche), Neugeborene (Säuglinge bis zu einem Lebensalter von vier Wochen), Säuglinge die jünger als zwei Monate sind, Säuglinge mit einem zu geringen Geburtsgewicht, immunsupprimierte und geschwächte Säuglinge, Säuglinge mit medizinischen Komplikationen, hospitalisierte Säuglinge und Säuglinge HIV-positiver Mütter (EFSA, 2004; FAO/WHO, 2004, 2006, 2008). Die minimale Infektionsdosis ist vermutlich sehr gering und dürfte einer Ausgangskontamination in Säuglingsnahrung von weniger als 3 Kbe/100g entsprechen (FAO/WHO, 2004).

Klinische Bilder bei neonatalen Erkrankungen nach einer Infektion mit *Cronobacter* spp. manifestieren sich besonders in Meningitiden, Septikämien und nekrotisierenden Enterokolitiden. *Cronobacter* spp. bedingte Meningitiden sind oft von einer Sepsis begleitet (MUYTJENS et al., 1983) und mit anderen Komplikationen, wie der Ausbildung von Zysten, Abszessen, Nekrosen, Ventrikulitiden, Ventrikeldilatationen und Hydrocephalus verbunden

(JØKER et al., 1965; MUYTJENS et al., 1983; GALLAGHER & BALL, 1991; BAR-OZ et al., 2001; LAI et al., 2001). Erkrankungen des zentralen Nervensystems gehen oft mit neurologischen Spätschäden einher, sodass Überlebende oft geistige und körperliche Entwicklungsstörungen aufweisen (FAO/WHO, 2006). Die nekrotisierende Enterokolitis ist vor allem durch Darmnekrosen und Emphysembildung charakterisiert (VAN ACKER et al., 2001).

Die Mortalitätsrate von *Cronobacter* spp. bedingten Erkrankungen bei Säuglingen liegt je nach klinischer Manifestation zwischen < 10% und 80%. Die Mortalität hinsichtlich der *Cronobacter* spp. bedingten Meningitis ist sehr hoch, sie liegt zwischen 40% und 80% (NAZAROWEC-WHITE & FARBER, 1997a; IVERSEN & FORSYTHE, 2003). Die Mortalitätsrate der durch *Cronobacter* spp. bedingten Bakteriämie beträgt 8% (FAO/WHO, 2006) und die der nekrotisierenden Enterokolitis liegt zwischen 10% und 55% (IVERSEN & FORSYTHE, 2003).

Wie bereits erwähnt können *Cronobacter* spp. bedingte Erkrankungen auch bei Erwachsenen auftreten. In den meisten Fällen handelt es sich um ältere Menschen (> 60 Jahre), immungeschwächte Menschen oder Menschen mit schweren Grunderkrankungen (LAI et al., 2001). Neben der Bakteriämie und Septikämie (JIMINEZ & GIMENEZ, 1982; HAWKINS et al., 1991; EMERY & WEYMOUTH, 1997; LAI et al., 2001; SEE et al., 2007) wird von Pneumonie (LAI et al., 2001), Vaginitis (ONGRÁDI, 2002), Osteomyelitis (PRIBYL et al., 1985; CORTI et al., 2007) und multiplen Abszessen in der Milz (SEE et al., 2007) berichtet. In einer Studie von GOSNEY et al. (2006) wurden *Cronobacter* spp. in der Mundschleimhaut von Patienten nach Schlaganfällen nachgewiesen. *Cronobacter* spp. bedingte Meningitiden sind bei Erwachsenen bisher nicht beschrieben. Todesfälle sind bei den über 68 Jährigen zu verzeichnen.

2.1.7 Rechtliche Einordnung

Im Jahre 2002 wurde *Cronobacter* spp. von der International Commission for Microbiological Specifications for Foods (ICMSF) als „severe hazard for restricted populations, life threatening or substantial chronic sequelae or long durations“ eingestuft (ICMSF, 2002).

Basierend auf einem Expertentreffen zum Thema „*Enterobacter sakazakii* und andere Mikroorganismen in pulverförmiger Säuglingsanfangsnahrung“ wurden *Cronobacter* spp. im

Hinblick auf das Erkrankungsrisiko von Säuglingen von der FAO/WHO in die „Risikokategorie A“ eingeteilt (FAO/WHO, 2004). Bei Kategorie A besteht ein klarer Beweis der Kausalität. Derzeit zählen die *Enterobacteriaceae Cronobacter* spp. und *Salmonella enterica* zu dieser Kategorie A. Beide rufen Erkrankungen bei Säuglingen (Kinder unter 12 Monaten) und Kleinkindern (Kinder zwischen 1 und 3 Jahren) hervor und sind in pulverförmiger Säuglingsanfangsnahrung nachgewiesen worden (FAO/WHO, 2004 und 2006).

Die Europäische Kommission hat mit Verordnung (EG) Nr. 2073/2005 spezifische Vorschriften zur Untersuchung von Säuglingsnahrungsmitteln erlassen.

Laut der Verordnung (EG) Nr. 2073/2005 der Kommission vom 15. November 2005 über mikrobiologische Kriterien für Lebensmittel, geändert durch die Verordnungen (EG) Nr. 1441/2007 und Nr. 365/2010, sind *Cronobacter* spp. (*E. sakazakii*) als Lebensmittelsicherheitskriterium definiert. Gemäß diesen Vorgaben dürfen *Cronobacter* spp. in 30 x 10 g getrockneter Säuglingsanfangsnahrung und getrockneten diätetischen Lebensmitteln für besondere medizinische Zwecke, die für Säuglinge unter sechs Monaten bestimmt sind, nicht nachweisbar sein.

2.1.8 Nachweis und Identifizierung von *Cronobacter* spp.

2.1.8.1 Kultureller Nachweis von *Cronobacter* spp.

Zum selektiven Nachweis von *Cronobacter* spp., insbesondere in Säuglingsnahrungsmitteln, wurden in den letzten Jahren zahlreiche Methoden entwickelt. Eine Übersicht der verschiedenen Methoden zum kulturellen Nachweis von *Cronobacter* spp. ist in Tabelle 3 zusammengestellt.

Als Normverfahren gilt die analytische Referenzmethode der Verordnung (EG) Nr. 2073/2005 der Kommission vom 15. November 2005 über mikrobiologische Kriterien für Lebensmittel: Technical Specification ISO/TS 22964 – IDF/RM 210:2006 „Milk and milk products – Detection of *Enterobacter sakazakii*“.

Bei diesem Verfahren wird zunächst eine nichtselektive Voranreicherung in gepuffertem Peptonwasser durchgeführt, gefolgt von einer selektiven Anreicherung in mLST-Bouillon

(„modifizierte Laurylsulfat-Trypton-Bouillon mit Vancomycin“) und Ausstrich auf Selektivmedium (ESIA[®]-Agar; „*E. sakazakii*-Isolation-Agar“ der Firma AES Laboratoire). Zur Identifizierung werden präsumtive *Cronobacter* spp.-Kolonien (blau-violette Kolonien) zur Prüfung auf ihre Fähigkeit zur Bildung gelber Pigmente auf CASO-Agar (Caseinpepton-Sojamehlpepton-Agar) ausgestrichen und mittels API[®] 20 E/ID 32 E endgültig identifiziert (ISO/TS 22964, 2006).

Eine Alternative zur ISO/TS 22964-Methode stellt die CSB-Methode dar. Dabei wird die selektive Anreicherung in CSB-Bouillon („*Cronobacter* Screening Broth“) durchgeführt und anstelle des ESIA[®]-Agars eine modifizierte Version des DFI-Agars (mDFI) beimpft (IVERSEN et al., 2008b). Zur Identifizierung werden ebenfalls präsumtive *Cronobacter* spp.-Kolonien auf CASO-Agar ausgestrichen und mittels API[®] 20 E/ID 32 E endgültig identifiziert. Bei der CSB-Bouillon handelt es sich um eine Indikatorbouillon, welche die Säurebildung durch Fermentation von D-Sucrose mit einem Farbumschlag von violett nach gelb anzeigt. In einer Studie von IVERSEN et al. (2008b) zeigte die Verwendung der CSB-Bouillon eine 100% Sensitivität für den Nachweis von allen *Cronobacter*-Spezies.

International wird die sogenannte FDA-Methode („Isolation and enumeration of *Enterobacter sakazakii* from dehydrated powdered infant formula“) der US-amerikanischen Lebens- und Arzneimittelbehörde zur quantitativen Bestimmung von *Cronobacter* spp. in pulverförmiger Säuglingsnahrung häufig eingesetzt (FRIEDEMANN, 2008). Dieser quantitative Nachweis basiert auf dem MPN (most probable number)-Verfahren und erfolgt durch die Einwaage von insgesamt 333 g (3 x 100 g, 3 x 10 g und 3 x 1 g) Nahrungspulver. Nach einer nichtselektiven Anreicherung (Auflösen des Pulvers in Aqua dest.), gefolgt von einer für *Enterobacteriaceae* selektiven Anreicherung in EEB (*Enterobacteriaceae* Enrichment Broth) wird ein für *Enterobacteriaceae* selektives Festnährmedium (VRBG, Violet Red Bile Glucose-Agar) beimpft. Zur Identifizierung werden auch hier präsumtive *Cronobacter* spp. Kolonien auf CASO-Agar ausgestrichen und mittels API[®] 20 E/ID 32 E endgültig identifiziert.

Eine neue Version der FDA-Methode wurde von LAMPEL & CHEN (2009) erarbeitet und ist seit März 2012 Bestandteil der FDA *Bacteriological Analytical Manual*. Diese „neue FDA-Methode“ setzt sich aus einer Anreicherung der Probe im Verhältnis 1:10 in gepuffertem Peptonwasser, Zentrifugation (3000 x g, 10 min) von 4 x 40 ml, Resuspension der Pellets in je 200 µl phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) und einem anschließend kombinierten kulturellen (Ausstrich auf DFI-Agar und R&F[®]-ESPM-ESSM) und molekularbiologischen Verfahren (PCR) zusammen. Zur endgültigen Identifizierung werden

von jedem Chromogen-Agar verdächtige, präsumtive *Cronobacter* spp. Kolonien mittels Real-Time PCR und API[®] ID 32 E oder VITEK 2.0 untersucht (CHEN et al., 2012).

Tabelle 3: Methoden zum kulturellen Nachweis von *Cronobacter* spp. (angelehnt an FAO/WHO, 2006)

Methode/ Charakteristisches Nährmedium	Tag 0 nichtselektive Voranreicherung	Tag 1 selektive Anreicherung	Tag 2 primäre kulturelle Isolierung auf Selektivmedium	Tag 5 endgültige, kulturell-biochemische Identifizierung	Referenz
FDA*	steriles, dest. Wasser	EEB (36°C)	VRBG-Agar (36°C)	Gelbpigmentierung auf CASO-Agar API® 20 E	FDA (2002)
DFI	gepuffertes Peptonwasser	EEB (37°C)	DFI-Agar (37°C)	Gelbpigmentierung auf CASO-Agar API® 20 E	IVERSEN et al. (2004a)
mLST	gepuffertes Peptonwasser	mLST-Bouillon mit Vancomycin (45°C)	CASO-Agar mit Gallsalzen (37°C)	Gelbpigmentierung auf CASO-Agar α-Glucosidase-Aktivität API® 20 E	GUILLAUME- GENTIL et al. (2005)
ISO	gepuffertes Peptonwasser	mLST-Bouillon mit Vancomycin (45°C)	ESIA® (44°C)	Gelbpigmentierung auf CASO-Agar API® 20 E	ISO/TS 22964 (2006)
R&F® ESPM- ESSM (neue FDA-Methode)	steriles, dest. Wasser	EEB (35° - 37°C)	ESPM (35° - 37°C) ESSM (35° - 37°C)	Gelbpigmentierung auf CASO-Agar API® 20 E	RESTAINO et al. (2006)
CSB	gepuffertes Peptonwasser	CSB-Bouillon (42°C)	mDFI-Agar (37°C)	Gelbpigmentierung auf CASO-Agar API® 20 E / ID 32 E	IVERSEN et al., (2008b)

*zusätzlich quantitativer Nachweis von *Enterobacteriaceae* basierend auf dem MPN-Verfahren, MPN = Most Probable Number

FDA = Food and Drug Administration; dest. = destilliertes; EEB = *Enterobacteriaceae* Enrichment Broth; VRBG = Violet Red Bile Glucose Agar;
CASO = Caseinpepton-Sojamehlpepton-Agar; DFI = Druggan-Forsythe-Iversen Agar; mLST = modifizierte Laurylsulfat-Trypton-Bouillon; ISO = International
Organization for Standardization; ESIA® = *E. sakazakii* Isolation Agar; ESPM = *E. sakazakii* Plating Medium; ESSM = *E. sakazakii* Screening Medium;
CSB = *Cronobacter* Screening Broth; mDFI = modifizierter Druggan-Forsythe-Iversen Agar

2.1.8.2 Identifizierung von *Cronobacter* spp. mittels API® 20 E / ID 32 E Testsystemen

API® 20 E und API® ID 32 E sind kommerzielle, standardisierte biochemische Testsysteme zur Identifizierung von *Enterobacteriaceae* und anderen gram-negativen Stäbchen. Sie beruhen auf verschiedenen miniaturisierten, biochemischen Reaktionen und einer Datenbank, die mittels einer Identifizierungssoftware (apiweb™) eine Identifizierung ermöglicht. Mittels API® 20 E werden folgende Reaktionen geprüft: β -Galactosidase, Arginin-Dehydrolyase, Lysin-Decarboxylase, Ornithin-Decarboxylase, Citratverwertung, Schwefelwasserstoff-Bildung, Urease, Tryptophan-Desaminase, Indolbildung, Acetoinbildung (Voges-Proskauer-Reaktion), Gelatinase. Weiterhin wird die Fähigkeit zur Fermentation bzw. Oxidation folgender Zucker geprüft: D-Glukose, D-Mannit, Inosit, D-Sorbit, L-Rhamnose, D-Saccharose, D-Melibiose, Amygdalin, L-Arabinose. Der Oxidase-Test muss separat nach Bebrütung durchgeführt werden und stellt die 21. Identifizierungsreaktion dar. Mittels API® ID 32E können zusätzlich weitere Reaktionen bzw. Enzyme nachgewiesen werden: Lipase, β -Glucosidase, β -Glucuronidase, Malonatverwertung, N-Acetyl- β -Glucosaminidase, α -Glucosidase, α -Galactosidase, α -Maltosidase und L-Aspartat-Arylamidase sowie die Fermentation folgender Zucker: L-Arabit, Galacturonsäure, 5-Ketogluconat, Mannitol, Maltose, Adonitol, Palatinose, D-Arabit, Trehalose und D-Cellobiose.

Das Ablesen der Testsysteme erfolgt visuell, wobei das entsprechende Ergebnis als numerisches Profil codiert wird, welches anschließend in der Identifizierungssoftware (apiweb™) eingegeben werden kann.

In einer Studie von IVERSEN et al. (2007b) zeigte das API® ID 32E eine zuverlässigere Identifizierung von *Cronobacter* spp. als das API® 20E System. Mittels API® ID 32E konnten 99,5% der untersuchten Isolate eindeutig identifiziert werden während das API® 20E System nur 70% als sicher identifizierte (IVERSEN et al., 2007b). In einer Vergleichsarbeit von ZHU et al. (2011) wurde die Zuverlässigkeit der Identifizierung von *Cronobacter* spp. auf Genusebene mittels API® ID 32E ebenfalls als gut erachtet. Eine Identifizierung auf Speziesebene ist aufgrund fehlender spezifischer Reaktionen und Einschränkungen in der Datenbank nur begrenzt möglich (ZHU et al., 2011).

2.1.8.3 Identifizierung und Differenzierung mittels MALDI-TOF MS

Die Matrix-unterstützte Laserdesorptions-Ionisations-Flugzeit-Massenspektrometrie (MALDI-TOF MS = **M**atrix **A**ssisted **L**aser **D**esorption **I**onisation-**T**ime **O**f **F**light **M**ass **S**pectrometry) stellt eine neue Technologie in der Proteinanalytik und Identifizierung von Bakterien dar. Sie basiert auf einem massenspektrometrischen Fingerabdruck (Fingerprint), wobei bestimmte Bestandteile dieser Fingerprints charakteristisch für eine Gattung, Spezies oder Subspezies sind (PAVLOVIC et al., 2011).

Das grundlegende Prinzip dieser Methode ist die Ionisation eines neutralen Moleküls, Trennung nach Moleküladungsgröße und die nachfolgende exakte Bestimmung der Molekülmasse der so gebildeten primären Ionen und deren Zerfallsprodukte im Hochvakuum (PAVLOVIC et al., 2011). Für die Durchführung der MALDI-TOF MS Analyse wird Koloniematerial auf einer Metallplatte (Target) aufgetragen und nach dem Eintrocknen mit einer sogenannten „Matrixlösung“ überschichtet. Die Art der Matrix hängt dabei vom zu analysierenden Molekültyp ab. Für Proteine werden entweder 3-Cyano-4-Hydroxy-Zimtsäure (HCCA) oder Sinapinsäure verwendet. Dabei nutzt die MALDI-TOF MS die Eigenschaft dieser organischen Verbindungen, nach Anregung durch den Laser schonend in die Gasphase überzugehen und zu ionisieren. Nach der Einschleusung des auskristallisierten Proben-Matrixgemischs wird im MALDI-TOF Massenspektrometer ein Hochvakuum erzeugt und die Matrixlösung mit den eingelagerten Analytmolekülen unter Laserbeschuss explosionsartig verdampft. Dabei werden die zu untersuchenden Analytmoleküle freigesetzt und ionisiert. Die entstandenen Ionen werden in einem starken elektrischen Feld beschleunigt und durch ein Flugrohr geleitet, in dem in Abhängigkeit von der Masse und Ionisierungsgrad des Analytmoleküls unterschiedliche Geschwindigkeiten gemessen werden können. Durch die Messung der Flugzeit (time-of-flight) der Analytmoleküle können die Molekularmassen exakt bestimmt und ein Massenspektrum erstellt werden. Diese Daten können mit hinterlegten Referenzspektren einer Datenbank abgeglichen und zugeordnet werden (PAVLOVIC et al., 2011).

Mittels MALDI-TOF MS können *Cronobacter* spp. sowohl auf Genus- als auch Speziesebene sicher, zuverlässig und schnell identifiziert werden (STEPHAN et al., 2010; LEHNER et al., 2011). In einer Vergleichsarbeit von ZHU et al. (2011) wird MALDI-TOF

MS im Hinblick auf die Identifizierung von *Cronobacter* spp. zu nahverwandten *Enterobacteriaceae* ebenfalls als eine schnelle und eindeutige Methode beschrieben.

Eine Studie zur Differenzierung von *Cronobacter* spp. auf Biotyp-Ebene mittels MALDI-TOF MS wurde von KARAMONOVÁ et al. (2013) veröffentlicht. Diese Autoren untersuchten in einer Studie 300 individuelle Spektren von 19 *C. sakazakii*-Stämmen und etablierten eine Referenzdatenbank für acht *C. sakazakii*-Biotypen.

2.1.8.4 Biotypisierung und biochemische Eigenschaften

Die biochemischen Eigenschaften eines Mikroorganismus können zur Speziesdifferenzierung herangezogen werden. FARMER et al. (1980) unterteilten erstmals 57 *Cronobacter*-Stämme (damals *E. sakazakii*) in insgesamt 15 verschiedene Biotypen. Dabei entsprachen 24% der untersuchten Stämme dem Biotyp 1, dem heutigen Referenzstamm *C. sakazakii* ATCC 29544 (FARMER et al., 1980). In weiteren Untersuchungen von NAZAROWEC-WHITE & FARBER (1999) konnten 18 *Cronobacter*-Isolate drei Biotypen zugeordnet werden, wobei neun Isolate (50%) Biotyp 1, sechs Isolate (33%) Biotyp 2 und drei Isolate (17%) Biotyp 3 entsprachen. IVERSEN et al. (2006) untersuchten in einer Studie die biochemischen Profile von 189 *Cronobacter*-Stämmen und verglichen diese mit den Biotypen nach FARMER et al. (1980). Dabei konnte die Mehrzahl der Isolate (153/189) den 15 Biotypen zugeordnet werden. Für 36 Isolate war jedoch aufgrund einzelner biochemischer Reaktionen keine eindeutige Zuordnung zu einem der 15 Biotypen möglich. Daraufhin wurden, zusätzlich zu den 15 Biotypen nach FARMER et al. (1980), elf Subtypen sowie ein weiterer Biotyp (Biotyp 16) mit drei Subtypen eingeführt (IVERSEN et al. 2006). Die Biotypisierung und Einteilung von *Cronobacter* spp. in verschiedene Biotypen basiert auf folgenden biochemischen Reaktionen:

- Acetoinbildung (Voges-Proskauer-Test)
- Methylrot-Test
- Nitrat-Reduktion
- Ornithinverwertung (Ornithin-Decarboxylase)
- Beweglichkeitsprüfung (Motilität)
- Säurebildung über Dulcitol und myo-Inositol
- Indolbildung
- Malonatverwertung
- Gasbildung aus D-Glukose

Die charakteristischen biochemischen Eigenschaften zur Differenzierung der verschiedenen Spezies sind in Tabelle 4 zusammengestellt.

Tabelle 4: Biotypisierung von *Cronobacter* spp. (Zusammengestellt nach FARMER et al., 1980; IVERSEN et al., 2006, 2008a; STEPHAN et al., 2007, 2008; JOSEPH et al., 2012a) unter Berücksichtigung der derzeit (Juni 2017) gültigen Taxonomie

Spezies	Biotyp	Charakteristische Eigenschaften										16S rDNA	
		VP	MR	NO ₃	ODC	Mot	Ino	Dul	Ind	Mal	Gas	cluster	
<i>C. sakazakii</i>	1	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	1
	2 / 2a	+	-	+	+	+/-	-	-	-	-	+	+	1
	3	+	-	+	+	-	+	-	-	-	+	+	1
	4 / 4a	+	-	+	-	+/-	+	-	-	-	+	+	1
	7	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	1
	8 / 8a	+	-	-	+	+	+/-	-	-	-	+	+	1
	8b / 8c	+	-	-	+	+	+/-	-	-	+	+	+	1
	11	+	-	+	+	+	-	+	-	-	+	+	1
	13 / 13a	-	+	+	+	+/-	+	-	-	-	+	+	1
	13b / 13c	-	+/-	+	-/+	+	+	-	-	-	+	+	1
<i>C. malonaticus</i>	5 / 5a	+	-	+	+	+/-	+	-	-	+	+	1	
	9 / 9a	+/-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	1	
<i>C. turicensis</i>	14 / 14a	+	-	+	-	+	-	-	-	+/-	+	1	
	16 / 16a	+	-	+	+	+/-	+	+	-	+	+	2	
	16b / 16c	+	-	+	+/-	+/-	+	+	-	-/+	+	2	

Fortsetzung Tabelle 4:

Spezies	Biotyp	Biochemische Reaktionen										16S rDNA cluster	
		VP	MR	NO ₃	ODC	Mot	Ino	Dul	Ind	Mal	Gas		
<i>C. myfjensis</i>	15	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	3
<i>C. dublinensis</i> subsp. <i>dublinensis</i>	12	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	4
<i>C. dublinensis</i> subsp. <i>lausannensis</i>	10	+	-	+	+	+	-	-	+	-	+	+	4
<i>C. dublinensis</i> subsp. <i>lactaridi</i>	6	+	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	4
<i>C. condimenti</i>	k. A.	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+	-	k. A.
<i>C. universalis</i>	k. A.	+	k. A.	+	+	v	+	+	-	+	+	v	k. A.

VP = Voges-Proskauer Acetoinproduktion; MR = Methylrot-Test; NO₃ = Nitratreduktion; ODC = Ornithinverwertung; Mot = Motilität bei 37 °C; Ino = Säureproduktion aus myo-Inositol; Dul = Säureproduktion aus Dulcitol; Ind = Indolproduktion; Mal = Malonatverwertung; Gas = Gasproduktion aus Glukose; k. A. = keine Angabe; + = positiv; - = negativ; v = variabel

2.1.8.5 PCR-Nachweis von *Cronobacter* spp.

2.1.8.5.1 Identifizierung von *Cronobacter* spp. auf Genusebene

Zum molekularbiologischen Nachweis bzw. zur Identifizierung von *Cronobacter* spp. auf Genusebene können verschiedene konventionelle PCR-Verfahren und Real-Time (RT)-PCR-Verfahren eingesetzt werden. Eine Übersicht der verschiedenen Verfahren ist in Tabelle 5 zusammengestellt. Die auf dem 1,6- α -Glucosidase (*gluA*)-Gen basierte konventionelle PCR und die auf dem *dnaG*-Gen basierte RT-PCR stellen nach Literaturangaben mit jeweils 100% Sensitivität und Spezifität die zuverlässigsten Systeme dar (IVERSEN et al., 2007b).

Tabelle 5: PCR-Verfahren zum Nachweis von *Cronobacter* spp.

PCR Verfahren	Zielgen	Referenz
konventionell	16S rRNA	LEHNER et al., 2004 HASSAN et al., 2007
	<i>ompA</i>	MOHAN NAIR & VENKITANARAYANAN, 2006
	<i>gluA</i>	LEHNER et al., 2006
	<i>zpx</i>	KOTHARY et al., 2007
	<i>wzx</i>	JARVIS et al., 2011
Real-Time	<i>dnaG</i>	SEO & BRACKETT, 2005
	Region zwischen tRNA-Glu und 23S rRNA	DERZELLE & DILASSER, 2006
	16S-23S rRNA IST-Region	LIU et al., 2006
	16S rRNA	KANG et al., 2007
	MMS Operon	HYEON et al., 2010

rRNA = ribosomale Ribonukleinsäure; *ompA* = outer membrane protein A; *gluA* = α -Glucosidase Gen; *zpx* = Zink-Metalloprotease Gen; *wzx* = O-Antigen Flippase Gen; *dnaG* = Primase Gen; tRNA = transfer Ribonukleinsäure; IST = internal transcribed spacer sequence; MMS = macromolecular synthesis operon

2.1.8.5.2 Differenzierung von *Cronobacter* spp. auf Speziesebene

Zur Differenzierung der sieben *Cronobacter*-Spezies (*C. sakazakii*, *C. malonaticus*, *C. turicensis*, *C. mytjensii*, *C. dublinensis*, *C. universalis* und *C. condimentii*) wurde ein auf der Beta-Untereinheit des RNA-Polymerase kodierenden Gens (*rpoB*-Gen) basiertes PCR-Verfahren entwickelt (STOOP et al., 2009; LEHNER et al., 2012). Hierbei wurden folgende Primerpaare verwendet: Csakf/Csacr, Cmalf/Cmalr, Cturf/Cturr, Cmuyf/Cmuyr, Cdubl/Cdubl, Cgenomf/Cgenomr und Cconf/Cconr. Da die *rpoB*-Gensequenzen für die Spezies *C. sakazakii* und *C. malonaticus* sehr ähnlich sind, ist ein zwei-Stufen Verfahren für die eindeutige Differenzierung zwischen diesen beiden Spezies nötig (STOOP et al., 2009). Eine weitere PCR-Methode wurde von STRYDOM et al. (2011) entwickelt. Dabei handelt es sich um eine PCR-RFLP-Analyse, basierend auf dem *rpoB*-Gen, in Kombination mit den Restriktionsendonukleasen *Csp6I* und *HinPII* (STRYDOM et al., 2011).

Eine von CARTER et al. (2013) entwickelte Spezies-spezifische Multiplex-PCR, basierend auf dem *cgca*-Gen (diguanylate cyclase-encoding gene) zeigte nach Angaben dieser Autoren bei 305 getesteten *Cronobacter*-Isolaten eine 100%ige Spezifität und 100%ige Sensitivität. Diese Multiplex-PCR identifiziert in nur einem Untersuchungsgang sechs *Cronobacter*-Spezies (*C. sakazakii*, *C. malonaticus*, *C. turicensis*, *C. mytjensii*, *C. dublinensis* und *C. universalis*) und stellt für die Differenzierung von *Cronobacter*-Isolaten eine schnelle und sichere Methode dar (CARTER et al., 2013).

2.1.8.5.3 Kommerzielle PCR-Methoden

Für *Cronobacter* spp. sind derzeit sechs kommerzielle Real-Time PCR-Systeme erhältlich:

- BAX[®] System PCR Assay *E. sakazakii* (DuPont Qualicon, Wilmington, USA)
- Assurance GDS[™] *E. sakazakii* (BioControl, Bellvue, USA)
- foodproof[®] *E. sakazakii* Detection Kit (Biotecon Diagnostics, Potsdam, Deutschland)
- VIT[®] *E. sakazakii* (vermicon identification technology, München, Deutschland)
- TaqMan[®] *E. sakazakii* Detection Kit (Applied BioSystems, USA)
- Mericon *Cronobacter* spp. Kit (QIAGEN AG, Hombrechtikon, Schweiz)

Die kommerziellen PCR Systeme BAX[®] System PCR Assay *E. sakazakii*, Assurance GDS[™] *E. sakazakii* und foodproof[®] *E. sakazakii* Detection Kit wurden in einer Veröffentlichung von FRICKER-FEER et al. (2011) untereinander verglichen. Dabei wurden bei zwei der getesteten RT-PCR Systeme (Assurance GDS[™] *E. sakazakii* und foodproof[®] *E. sakazakii* Detection Kit) eine 100%ige Spezifität sowohl für Reinkulturen als auch in mit *Cronobacter* spp. kontaminierten Proben pulverförmiger Säuglingsanfangsnahrung beobachtet.

2.1.8.6 Genotypisierungsmethoden

2.1.8.6.1 Sequenzanalyse

Der Vergleich von rRNA-Sequenzen ist eine Methode zur Analyse phylogenetischer und evolutionärer Verhältnisse zwischen verschiedenen Mikroorganismen (WEISBURG et al., 1991).

In einer Studie von IVERSEN et al. (2004d) konnten verschiedene *Cronobacter*-Stämme aufgrund des 16S rRNA- und hsp60-Gens in vier taxonomisch heterogene Cluster eingeteilt werden. Dabei werden die Spezies *C. sakazakii* und *C. malonaticus* in einem Cluster zusammengefasst. Mehrere Untersuchungen zeigten, dass eine Differenzierung

zwischen den Spezies *C. sakazakii* und *C. malonaticus* basierend auf dem 16S rRNA-Gen allein nicht möglich ist (IVERSEN et al., 2007a; TURCOVSKÝ et al., 2011; STRYDOM et al., 2012). Weitere biochemische Reaktionen, wie die Malonatverwertung, müssen für eine eindeutige Identifizierung herangezogen werden (STRYDOM et al., 2012). Andere Gene, wie das *rpoB*-Gen, stellen eine Alternative zur Identifizierung und Differenzierung von *Cronobacter* spp. dar (STOOP et al., 2009, LI et al., 2012). Die Sequenzierung des *rpoB*-Gens wurde bereits 1997 als Methode zur Differenzierung von genetisch eng verwandten Spezies beschrieben (MOLLET et al., 1997). Basierend auf diesem Gen entwickelten STOOP et al. (2009) eine Spezies-spezifische PCR und STRYDOM et al. (2011) eine PCR-RFLP-Analyse (siehe **2.1.8.5.2**).

Die Sequenzanalyse des *rpoA*-Gens (Alpha-Untereinheit des RNA-Polymerase kodierenden Gens) zeigte jedoch wie für das 16S rRNA-Gen eine sehr enge genetische Verwandtschaft zwischen den Spezies *C. sakazakii* und *C. malonaticus*, eine eindeutige Unterscheidung zwischen diesen beiden Spezies war daher nicht möglich (STRYDOM et al., 2012). Auch die Sequenzierung des *recN*-Gens (DNA-Reparatur- und Rekombinationsgen/DNA-repair and recombination gene) wurde in einigen Studien zur Differenzierung von *Cronobacter* spp. erfolgreich genutzt (KUHNERT et al., 2009; EL-SHAROUD et al., 2009).

2.1.8.6.2 Multilokus-Sequenztypisierung (MLST)

Die MLST ist eine PCR-basierte Methode, die im Jahr 1998 von MAIDEN et al. (1998) für die Untersuchung von *Neisseria meningitidis* entwickelt wurde. Für die MLST-Analyse werden einzelne Nukleotidsequenzen (Größe ca. 500 Basenpaare) von einer begrenzten Anzahl sogenannter Haushaltsgene (Housekeeping-Gene), die für den Organismus essentiell und selektionsneutral sind, untersucht und miteinander verglichen. Zunächst wird die bakterielle DNA extrahiert und im Anschluss werden die entsprechenden Gene mittels ihrer spezifischen Primer amplifiziert. Die amplifizierten Fragmente der Gene werden sequenziert und können im Fall von *Cronobacter* spp. mittels einer Datenbank (<http://pubmlst.org/cronobacter/>) mit bereits vorhandenen Sequenzen verglichen bzw. neue Sequenzen können hinzugefügt werden.

Bei der Auswertung der MLST wird jeder einzelnen Sequenz eines Gens eine willkürliche Allelnummer zugeordnet. Die Zahlenkombination der Housekeeping-Gene ergibt ein Allelprofil, welches einem numerischen Sequenztyp zugeordnet wird. Isolate, die entweder den gleichen Sequenztyp haben oder sich in der Sequenz eines Gens unterscheiden („Single variants“), werden zu einem Klon gerechnet. Sequenztypen, die mindestens vier gemeinsame Allelnummern („Loci“) teilen, werden zu einem klonalen Komplex („Clonal complex“) zusammengefasst.

Besonders im Hinblick auf die Differenzierungsprobleme der nahe verwandten Spezies *C. sakazakii* und *C. malonaticus* entwickelten BALDWIN et al. (2009) ein MLST-Schema zur sicheren Identifizierung und Differenzierung dieser beiden Spezies. Die *Cronobacter*-MLST basiert auf sieben Housekeeping-Genen mit einer Länge von insgesamt 3036 Basenpaaren (Bp). Eine Übersicht der hierzu verwendeten Gene ist in Tabelle 6 zusammengestellt.

Tabelle 6: Übersicht über die in der *Cronobacter*-MLST verwendeten Housekeeping-Gene (BALDWIN et al., 2009)

Gen	Bezeichnung/Funktion des Genprodukts	Größe in Bp
<i>atpD</i>	ATP synthase beta chain	1.382
<i>fusA</i>	Elongation factor	2.114
<i>glnS</i>	Glutaminyl-tRNA synthetase	1.667
<i>gltB</i>	Glutamate synthase large subunit	4.208
<i>gyrB</i>	DNA gyrase B	2.414
<i>infB</i>	Translation initiation factor IF-2	2.711
<i>pps</i>	Phosphoenol-pyruvate synthase	2.378

Bp = Basenpaare

In einer Studie von JOSEPH et al. (2012b) zur Diversität von *Cronobacter* spp. wurden insgesamt 325 *Cronobacter*-Isolate auf ihre phylogentische Verwandtschaft mittels MLST untersucht. Dabei konnte die Existenz von sieben Spezies (*C. sakazakii*, *C. malonaticus*, *C. turicensis*, *C. mytjensii*, *C. dublinensis*, *C. universalis* und *C. condimenti*) nachgewiesen werden. Die MLST stellt eine effektive und robuste Typisierungsmethode dar (JOSEPH et al., 2012b) und wurde bereits in einigen Studien zur Differenzierung herangezogen (HAMBY et al., 2011; JOSEPH & FORSYTHE, 2011; KUCEROVA et al., 2011; JOSEPH et al., 2012a, 2012b; HARIRI et al., 2013).

Durch den objektiven Vergleich festgelegter Gene, die sehr hohe Reproduzierbarkeit (URWIN & MAIDEN, 2003) und die Möglichkeit des Vergleichs von Sequenzen über eine öffentlich zugängliche Datenbank wird die Durchführung epidemiologischer Studien und ein Stammvergleich auf internationaler Ebene ermöglicht (JOSEPH et al., 2012b; JOSEPH & FORSYTHE, 2012). Derzeit (Juni 2017) sind 53534 Sequenzen von 1950 *Cronobacter*-Isolaten in der Datenbank hinterlegt (Stand: 29.06.2017).

2.1.8.6.3 Pulsfeld-Gelelektrophorese (PFGE)

Die Pulsfeld-Gelelektrophorese wird als Standard zur Typisierung von *Cronobacter* spp. angesehen und spielt für epidemiologische Fragestellungen sowie in Bezug auf die Ermittlung von Infektionsquellen und Übertragungswegen eine entscheidende Rolle. In mehreren Studien wurde sie bereits für eine epidemiologische Aufklärung auf Betriebsebene von Eintrags- bzw. Kontaminationsquellen und Übertragungswegen eingesetzt (MULLANE et al., 2007; MULLANE et al., 2008b; IVERSEN et al., 2009; MILED-BENNOUR et al., 2010). Zudem dient sie der klonalen Verwandtschaftsanalyse und lässt sich auf beliebige *Cronobacter* spp. Stämme anwenden (LEHNER et al., 2013). Dabei wird das Genom mittels Restriktionsenzymen in unterschiedlich große DNA-Fragmente (größer als 15 bis 20 Kb) geschnitten und anschließend gelelektrophoretisch aufgetrennt. Durch periodisch wechselnde Richtung des elektrischen Trennfeldes wird gewährleistet, dass sich die verschiedenen großen DNA-Fragmente unterschiedlich im Gel auftrennen (LEHNER et al., 2011). Die dabei entstandenen Restriktionsmuster werden in PFGE-Typen eingeteilt und können mithilfe einer

Computer-Software ausgewertet werden. Zur Veranschaulichung der genetischen Ähnlichkeit der Isolate wird eine Dendrogrammanalyse angefertigt. Ein gemäß PulseNet standardisiertes Protokoll für die PFGE-Genotypisierung von *Cronobacter* spp. wurde von einer internationalen Forschergruppe entwickelt und validiert. Die Daten sind in Tabelle 7 zusammengestellt.

Tabelle 7: PFGE-Protokoll für die Genotypisierung von *Cronobacter*-Isolaten (BRENGI et al., 2012)

Elektrophorese Bedingungen (IST-FST)	1,8 bis 25 sec
Spannung	200 V (6 V/cm)
Laufzeit	17 – 18 Stunden
1. Restriktionsenzym	<i>Xba</i> I
2. Restriktionsenzym	<i>Spe</i> I
Vorbereitung der Blöckchen	Gemäß standardisierten PulseNet Protokoll für <i>Escherichia coli</i> O157:H7, <i>Salmonella</i> , und <i>Shigella</i>
	Optische Dichte der Bakteriensuspension: 1.0

IST = Initial switch time; FST = Final switch time; sec = Sekunden; V = Volt

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 Materialien

3.1.1 Probenmaterial

Im Rahmen dieser Arbeit wurden insgesamt 259 *Cronobacter*-Isolate unterschiedlicher Herkunft untersucht. Diese Isolate stammten aus der Stammsammlung des Instituts für Tierärztliche Nahrungsmittelkunde, Professur für Milchwissenschaften der Justus-Liebig-Universität Gießen. Sie wurden in den Jahren von 2003 bis 2010 aus unterschiedlichen Lebensmitteln und dem Produktionsumfeld von Säuglingsnahrung herstellenden Betrieben isoliert und in einem Kryokonservierungssystem (Cryobank™, Mast Diagnostica) aufbewahrt. Eine Übersicht der verwendeten *Cronobacter*-Isolate ist in Tabelle 8 zusammengestellt.

Alle Isolate waren in diesem Zeitraum sowohl kulturell (α -Glucosidase-Aktivität auf Selektivnährboden, Gelbpigmentbildung auf CASO-Agar) als auch mit kommerziellen biochemischen Testsystemen (API® 20 E, API® ID 32 E und Enterotube II-System) und molekularbiologisch mittels Genus-spezifischer PCR, einer an der Professur erarbeiteten PCR-Methode auf Basis des 16S rRNA-Gens (HASSAN et al., 2007), untersucht und auf Genusebene als *Cronobacter* spp. identifiziert worden.

Tabelle 8: Übersicht der Herkunft der verwendeten *Cronobacter*-Isolate

Herkunft	Probenanzahl n, aus der die Isolate gewonnen wurden	Anzahl der für diese Arbeit verwendeten Isolate
Säuglingsnahrungsmittel aus Deutschland	69	143
Säuglingsnahrungsmittel aus Indonesien	26	70
Trockenteigwaren	14	14
Fertigsalat	10	10
Sonstige Milchtrockenerzeugnisse (Diätetische Lebensmittel)	3	8
Müsli	1	1
Wasser	1	1
Stärkeisolate	2	2
Produktionsumfeld von Säuglingsnahrung herstellenden Betrieben	6	6
k. A.	4	4
Σ	136	259

k. A. = keine Angaben

3.1.2 Chemikalien, Nährmedien und Reagenzien

Acetonitril	Merck, 1.14291.2500
Ameisensäure, 89-91%	Merck, 1.00253.1000
API [®] 20 E	bioMérieux, Marcy l'Etoile, Frankreich, 20100
API [®] ID 32 E	bioMérieux, 32400
API [®] NaCl 0,85% Medium, 3 ml	bioMérieux, 20040
Aqua destillata steril, nukleasefrei	Qiagen, Venlo, Niederlande, 129117
Biozym LE Agarose	Biozym Scientific, Hessisch Oldendorf, Deutschland, 840004
Borat (Borsäure)	VWR, 1.00160.1000
Brij [®] 35	VWR, 8.01962.0250
<i>Brilliance[™] Enterobacter sakazakii Agar</i> (DFI-Formulierung)	Oxoid, CM 1055
Buraton [®] rapid	Schülke & Mayr GmbH, Norderstedt, Deutschland
Caseinpepton-Sojamehlpepton-Agar USP (CASO-Agar)	Merck, 1.05458.0500
Caseinpepton-Sojamehlpepton-Bouillon (CASO-Bouillon)	Merck, 1.05459.0500
Creatin (Monohydrat)	Merck, 8.41470.0050
D (+) Glucose-Monohydrat	Merck, 1.08342.1000
dNTP-Set (Desoxyribonukleosidtriphosphat)	Fermentas Life Science, St. Leon-Roth, Deutschland, R0181
DreamTaq DNA Polymerase (5 U/μl) 10x DreamTaq Puffer mit 20 mM MgCl ₂	Thermo Scientific, Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland, EP0703
Dulcitol, 97%	Alfa Aesar [®] GmbH & Co KG, Karlsruhe, Deutschland, A18402
EDTA (Titriplex II)	VWR, 1.08417.0250
EDTA (Titriplex III)	VWR, 1.08418.0250
Eisessig (Essigsäure 100%)	Merck, 1.00056.2500

Ethanol absolute	Merck, 8.18760.2500
Ethidiumbromid	Merck, 1.11608.0030
Glycerin, 99.5%	VWR, 24388.295
Isopropanol (2-Propanol)	Merck, 1.13350.2500
James Reagenz	bioMérieux, 70542
Kaliumhydroxidplättchen	Merck, 1.0533.0500
KÓVACS Indolreagenz	VWR, 1.09293.0100
Lambda ladder PFG marker	New England Biolabs® GmbH, N0340S
Loading Dye Solution (6x DNA Loading Dye)	Thermo Scientific R0611
L-Ornithinmonohydrochlorid	Merck, 1.06906.0025
Low range ladder PFG marker	New England Biolabs® GmbH, N0350S
LowMelt Agarose, 1,5%	Carl Roth GmbH + Co. KG, 6351.2
Lysozyme	Merck, 1.05281.0010
Lysozyme BioChemica	AppliChem, Darmstadt, Deutschland A.3711.0010
Malonat-Phenylalanin-Bouillon	Sifin, Berlin, Deutschland, REF TN 1159
Marker GeneRuler® 50 bp DNA Ladder	Thermo Scientific, SM0371
Methylrot	Merck, 1.06076.0025
Molecular Biology Certified Agarose	IBI Scientific, Peosta IA, USA, IB 70062
MR-VP-Bouillon (Methylrot-Voges-Proskauer-Bouillon)	Merck, 1.05712.0500
myo-Inositol BioChemica BC	AppliChem, A1716,0050
Natriumchlorid	VWR, 1.06404.1000
Natrium-Desoxycholat	VWR, 1.06504.0250
Natriumhydroxid-Plättchen	VWR, 1.06498.1000
Natronlauge-Maßlösung (2N)	VWR, SAFF71474-1L
Nitratbouillon	Acila Dr. Weidner GmbH, Weiterstadt, Deutschland, ADB 0320
Nit 1 + Nit 2 Kit	bioMérieux, 70442
N-Lauroylsarcosine sodium salt	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA, L 5777-50G
Paraffinöl	bioMérieux, 70100

Phenolrot-Bouillon (Basis)	Merck, 1.10987.0500
PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid 100 mM)	Sigma Aldrich, P-7626
Proteinase K (20 mg/ml)	Thermo Scientific, EO 0492
Qiagen DNeasy [®] Blood & Tissue Kit (250)	Qiagen, 69506
Qiagen QIAquick [®] Gel Extraction Kit	Qiagen, 28704
Qiagen QIAquick [®] PCR Purification Kit	Qiagen, 28104
SIM-Nährboden	Merck, 1.5470.0500
Tango Puffer mit BSA	Thermo Scientific, BY5
TDA-Reagenz (Tryptophan-Deaminase)	bioMérieux, 70402
Thiourea	VWR, 28615.231
TRIS (Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan)	Roth, 5429.3
Triton [®] x-100, Sigma Ultra	Sigma Aldrich, T 9284-1L
VP 1 + VP 2 Kit	bioMérieux, 70422
<i>Xba</i> I	Thermo Scientific, ER 0681

3.1.3 Laborgeräte und Verbrauchsmaterialien

Alufolie, alupro [®]	VWR, 293-4187
Autoclav Ster Vis	Holzner, Heidelberg, Deutschland
Brutschränke Heraeus Function line	Heraeus, Kendro Laboratory Products, Hanau, Deutschland
Bunsenbrenner, gasprofi 1SCS	WLD Tec, Göttingen, Deutschland, 6.001.000
CHEF-DR [®] II Control Module	BioRad Laboratories GmbH, München, Deutschland
CHEF-DR [®] II Cooling Module	BioRad
CHEF-DR [®] II Drive Module	BioRad
CHEF-DR [®] II Variable Speed Pump	BioRad
Cryobank [™] - Röhrenchen	Mast Diagnostica, Mast Group Ltd., Merseyside, UK
Cryobank [™] -Aufbewahrungsbox	Mast Diagnostica

Cryovial® (4 ml)	Simport, Kanada, T311-4
Dampftopf	Gössner Fritz GmbH & Co. KG, Hamburg, Deutschland
DNA UV-Cleaner, UVC/T	Kisker Biotech, Steinfurt, Deutschland
Durham-Röhrchen	VWR, GERB8130
Einkanalpipetten, Modell Reference 10 µl	Eppendorf
Einkanalpipetten, Modell Reference, 1000 µl	Eppendorf
Einkanalpipetten, Modell Reference, 100 µl	Eppendorf
Einkanalpipetten, Modell Reference, 200 µl	Eppendorf
Einmalküvetten	Sarstedt AG & Co. Nümbrecht, Deutschland, 67.741
Einmalösen steril, 10 µl	Bioster, 18100.2
Einmaltücher, Tork®	VWR, 115-1723
Elektrophoresekammer, Electrophoresis Cell	BioRad
Entsorgungsbeutel	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Erlenmeyerkolben, 250 ml	VWR, 214-1172
Gefahrstoffschrank	Düperthal, FWF 90
Gefrierschrank	Liebherr
Gefrierschrank, Bosch economic froster	Robert Bosch GmbH, Stuttgart, Deutschland
Gefriertruhe, Hera freeze 286 Basic	Heraeus
Geldokumentationssystem, Gel-Doc 2000	BioRad
Gelelektrophorese Power Pac 1000	BioRad
Gelkamm	BioRad
Gelkammer Sub-Cell® GT	BioRad
Gießblock (PFGE)	BioRad
Glasflaschen, 1000 ml	Schott, Duran Group GmbH, Wertheim/Main, Deutschland
Handschuhe, Latex	VWR, 112-2751
Kühlschrank	Liebherr Economy

Magnetrührer Heidolph mit Heizung, MR 3001	VWR, 442-1203
Magnetrührstäbchen	VWR, 442-0059
Mediaclav 10 Mediajet	Integra Biosciences, Fernwald, Deutschland
Messpipetten, 10 ml	VWR, 612-4125
Mikrowelle, Continent MW 800	Continent, Deutschland, CW 1109-3
Nitrilhandschuhe, Thin nitrile technology, Powder-free	Ansell Healthcare Europe
Parafilm "M"	Pechiney Plastic Packaging, Menasha, WI, USA
Pasteurpipette, Glas	VWR, 612-1701
PCR-Reaktionsgefäße, 0,2 ml	Nerbe plus GmbH, Winsen/Luhe, Deutschland
Petrischalen	Nerbe plus GmbH
pH Meter, Microprocessor, pH 537	WTW-Inolab®
Pipettenspitzen Biosphere	Sarstedt, 70.762.211
Fil. Tip 1000 blau	
Pipettenspitzen Biosphere	Sarstedt, 70.760.211
Fil. Tip 200 farblos	
Pipettenspitzen Biosphere	Sarstedt, 70.760.212
Fil. Tip 100 gelb	
Pipettenspitzen Biosphere	Sarstedt, 70.1130.210
Fil. Tip 10 farblos	
Pipettierhelfer, Accu-jet® pro, Brand	VWR, 612-2625
Plastikzentrifugenröhrchen, Röhre 50 ml	Sarstedt, 62.547.254
Reagenzgläser, 10 ml	VWR, 212-1118
Reaktionsgefäße, Safe Seal	Sarstedt, 72.695.500
Rotilabo®-Verschlussclips	Carl Roth, N217.1
Schüttler, Köttermann® 4010	Köttermann Systemlabor
Sony Video Graphic Printer, UP-895 CE	Sony, Tokyo, Japan
Thermocycler iCycler	Biorad
UV-Visible Spectrophotometer, UV-1601	Shimadzu Europa GmbH
Vortex VF 2	JK Janke & Kunkel IKA® -Labortechnik

Waage Mettler PM 1200	Mettler-Toledo GmbH, Gießen, Deutschland
Waage Mettler PM 480 Delta Range	Mettler-Toledo GmbH
Waage Sartorius LA 230 S	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
Wasserbad GFL [®] 1002/1003	MAGV GmbH, Rabenau-Londorf, Deutschland
Wasserwaagen, rund	BioRad
Wattestäbchen, steril	VWR, 115-8270
Zentrifuge 3200	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Zentrifuge Heraeus Pico 17 Centrifuge	Thermo Electron Corporation, Langenselbold, Deutschland
Zentrifuge Mini Spin	Eppendorf

3.1.4 Bakterien-Typ- bzw. Referenzstämme

Für die eigenen Arbeiten wurden die in Tabelle 9 aufgeführten Typ- bzw. Referenzstämme verwendet.

Tabelle 9: Aufstellung der verwendeten Typ- bzw. Referenzstämme

Mikroorganismus	Bezeichnung	Herkunft
<i>Cronobacter sakazakii</i>	DSM 4485*	Leibniz-Institut DSMZ
<i>Cronobacter malonaticus</i>	DSM 18702*	Leibniz-Institut DSMZ
<i>Cronobacter mytitiensis</i>	DSM 21870*	Leibniz-Institut DSMZ
<i>Cronobacter turicensis</i>	DSM 18703*	Leibniz-Institut DSMZ
<i>Cronobacter dublinensis</i> subsp. <i>dublinensis</i>	DSM 18705*	Leibniz-Institut DSMZ
<i>Cronobacter dublinensis</i> subsp. <i>lausannensis</i>	DSM 18706*	Leibniz-Institut DSMZ
<i>Cronobacter dublinensis</i> subsp. <i>lactaridi</i>	DSM 18707*	Leibniz-Institut DSMZ
<i>Cronobacter condimenti</i>	1330 = LMG 26250*	Institut für Lebensmittelsicherheit und -hygiene, UZH
<i>Cronobacter universalis</i>	E 797 = NCTC 9529*	Institut für Lebensmittelsicherheit und -hygiene, UZH
<i>Enterobacter cloacae</i>	ATCC 13047*	Max von Pettenkofer-Institut, LMU München
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922*	Professur für Tierärztliche Nahrungsmittelkunde, JLU Gießen
<i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp. <i>pneumoniae</i>	DSM 30104*	Max von Pettenkofer-Institut, LMU München
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	DSM 939	Leibniz-Institut DSMZ

* Typstamm; ATCC (American Type Culture Collection); Leibniz-Institut DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH); JLU (Justus-Liebig-Universität); LMG (Laboratorium voor Microbiologie, Gent, Belgien); LMU (Ludwig-Maximilians-Universität); NCTC (National Collection of Type Cultures, Public Health England); UZH (Universität Zürich)

Die Typ- bzw. Referenzstämme wurden im Stammhaltungssystem Cryobank™ (Mast Diagnostica) für Mikroorganismen bei -80 °C im Gefrierschrank aufbewahrt. Zur Verwendung wurden sie jeweils auf CASO-Agar rekultiviert.

3.2 Methoden

3.2.1 Konservierung und Lagerung der Isolate

Zur Aufbewahrung im Zeitraum der eigenen Untersuchungen wurden alle Isolate zusätzlich zum Stammhaltungssystem Cryobank™ (Mast Diagnostica) in Form eines Glycerinstocks konserviert.

Zur Rekultivierung wurde aus der Kryobank (Cryobank™-Kryoröhrchen) für jedes Isolat ein Kügelchen mit einer sterilen Öse entnommen und auf CASO-Agar ausgestrichen. Nach Bebrütung für 24 h bei 37 °C wurde eine Einzelkolonie abgenommen, in CASO-Bouillon eingerieben und erneut 24 h bei 37 °C bebrütet. Zur Konservierung dieser Bakterienkultur wurde 1,5 ml steriles Glycerin (99,5%) mit 0,5 ml beimpfter CASO-Bouillon in einem Cryovial® gut gemischt und bei -80 °C im Gefrierschrank gelagert. Aus diesem „Glycerinstock“ wurde bei Bedarf Material mit einer sterilen Öse entnommen.

3.2.2 Identifizierung mittels MALDI-TOF MS

Zur Überprüfung der Richtigkeit der Identifizierung auf Genusebene wurden ausgewählte Isolate (n=141) mittels MALDI-TOF MS analysiert. Diese Untersuchungen fanden mit freundlicher Unterstützung von Dr. Markus Timke und Dr. Markus Kostrzewa von Bruker Daltonik GmbH in Bremen statt. Dazu wurden jeweils drei bis fünf auf CASO-Agar gut gewachsene Kolonien der ausgewählten Isolate in 300 µl Aqua dest. suspendiert. Nach Zugabe von 900 µl absolutem Ethanol wurde die Probe für 2 min bei 13.000 Umdrehungen/min zentrifugiert. Zur Entfernung des Alkohols wurde das Pellet nach Verwerfen des Überstandes kurz getrocknet. Anschließend wurde das Pellet in 50 µl

70%iger Ameisensäure resuspendiert und mit 50 µl Acetonitril vermischt. Nach weiterem Zentrifugieren für 2 min bei 13.000 Umdrehungen/min wurde ca. 1 µl des klaren Überstandes auf ein MALDI-Stahltarget pipettiert und nach dem Trocknen mit 1 µl Matrix-Lösung überschichtet. Anschließend wurde die Probe mit dem microflex LT-Massenspektrometer in Verbindung mit der MALDI Biotyper™ 3.0 Software (Bruker Daltonik GmbH, Bremen) analysiert. Die Spektrensätze von 141 *Cronobacter*-Isolaten wurden gegen eine MALDI-TOF MS-Datenbank mit 26 *Cronobacter* spp.-Einträgen abgeglichen und nach dem in Tabelle 10 gezeigten Schema ausgewertet. Eine sehr wahrscheinliche Speziesidentifizierung lag bei einer Bewertungszahl von $\geq 2,3$ vor, eine sichere Gattungsidentifizierung und mögliche Speziesidentifizierung wurde durch einen Wert zwischen 2,0 bis 2,299 definiert. Ein Wert unterhalb von 2,0 bis $\geq 1,7$ ließ eine wahrscheinlich brauchbare Gattungsidentifizierung vermuten. Bei Werten unter 1,7 war keine zuverlässige Identifizierung mehr möglich.

Tabelle 10: Bewertungszahlen des MALDI-Biotyper und deren Bedeutung (Bruker Daltonik GmbH, Bremen)

Bewertungszahl	Bedeutung	Symbol
2,300 bis 3,000	Speziesidentifizierung mit hoher Wahrscheinlichkeit	(+++)
2,000 bis 2,299	Sichere Gattungsidentifizierung, Speziesidentifizierung wahrscheinlich	(++)
1,700 bis 1,999	Gattungsidentifizierung wahrscheinlich	(+)
0,000 bis 1,699	Keine verlässliche Identifizierung	(-)

3.2.3 Biochemische Charakterisierung

Zur Speziesdifferenzierung und Einteilung in die jeweiligen Biotypen wurden verschiedene biochemische Reaktionen nach FARMER et al. (1980) und IVERSEN et al. (2006) durchgeführt. Zunächst wurden die in Glycerin konservierten Isolate auf CASO-Agar kultiviert (24 h, 37 °C). Am nächsten Tag wurden die zu testenden Kolonien in die jeweiligen Probenröhrchen beimpft und für 24 h bis 48 h bei 37 °C bebrütet. Eine Übersicht der verwendeten Kontrollstäme ist in Tabelle 11 zusammengestellt.

Methylrot-VOGES-PROSKAUER-Test

Mit dem Methylrot-Voges-Proskauer-Test wird zum einen die Verwertung von Glukose unter Säurebildung und zum anderen die Bildung von Acetoin (3-Hydroxy-2-butanon, Acetylmethylcarbinol) geprüft. Der Nachweis von Säurebildung aus Glukose wird durch den pH-Wert des Testmilieus bestimmt und durch Methylrot sichtbar gemacht. Der Umschlagpunkt liegt zwischen einem pH-Wert von 4,4 und 5,1.

Je ein Probenröhrchen mit MR-VP-Bouillon wurde mit der zu testenden Kolonie beimpft und 24 h bei 37 °C bebrütet. Nach Durchmischen des bebrüteten Probenröhrchens wurde die Hälfte der Bakteriensuspension in ein weiteres, steriles Probenröhrchen überführt. Anschließend wurden in das eine Röhrchen etwa fünf Tropfen Methylrot-Indikatorlösung dazugegeben und der Farbumschlag abgelesen. Ein Farbumschlag von Orange nach Rot zeigte eine hohe Säurebildung ($\text{pH} < 4,4$), also eine positive Reaktion, ein Farbumschlag von Orange nach Gelb eine geringe Säurebildung, also eine negative Reaktion an. In das andere Röhrchen wurden 1 ml O'MEARA-Reagenz gegeben und für ca. 10 min stehengelassen. Trat eine rosa Färbung, beginnend an der Oberfläche, auf, handelte es sich um ein positives VP-Ergebnis. Als Kontrollstäme wurden *Escherichia coli* ATCC 25922 (positiv für MR, negativ für VP) und *Enterobacter cloacae* ATCC 13047 (negativ für MR, positiv für VP) verwendet.

SIM (Sulphide Indole Motility)-Test

Mit dem SIM-Nährboden können die Bildung von Sulfid (Schwefelwasserstoff (H_2S)-Bildung), Indol und die Beweglichkeit (Motilität) geprüft werden.

Die zu testende Kolonie wurde mit einer Stichöse in die oberste Schicht des Nährbodens eingepflegt und 18 h bis 24 h bei 37 °C bebrütet. Beweglichkeit wurde durch eine diffuse Trübung im Bereich des Stichkanals angezeigt, während die Bildung von H_2S eine Schwärzung im Bereich des Wachstums zeigte. Zum Nachweis des Enzyms Tryptophanase wurde der Nährboden mit KOVACS-Indolreagenz überschichtet. Tryptophanase spaltet Tryptophan zu Indol, Pyruvat und Ammoniak. Indol reagiert mit dem KOVACS-Reagenz unter Bildung des roten Cyaninfarbstoff Rosindol, der in Alkohol, Ether und Chloroform löslich ist. Das Indol-Reagenz, auch KOVACS-Reagenz genannt, ist eine Lösung aus 5% 4-(N,N-Dimethylamino)-benzaldehyd in 75% Isoamylalkohol und 25% konzentrierter Salzsäure. Als Kontrollstämme wurden *Escherichia coli* ATCC 25922 (Motilität und Indol positiv) und *Pseudomonas aeruginosa* DSM 939 (Motilität und Indol negativ) verwendet.

Nitrat-Reduktionstest

Der Nitrat-Reduktionstest dient zum Nachweis des bakteriellen Enzyms Nitratreduktase durch den Abbau von Nitrat (NO_3) zu Nitrit (NO_2) bzw. zu molekularem Stickstoff (N_2). Hierfür wurde die zu testende Kolonie in ein Röhrchen mit Nitratbouillon beimpft und 24 h bei 37 °C bebrütet. Am nächsten Tag erfolgte die Zugabe von jeweils zwei Tropfen von Nit 1 (Sulfanilsäure) und Nit 2 (N,N-dimethyl-1-naphthylamin). Ein Farbumschlag zu Rot zeigte die Anwesenheit von Nitrit und somit eine positive Reaktion an. Als Kontrollstämme wurden *Escherichia coli* ATCC 25922 (positiv) und *Pseudomonas aeruginosa* DSM 939 (negativ) verwendet.

Malonatverwertung

Die Malonat-Phenylalanin-Bouillon, modifiziert nach EWING, dient zum Nachweis von Mikroorganismen, die Natriummalonat als Kohlenstoffquelle und Ammoniumsulfat als Stickstoffquelle nutzen können. Durch das aus diesen beiden Stoffwechselreaktionen

entstehende Natriumhydroxid wird ein alkalisches Milieu erzeugt, welches zu einem Farbumschlag des pH-Indikators Bromthymolblau zu türkisblau führt. Mikroorganismen, die Malonat nicht nutzen können, zeigen keinen Farbumschlag oder eine Gelbfärbung des Mediums aufgrund der Verwertung von Dextrose, was zur Bildung eines sauren Milieus ($\text{pH} < 6$) führt.

Die zu testende Kolonie wurde mit einer sterilen Öse in die Bouillon überführt und 24 h bei 37 °C bebrütet. Die Auswertung erfolgte visuell am nächsten Tag. Als Kontrollstämmen wurden *Enterobacter cloacae* ATCC 13047 (positiv) und *Escherichia coli* ATCC 25922 (negativ) verwendet.

Verwertung von D-Glukose, myo-Inositol und Dulcitol

Die Verwertung von D-Glukose, myo-Inositol und Dulcitol erfolgte in einer Phenolrot-Bouillon mit dem jeweiligen Zuckerzusatz und dem Indikator Phenolrot. Dazu wurden die jeweiligen Zucker mit der Phenolrot-Bouillon angelegt. Die zu testende Kolonie wurde in das Probenröhrchen beimpft und 24 h bei 37 °C bebrütet. War der jeweilige Keim in der Lage den Zucker abzubauen, kam es durch die Säurebildung zum Farbumschlag des Indikators von Rot nach Gelb. Wurde der Zucker nicht abgebaut, blieb die ursprüngliche Farbe der Bouillon (Rot) erhalten. Bei Glukose wurde neben der Säurebildung auch die Gasbildung beurteilt. Hierfür wurde zusätzlich ein Durham-Röhrchen, mit der Öffnung nach unten, in die Bouillon gegeben. Bei Gasbildung war eine Luftblase im Durham-Röhrchen zu sehen. Als Kontrollstämmen wurden *Cronobacter sakazakii* DSM 4485 (Inositol positiv), *Escherichia coli* ATCC 25922 (Glukose und Dulcitol positiv, Inositol negativ, Gasbildung positiv) und *Pseudomonas aeruginosa* DSM 939 (alle Reaktionen negativ) verwendet.

Ornithinverwertung (Ornithin-Decarboxylase, ODC)

Die Ornithindecarboxylase-Testbouillon enthält Ornithin als Substrat und Bromkresolpurpur als pH-Indikator. Sie dient zum Nachweis der Ornithin-Decarboxylase. Die zu testende Kolonie wurde mit einer sterilen Öse in die Ornithindecarboxylase-Testbouillon überführt und anschließend das Medium mit sterilisiertem Paraffinöl großzügig überschichtet. Die beimpfte Testbouillon wurde danach

bis zu vier Tage bei 37 °C bebrütet. In den ersten sechs bis acht Stunden wird der Nährboden intensiv gelb, da zunächst Glukose zu Säure abgebaut wird und die Farbe des pH-Indikators bei einem pH-Wert unter 5,6 nach Gelb umschlägt. Ornithin-Decarboxylase-positive Bakterien bewirken durch den Abbau von Ornithin danach wieder einen pH-Anstieg und der Nährboden färbt sich violett (ODC-Test positiv). Verfügen Bakterien nicht über das Enzym Ornithindecarboxylase, wird Ornithin nicht abgebaut und das Medium bleibt gelb. Als Kontrollstämmen wurden *Escherichia coli* ATCC 25922 (positiv) und *Klebsiella pneumoniae* spp. *pneumoniae* DSM 30104 (negativ) verwendet.

Tabelle 11: Verwendete Kontrollstämme für die Biotypisierung und ihre Reaktionen

Stammbezeichnung	VP	MR	NO ₃	ODC	Mot	Ino	Dul	Ind	Mal	Gas	Glu
<i>Cronobacter sakazakii</i> DSM 4485	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+
<i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp. <i>pneumoniae</i> DSM 30104	+	-	+	-	+	-	-	-	+	+	+
<i>Enterobacter cloacae</i> ATCC 13047	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> DSM 939	-	-	-	/	-	-	-	-	+	-	-

ATCC = American Type Culture Collection; DSM = Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen; MR = Methylrot-Test; VP = Voges-Proskauer-Test; NO₃ = Nitrat-Reduktionstest; ODC = Ornithinverwertung; Mot = Beweglichkeitsprüfung; Ino = Säurebildung aus myo-Inositol; Dul = Säurebildung aus Dulcitol; Ind = Indolbildung; Mal = Malonatverwertung; Gas = Gasbildung; Glu = Säurebildung aus D-Glukose; + = positive Reaktion; - = negative Reaktion; / = nicht durchführbar

3.2.4 Molekularbiologische Charakterisierung

Zur molekularbiologischen Differenzierung wurden alle Isolate mit einer Spezies-spezifischen PCR-Methode auf Basis des *rpoB*-Gens (STOOP et al., 2009) untersucht. Die Durchführung der molekularbiologischen Differenzierung erfolgte unter Verwendung der in den folgenden Kapiteln beschriebenen Methodik.

3.2.4.1 Extraktion der bakteriellen DNA

Die DNA-Extraktion erfolgte unter Verwendung des kommerziellen Qiagen DNeasy[®] Blood & Tissue Kit (250). Zunächst wurden mittels steriler Einmalöse aus dem Glycerinstock des zu testenden Keims ca. 10 µl auf CASO-Agar ausgestrichen und 24 h bei 37 °C bebrütet. Je eine Kolonie wurde zur Zellwandlyse mittels einer sterilen Einmalöse in je 180 µl TE-Lysis-Puffer mit Lysozymzusatz (20 mg/ml TE-Puffer) in einem Reaktionsgefäß eingerieben und 1 h bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Zwischendurch wurde das Reaktionsgefäß mittels Vortexer geschüttelt. Nach Zugabe von 30 µl Proteinase K (pro Probe) und 200 µl Lysis-Puffer (AL) zur Deproteinisierung erfolgte eine weitere Inkubation von 2 h bei 56 °C im Brutschrank. Zur Inaktivierung der Proteinase K wurden jeweils 200 µl Ethanol hinzugegeben, kurz gemischt und zentrifugiert. Anschließend wurde die gesamte Menge (ca. 600 µl) in eine Qiagen Kit Säule gegeben und 1 min bei 9.600 x g (9.600fache der Erdbeschleunigung) zentrifugiert. Während dieses Schrittes erfolgte die selektive Bindung der DNA an die Membran der Kit Säule. Zur Entfernung verbliebener Kontaminanten und Enzyminhibitoren folgten zwei Reinigungsschritte: Zunächst erfolgte die Zugabe von 500 µl Waschpuffer AW 1 und die Zentrifugation für 2 min bei 16.000 x g, anschließend die Zugabe von 500 µl Waschpuffer AW 2 und erneuter Zentrifugation für 2 min bei 16.000 x g. Der Überstand wurde verworfen und die Säule in ein neues Reaktionsgefäß gestellt. Das Ablösen der DNA von der Membran erfolgte mit 200 µl Elutionspuffer (AE). Hierzu wurde die Säule 5 min bei Raumtemperatur stehen gelassen und anschließend 5 min bei 16.000 x g zentrifugiert. Die DNA-haltigen Eluate wurden direkt in der PCR eingesetzt oder bei -18 °C im Gefrierschrank gelagert.

3.2.4.2 Ansetzen der gebrauchsfertigen Primer

Die verwendeten Oligonukleotidprimer wurden gefriergetrocknet in Kunststoffröhrchen bis zur weiteren Verarbeitung im Kühlschrank bei 6 °C bis 8 °C gelagert. Zur Ansetzung der Stammlösung wurde je nach Herstellerangaben die angegebene Wassermenge (nukleasefreies Aqua dest.) in das Röhrchen pipettiert, sodass eine Konzentration des Primers von 100 pmol/μl erreicht wurde. Die Primerlösung wurde 30 min bei Raumtemperatur stehen gelassen und danach vorsichtig mit einer Pipette gemischt. Diese Primerstammlösung wurde bei -18 °C im Gefrierschrank aufbewahrt. Durch Mischung von 10 μl dieser Stammlösung mit 90 μl nucleasenfreiem Aqua dest. in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß wurde jeweils eine Primer-Gebrauchslösung hergestellt. Die Gebrauchslösung wurde bei -18 °C gelagert oder direkt für das Reaktionsgemisch (Mastermix) verwendet. Eine Übersicht der verwendeten Oligonukleotidprimer ist in Tabelle 12 zusammengestellt.

Tabelle 12: Übersicht über die in dieser Arbeit eingesetzten Oligonukleotidprimer zur Amplifizierung der Spezies-spezifischen Abschnitte des *rpoB*-Gens von *Cronobacter* spp.

Spezies	Primer	Sequenz (5' → 3')	Amplikongröße (Bp)	Referenz
<i>C. sakazakii</i>	Csakf	ACG CCA AGC CTA TCT CCG CG	514	STOOP et al., 2009
	Csagr	ACG GTT GGC GTC ATC GTG		
<i>C. malonaticus</i>	Cmalif	CGT CGT ATC TCT GCT CTC	251	STOOP et al., 2009
	Cmalr	AGG TTG GTG TTC GCC TGA		
<i>C. muytjensii</i>	Cmuyf	TGT CCG TGT ATG CGC AGA CC	330	STOOP et al., 2009
	Cmuyr	TGT TCG CAC CCA TCA ATG CG		
<i>C. dublinensis</i>	Cdablf	GCA CAA GCG TCG TAT CTC C	418	STOOP et al., 2009
	Cdablr	TTG GCG TCA TCG TGT TCC		
<i>C. turicensis</i>	Ctuurf	CGG TAA AAG AGT TCT TCG GC	628	STOOP et al., 2009
	Ctuur	GTA CCG CCA CGT TTC GCC		
<i>C. universalis</i>	Cgenomf	ACA AAC GTC GTA TCT CTG CG	506	STOOP et al., 2009
	Cgenomr	AGC ACG TTC CAT ACC GGT C		
<i>C. condimenti</i>	Cconf	AAC GCC AAG CCA ATC TCG	689	LEHNER et al., 2012
	Cconr	GTA CCG CCA CGT TTT GCT		

3.2.4.3 Durchführung der Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Zur DNA-Amplifikation wurde zunächst das Reaktionsgemisch (Mastermix) mit der in Tabelle 13 aufgeführten Zusammensetzung hergestellt.

Tabelle 13: Zusammensetzung des Reaktionsgemisches (Mastermix) zur Durchführung der PCR

Reagenzien	Volumen pro PCR-Ansatz
Aqua dest.	21,3 µl
10x DreamTaq Puffer mit 20 mM MgCl ₂	3,0 µl
dNTP-Mix (10 mmol/l) (je Nukleotid)	1,0 µl
Primer F (10 µmol/l)	1,0 µl
Primer R (10 µmol/l)	1,0 µl
DreamTaq DNA Polymerase (5 U/µl)	0,2 µl
Gesamt-Volumen pro Ansatz	27,5 µl

Aqua dest. = Aqua destillata; DNA = Desoxyribonukleinsäure; dNTP = Desoxynukleotidtriphosphate; MgCl₂ = Magnesiumchlorid; Primer F = Vorwärtsprimer; Primer R = Rückwärtsprimer; Taq = *Thermus aquaticus*

Von diesem Reaktionsgemisch wurden je 27,5 µl in ein 0,2 ml Reaktionsgefäß (PCR-Tube) pipettiert und mit 2,5 µl der extrahierten DNA gut vermischt. Als Positiv- und Negativkontrollen dienten die in Tabelle 9 aufgeführten Typ- bzw. Referenzstämme. Zur Vermeidung einer Kontamination der Reagenzien, wurde stets ein Reaktionsansatz ohne DNA-Zugabe als Negativkontrolle mitgeführt (Leerwert). Die Amplifizierung erfolgte in einem Thermocycler (iCycler) unter Verwendung des in Tabelle 14 aufgeführten Temperatur-Zeit-Profiles. Die für die einzelnen Oligonukleotidprimer verwendeten Anlagerungstemperaturen (Annealing) sind der Tabelle 15 zu entnehmen. Die DNA-Amplifikate wurden entweder unmittelbar im Anschluss an die PCR

gelelektrophoretisch aufgetrennt oder aber über Nacht bei 4 °C gelagert und am folgenden Tag weiterverarbeitet.

Tabelle 14: Temperatur-Zeit-Profil zur DNA-Amplifikation

Vorgang	Temperatur	Zeit
Initiale Denaturierung	94 °C	5 min
Denaturierung	94 °C	1 min
Anlagerung (Annealing)	variabel	variabel
Synthese/Verlängerung (Extension)	72 °C	30 sec
Abschließender Syntheseschritt (Final Extension)	72 °C	5 min
Abkühlung	4 °C	∞

} 30 Zyklen

Tabelle 15: Annealing-Temperaturen der Spezies-spezifischen Oligonukleotidprimer

Spezies	Primerpaar	Temperatur	Zeit (Dauer)
<i>C. sakazakii</i>	Csakf/Csakr	67 °C	1 min
<i>C. malonaticus</i>	Cmalf/Cmalr	60 °C	30 sec
<i>C. turicensis</i>	Cturf/Cturr	61 °C	1 min
<i>C. dublinensis</i>	Cdublf/Cdublr	64 °C	30 sec
<i>C. muytjensii</i>	Cmuyf/Cmuyr	67 °C	20 sec
<i>C. universalis</i>	Cgenomf/Cgenomr	64 °C	30 sec
<i>C. condimenti</i>	Cconf/Cconr	61 °C	30 sec

Zur Differenzierung der *Cronobacter*-Isolate wurden sieben unterschiedliche Spezies-spezifische PCR durchgeführt (Tabelle 16). Dabei wurden alle Isolate (n=259) einheitlich mit den Spezies-spezifischen Primerpaaren für *C. sakazakii*, *C. malonaticus* und *C. muytjensii* untersucht. Einige ausgewählte Isolate wurden zusätzlich mit den

Spezies-spezifischen Primerpaaren für *C. turicensis* (n=174), *C. dublinensis* (n=161), *C. universalis* (n=165) und *C. condimentii* (n=166) überprüft.

Tabelle 16: Übersicht zur Auswertung der Ergebnisse der Spezies-spezifischen *rpoB*-PCR

Spezies- identifizierung	PCR mit den Spezies-spezifischen Primerpaaren						
	Csakf/ Csakr	Cmalf/ Cmalr	Cturf/ Cturr	Cdubl/ Cdubl	Cmuyf/ Cmuyr	Cgenomf/ Cgenomr	Cconf/ Cconr
<i>C. sakazakii</i>	+	-	-	-	-	-	-
<i>C. malonaticus</i>	+	+	-	-	-	-	-
<i>C. turicensis</i>	-	-	+	-	-	-	-
<i>C. dublinensis</i>	-	-	-	+	-	-	-
<i>C. mytjensii</i>	-	-	-	-	+	-	-
<i>C. universalis</i>	-	-	-	-	-	+	-
<i>C. condimentii</i>	-	-	-	-	-	-	+

+: positive; -: negative

3.2.4.4 Gelelektrophorese und optische Darstellung der PCR-Produkte

Der Nachweis der DNA-Amplifikate erfolgte mittels Agarosegelelektrophorese. Zur optimalen Darstellung der Fragmente wurde ein 2%iges Agarosegel hergestellt. Hierfür wurden 3 g Agarosepulver in 150 ml 1x TAE (Tris-Acetat-EDTA)-Puffer gegeben und in der Mikrowelle solange erhitzt, bis alle Schwebeteile gelöst waren. Die flüssige Agarose wurde dann ca. 15 min in einem 56 °C warmen Wasserbad abgekühlt und anschließend in die mit einem Kamm versehene Formschale gegossen. Nach 30 min wurde der Kamm vorsichtig entfernt und das erstarrte Gel in die Gelelektrophoresekammer gelegt. Mit dem entsprechenden Laufpuffer (1x TAE-Puffer) wurde die Gelelektrophoresekammer aufgefüllt, bis das Gel vollständig bedeckt war. Für das Auftragen der PCR-Produkte wurden jeweils 10 µl DNA-Amplifikat mit 2 µl „6x Loading Dye Solution“ vermischt und in die Vertiefungen (Slots) des Agarosegels pipettiert. Zur Größenabschätzung der Amplifikate wurde in die erste Vertiefung 2 bis 4 µl eines Molekulargewichtstandardmarkers von 50 Bp (0,5 µg/µl) aufgetragen. Die

gelektrophoretische Auftrennung erfolgte bei 120 mA für ca. 2,5 h. Zur optischen Darstellung wurde das Gel in einer Ethidiumbromid-Lösung (5 µg/ml) für 10 min gefärbt. Anschließend wurde durch Schwenken in Aqua dest. für 20 min bei Raumtemperatur überschüssiger Farbstoff entfernt. Danach wurde das Gel im Geldokumentationssystem (GelDoc 2000) unter Ultraviolett-Licht (UV-Licht) bei einer Wellenlänge von 302 nm betrachtet und digital fotografiert. Positive DNA-Amplifikate stellten sich als weiße Banden vor schwarzem Hintergrund dar.

3.2.5 Sequenzanalyse des *rpoB*-Gens

Einige ausgewählte Isolate (n=26) wurden mittels Sequenzanalyse untersucht, um die Nukleotidabfolge in einem bestimmten Abschnitt innerhalb des *rpoB*-Gens zu bestimmen. Die *rpoB*-Gensequenzen dieser 26 Isolate wurden mit zwölf *Cronobacter*-Typstämmen (Tabelle 17) der GenBank-Datenbank des „U.S. National Center for Biotechnology Information“ (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) mittels Multisequenzalignment unter der Verwendung des Computerprogramms „Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0“ (MEGA 6, TAMURA et al., 2013) verglichen. Die phylogenetischen Beziehungen der Aminosäuresequenzen konnte durch Anwendung einer Clustermethode „Neighbour-Joining Algorithmus“ in Form eines Dendrogramms mit folgenden Parametern ermittelt werden: Gap open penalty: 15, Gap extention penalty: 6.66, Transition Weight: none, DNA Weight Matrix: IUB.

Tabelle 17: GenBank-Nummern der verwendeten *rpoB*-Gen Sequenzen der *Cronobacter*-Typstämme

Spezies	Stammnummer	GenBank-Nummer
<i>C. sakazakii</i>	ATCC 29544	FJ717657
<i>C. malonaticus</i>	LMG 23826	FJ717659
<i>C. universalis</i>	NCTC 9529	FJ717656
<i>C. turicensis</i>	LMG 23827	FJ717652
<i>C. muytjensii</i>	ATCC 51329	FJ717658
<i>C. dublinensis</i> subsp. <i>dublinensis</i>	LMG 23823	FJ717653
<i>C. dublinensis</i> subsp. <i>lausannensis</i>	LMG 23824	FJ717654
<i>C. dublinensis</i> subsp. <i>lactaridi</i>	LMG 23825	FJ717655
<i>C. condimenti</i>	LMG 26250	JX425292
<i>S. turicensis</i> (ehemals <i>C. turicensis</i>)	LMG 23730	JX425298
<i>C. zurichensis</i>		
<i>F. helveticus</i> (ehemals <i>C. helveticus</i>)	LMG 23732	JX425293
<i>C. helveticus</i>		
<i>F. pulveris</i> (ehemals <i>C. pulveris</i>)	LMG 24057	JX425295

ATCC (American Type Culture Collection); LMG (Laboratorium voor Microbiologie, Gent, Belgien); NCTC (National Collection of Type Cultures, Public Health England)

3.2.5.1 Primer zur Amplifikation des *rpoB*-Gens

Die zur Herstellung eines Amplikons des zu prüfenden Genabschnitts des *rpoB*-Gens verwendeten Oligonukleotidprimer sind in Tabelle 18 dargestellt. Herstellung und Verwendung der gebrauchsfertigen Primer erfolgte gemäß der unter **3.2.4.2** beschriebenen Methodik.

Tabelle 18: Oligonukleotidprimer für die Amplifikation eines Genabschnitts zur Sequenzierung des *rpoB*-Gens (MOLLET et al., 1997)

Gen	Richtung	Primersequenz (5' → 3')	Allelgröße (Bp)
<i>rpoB</i>	F	AAC CAG TTC CGC GTT GGC CTG G	1088
	R	CCT GAA CAA CAC GCT CGG A	

rpoB = Beta-Untereinheit des RNA-Polymerase kodierenden Gens; F = vorwärts;
R = rückwärts

3.2.5.2 Durchführung der PCR

Zur Herstellung des zur Durchführung der Sequenzanalyse benötigten Materials wurde die Extraktion der bakteriellen DNA nach der unter **3.2.4.1** beschriebenen Methodik durchgeführt. Das Reaktionsgemisch (Mastermix) zur Durchführung der PCR wurde entsprechend der in Tabelle 13 aufgeführten Zusammensetzung, wie unter **3.2.4.3** beschrieben, hergestellt.

Von diesem Reaktionsgemisch wurden je 27,5 µl in ein 0,2 ml Reaktionsgefäß (PCR-Tube) pipettiert und mit 2,5 µl der extrahierten DNA gut vermischt. Zur Vermeidung einer Kontamination der Reagenzien wurde stets ein Reaktionsansatz ohne DNA-Zugabe als Negativkontrolle mitgeführt (Leerwert). Die Amplifizierung erfolgte in einem Thermocycler (iCycler) unter Verwendung des in Tabelle 19 aufgeführten Temperatur-Zeit-Profiles. Die DNA-Amplifikate wurden zur Überprüfung direkt

gelelektrophoretisch aufgetrennt und optisch dargestellt. Die Durchführung erfolgte nach den unter 3.2.4.4 beschriebenen Angaben.

Tabelle 19: Temperatur-Zeit-Profil zur DNA-Amplifikation des *rpoB*-Gens (MOLLET et al., 1997)

Vorgang	Temperatur	Zeit	
Initiale Denaturierung	94 °C	90 sec	
Denaturierung	94 °C	10 sec	} 40 Zyklen
Anlagerung (Annealing)	55 °C	20 sec	
Synthese/Verlängerung (Extension)	72 °C	50 sec	
Abschließender Syntheseschritt (Final Extension)	72 °C	5 min	
Abkühlung	4 °C	∞	

3.2.5.3 Reinigung der DNA-Amplifikate

Zur Vorbereitung der Sequenzierung wurden die DNA-Amplifikate mit einem kommerziellen Reinigungs-Kit (QIAquick® PCR Purification Kit) nach Herstellerangaben gereinigt. Zunächst wurden jeweils 40 µl Amplifikat mit 200 µl Bindungspuffer (PB-Puffer) in einem Reaktionsgefäß gut gemischt. Eine gelbliche Verfärbung dieses Gemisches zeigte einen korrekten pH-Wert von $\leq 7,5$ an. Danach wurde die gesamte Menge in eine QIAquick Säule pipettiert und nach einer Einwirkzeit von 1 min bei 16.000 x g für 1 min zentrifugiert, um die DNA an die Säule zu binden. Zur Reinigung der DNA wurden 750 µl Waschpuffer (PE-Puffer) auf die Säule pipettiert und die Flüssigkeit zweimal bei 16.000 x g jeweils 1 min abzentrifugiert. Die DNA wurde von der Säule gelöst, indem anschließend 30 µl Elutionspuffer (EB-Puffer) auf die Säule gegeben wurde. Nach 5 min bei Raumtemperatur wurde die Säule 1 min bei 16.000 x g zentrifugiert. Die gereinigten DNA-Amplifikate wurden dann direkt weiterverarbeitet oder zur Aufbewahrung bei -18 °C eingefroren.

3.2.5.4 Sequenzierung und Auswertung der DNA-Amplifikate

Für die Sequenzanalyse wurden jeweils 5 µl des gereinigten DNA-Amplikats mit 2 µl des jeweiligen Primers (Primer *rpoB*-F oder Primer *rpoB*-R) in einem Reaktionsgefäß (PCR-Tube) gut gemischt, verpackt und an SEQLAB Sequence Laboratories (Göttingen, Deutschland) versandt.

Die erhaltenen Gensequenzen wurden nach 24 h von der SEQLAB-Internetseite (www.seqlab.de) heruntergeladen und mit dem Computerprogramm MEGA 6 (<http://www.megasoftware.net/>) ausgewertet.

3.2.6 Multilokus-Sequenztypisierung (MLST)

Ausgewählte Isolate (n=14) wurden mittels MLST an sieben Housekeeping-Genen untersucht. Eine Übersicht der verwendeten Gene ist in Tabelle 6 unter **2.1.8.6.2** zusammengestellt.

3.2.6.1 Primer zur Amplifikation und Sequenzierung der sieben Housekeeping-Gene von *Cronobacter* spp.

Die verwendeten Oligonukleotidprimer zur Amplifizierung und Sequenzierung der sieben Housekeeping-Gene sind in den Tabellen 20 und 21 aufgeführt. Die Herstellung der gebrauchsfertigen Primer erfolgte gemäß der unter **3.2.4.2** beschriebenen Methodik.

Tabelle 20: Übersicht der verwendeten Oligonukleotidprimer für die Amplifizierung der sieben Housekeeping-Gene von *Cronobacter* spp. (BALDWIN et al., 2009)

Gen	Richtung	Primersequenz (5' → 3')
<i>atpD</i>	F	CGA CAT GAA AGG CGA CAT
	R	TTA AAG CCA CGG ATG GTG
<i>fusA</i>	F	GAA ACC GTA TGG CGT CAG
	R	AGA ACC GAA GTG CAG ACG
<i>glnS</i>	F	GCA TCT ACC CGA TGT ACG
	R	TTG GCA CGC TGA ACA GAC
<i>gltB</i>	F	CAT CTC GAC CAT CGC TTC
	R	CAG CAC TTC CAC CAG CTC
<i>gyrB</i>	F	TGC ACC ACA TGG TAT TCG
	R	CAC CGG TCA CAA ACT CGT
<i>infB</i>	F	GAA GAA GCG GTA ATG AGC
	R	CGA TAC CAC ATT CCA TGC
<i>pps</i>	F	GTC CAA CAA TGG CTC GTC
	R	CAG ACT CAG CCA GGT TTG

Tabelle 21: Übersicht der verwendeten Oligonukleotidprimer für die Sequenzierung der sieben Housekeeping-Gene von *Cronobacter* spp. (BALDWIN et al., 2009)

Gen	Richtung	Primersequenz (5' → 3')	Allelgröße (Bp)
<i>atpD</i>	F	CGA AAT GAC CGA CTC CAA	390
	R	GGA TGG CGA TGA TGT CTT	
<i>fusA</i>	F	GCT GGA TGC GGT AAT TGA	438
	R	CCC ATA CCA GCG ATG ATG	
<i>glnS</i>	F	GGG TGC TGG ATA ACA TCA	363
	R	CTT GTT GGC TTC TTC ACG	
<i>gltB</i>	F	GCG AAT ACC ACG CCT ACA	507
	R	GCG TAT TTC ACG GAG GAG	
<i>gyrB</i>	F	CTC GCG GGT CAC TGT AAA	402
	R	ACG CCG ATA CCG TCT TTT	
<i>infB</i>	F	TGA CCA CGG TAA AAC CTC	441
	R	GGA CCA CGA CCT TTA TCC	
<i>pps</i>	F	ACC CTG ACG AAT TCT ACG	495
	R	CAG ATC CGG CAT GGT ATC	

3.2.6.2 Durchführung der PCR

Zur Herstellung des zur Durchführung der MLST benötigten Materials wurde die Extraktion der bakteriellen DNA nach der unter 3.2.4.1 beschriebenen Methodik durchgeführt. Das Reaktionsgemisch (Mastermix) zur Durchführung der PCR wurde entsprechend der in Tabelle 13 aufgeführten Zusammensetzung, wie unter 3.2.4.3 beschrieben, hergestellt.

Von diesem Reaktionsgemisch wurden je 27,5 µl in ein 0,2 ml Reaktionsgefäß (PCR-Tube) pipettiert und mit 2,5 µl der extrahierten DNA gut vermischt. Zur Vermeidung einer Kontamination der Reagenzien wurde stets ein Reaktionsansatz ohne DNA-Zugabe als Negativkontrolle mitgeführt (Leerwert). Die Amplifizierung erfolgte in einem Thermocycler (iCycler) unter Verwendung des in Tabelle 22 aufgeführten

Temperatur-Zeit-Profiles. Die DNA-Amplifikate wurden zur Überprüfung direkt gelelektrophoretisch aufgetrennt und optisch dargestellt. Die Durchführung erfolgte nach den unter 3.2.4.4 beschriebenen Angaben.

Tabelle 22: Temperatur-Zeit-Profil zur DNA-Amplifikation der sieben Housekeeping-Gene angelehnt an BALDWIN et al. (2009)

Vorgang	Temperatur	Zeit
Initiale Denaturierung	94 °C	2 min
Denaturierung	94 °C	1 min
Anlagerung (Annealing)	58 °C	1 min
Synthese/Verlängerung (Extension)	72 °C	2 min
Abschließender Syntheseschritt (Final Extension)	72 °C	5 min
Abkühlung	4 °C	∞

} 30 Zyklen

3.2.6.3 Reinigung der DNA-Amplifikate

Die Reinigung der DNA-Amplifikate erfolgte entsprechend der unter 3.2.5.3 beschriebenen Methodik.

3.2.6.4 Sequenzierung und Auswertung der DNA-Amplifikate

Zur Sequenzierung der DNA-Amplifikate zur Durchführung der MLST wurden jeweils 5 µl des gereinigten DNA-Amplifikats mit 2 µl des jeweiligen Primers (Primer F oder Primer R) in einem Reaktionsgefäß (PCR-Tube) gut gemischt, verpackt und an SEQLAB Sequence Laboratories (Göttingen, Deutschland) versandt.

Die Gensequenzen konnten nach 24 h von der SEQLAB-Internetseite (www.seqlab.de) heruntergeladen und mit dem Computerprogramm MEGA 6 (<http://www.megasoftware.net/>) ausgewertet werden. Jede Sequenz wurde auf Plausibilität kontrolliert und die jeweilige Vorwärtssequenz mit der Rückwärtssequenz verglichen. Falls erforderlich, wurden die Sequenzen manuell editiert. Um den spezifischen Bereich des jeweiligen Gens zu ermitteln, wurden die Sequenzen mit einem bekannten Allel des zu untersuchenden Gens aus der MLST-Datenbank (<http://pubmlst.org/cronobacter/>) verglichen. Das Allel aus der Datenbank diene in diesem Schritt lediglich dazu, die korrekte Länge des sequenzierten Gens zu ermitteln und überzählige Basen aus der Analysesequenz zu entfernen. Die bearbeiteten Genabschnitte wurden online in Form von „fasta-Dateien“ an die Betreiber der Datenbank übermittelt und der MLST-Datenbank (<http://pubmlst.org/cronobacter/>) hinzugefügt. Die Sequenzen der Housekeeping-Genabschnitte erlauben phylogenetisch die eindeutige Zuordnung von Isolaten zu sogenannten Sequenztypen (ST) bzw. zu klonalen Komplexen der *Cronobacter*-Spezies.

3.2.7 Makrorestriktionsanalyse von *Cronobacter* spp.

Zur Analyse der klonalen Verwandtschaft von *Cronobacter*-Isolaten wurde eine Makrorestriktionsanalyse unter Verwendung des Contour-Clamped Homogeneous Electric Field - Pulsfeld-Gelelektrophorese Systems (CHEF-DR[®] II-PFGE System, BioRad) durchgeführt. Dabei wurde das Genom mittels der Restriktionsendonuklease *Xba*I in unterschiedlich große DNA-Fragmente geschnitten und anschließend gelelektrophoretisch aufgetrennt. Mithilfe der Computer-Software BioNumerics (Version 5.1, Applied Maths, Belgien) konnten die Restriktionsmuster ausgewertet und die genetische Ähnlichkeit der Isolate verglichen werden.

3.2.7.1 Vorbereitung der Makrorestriktionsanalyse

Die Durchführung der PFGE erfolgte nach einer modifizierten Version des PulseNet Standardprotokolls für PFGE vom CDC (Centers for Disease Control and Prevention, USA). Zunächst wurden die ausgewählten Isolate 24 h bei 37 °C auf CASO-Agar angezüchtet. Aus dieser Übernachtskultur wurde mit einer sterilen Einmalöse Koloniematerial in 1 ml TE-Puffer eingerieben, bis eine homogene Suspension entstand. Diese Suspension wurde anschließend durch photometrische Messung auf eine Transmission von ca. 4% eingestellt, sodass alle Isolate eine einheitliche Dichte aufwiesen. Von dieser eingestellten Suspension wurden jeweils 120 µl mit der gleichen Menge Agarosegel (18 mg Agarose pro 1 ml TE-Puffer) gemischt und in vorbereitete Gießblöcke pipettiert. Pro Isolat wurden jeweils zwei Blöckchen hergestellt. Diese wurden zum Aushärten 20 min bei Raumtemperatur stehen gelassen und danach in ein Reaktionsgefäß mit 400 µl Lysispuffer (1 mg Lysozym in 200 µl Lysispuffer pro Blöckchen) überführt. Zur Lyse der bakteriellen Zellwand wurden die Blöckchen ca. 6 h bei 37 °C im Brutschrank bebrütet. Danach wurde zur Deproteinisierung pro Isolat 25 µl Proteinase K dazu pipettiert und 24 h bei 56 °C bebrütet. Am nächsten Tag wurden die Blöckchen zur Entfernung überschüssiger Substanzen und Zellbestandteile gewaschen. Hierzu wurde der Lysisansatz mit einer sterilen Pasteurpipette vollständig entfernt und zunächst 1 ml TE-Puffer hinzupipettiert. Nach 15 min bei Raumtemperatur wurde die Flüssigkeit wieder vollständig entfernt und der Vorgang wiederholt. Anschließend wurden pro Isolat 400 µl TE-Puffer und 4 µl PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid)-Lösung (1 mmol/l) dazugegeben und zur Inaktivierung der Proteinase K 1 h bei 56 °C bebrütet. Danach wurden die Blöckchen noch zweimal mit jeweils 1 ml TE-Puffer gewaschen und entweder direkt weiterverarbeitet oder im Kühlschrank bei 8 °C aufbewahrt.

Zur Durchführung der Restriktion wurde ein Reaktionsgemisch (Mastermix) in der in Tabelle 23 angegebenen Zusammensetzung hergestellt. Je Isolat wurden 200 µl des Reaktionsgemisches hinzupipettiert und 6 h bei 37 °C bebrütet.

Tabelle 23: Zusammensetzung des Reaktionsgemisches zur Restriktion für die PFGE

Substanz	Verwendete Menge pro Isolat
Aqua dest. steril	178 μ l
Tango Puffer 10 fach (mit BSA)	20 μ l
Restriktionsenzym <i>Xba</i> I	2 μ l
Gesamtvolumen pro Isolat	200 μ l

BSA = Bovine Serum Albumine; dest. = destilliertes

3.2.7.2 Gelelektrophorese und optische Darstellung der DNA-Fragmente

Die gelelektrophoretische Auftrennung aller nach **3.2.7.1** hergestellten DNA-Restriktionsfragmente erfolgte in einem 1,1%igen Agarosegel. Hierzu wurden 1,5 g Agarosepulver in 140 ml 1x TBE-Puffer (0,5fach) gegeben und in einem Mikrowellenofen solange erhitzt, bis alle Schwebeteile gelöst waren. Die flüssige Agarose wurde dann ca. 15 min in einem 56 °C warmen Wasserbad abgekühlt und anschließend in die mit einem Kamm versehene Formschale gegossen. Nach 30 min wurde das erstarrte Gel zur Erhöhung der Festigkeit kurz auf einen Eisblock gelegt und der Kamm entfernt. Die bebrüteten Blöckchen wurden aus den Reaktionsgefäßen auf das Gel überführt und vorsichtig in die Vertiefungen (Slots) des Gels eingeführt. In der ersten Vertiefung wurden zum Größenvergleich der Restriktionsbanden zwei PFGE Marker (*Lambda ladder* und *Low range ladder*, Biolabs[®] GmbH) positioniert.

Anschließend wurden die Vertiefungen mit vorher abgenommener Agarose verschlossen und das fertige Gel in die Elektrophoresekammer mit 0,5-fachem TBE-Laufpuffer gelegt. Um einer möglichen DNA-Degradation durch Tris-Radikale im TBE-Puffer vorzubeugen, wurden zusätzlich 870 ml einer Thioharnstoff-Lösung (50 μ mol) zu 2,2 l TBE-Laufpuffer dazugegeben. Die PFGE zur Auftrennung der DNA-Fragmente erfolgte nach dem in Tabelle 24 zusammengestellten Programm.

Tabelle 24: PFGE-Programm für *Cronobacter* spp.

	Durchgang I	Durchgang II
Initial A time (Start-Umschaltzeit)	1 sec	15 sec
Final A time (End-Umschaltzeit)	15 sec	35 sec
Spannung	200 V (6 V/cm)	200 V (6 V/cm)
Laufzeit	7 h	16 h

Zur optischen Darstellung der Restriktionsmuster wurde das Gel mit Ethidiumbromid-Lösung gefärbt und anschließend im Geldokumentationssystem Gel-Doc 2000 (BioRad) ausgewertet. Mithilfe der Computer-Software BioNumerics (Version 5.1, Applied Maths, Belgien) wurden die Bandenmuster bearbeitet und miteinander verglichen. Zur Veranschaulichung der klonalen Verwandtschaft wurde eine Dendrogrammanalyse auf der Grundlage der Clustermethode „Unweighted pair group method with arithmetic mean“ (UPGMA) mit der Dice-Einstellung für den Koeffizienz-Vergleich und einer Positionstoleranz von 1% angefertigt. Dabei wurden zwei Isolate als identisch bezeichnet, wenn ihre Übereinstimmung bei $\geq 99\%$ lag, d.h. dass sie sich in keiner Bande voneinander unterschieden. Dagegen wurden zwei Isolate bei einer Unterscheidung in 2-3 Banden als nah verwandt, bei 4-6 Banden als möglicherweise verwandt und bei mehr als 7 Banden als unterschiedlich bezeichnet (TENOVER et al., 1995).

4 ERGEBNISSE

4.1 Ergebnisse der MALDI-TOF MS

Zur Überprüfung der Qualität der Identifizierung von *Cronobacter* spp. auf Genusebene mittels MALDI-TOF MS wurden ausgewählte Isolate (n=141) untersucht. Jede Probe wurde mittels microflex LT-Massenspektrometer in Verbindung mit der MALDI Biotyper 3.0 Software (Bruker Daltonik GmbH, Bremen) analysiert. Die Spektrensätze der 141 *Cronobacter*-Isolate wurden gegen eine MALDI-TOF MS-Datenbank mit 26 *Cronobacter* spp.-Einträgen abgeglichen und ausgewertet. Alle 141 untersuchten Isolate konnten erfolgreich auf Genusebene als *Cronobacter* spp. identifiziert werden. Die Bewertungszahlen lagen dabei in einem Bereich von 2,008 bis 2,587 (siehe Anhang).

4.2 Ergebnisse der biochemischen Charakterisierung

Bei der mikrobiologischen Untersuchung wurden anhand von verschiedenen biochemischen Reaktionen alle Isolate differenziert und dem jeweiligen Biotyp zugeordnet. Die Auswertung und Zuordnung der Isolate erfolgte nach den in Tabelle 4 zusammengestellten Kriterien.

Insgesamt wurden 213 von 259 der Isolate (82,2%) als *C. sakazakii* identifiziert. Die Mehrzahl dieser Isolate entsprachen Biotyp 1 (39,8%) bzw. Biotyp 2 (37,0%). Es folgten mit abnehmender Häufigkeit die Biotypen 8a (1,9%), 8 (0,8%) und 13 (0,8%). Fünf der als *C. sakazakii* identifizierten Isolate (1,9%) konnten keinem Biotyp eindeutig zugeordnet werden. Als zweithäufigste Spezies mit einem Anteil von 13,9% (36 von 259) der Isolate war *C. malonaticus* mit den Biotypen 5 (10,0%) und 9 (3,9%) vertreten. Neun Isolate (3,5%) wurden als *C. turicensis* (Biotyp 16) identifiziert, ein Isolat (0,4%) erwies sich als *C. muytjensii* (Biotyp 15).

Eine Übersicht der Ergebnisse der biochemischen Spezieszuordnung ist in Tabelle 25 zusammengestellt. Die Verteilung der einzelnen Spezies in die jeweiligen Biotypen ist in Tabelle 26 dargestellt.

Tabelle 25: Übersicht der biochemischen Spezieszuordnung

Spezies	Anzahl der Isolate	
	n	in %
<i>C. sakazakii</i>	213	82,2
<i>C. malonaticus</i>	36	13,9
<i>C. turicensis</i>	9	3,5
<i>C. mytjensii</i>	1	0,4
Σ	259	100

Tabelle 26: Biotypenverteilung der einzelnen Spezies

Spezies	Biotyp	Anzahl der Isolate	
		n	in %
<i>C. sakazakii</i>	1	103	39,8
	2	96	37,0
	8	2	0,8
	8a	5	1,9
	13	2	0,8
	keinem Biotyp zuzuordnen	5	1,9
<i>C. malonaticus</i>	5	26	10,0
	9	10	3,9
<i>C. turicensis</i>	16	9	3,5
<i>C. mytjensii</i>	15	1	0,4
Σ		259	100

Die Häufigkeitsverteilung der verschiedenen Spezies in Bezug auf die Herkunft der Isolate ist in Abbildung 1 dargestellt. Von den 213 Isolaten aus Säuglingsnahrungsmitteln (Herkunft: Deutschland bzw. Indonesien) wurden 183 (85,9%) Isolate als *C. sakazakii* und 30 (14,1%) als *C. malonaticus* identifiziert, andere Spezies waren hier nicht vertreten. Bei den Trockenteigwaren (n=14) handelte es sich bei der Mehrzahl der Isolate ebenfalls um *C. sakazakii* (n=10, 71,5%), zwei Isolate wurden als *C. turicensis* (14,3%) und je ein Isolat als *C. malonaticus* (7,1%) und *C. mytjensii* (7,1%) identifiziert. Bei den Fertigsalaten (n=10) konnten sechs Isolate als *C. turicensis* (60%) und vier Isolate als *C. sakazakii* (40%) identifiziert werden. Bei dem aus Müsli gewonnenen Isolat handelte es sich um *C. turicensis*. Bei den Milchtrockenerzeugnissen handelte es sich bei fünf Isolaten um *C. malonaticus* und bei drei Isolaten um *C. sakazakii*. Isolate aus dem Produktionsumfeld von Säuglingsnahrung herstellenden Betrieben (n=6), aus Stärkepulver (n=2), aus einer Wasserprobe und ohne Herkunftsangaben (n=4) wurden alle als *C. sakazakii* identifiziert.

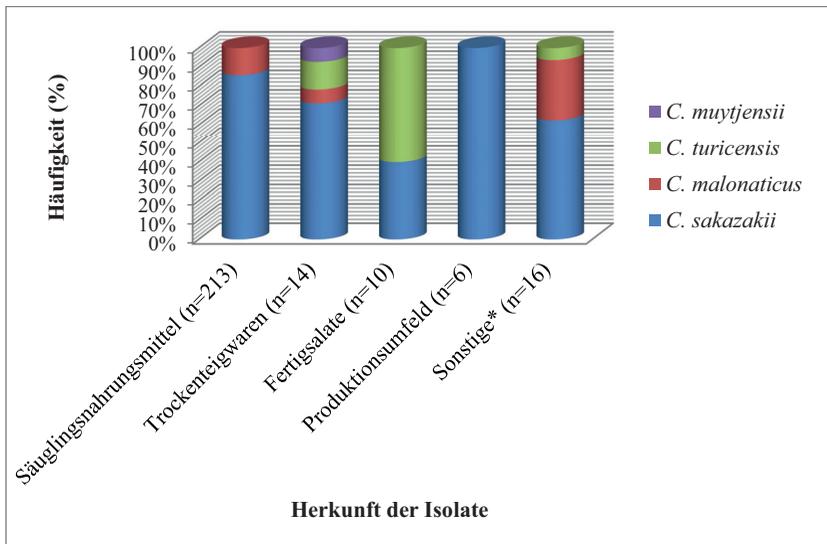


Abbildung 1: Speziesverteilung der Isolate in Abhängigkeit von der Herkunft aus verschiedenen Lebensmitteln bzw. anderen Probenmaterialien

*diätetische Lebensmittel (n=8), Müsli (n=1), Stärke (n=2), Wasser (n=1), ohne Herkunftsangaben (n=4)

4.3 Ergebnisse der Spezies-spezifischen PCR unter Verwendung des *rpoB*-Gens

Die Amplifizierung erfolgte nach den unter 3.2.4.3 beschriebenen Bedingungen. Zur Amplifizierung der Spezies-spezifischen Abschnitte des *rpoB*-Gens wurden die Oligonukleotidprimer nach STOOP et al. (2009) und LEHNER et al. (2012) verwendet (siehe Tabelle 12). Bei den Untersuchungen konnten alle Isolate mit der Spezies-spezifischen *rpoB*-Gen PCR differenziert werden. Dabei wurden insgesamt 217 Isolate als *C. sakazakii*, 33 als *C. malonaticus*, acht als *C. turicensis* und ein Isolat als *C. mytjensii* identifiziert. Eine Übersicht der Speziesidentifizierung ist in Tabelle 27 zusammengestellt.

Tabelle 27: Übersicht der Speziesidentifizierung mittels Spezies-spezifischer PCR unter Verwendung des *rpoB*-Gens

Spezies	Anzahl der Isolate	
	n	%
<i>C. sakazakii</i>	217	83,8
<i>C. malonaticus</i>	33	12,7
<i>C. turicensis</i>	8	3,1
<i>C. mytjensii</i>	1	0,4
Σ	259	100

Von den 259 untersuchten Isolaten mit dem Spezies-spezifischen Primerpaar für *C. sakazakii*, zeigten 96,5% (n=250) der Isolate ein typisches Amplikon mit einer einheitlichen Größe von 514 Bp (Abbildung 2). Mit dem Cmalf/Cmalr-Primerpaar zeigten 33 Isolate typische Amplikons mit einer Größe von 251 Bp (Abbildung 3). Mit dem Cturr/Cturr-Primerpaar reagierten acht Isolate positiv (Abbildung 4). Ein Isolat zeigte mit dem Spezies-spezifischen Primerpaar für *C. mytjensii* ein typisches Amplikon (Abbildung 5). Mit den Primerpaaren Cdubl/Cdubl, Cgenomf/Cgenomr und Cconf/Cconr

zeigten keine der untersuchten Isolate ein positives Ergebnis. Eine Übersicht der positiven Ergebnisse der einzelnen Spezies-spezifischen Primerpaare ist in Tabelle 28 zusammengestellt.

Tabelle 28: Übersicht der positiven PCR-Ergebnisse der Spezies-spezifischen Primerpaare

Primer- paar	Anzahl der untersuchten Isolate	Anzahl der Isolate mit einem positiven Ergebnis						
		C. <i>sakazakii</i>	C. <i>malonaticus</i>	C. <i>muytjensii</i>	C. <i>turicensis</i>	C. <i>dublinensis</i>	C. <i>universalis</i>	C. <i>condimenti</i>
Csakf/ Csakr	259	250	250	0	0	0	0	0
Cmalf/ Cmalr	259	0	33	0	0	0	0	0
Cmuyf/ Cmuyr	259	0	0	1	0	0	0	0
Cturf/ Cturr	174	0	0	0	8	0	0	0
Cdublff/ Cdublr	161	0	0	0	0	0	0	0
Cgenomf/ Cgenomr	165	0	0	0	0	0	0	0
Cconf/ Cconr	166	0	0	0	0	0	0	0

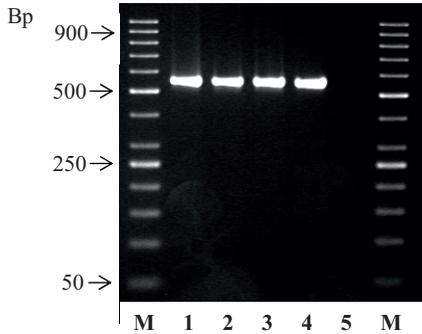


Abbildung 2: Typische Amplikons (514 Bp) des *C. sakazakii*-spezifischen Abschnitts des *rpoB*-Gens unter Verwendung der Oligonukleotidprimer Csakf und Csakr; (M = Marker GeneRuler® 50 bp DNA Ladder, 1 = Isolat 39a-2003, 2 = Isolat DB-53c, 3 = Isolat C67, 4 = Referenz-/Typstamm *C. sakazakii* ATCC 29544 = DSM 4485, 5 = Leerwert)

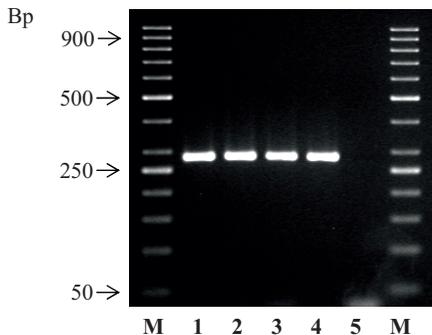


Abbildung 3: Typische Amplikons (251 Bp) des *C. malonaticus*-spezifischen Abschnitts des *rpoB*-Gens unter Verwendung der Oligonukleotidprimer Cmalf und Cmalr; (M = Marker GeneRuler® 50 Bp DNA ladder, 1 = Isolat 37a-2003, 2 = Isolat DB-84a/1-05, 3 = Isolat N6, 4 = Referenz-/Typstamm *C. malonaticus* E 825 = LMG 23826, 5 = Leerwert)

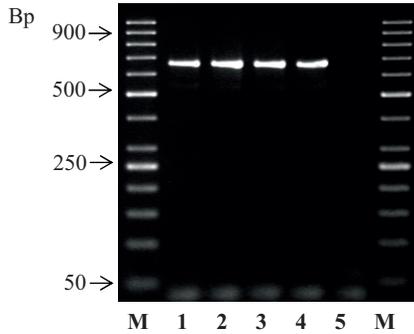


Abbildung 4: Typische Amplikons (628 Bp) des *C. turicensis*-spezifischen Abschnitts des *rpoB*-Gens unter Verwendung der Oligonukleotidprimer Cturf und Cturr; (**M** = Marker GeneRuler® 50 Bp DNA ladder, **1** = Isolat N35, **2** = Isolat C32, **3** = Isolat C102, **4** = Referenz-/Typstamm *C. turicensis* DSM 18703 = LMG 23827, **5** = Leerwert)

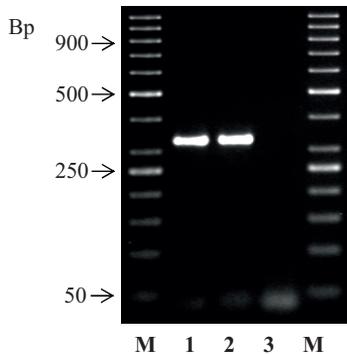


Abbildung 5: Typische Amplikons (330 Bp) des *C. mytjensii*-spezifischen Abschnitts des *rpoB*-Gens unter Verwendung der Oligonukleotidprimer Cmuyf und Cmuyr; (**M** = Marker GeneRuler® 50 Bp DNA ladder, **1** = Isolat N40, **2** = Referenz-/Typstamm *C. mytjensii* DSM 21870 = ATCC 51329, **3** = Leerwert)

4.4 Gegenüberstellung der Identifizierungsergebnisse der biochemischen Untersuchungen und der Spezies-spezifischen PCR

Da sich das bei der Spezies-spezifischen PCR erhobene Artenspektrum von dem der biochemischen Identifizierung unterschied, wurden im Folgenden die Ergebnisse beider Methoden verglichen.

Die Amplifizierung des Spezies-spezifischen Bereiches des *rpoB*-Gens lieferte bei 88,8% (n=230) der Isolate übereinstimmende Ergebnisse mit denen der Biochemie. 11,2% (n=29) der Isolate konnten nicht durch die Spezies-spezifische PCR nach STOOP et al. (2009) und LEHNER et al. (2012) bestätigt werden. Es wurden folgende Unterschiede festgestellt: 16 Isolate, die biochemisch als *C. malonaticus* identifiziert wurden, zeigten mit den Spezies-spezifischen Primern das für *C. sakazakii* typische Amplikon, jedoch keines mit den Spezies-spezifischen Primern für *C. malonaticus*. Zwölf Isolate, die biochemisch als *C. sakazakii*, und ein Isolat, das biochemisch als *C. turicensis* identifiziert wurden, zeigten mit den Spezies-spezifischen Primern das für *C. malonaticus* typische Amplikon.

Im Hinblick auf die Unterschiede zwischen der biochemischen und molekularbiologischen Differenzierung wurde bei einer Teilmenge dieser nicht eindeutig differenzierbaren Isolate ein spezifischer Bereich des *rpoB*-Gens sequenziert und im Vergleich zu zwölf *Cronobacter*-Typstämmen analysiert.

Eine detaillierte Darstellung der Untersuchungsergebnisse wird im Anhang wiedergegeben.

4.5 Ergebnisse der Sequenzanalyse des *rpoB*-Gens

Mit der Spezies-spezifischen PCR konnten alle Isolate einer Spezies zugeordnet werden. Einige Isolate zeigten jedoch im Vergleich zur der biochemischen Differenzierung Unterschiede hinsichtlich ihrer Spezieszuordnung. Besonders zwischen den genetisch eng verwandten Spezies *C. sakazakii* und *C. malonaticus* konnte nicht eindeutig differenziert

werden. Hierzu wurden ausgewählte Isolate (n=26, davon 18 Isolate, die nicht mit der Spezies-spezifischen PCR bestätigt werden konnten) mittels Sequenzanalyse untersucht, um die Nukleotidabfolge in einem bestimmten Abschnitt des *rpoB*-Gens betrachten zu können. Die *rpoB*-Gensequenzen dieser 26 Isolate wurden dann untereinander und mit zwölf *Cronobacter*-Typstämmen von der NCBI-Datenbank mittels Multisequenzalignment verglichen und analysiert. Die Amplifizierung des *rpoB*-Gens erfolgte nach der unter **3.2.5.2** beschriebenen Methodik und ergab eine Amplikongröße von 1088 Bp.

Um phylogenetische Beziehungen untereinander feststellen zu können, wurden die 26 sequenzierten Isolate vergleichend zu neun *Cronobacter*-Typstämmen sowie drei ehemaligen *Cronobacter*-Spezies, jetzt als *Siccibacter* und *Franconibacter* eingruppiert (STEPHAN et al., 2014), durch eine Dendrogrammanalyse bewertet (Abbildung 6). Mit der *rpoB*-Gen Sequenzanalyse konnten 15 Isolate (57,7%) einer Spezies zugeordnet werden, während elf Isolate (42,3%) nicht identifiziert werden konnten. Mittels Multisequenzalignment konnten innerhalb der Isolate acht verschiedene Cluster unterschieden werden. Diese Cluster enthalten ein bis zehn verschiedene Isolate. Zehn Isolate können mit demselben Cluster (Cluster 1) wie der *C. sakazakii*-Typstamm DSM 4485 eingeteilt werden. Zwei Isolate (36a-2003 und 37a-2003) bilden ein gemeinsames Cluster mit dem *C. malonaticus*-Typstamm DSM 18702 (Cluster 3). Die Isolate N35 und N160 bilden ein Cluster mit dem *C. turicensis*-Typstamm DSM 18703 (Cluster 7) und Isolat N40 mit dem *C. mutjensii*-Typstamm 21870 (Cluster 8). Die übrigen elf Isolate (in Abbildung 6 mit * markiert) bilden eigenständige Cluster, die keiner Spezies eindeutig zugeordnet werden können (Cluster 2 mit zwei Isolaten, Cluster 4 mit drei Isolaten, Cluster 5 mit einem Isolat und Cluster 6 mit fünf Isolaten).

Die vorübergehend dem Genus *Cronobacter* zugeordneten Stämme (*C. zurichensis*, *C. helveticus* und *C. pulveris*) ergaben deutliche Abweichungen, so dass ihre genetische Form zum Genus *Cronobacter* auch durch die in Abbildung 6 gezeigten Ergebnisse bestätigt wird. Heute werden diese drei Spezies zwei neuen Genera zugeordnet: *C. zurichensis* wird jetzt als *Siccibacter turicensis* bezeichnet. *C. helveticus* und *C. pulveris* werden jetzt dem Genus *Franconibacter* zugeordnet und werden entsprechend als *F. helveticus* und *F. pulveris* bezeichnet (STEPHAN et al., 2014).

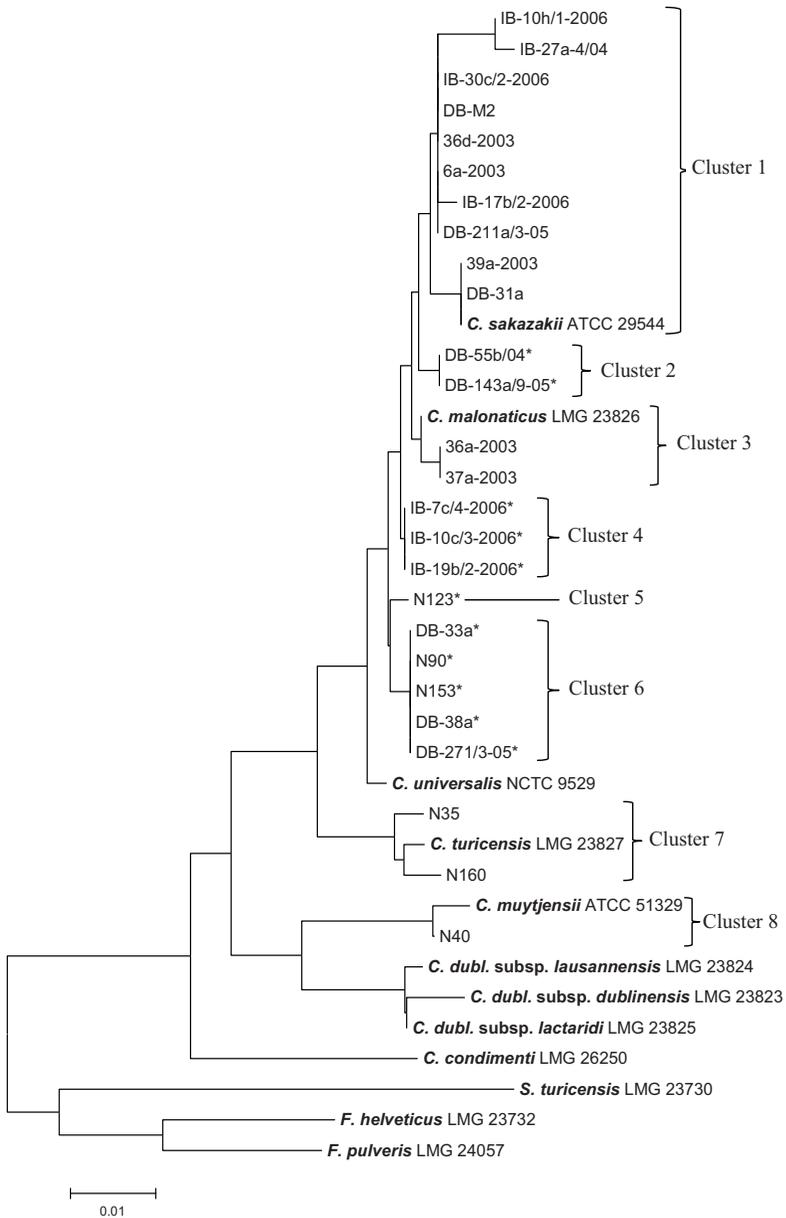


Abbildung 6: Dendrogrammanalyse (Neighbour-Joining Tree) der *rpoB*-Gen Sequenzen von ausgewählten Isolaten (n=26), *Cronobacter*-Typstämmen (n=9), *Siccibacter* (*S.*) *turicensis*, *Franconibacter* (*F.*) *helveticus* und *F. pulveris*. (MEGA Version 6.0; Gap open penalty: 15, Gap extension penalty: 6.66, Transition Weight: none, DNA Weight Matrix: IUB).

4.6 Gegenüberstellung der Identifizierungsergebnisse der biochemischen Untersuchungen, der Spezies-spezifischen PCR und der partiellen *rpoB*-Gen Sequenzanalyse

In Tabelle 29 sind die Isolate (n=8), die in allen drei Untersuchungen übereinstimmende Identifizierungsergebnisse aufweisen, zusammengefasst.

Tabelle 29: Vergleichende Darstellung der Isolate mit übereinstimmenden Identifizierungsergebnissen

Isolat	Biotyp ¹	Identifizierungsergebnisse		
		Biochemie ²	<i>rpoB</i> -PCR ³	Sequenzierung ⁴
39a-2003	1	<i>C. sakazakii</i>	<i>C. sakazakii</i>	<i>C. sakazakii</i>
6a-2003	2	<i>C. sakazakii</i>	<i>C. sakazakii</i>	<i>C. sakazakii</i>
IB-27a-4/04	2	<i>C. sakazakii</i>	<i>C. sakazakii</i>	<i>C. sakazakii</i>
37a-2003	5	<i>C. malonaticus</i>	<i>C. malonaticus</i>	<i>C. malonaticus</i>
36a-2003	9	<i>C. malonaticus</i>	<i>C. malonaticus</i>	<i>C. malonaticus</i>
N40	15	<i>C. mytjensii</i>	<i>C. mytjensii</i>	<i>C. mytjensii</i>
N35	16	<i>C. turicensis</i>	<i>C. turicensis</i>	<i>C. turicensis</i>
N160	16	<i>C. turicensis</i>	<i>C. turicensis</i>	<i>C. turicensis</i>

¹ nach FARMER et al. (1980) und IVERSEN et al. (2006); ² nach IVERSEN et al. (2006, 2007a); ³ nach STOOP et al. (2009) und LEHNER et al. (2012); ⁴ *rpoB*-Gen Sequenzanalyse nach MOLLET et al. (1997)

Eine vergleichende Darstellung der Isolate mit unterschiedlichen Identifizierungsergebnissen (n=18) erfolgt in Tabelle 30. Isolate (n=9), die biochemisch als *C. sakazakii* und mit der Spezies-spezifischen PCR als *C. malonaticus* identifiziert wurden, zeigten keine Clusterbildung mit den *Cronobacter*-Typstämmen und konnten keiner Spezies mittels *rpoB*-Gen Sequenzanalyse zugeordnet werden. Mit Ausnahme von einem Isolat (IB-10c/3-2006) sind Isolate (n=7), die biochemisch als *C. malonaticus* und mit der Spezies-spezifischen PCR als *C. sakazakii* identifiziert wurden, in Cluster 1 mit dem *C. sakazakii*-Typstamm gruppiert. Isolat N123 wurde biochemisch als *C. turicensis* und

mit der Spezies-spezifischen PCR als *C. malonaticus* identifiziert. Dieses Isolat bildet Cluster 5 (Abbildung 6).

Tabelle 30: Vergleichende Darstellung der Isolate mit unterschiedlichen Identifizierungsergebnissen

Isolat	Biotyp ¹	Identifizierungsergebnisse		
		Biochemie ²	<i>rpoB</i> -PCR ³	Sequenzierung ⁴
IB-7c/4-2006	1	<i>C. sakazakii</i>	<i>C. malonaticus</i>	n. i.
IB-19b/2-2006	1	<i>C. sakazakii</i>	<i>C. malonaticus</i>	n. i.
DB-38a	1	<i>C. sakazakii</i>	<i>C. malonaticus</i>	n. i.
DB-143a/9-05	1	<i>C. sakazakii</i>	<i>C. malonaticus</i>	n. i.
DB-271/3-05	1	<i>C. sakazakii</i>	<i>C. malonaticus</i>	n. i.
N90	1	<i>C. sakazakii</i>	<i>C. malonaticus</i>	n. i.
N153	1	<i>C. sakazakii</i>	<i>C. malonaticus</i>	n. i.
DB-55b/04	1	<i>C. sakazakii</i>	<i>C. malonaticus</i>	n. i.
DB-33a	2	<i>C. sakazakii</i>	<i>C. malonaticus</i>	n. i.
36d-2003	5	<i>C. malonaticus</i>	<i>C. sakazakii</i>	<i>C. sakazakii</i>
IB-10h/1-2006	5	<i>C. malonaticus</i>	<i>C. sakazakii</i>	<i>C. sakazakii</i>
IB-17b/2-2006	5	<i>C. malonaticus</i>	<i>C. sakazakii</i>	<i>C. sakazakii</i>
IB-30c/2-2006	5	<i>C. malonaticus</i>	<i>C. sakazakii</i>	<i>C. sakazakii</i>
DB-31a	5	<i>C. malonaticus</i>	<i>C. sakazakii</i>	<i>C. sakazakii</i>
DB-211a/3-05	5	<i>C. malonaticus</i>	<i>C. sakazakii</i>	<i>C. sakazakii</i>
DB-M2	5	<i>C. malonaticus</i>	<i>C. sakazakii</i>	<i>C. sakazakii</i>
IB-10c/3-2006	5	<i>C. malonaticus</i>	<i>C. sakazakii</i>	n. i.
N123	16	<i>C. turicensis</i>	<i>C. malonaticus</i>	n. i.

¹ nach FARMER et al. (1980) und IVERSEN et al. (2006); ² nach IVERSEN et al. (2006, 2007a); ³ nach STOOP et al. (2009) und LEHNER et al. (2012); ⁴ *rpoB*-Gen Sequenzanalyse nach MOLLET et al. (1997); n. i. = nicht identifizierbar

4.7 Ergebnisse der MLST

Mittels MLST wurden ausgewählte Isolate (n=14) analysiert und ihre Allelprofile mit der vorhandenen Datenbank verglichen. Die Allelsequenzen der sieben Housekeeping-Gene der untersuchten Isolate wurden in die Datenbank (<http://pubmlst.org/cronobacter/>) aufgenommen und aus den Allelnummern der Sequenztyp (ST) gebildet. Aus dem Abgleich der Allelprofile von sieben Housekeeping-Genen ergibt sich die Zuordnung zu phylogenetischen klonalen Komplexen bzw. einer Spezies. Die untersuchten Isolate sind unter den aufgelisteten ID-Nummern (Tabelle 31) in der Datenbank hinterlegt.

Elf Isolate konnten einem Sequenztyp eindeutig zugeordnet werden. Bei drei Isolaten (N51, N40, C102) konnte das Gen *glbB* nicht sequenziert und somit kein ST ermittelt werden. Insgesamt wurden elf verschiedene Sequenztypen (STs) nachgewiesen. Darunter befanden sich sieben STs, die erstmals im Rahmen dieser Studie beschrieben wurden (ST243, ST248, ST249, ST250, ST251, ST252, ST253). Bei den bereits bekannten STs handelte es sich um ST4, ST20, ST64 und ST138. In Tabelle 31 sind die Ergebnisse der MLST-Analyse zusammengestellt.

Tabelle 31: Ergebnisse der MLST

ID-Nr. ¹	Isolat	Biotyp ²	Herkunft	Allelnummer						Sequenztyp (ST)	Spezies gemäß MLST	
				<i>atpD</i>	<i>fusA</i>	<i>glnS</i>	<i>gltB</i>	<i>gyrB</i>	<i>infB</i>			<i>pps</i>
673	39a-2003	1	IB	19	16	19	41	120	15	23	243	<i>C. sakazakii</i>
674	DB-38a	1	DB	3	15	28	22	5	117	19	248	<i>C. sakazakii</i>
675	DB-55b/04	1	DB	16	14	24	17	25	33	25	20	<i>C. sakazakii</i>
676	DB-73a/2-05	1	DB	5	1	3	3	5	5	4	4	<i>C. sakazakii</i>
677	N51	1	TTW	15	14	15	n.i.	22	5	16	n.i.	<i>C. sakazakii</i>
678	DB-53c	2	DB	15	8	13	94	99	118	126	249	<i>C. sakazakii</i>
679	DB-M2	5	DB	16	8	13	40	15	15	10	64	<i>C. sakazakii</i>
680	37a-2003	5	IB	57	7	25	8	72	40	89	138	<i>C. malonaticus</i>
681	36a-2003	9	IB	3	13	102	8	77	119	154	250	<i>C. malonaticus</i>
682	N40	15	TTW	26	87	103	n.i.	121	120	155	n.i.	<i>C. mytilensis</i>
683	N35	16	TTW	36	22	57	124	46	18	156	251	<i>C. turicensis</i>
684	C32	16	S	86	22	104	120	117	116	152	252	<i>C. turicensis</i>
685	C102	16	S	87	88	105	n.i.	122	121	157	n.i.	<i>C. turicensis</i>
686	N123	16	M	88	89	106	125	123	122	158	253	<i>C. turicensis</i>

¹ Identitätsnummer der MLST-Datenbank (<http://pubmlst.org/cronobacter/>); ² nach FARMER et al. (1980) und IVERSEN et al. (2006)

n. i. = nicht identifizierbar; IB = indonesische Säuglingsnahrung; DB = deutsche Säuglingsnahrung; TTW = Trockenteigwaren; S = Fertigsalat; M = Müsli

4.8 Ergebnisse der Makrorestriktionsanalyse

Zur Darstellung der klonalen Beziehungen zwischen den verschiedenen Isolaten wurde das Genom von 135 Isolaten mittels der Restriktionsendonuklease *Xba*I in unterschiedlich große DNA-Fragmente geschnitten und anschließend unter Verwendung des CHEF-DR® II-PFGE Systems (BioRad) untersucht. Die Makrorestriktionsanalyse der chromosomalen DNA erfolgte nach der unter 3.2.7 beschriebenen Methodik. Das verwendete Restriktionsenzym *Xba*I ergab für alle 135 Isolate reproduzierbare DNA-Fingerprintmuster. Nach Auftrennung der DNA-Fragmente konnten für *C. sakazakii* 78, für *C. malonaticus* 14 und für *C. turicensis* sieben PFGE-Typen (insgesamt 99 Restriktionsmuster) unterschieden werden. Die Anzahl der jeweiligen Fragmente (Banden) lag je nach Isolat zwischen acht und 16.

In den Abbildungen 7 und 8 werden exemplarisch die Restriktionsmuster von 18 verschiedenen Isolaten dargestellt.

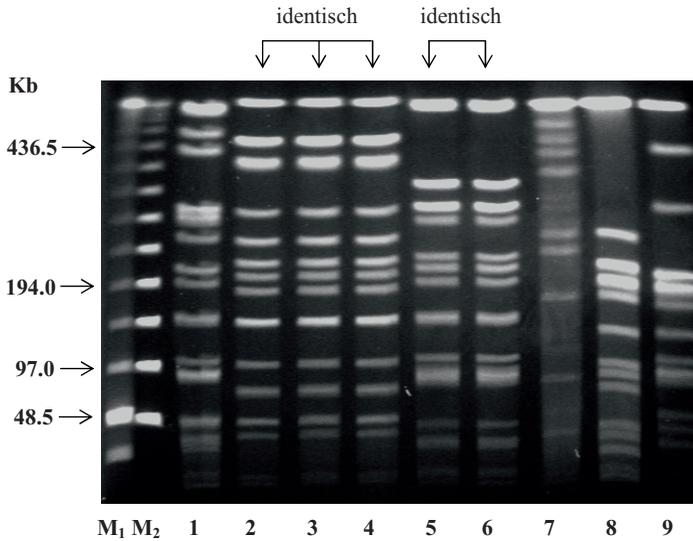


Abbildung 7: Verschiedene Restriktionsmuster von *C. sakazakii*- und *C. malonaticus*-Isolaten (n=9) aus deutscher Säuglingsnahrung nach Verdau der genomischen DNA mit der Restriktionsendonuklease *Xba*I

M₁: „low range“ PFGE Marker (0,1 – 200 Kb)

M₂: „lambda ladder“ PFGE Marker (50 – 1000 Kb)

Spur 1: *C. sakazakii* DB-80c/5-05, Hersteller H11, Probe 43

Spur 2 – 4: drei identische *C. malonaticus*-Isolate aus derselben Probenpackung (2: DB-84a/6-05, 3: DB-84b/4-05, 4: DB-84c/4-05), Hersteller H13, Probe 45

Spur 5 – 6: zwei identische *C. sakazakii*-Isolate aus derselben Probenpackung (5: DB-89c/1-05, 6: DB-89c/6-05), Hersteller H7, Probe 46

Spur 7: *C. sakazakii* DB-41c, Hersteller H6, Probe 35

Spur 8: *C. sakazakii* DB-42a/04, Hersteller H7, Probe 36

Spur 9: *C. sakazakii* DB-129a/1-05, Hersteller H7, Probe 48

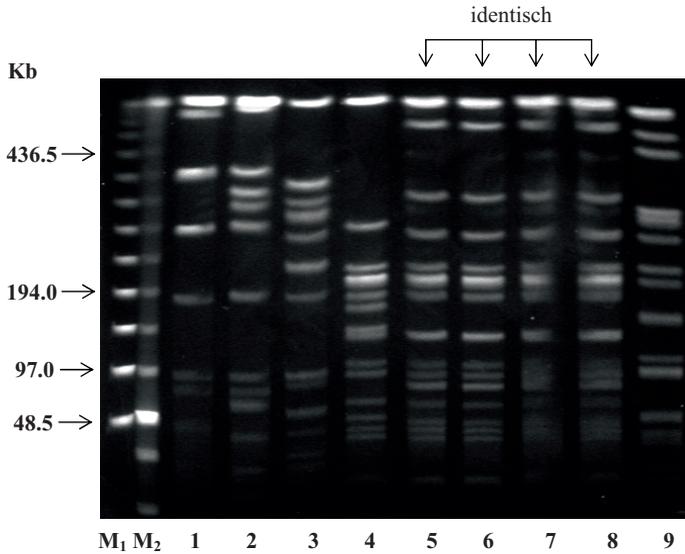


Abbildung 8: Verschiedene Restriktionsmuster von *C. sakazakii*-Isolaten aus indonesischer (n=2, Spur 1 und 2) und deutscher (n=7, Spur 3 bis 9) Säuglingsnahrung nach Verdau der genomischen DNA mit der Restriktionsendonuklease *Xba*I

M₁: „*lambda ladder*“ PFGE Marker (50 – 1000 Kb)

M₂: „*low range*“ PFGE Marker (0,1 – 200 Kb)

Spur 1: *C. sakazakii* 7a-2003, Hersteller H1, Probe 2

Spur 2: *C. sakazakii* 50a-2003 Hersteller H2, Probe 8

Spur 3: *C. sakazakii* DB-1b-04 Hersteller H5, Probe 27

Spur 4: DB-65c/1-05 Hersteller H5, Probe 40

Spur 5 – 8: vier identische *C. sakazakii*-Isolate aus derselben Probenpackung (5: DB-74c/1-05, 6: DB-74c/2-05, 7: DB-74c/6-05, 8: DB-74c/9-05), Hersteller H10, Probe 42

Spur 9: *C. sakazakii* DB-80c/1-05 Hersteller H11, Probe 43

Die Analyse der Verwandtschaft, basierend auf der Ähnlichkeit der Restriktionsmuster (Verwandtschaftsgrad 95%), wurde mithilfe der Computer-Software BioNumerics (Version 5.1, Applied Maths, Belgien) ausgewertet. Die Restriktionsmuster der Isolate einer Spezies wurden miteinander verglichen. In Tabelle 32 ist eine Übersicht der untersuchten Isolate mittels Makrorestriktionsanalyse zusammengestellt. Insgesamt wurden 135 Isolate aus 84 unterschiedlichen Proben von 43 verschiedenen Herstellern untersucht. Bei den untersuchten Isolaten handelte es sich um die Spezies *C. sakazakii* (n=105), *C. malonaticus* (n=23) und *C. turicensis* (n=7). Insgesamt konnten 99 verschiedene PFGE-Typen unterschieden werden, wobei 22 PFGE-Typen mehrere Isolate enthielten. Vertreter der anderen *Cronobacter*-Spezies waren nicht unter den geprüften Isolaten vertreten.

Tabelle 32: Übersicht der mittels Makrorestriktionsanalyse untersuchten Isolate

Spezies	Anzahl der Isolate	Anzahl der PFGE-Typen	Anzahl der Probenpackungen	Anzahl der Hersteller
<i>C. sakazakii</i>	105	78	64	29
<i>C. malonaticus</i>	23	14	13	8
<i>C. turicensis</i>	7	7	7	6
Σ	135	99	84	43

Hinsichtlich der Restriktionsmuster konnten bei den Spezies *C. sakazakii*, *C. malonaticus* und *C. turicensis* eine große genetische Vielfalt dargestellt werden. Bei den untersuchten *Cronobacter*-Isolaten zeigten verschiedene Isolate unterschiedlicher Herkunft deutlich verschiedene Restriktionsmuster auf (Abbildungen 9–11).

Bei Betrachtung der Isolate aus deutschen und indonesischen Säuglingsnahrungsmitteln (n=98) traten bei verschiedenen Probenpackungen unterschiedlicher Hersteller in allen Fällen unterschiedliche Restriktionsmuster auf. Bei Isolaten aus derselben Probenpackung handelte es sich meistens um identische Isolate (Beispiele in den Abbildungen 9 und 10, Box I). Auffällig war jedoch, dass in einigen Fällen auch mehrere Isolate aus derselben Packung unterschiedliche Restriktionsmuster aufwiesen, wie das Beispiel in Abbildung 9, Box II zeigt. Dabei handelte es sich teilweise sogar um verschiedene Spezies (Beispiele in den Abbildungen 9 und 10, Box III).

Aus verschiedenen Probenpackungen eines Herstellers wurden überwiegend Isolate mit unterschiedlichen Restriktionsmustern isoliert. Allerdings traten bei verschiedenen Probenpackungen eines Herstellers auch Isolate mit identischen Restriktionsmustern auf (Beispiel in Abbildung 9, Box VI). Das trat sowohl bei Isolaten aus Säuglingsnahrungsmitteln deutscher und indonesischer Herkunft, als auch bei den diätetischen Milchprodukten (n=5) auf (Beispiel in Abbildung 10, Box VI).

Die Restriktionsmuster von Isolaten aus Trockenteigwaren (n=13), Salaten (n=9), Stärke (n=2), Müsli (n=1) und Wasser (n=1) waren hiervon deutlich verschieden. Mit der Ausnahme von zwei identischen Isolaten wiesen Isolate aus dem Produktionsumfeld von Säuglingsnahrung herstellenden Betrieben (n=6) ebenfalls deutliche Unterschiede hinsichtlich ihrer Restriktionsmuster auf.

Eine detaillierte Darstellung der ermittelten PFGE-Typen ist im Anhang zusammengestellt.

C. sakazakii

Dice (Tol 1.0%-1.0%) (H>0.0% S>0.0%) [0.0%-100.0%]

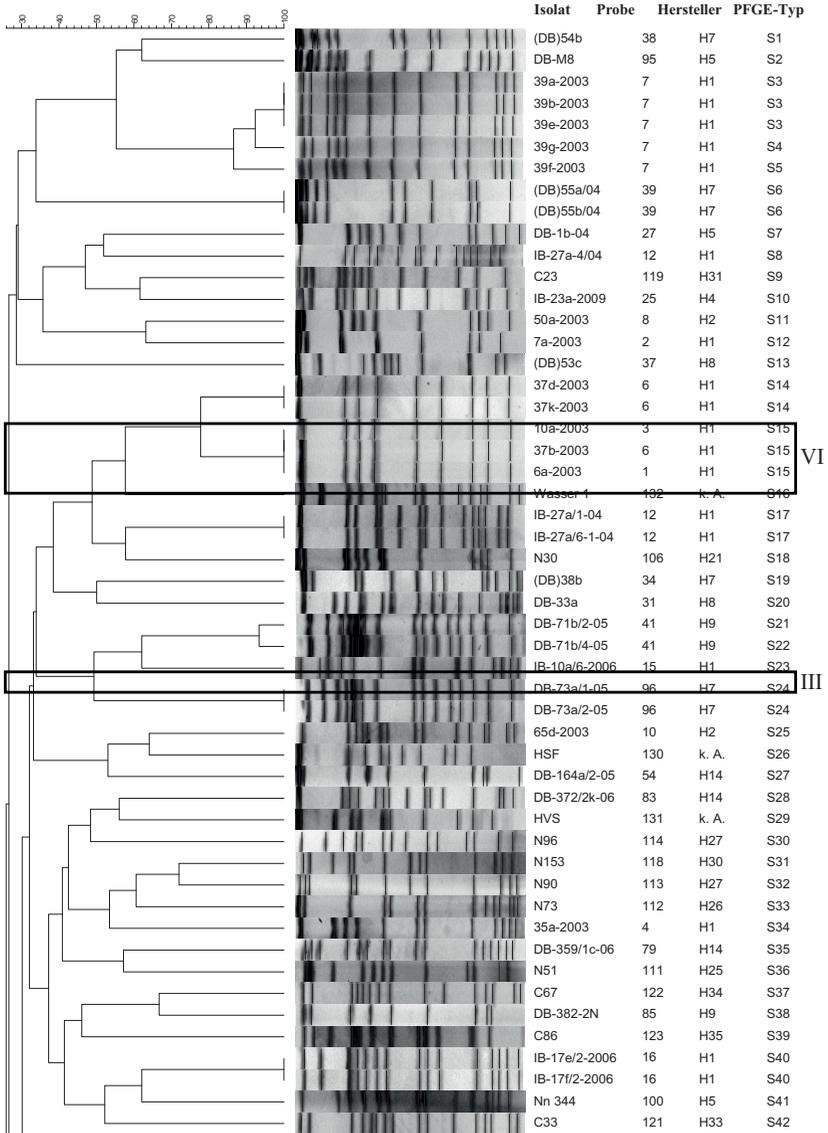
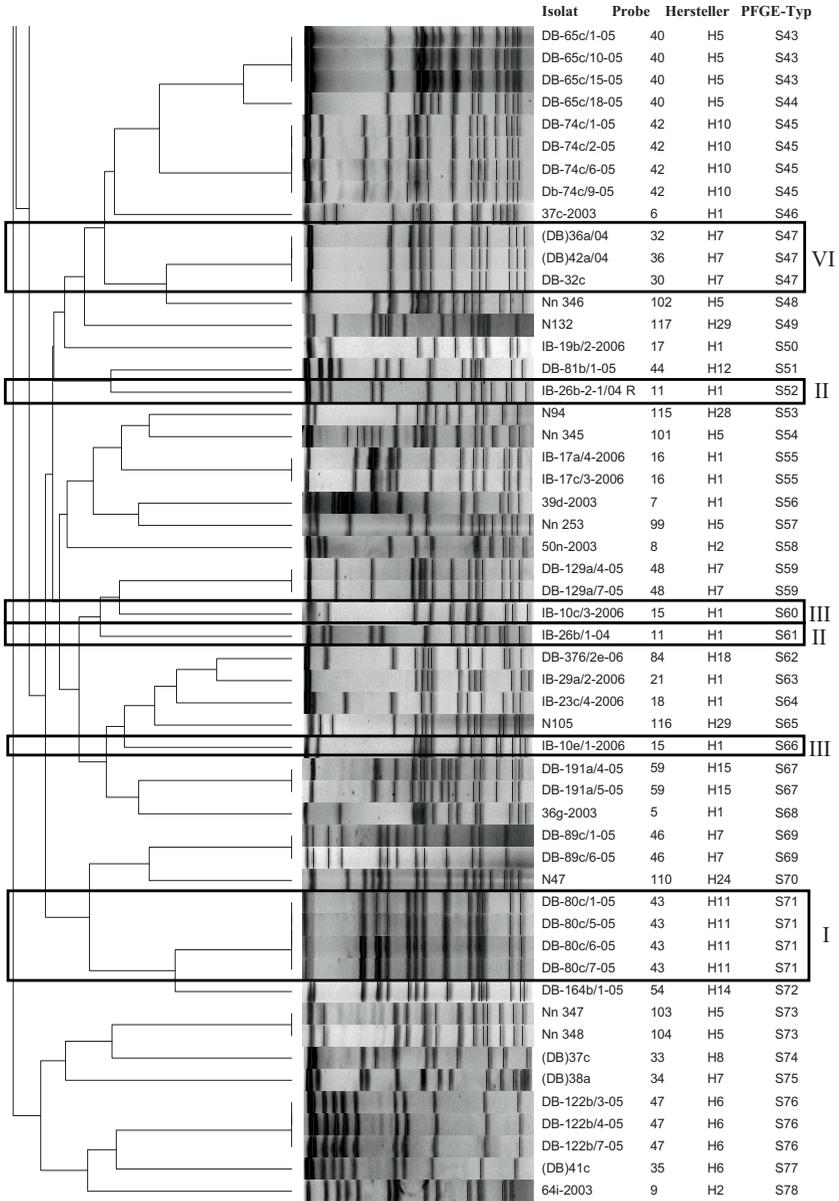


Abbildung 9: Dendrogrammanalyse der *Xba*I-Makrorestriktionsmuster ausgewählter *C. sakazakii*-Isolate



Fortsetzung Abbildung 9

Fortsetzung **Abbildung 9:**

Die mit Boxen markierten Ergebnisse zeigen:

Box I: Isolate aus derselben Probenpackung mit identischen Restriktionsmustern

Box II: Isolate aus derselben Probenpackung mit unterschiedlichen Restriktionsmustern

Box III: Isolate aus derselben Probenpackung mit unterschiedlichen Restriktionsmustern mit unterschiedlicher Spezieszuordnung (siehe auch Abbildung 10)

Box IV: Isolate aus unterschiedlichen Probenpackungen eines Herstellers mit identischen Restriktionsmustern

C. malonicus

Dice (Tol 1.0%-1.0%) (H>0.0% S>0.0%) [0.0%-100.0%]

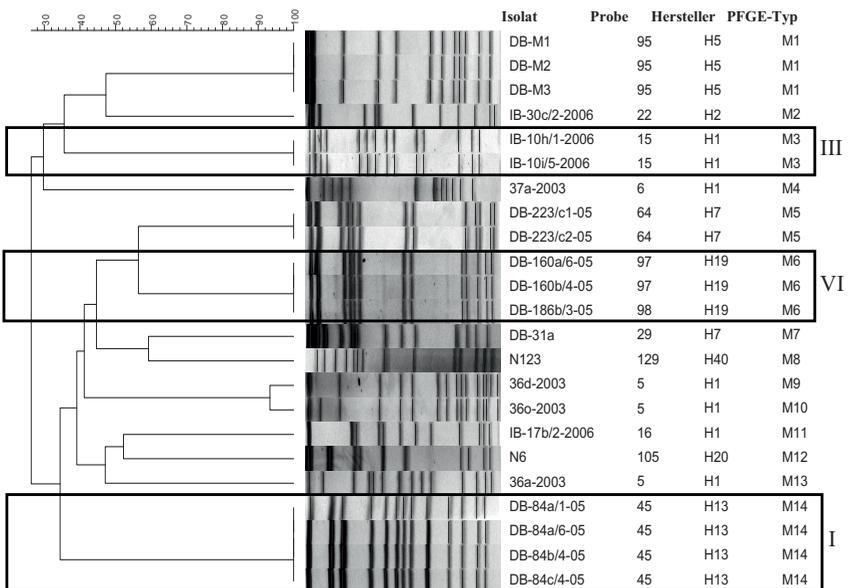


Abbildung 10: Dendrogrammanalyse der *XbaI*-Makrorestriktionsmuster ausgewählter *C. malonicus*-Isolate

Die mit Boxen markierten Isolate zeigen:

Box I: Isolate aus derselben Probenpackung mit identischen Restriktionsmustern

Box III: Isolate aus derselben Probenpackung mit unterschiedlichen Restriktionsmustern mit unterschiedlicher Spezieszuordnung (siehe Abbildung 9)

Box IV: Isolate aus unterschiedlichen Probenpackungen eines Herstellers mit identischen Restriktionsmustern

C. turicensis

Dice (Tol 1.0%-1.0%) (H>0.0% S>0.0%) [0.0%-100.0%]

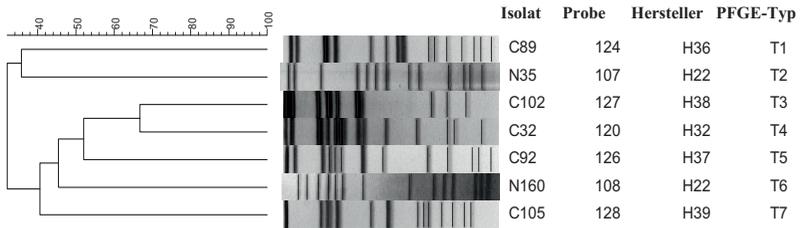


Abbildung 11: Dendrogrammanalyse der *Xba*I-Makrorestriktionsmuster ausgewählter *C. turicensis*-Isolate aus verschiedenen Probenpackungen mit unterschiedlichen Restriktionsmustern.

5 DISKUSSION

Cronobacter spp. (früher *Enterobacter sakazakii*) sind gramnegative, fakultativ anaerobe, bewegliche Stäbchenbakterien aus der Familie *Enterobacteriaceae*. Die Gattung *Cronobacter* wurde erstmals 2008 von IVERSEN et al. (2008a) beschrieben. Seit dieser Neuklassifizierung werden regelmäßig neue molekularbiologische Nachweis- und Identifizierungsmethoden zur Speziesdifferenzierung entwickelt.

In diesem Zusammenhang besteht derzeit die Schwierigkeit, dass die taxonomische Einordnung von Spezies zur Gattung *Cronobacter* noch starken Veränderungen unterworfen ist. So wurden von IVERSEN et al. (2007a) bei der Etablierung des Genus *Cronobacter* fünf Spezies beschrieben. Neben *C. sakazakii* subsp. *sakazakii* und *C. sakazakii* subsp. *malonaticus* waren dies *C. turicensis*, *C. mytzensii*, *C. dublinensis* und *C. genomospecies* I. Bereits ein Jahr später korrigierten IVERSEN et al. (2008a) diese Einteilung. *C. sakazakii* und *C. malonaticus* wurden als jeweils eigenständige Spezies eingestuft, *C. dublinensis* und *C. genomospecies* wurden dagegen zusammengefasst zu *C. dublinensis* mit drei Subspezies, *C. dublinensis* subsp. *dublinensis*, *C. dublinensis* subsp. *lausannensis* und *C. dublinensis* subsp. *lactaridi*. Somit umfasste das Genus *Cronobacter* sieben Spezies bzw. Subspezies. Einige Jahre später beschrieben JOSEPH et al. (2012a) zwei weitere *Cronobacter*-Spezies, *C. condimenti* sowie *C. universalis*. Damit umfasste das Genus *Cronobacter* nunmehr neun Spezies/Subspezies. BRADY et al. (2013) schlugen kurz darauf vor, *Enterobacter turicensis*, *E. helveticus* und *E. pulveris* als *C. zurichensis*, *C. helveticus* und *C. pulveris* dem Genus hinzuzufügen, womit das Genus *Cronobacter* auf insgesamt 12 Spezies/Subspezies anwuchs. Ein Jahr später widersprachen STEPHAN et al. (2014) jedoch dieser Erweiterung und sprachen *C. pulveris* und *C. zurichensis* dem neuen Genus *Franconibacter* zu, *C. pulveris* wurde in das neue Genus *Siccibacter* eingeordnet (STEPHAN et al. 2014). Diese Änderungen fanden teilweise innerhalb des Zeitraums der experimentellen Arbeiten an dieser Dissertation statt, weshalb gerade die Ergebnisse der molekularbiologischen Untersuchungsverfahren mehrfach uminterpretiert werden mussten. Derzeit (Juni 2017) weist das Genus *Cronobacter* sieben konsolidierte Spezies auf (*C. sakazakii*, *C. malonaticus*, *C. turicensis*, *C. mytzensii*, *C. condimenti*, *C. universalis*, *C. dublinensis*), wobei für *C. dublinensis* drei Subspezies existieren. Aufgrund des bisherigen Verlaufs der taxonomischen Einstufung sind jedoch in der Zukunft weitere

Änderungen zu erwarten. Letztlich waren in den eigenen Untersuchungen jedoch lediglich vier Spezies von Bedeutung, *C. sakazakii* und *C. malonaticus* sowie, mit deutlich geringerer Relevanz, *C. turicensis* und *C. mytzensis*.

Cronobacter spp. sind in der Umwelt und in Lebensmitteln pflanzlicher und tierischer Herkunft weit verbreitet. Im Hinblick auf die Überwachung und Prävention von lebensmittelbedingten Erkrankungen, verursacht durch *Cronobacter* spp., ist eine schnelle und sichere Identifizierung essentiell. *Cronobacter* spp. sind opportunistische Krankheitserreger, die vor allem bei Neugeborenen und Säuglingen, aber auch bei immungeschwächten und älteren Menschen schwere Allgemeinerkrankungen hervorrufen können. Aufgrund der Tatsache, dass bisher nur die Spezies *C. sakazakii*, *C. malonaticus* und *C. turicensis* mit neonatalen Erkrankungen in Verbindung gebracht worden (KUCEROVA et al., 2010), ist die Speziesdifferenzierung für epidemiologische Studien sehr interessant und könnte auch für die Risikobewertung von *Cronobacter* spp. in Säuglingsnahrung eine Rolle spielen.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Variabilität und relative Häufigkeit verschiedener *Cronobacter*-Spezies in Säuglingsnahrungsmitteln sowie in einigen anderen Lebensmitteln des deutschen Marktes und des Produktionsumfeldes von Säuglingsnahrung herstellenden Betrieben zu untersuchen und die Häufigkeitsverteilung der einzelnen Spezies darzustellen. Zudem sollten die verschiedenen Differenzierungsmöglichkeiten untereinander verglichen und auf ihre Routinetauglichkeit getestet werden.

5.1 Identifizierung mittels MALDI-TOF MS

Die MALDI-TOF MS stellt eine schnelle Methode zur Identifizierung und Differenzierung von *Cronobacter* spp. dar, im Rahmen der methodischen Grenzen (Erfordernis einer umfangreichen Datenbank zu jeder Spezies) liefert sie an sich zuverlässige Ergebnisse (STEPHAN et al., 2010; LEHNER et al., 2011). Sie gehört mittlerweile zu den Schlüsseltechnologien der Proteinanalytik und auch der Bakterienidentifizierung (LEHNER et al., 2013). Durch sehr kurze Analysezeiten, einfache Handhabung der Proben und der Möglichkeit des direkten Vergleichs zwischen charakteristischen Spektren, ist sie zu einer wichtigen Methode für die Identifizierung und Klassifizierung von

Mikroorganismen geworden (HOLLAND et al., 1996; STEPHAN et al., 2010; PAVLOVIC et al., 2011).

STEPHAN et al. (2010) beschrieben als erstes die Identifizierung von *Cronobacter* spp. mit der MALDI-TOF MS Technik und entwickelten eine Referenzdatenbank mit 54 Einträgen zu *Cronobacter* spp.. Mittels unterschiedlicher Massenspektren von verschiedenen *Cronobacter*-Spezies lassen sich die einzelnen Spezies sehr gut und sicher voneinander unterscheiden (LEHNER et al., 2013).

In der vorliegenden Arbeit erbrachte die Überprüfung der ausgewählten Isolate (n=141) mittels MALDI-TOF MS auf Gattungsebene gute Ergebnisse. Alle untersuchten Isolate konnten dem Genus *Cronobacter* zugeordnet werden. Eine weitere Identifizierung auf Speziesebene wurde in dieser Arbeit nicht durchgeführt, da die Referenzdatenbank hierfür nicht ausreichend war.

In anderen Studien zur Identifizierung von *Cronobacter* spp. mittels MALDI-TOF waren ebenfalls gute Identifizierungsergebnisse auf Genusebene möglich. JAVŮRKOVÁ et al. (2012) zeigten in einer Studie, dass die MALDI-TOF MS eine gute Methode für den Nachweis von *Cronobacter* spp. in pulverförmige Säuglingsnahrung darstellt. In einer Vergleichsarbeit von ZHU et al. (2011) wird MALDI-TOF MS im Hinblick auf die Identifizierung von *Cronobacter* spp. unter nahverwandten *Enterobacteriaceae* ebenfalls als eine schnelle und eindeutige Methode beschrieben.

Im Hinblick auf die Identifizierung auf Speziesebene zeigten CETINKAYA et al. (2013) in einer Studie anhand von zwei *Cronobacter*-Isolaten die Diskrepanz zwischen MALDI-TOF MS einerseits und 16S rRNA- und *fusA*-Gen-Sequenzanalyse andererseits. Ein wesentlicher Nachteil der MALDI-TOF MS liegt vor allem in der Abhängigkeit der erhaltenen Spektren von den Kultivierungsbedingungen (PAVLOVIC et al., 2011). Die charakteristischen Massenspektren wurden durch unterschiedliche Wachstumsbedingungen (wie Nährmedien, Bebrütungsdauer und -temperatur) und Probenanreicherungen stark beeinflusst (WANG et al., 1998). Nach Anzucht auf CASO-Agar für 48 h wurden dagegen gut reproduzierbare Ergebnisse erzielt (STEPHAN et al., 2010; KARAMONOVÁ et al., 2013).

Ergänzend zu den anderen Verfahren stellt die MALDI-TOF MS dennoch eine gute Methode für die Identifizierung auf Gattungsebene dar. Um eine Reproduzierbarkeit der

Spezies-spezifischen Massenspektren zu gewährleisten, ist jedoch eine hohe Standardisierung der Methodik erforderlich. Insbesondere ist für eine sichere Differenzierung auf Speziesebene eine zuverlässige und umfassende Referenzdatenbank mit allen Spezies der Gattung *Cronobacter* essentiell (PAVLOVIC et al., 2011; ZHU et al., 2011).

5.2 Biochemische Charakterisierung

In den vorliegenden Untersuchungen wurden alle Isolate (n=259) aufgrund der vier relevanten biochemischen Reaktionen (IVERSEN et al., 2006; 2007a) zur Differenzierung von *Cronobacter* spp. (Säurebildung über Dulcitol und myo-Inositol, Indolbildung und Malonatverwertung) vorläufig in vier Spezies eingeteilt. Dominierend war hierbei *C. sakazakii* (n=213), *C. malonaticus* (n=36), *C. turicensis* (n=9) und *C. mytjensii* (n=1).

Die Einteilung der Biotypen erfolgte nach FARMER et al. (1980) bzw. nach IVERSEN et al. (2006), basierend auf folgenden biochemischen Reaktionen: Acetoinbildung (Voges-Proskauer-Test), Methylrot-Test, Nitrat-Reduktion, Ornithinverwertung (Ornithin-Decarboxylase), Beweglichkeitsprüfung (Motilität), Säurebildung über Kohlenhydrate (Dulcitol und myo-Inositol), Indolbildung, Malonatverwertung und die Gasbildung aus D-Glukose.

Zusammengefasst zeigen diese Ergebnisse die Dominanz der Spezies *C. sakazakii* der Biotypen 1 und 2. Ähnliche Ergebnisse wurden auch in anderen Studien beschrieben (FARMER et al., 1980, IVERSEN et al., 2006, MILED-BENNOUR et al., 2010; TURCOVSKÝ et al., 2011; HOCHÉL et al., 2012; GIČOVÁ et al., 2013).

Durch die Einführung der neuen Spezies *C. condimenti* und *C. universalis* (JOSEPH et al., 2012a) ist jedoch eine eindeutige und zuverlässige Differenzierung mit biochemischen Reaktionen nach FARMER et al. (1980) und IVERSEN et al. (2006) nicht mehr möglich, auch wenn diese beiden Spezies bisher nur selten nachgewiesen wurden.

Auch durch Beschränkungen in der Reproduzierbarkeit und durch die Variabilität einzelner Stoffwechseleigenschaften wurde die rein phänotypisch-biochemische Charakterisierung mittlerweile durch verschiedene molekularbiologische Methoden abgelöst und spielt für

die Speziesdifferenzierung keine Rolle mehr (JOSEPH & FORSYTHE, 2012; JOSEPH et al., 2013).

In einer Studie von JOSEPH et al. (2013) wurden 163 *Cronobacter*-Isolate hinsichtlich ihrer Biotypen und MLST-Sequenztypen untereinander verglichen. Lediglich 17 der 31 Biotypenvarianten traten bei fünf von sieben berücksichtigten *Cronobacter*-Spezies auf. Für die Spezies *C. mytjensii* und *C. dublinensis* konnten keine spezifischen Biotypen festgestellt werden. Demnach stellt die biochemische Untersuchung von *Cronobacter* spp. nur noch eine Identifizierung hinsichtlich des Biotyps und keine Unterscheidung auf Speziesebene dar. Für künftige epidemiologische Untersuchungen könnte der Biotyp dennoch eine Rolle spielen, da vermutlich nur wenige Biotypen im Zusammenhang mit Erkrankungen auftauchen.

5.3 Molekularbiologische Charakterisierung

Für den Nachweis von *Cronobacter* spp. sind zahlreiche PCR-Methoden in der Literatur beschrieben worden (LEHNER et al., 2004; SEO & BRACKETT, 2005; DERZELLE & DILASSER, 2006; LEHNER et al., 2006a; LIU et al., 2006; MOHAN NAIR & VENKITANARAYANAN, 2006; HASSAN et al., 2007; KANG et al., 2007; KOTHARY et al., 2007; HYEON et al., 2010; JARVIS et al., 2011). Für die Differenzierung von *Cronobacter*-Spezies wurden ebenfalls mehrere Spezies-spezifische PCR-Systeme beschrieben, basierend auf dem *rpoB*-Gen (STOOP et al., 2009; LEHNER et al., 2012) sowie eine kombinierte PCR-RFLP-Analyse (STRYDOM et al., 2011) und eine Multiplex-PCR, basierend auf dem *cgcA*-Gen (CARTER et al., 2013). In der vorliegenden Studie wurde das auf dem Nachweis des *rpoB*-Gens basierende PCR-Verfahren für die Differenzierung der *Cronobacter*-Isolate herangezogen. Mittels dieser Methode konnten alle Isolate differenziert werden. Dabei wurden 217 (83,8%) Isolate als *C. sakazakii*, 33 (12,7%) als *C. malonaticus*, acht (3,1%) als *C. turicensis* und ein (0,4%) Isolat als *C. mytjensii* identifiziert.

Zur eindeutigen Differenzierung zwischen den beiden wichtigsten Spezies, *C. sakazakii* und *C. malonaticus*, muss jedoch ein Zwei-Stufen-PCR-Verfahren angewendet werden, da beide Spezies mit dem *C. sakazakii*-Primerpaar ein identisches Amplikon (514 Bp) zeigen.

Für die Unterscheidung ist hier daher eine zweite PCR mit einem Spezies-spezifischen Primerpaar für *C. malonaticus* notwendig. Isolate, die zusätzlich ein typisches Amplikon mit dem *C. malonaticus*-Primerpaar (251 Bp) aufweisen, werden der Spezies *C. malonaticus* zugeordnet (STOOP et al., 2009). Damit erhöht sich der Untersuchungsaufwand beträchtlich, da *C. sakazakii* und *C. malonaticus* in der Mehrzahl der Fälle mehr als 90% der Befunde ausmachen.

In einigen Studien wurde die Spezies-spezifische PCR nach STOOP et al. (2009) zur Bestätigung der biochemischen Speziesidentifizierung herangezogen und lieferte übereinstimmende Ergebnisse (JARVIS et al., 2011; FRANCO et al., 2011; GRIM et al., 2012; MOZROVÁ et al., 2014).

In der vorliegenden Arbeit lieferte die Amplifizierung des Spezies-spezifischen Bereiches des *rpoB*-Gens in 88,8% (n=230) übereinstimmende Ergebnisse mit denen der Biochemie. In einem erheblichen Anteil der Isolate konnte damit jedoch keine Übereinstimmung festgestellt werden. Am häufigsten wurden Diskrepanzen für die Spezies *C. sakazakii* und *C. malonaticus* festgestellt, was aufgrund der Dominanz dieser zwei Spezies auch zu erwarten war. Dabei zeigten 16 Isolate, die biochemisch als *C. malonaticus* identifiziert wurden, typische Amplikons nur mit den Spezies-spezifischen Primern für *C. sakazakii*. Zwölf Isolate, die biochemisch als *C. sakazakii* sowie ein Isolat, das biochemisch als *C. turicensis* identifiziert wurde, zeigten mit den Spezies-spezifischen Primern für *C. malonaticus* typische Amplikons. Um die genetisch eng verwandten Spezies *C. sakazakii* und *C. malonaticus* unterscheiden zu können, wurden ausgewählte Isolate (n=26) mittels Sequenzanalyse weiter untersucht, um die Nukleotidabfolge in einem bestimmten Abschnitt des *rpoB*-Gens betrachten zu können.

5.4 Sequenzanalyse des *rpoB*-Gens

Die Sequenzen ausgewählter Isolate (n=26) wurden untereinander und mit zwölf *Cronobacter*-Typstämmen aus der NCBI-Datenbank verglichen. Bei den 26 Isolaten handelte es sich zum einen um 18 Isolate, die biochemisch und molekularbiologisch unterschiedliche Identifizierungsergebnisse gezeigt hatten, zum anderen um acht Isolate, die in ihren biochemischen und molekularbiologischen Merkmalen übereinstimmten.

Von den 26 untersuchten Isolaten konnten 15 Isolate (57,7%) einer Spezies zugeordnet werden, während elf Isolate (42,3%) mit dieser Methodik nicht identifizierbar waren. Insgesamt bildeten die untersuchten Isolate acht verschiedene Cluster, die jeweils ein bis zehn verschiedene Isolate enthielten.

Bei der Gegenüberstellung der Ergebnisse der biochemischen Identifizierung, der Spezies-spezifischen PCR und der partiellen *rpoB*-Gen-Sequenzanalyse für die 26 untersuchten Isolate war auffällig, dass Isolate, die biochemisch als *C. malonaticus* und mit der Spezies-spezifischen PCR als *C. sakazakii* identifiziert wurden, mit Ausnahme eines Isolats (IB-10c/3-2006) ein Cluster (Cluster 1) mit dem *C. sakazakii*-Typstamm bildeten. Dagegen konnten Isolate die biochemisch als *C. sakazakii* und mit der Spezies-spezifischen PCR als *C. malonaticus* identifiziert wurden, weder dem Cluster 1 noch dem Cluster mit dem *C. malonaticus*-Typstamm zugeordnet werden (Tabelle 30). Ebenso wurde Isolat N123 biochemisch als *C. turicensis* und mit der Spezies-spezifischen PCR als *C. malonaticus* identifiziert und bildete unabhängig von den anderen Isolaten ein eigenes Cluster (Cluster 5). Eine Aussage, ob es sich bei diesen Isolaten um die Spezies *C. sakazakii* oder *C. malonaticus* handelt, kann mittels partieller *rpoB*-Gen-Sequenzanalyse nicht getroffen werden, da diese Methode nur *C. sakazakii* und *C. malonaticus* von anderen *Cronobacter*-Spezies unterscheiden kann (STRYDOM et al., 2012).

Die partielle *rpoB*-Gen Sequenzanalyse zeigte im Vergleich zur 16S rRNA-Gensequenzierung eine bessere Unterscheidungsfähigkeit (LI et al., 2012). Allerdings traten ebenfalls Differenzierungsprobleme zwischen den genetisch eng verwandten Spezies *C. sakazakii* und *C. malonaticus* auf. Biochemische Schlüsselreaktionen, wie die Malonatverwertung, wurden als eine ergänzende Methode beschrieben, um zwischen *C. sakazakii*- und *C. malonaticus*-Isolaten unterscheiden zu können (IVERSEN et al., 2007a; STRYDOM et al., 2011). In einigen Untersuchungen wurden allerdings auch *C. sakazakii*-Isolate beschrieben, die Malonat verwerten (EL-SHAROUD et al., 2009; MILED-BENNOUR et al., 2010; TURCOVSKÝ et al., 2011) bzw. *C. malonaticus*-Isolate die kein Malonat verwerten (MOZROVÁ et al., 2014), sodass auch hiermit keine zuverlässige Identifizierung möglich ist. In den eigenen Untersuchungen zeigten ebenfalls einige biochemisch als *C. malonaticus* identifizierten Isolate eine Clusterbildung mit dem *C. sakazakii*-Typstamm, sodass eine Aussage, ob es sich bei diesen Isolaten um die Spezies *C. sakazakii* oder *C. malonaticus* handelt, mittels

partieller *rpoB*-Gen Sequenzanalyse nicht getroffen werden konnte. Die partielle Sequenzierung des *rpoB*-Gens stellte jedoch eine hilfreiche Methode für die Identifizierung und taxonomische Klassifizierung der Gattung *Cronobacter* dar, auch wenn sie hinsichtlich der Speziesdifferenzierung keine ausreichend spezifischen Informationen lieferte (LI et al., 2012).

5.5 Multilokus-Sequenztypisierung (MLST)

Die MLST basiert auf der Analyse von Polymorphismen in den Sequenzen von sieben konstitutiv exprimierten Genen (Housekeeping-Gene) (LEHNER et al., 2013), sie wurden für *Cronobacter* spp. erstmals von JOSEPH et al. (2012b) eingesetzt. Die MLST ist eine besonders hoch auflösende Technik zur Unterscheidung einzelner Stämme derselben Spezies. Die Daten lassen sich sowohl für phylogenetische und epidemiologische Studien heranziehen, als auch zur Bestimmung der geografischen Verteilung z.B. von *Cronobacter* spp.-Stämmen verwenden (LEHNER et al., 2013). Durch die objektivierbare Vergleichsmöglichkeit anhand festgelegter Gene, die sehr hohe Reproduzierbarkeit (URWIN & MAIDEN, 2003) und die Möglichkeit eines weltweiten Vergleichs der Sequenzen mit denen in einer öffentlichen Datenbank hinterlegten Sequenzen wird die Durchführung epidemiologischer Studien und ein Stammvergleich auf internationaler Ebene erleichtert (JOSEPH et al., 2012b; JOSEPH & FORSYTHE, 2012).

Im Hinblick auf die mit anderen Methoden bestehenden Differenzierungsprobleme bei den genetisch eng verwandten Spezies *C. sakazakii* und *C. malonaticus* entwickelten BALDWIN et al. (2009) ein MLST-Schema, das eine sichere Identifizierung und Differenzierung dieser beiden Spezies ermöglichen soll. In einer Studie (JOSEPH et al., 2012b) zur genetischen Diversität von *Cronobacter* spp. wurden insgesamt 325 *Cronobacter*-Isolate auf ihre phylogenetische Verwandtschaft mittels MLST untersucht. Dabei konnten alle sieben anerkannten Spezies (*C. sakazakii*, *C. malonaticus*, *C. turicensis*, *C. mytjensii*, *C. dublinensis*, *C. universalis* und *C. condimenti*) nachgewiesen werden. Die MLST stellt eine effektive und robuste Typisierungsmethode dar (JOSEPH et al., 2012b) und wurde bereits in einigen Studien zur Differenzierung

herangezogen (HAMBY et al., 2011; JOSEPH & FORSYTHE, 2011; KUCEROVA et al., 2011; JOSEPH et al., 2012a, b; HARIRI et al., 2013).

Für einige MLST-Sequenztypen von *C. sakazakii* konnte ein Zusammenhang mit der Herkunft eines Isolates festgestellt werden. Beispielsweise wird *C. malonaticus* ST7 mit Infektionen bei Erwachsenen in Verbindung gebracht. *C. sakazakii* ST1 konnte primär für Isolate aus Säuglingsnahrungsmitteln sowie für klinische Isolate festgestellt werden, während *C. sakazakii* ST8 nur für klinische Isolate identifiziert wurde (JOSEPH et al., 2012c). Eine besondere Bedeutung kommt *C. sakazakii* ST4 zu. In einer Studie von JOSEPH & FORSYTHE (2011) wurde gezeigt, dass die meisten *Cronobacter* spp. bedingten Meningitiden bei Säuglingen, die in den letzten 30 Jahren beschrieben worden, auf *C. sakazakii* ST4 zurückzuführen waren. Auch die zuletzt in der Literatur gemeldeten Fälle von *Cronobacter* spp. bedingten Meningitiden aus den USA (CDC, 2011) wurden überwiegend durch *C. sakazakii* ST4 verursacht (HARIRI et al., 2013).

In der vorliegenden Arbeit wurden 14 Isolate mittels MLST untersucht. Die ermittelten Sequenzen wurden an die Betreiber der Datenbank übermittelt und der MLST-Datenbank (<http://pubmlst.org/cronobacter/>) hinzugefügt. Bis auf drei Isolate konnten alle einem Sequenztyp und somit einer Spezies eindeutig zugeordnet werden. Die MLST bestätigte die Speziesidentität von zehn Isolaten in Übereinstimmung mit den Ergebnissen der biochemischen Untersuchung. Vier Isolate konnten nicht bestätigt werden. Bei drei Isolaten (N51, N40, C102) konnte das Gen *gltB* nicht sequenziert und somit kein Sequenztyp ermittelt werden. Isolat DB-M2 wurde biochemisch als *C. malonaticus* (Biotyp 5) und mittels MLST als *C. sakazakii* identifiziert. Wie bereits erwähnt, stellt die biochemische Untersuchung von *Cronobacter* spp. nur noch eine Identifizierung hinsichtlich des Biotyps und keine Unterscheidung auf Speziesebene dar, da innerhalb der Gattung *Cronobacter* ein und derselbe Biotyp bei mehreren Spezies auftreten kann (JOSEPH et al., 2013). Bereits BALDWIN et al. (2009) zeigten, dass die Biotypen nach FARMER et al. (1980) und IVERSEN et al. (2006) nicht mit den Sequenztypen und somit mit der Speziesidentifizierung übereinstimmen.

Insgesamt wurden elf verschiedene Sequenztypen (STs) nachgewiesen. Darunter befanden sich sieben STs, die erstmals im Rahmen dieser Studie beschrieben wurden (ST243, ST248, ST249, ST250, ST251, ST252, ST253). Ein Isolat (DB-73a/2-05) aus deutscher Säuglingsnahrung wurde als *C. sakazakii* ST4 identifiziert. Andere Studien zeigten, dass

gerade ST4 häufig aus pulverförmiger Säuglingsnahrung und Milchpulverfabriken isoliert wurden (JOSEPH & FORSYTHE, 2012; SONBOL et al., 2013).

Die MLST stellte auch in der eigenen Arbeit eine gute Typisierungsmethode dar, die durch den Sequenzabgleich der sieben Housekeeping-Gene mit der ständig wachsenden DNA-Datenbank eine Zuordnung der Isolate zu den entsprechenden Gattungen und Spezies ermöglichte. Jedoch konnten auch bei dieser Methode nicht alle Isolate eindeutig identifiziert werden. Zudem sind die Untersuchungskosten relativ hoch.

5.6 Makrorestriktionsanalyse

Die Pulsfeld-Gelelektrophorese (PFGE) wird häufig im Rahmen einer epidemiologischen Typisierung eingesetzt und stellt eine gute Methode zur Differenzierung von *Cronobacter* spp. dar (LEHNER et al., 2013). Sie zeichnet sich durch ein hohes diskriminatorisches Potential und eine gute Reproduzierbarkeit aus (NAZAROWEC-WHITE & FARBER, 1999; LEHNER et al., 2013). Zudem besteht die Möglichkeit der Standardisierung und einer weltweiten Vergleichbarkeit über Datenbanken wie PulseNet (DRUDY et al., 2006a; BRENGI et al., 2012). Ein gemäß PulseNet standardisiertes Protokoll für die PFGE-Genotypisierung von *Cronobacter* spp. wurde bereits von einer internationalen Forschergruppe entwickelt und validiert (BRENGI et al., 2012).

In den letzten Jahren wurde die PFGE im Hinblick auf die Infektionsepidemiologie nicht nur für die betriebsinterne Aufklärung von Eintrags- bzw. Kontaminationsquellen für *Cronobacter* spp. in lebensmittelproduzierenden Fabriken eingesetzt (MULLANE et al., 2007, 2008b; IVERSEN et al., 2009; MILED-BENNOUR et al., 2010), sondern auch zur Klärung der genetischen Verwandtschaft von klinischen Isolaten (CLARK et al., 1990; NAZAROWEC-WHITE & FARBER, 1999; BLOCK et al., 2002) und Isolaten aus Säuglingsfertignahrung (VAN ACKER et al., 2001; MULLANE et al., 2007; TERRAGNO et al., 2009).

In der vorliegenden Arbeit wurde zur Übersicht der Verwandtschaft der *Cronobacter*-Isolate die Makrorestriktionsanalyse nach dem Verdau der chromosomalen

DNA mit der Restriktionsendonuklease *Xba*I und eine Auftrennung der Fragmente mittels PFGE durchgeführt. Die Verwendung der Restriktionsendonuklease *Xba*I erwies sich bereits in mehreren Studien als optimales Enzym zur Analyse der chromosomalen DNA von *Cronobacter* spp. (NAZAROWEC-WHITE & FARBER, 1999; MULLANE et al., 2007; IVERSEN et al., 2009) und konnte auch in dieser Untersuchung mit dem hausinternen PFGE-Protokoll reproduzierbare DNA-Fingerprintmuster von allen 135 untersuchten Isolaten erstellen.

Basierend auf einem Verwandtschaftsgrad von 95% als cut-off Wert konnten zwischen Isolaten unterschiedlicher Herkunft keine engen Verwandtschaftsverhältnisse festgestellt werden. Auch die Isolate aus deutscher und indonesischer Säuglingsnahrung zeigten eine große genetische Vielfalt. Insgesamt wurden 99 unterschiedliche PFGE-Typen ermittelt. Bei vergleichender Betrachtung mehrerer Isolate aus ein und derselben Probenpackung (Säuglingsnahrung) handelte es sich überwiegend um identische Isolate (Klone). Jedoch konnten in einigen Probenpackungen auch mehrere Isolate mit unterschiedlichen PFGE-Typen dargestellt werden, wobei es sich teilweise sogar um verschiedene *Cronobacter*-Spezies handelte. Das Vorkommen von mehreren *Cronobacter*-Spezies in ein und derselben Ursprungsprobe wurde bereits in mehreren Studien beschrieben (IVERSEN et al., 2009; TERRAGNO et al., 2009; FRICKER-FEER et al., 2012; CETINKAYA et al., 2013). Als Haupteintragsquellen für *Cronobacter* spp. in Säuglingsnahrung wurden kontaminierte Ausgangsmaterialien oder eine Rekontamination des Endproduktes aus dem Umfeld identifiziert (MULLANE et al., 2007; IVERSEN et al., 2009; LEHNER et al., 2010). Das heißt, es ist von multiplen Eintragsquellen auszugehen, was die Diversität der Isolate erklären könnte. Für epidemiologische Studien sollten deshalb immer mindestens fünf koloniebildende Einheiten pro Probe genotypisiert werden (FRICKER-FEER et al., 2012).

Die Restriktionsmuster der Isolate aus Trockenteigwaren, Salaten, Stärke, Müsli und Wasser waren von denjenigen aus Säuglingsnahrung deutlich verschieden. Mit der Ausnahme von zwei identischen Isolaten zeigten die Isolate aus dem Produktionsumfeld von Säuglingsnahrung herstellenden Betrieben ebenfalls deutliche Unterschiede hinsichtlich ihrer Restriktionsmuster.

Die PFGE lieferte mit der Verwendung des Restriktionsenzym *Xba*I zufriedenstellende Ergebnisse. Zum Nachweis herkunftsbezogener Zusammenhänge konnte für

Cronobacter-Isolate festgestellt werden, dass Isolate aus unterschiedlicher Herkunft eine hohe genetische Diversität aufweisen.

Gerade in epidemiologischen Studien stellt die PFGE eine gute und zuverlässige Methode dar. Nachteile dieser Methode können in der speziell benötigten Ausrüstung des Labors und des doch sehr zeitintensive Durchführung mit drei bis vier Arbeitstagen genannt werden.

5.7 Schlussfolgerung

Die taxonomische Klassifizierung von *Cronobacter* spp. ist für die Routinediagnostik nach wie vor problematisch, da sie mit einem erheblichen Nachweis- und Differenzierungsaufwand verbunden ist. Durch die Neuklassifizierung und die zunehmende Differenzierung sowie die Etablierung neuer Spezies innerhalb der Gattung *Cronobacter* treten Probleme in der eindeutigen Speziesdifferenzierung, besonders zwischen den genetisch eng verwandten Spezies *C. sakazakii* und *C. malonaticus*, auf. Da gerade diese beiden Spezies die wichtigsten Vertreter des Genus *Cronobacter* darstellen, ist hier ein erheblicher analytischer Aufwand erforderlich.

In der vorliegenden Arbeit wurden mehrere Methoden zur Speziesdifferenzierung herangezogen und evaluiert.

Die MALDI-TOF MS stellt eine gute Methode hinsichtlich der Identifizierung auf Genusebene dar. Einige Studien zeigen zwar auch eine gute Differenzierung auf Speziesebene, es muss jedoch beachtet werden, dass die Anzahl der untersuchten Stämme in diesen Studien sehr gering war und die Datenbanken derzeit noch nicht umfangreich genug sind.

Die biochemischen Speziesdifferenzierung nach FARMER et al. (1980) und IVERSEN et al. (2006) stellt keine sichere Methode zur Differenzierung von *Cronobacter* spp. dar. Durch die Variabilität der Stoffwechseleigenschaften und der speziesübergreifenden Biotypen lassen sich die biochemischen Reaktionen keiner Spezies eindeutig zuordnen (JOSEPH et al., 2012). Die biochemische Untersuchung von *Cronobacter* spp. stellt nur

noch eine Identifizierung hinsichtlich des Biotyps und keine Unterscheidung auf Speziesebene dar.

Die Spezies-spezifische PCR nach STOOP et al. (2009) und LEHNER et al. (2012) liefert prinzipiell gute Differenzierungsergebnisse, jedoch im Vergleich mit den biochemischen Untersuchungen treten gerade zwischen den genetisch eng verwandten Spezies *C. sakazakii* und *C. malonaticus* Differenzierungsprobleme auf. Dies limitiert den praktischen Nutzen dieser Methodik.

Die partielle Sequenzierung des *rpoB*-Gens stellt eine hilfreiche Methode für die Identifizierung und taxonomische Klassifizierung für die Gattung *Cronobacter* dar. Hinsichtlich der Speziesdifferenzierung treten jedoch ebenfalls die Differenzierungsprobleme zwischen den genetisch eng verwandten Spezies *C. sakazakii* und *C. malonaticus* auf, sodass keine Aussage hinsichtlich der Speziesdifferenzierung getroffen werden kann (LI et al., 2012). Mit dieser Methode ist nur eine Unterscheidung dieser beiden Spezies von den anderen *Cronobacter*-Spezies möglich (STRYDOM et al., 2012).

Die MLST stellt eine sichere Methode für die eindeutige Differenzierung von *Cronobacter* spp. dar. Aufgrund der Analyse von sieben verschiedenen Housekeeping-Genen ist eine sichere Differenzierung gewährleistet. Die Vorteile der MLST liegen vor allem in der Auswertung der Daten. Es handelt sich um eindeutige und objektive Ergebnisse, die als Zahlencodes zwischen Laboratorien ausgetauscht oder der Allgemeinheit über die Datenbank (<http://pubmlst.org/cronobacter/>) zur Verfügung gestellt werden können (LEHNER et al., 2013). Allerdings schließen der Arbeits- und Zeitaufwand sowie die hohen Kosten die MLST derzeit für die Routinediagnostik aus.

Die PFGE stellt weiterhin eine gute Methode für epidemiologische Aufklärungen von *Cronobacter* spp. dar. Zum Nachweis herkunftsbezogener Zusammenhänge konnte für *Cronobacter*-Isolate festgestellt werden, dass Isolate unterschiedlicher Herkunft eine hohe genetische Diversität aufwiesen.

Zusammenfassend kommen die Spezies *C. sakazakii* und *C. malonaticus* überwiegend in Säuglingsnahrungsmitteln vor, während *C. turicensis* eher in pflanzlichen Lebensmitteln vorkommt. Ein Isolat, das als *C. mytjensii* identifiziert wurde, stammte aus einer Eiernudelprobe mit Basilikum. Wie bereits in anderen Studien beschrieben, war

C. sakazakii auch in den eigenen Untersuchungen stets die dominierende Spezies innerhalb der Gattung *Cronobacter*, unabhängig vom Probenmaterial (LEHNER et al., 2010; MILED-BENNOUR et al., 2010; SONBOL et al., 2013, XU et al., 2014).

Hinsichtlich der Speziesdifferenzierung, besonders zwischen den Spezies *C. sakazakii* und *C. malonaticus*, besteht weiterhin Bedarf an einer einfachen, zuverlässigen und kostengünstigen Methode. Solange keine Anzeichen möglicher Unterschiede bezüglich der pathogenen Eigenschaften unter den Spezies existieren, ist eine Speziesdifferenzierung unter praktischen und rechtlichen Gesichtspunkten derzeit auch nicht erforderlich.

Zu beachten ist, dass die Gattung *Cronobacter* in der Verordnung (EG) Nr. 2073/2005 der Kommission vom 15. November 2005 über mikrobiologische Kriterien für Lebensmittel, geändert durch die Verordnungen (EG) Nr. 1441/2007 und Nr. 365/2010, als Lebensmittelsicherheitskriterium definiert ist, jedoch nur getrocknete Säuglingsanfangsnahrung und getrocknete diätetischen Lebensmitteln für besondere medizinische Zwecke, die für Säuglinge unter sechs Monaten bestimmt sind, berücksichtigt werden. *Cronobacter* spp. können jedoch Infektionen in allen Altersgruppen auslösen (LAI et al., 2001) und wurden in der Umwelt und in einem großen Sortiment von Lebensmitteln, besonders pflanzlicher Herkunft, isoliert (KUCEROVA et al., 2011). Es ist durchaus vorstellbar, dass *Cronobacter* spp. als Krankheitserreger von größerer Relevanz ist als bisher bekannt.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Cronobacter spp. (früher *Enterobacter sakazakii*) sind fakultativ anaerobe, peritrich begeißelte, gramnegative Stäbchenbakterien aus der Familie der *Enterobacteriaceae*. Sie sind opportunistische Erreger, die vor allem bei Neugeborenen und Säuglingen, aber auch bei immungeschwächten und älteren Patienten schwere Allgemeinerkrankungen hervorrufen können. Klinische Bilder von *Cronobacter* spp.-Infektionen manifestieren sich u.a. in Meningitiden, nekrotisierenden Enterokolitiden und Septikämien.

Die wichtigste Infektionsquelle für die Erkrankungen bei Säuglingen stellt kontaminierte pulverförmige Säuglingsnahrung dar (FAO/WHO, 2004; FRIEDEMANN, 2008). Deshalb sind *Cronobacter* spp. laut der Verordnung (EG) Nr. 2073/2005 der Kommission vom 15. November 2005 über mikrobiologische Kriterien für Lebensmittel, geändert durch die Verordnungen (EG) Nr. 1441/2007 und Nr. 365/2010, als Lebensmittelsicherheitskriterium definiert.

Neben pulverförmiger Säuglingsnahrung wurden *Cronobacter* spp. bisher aus einer großen Zahl von Lebensmitteln pflanzlicher und tierischer Herkunft isoliert. Aber auch in verschiedenen Umweltproben, wie aus Staubsaugerbeutelinhalt privaten Haushalte oder aus dem Produktionsumfeld lebensmittelherstellender Fabriken, konnten *Cronobacter* spp. nachgewiesen werden.

Aufgrund neuer genetischer und biochemischer Erkenntnisse wurde die ehemalige Spezies *Enterobacter sakazakii* taxonomisch durch die neue Gattung *Cronobacter* reklassifiziert (IVERSEN et al., 2008). Mittlerweile hat sich diese Taxonomie vorläufig etabliert und die neue Gattung *Cronobacter* enthält derzeit (Juni 2017) sieben Spezies: *Cronobacter* (*C.*) *sakazakii*, *C. malonaticus*, *C. turicensis*, *C. muytjensii*, *C. dublinensis* mit drei Subspezies (*C. dublinensis* subsp. *dublinensis*, *C. dublinensis* subsp. *lausannensis*, *C. dublinensis* subsp. *lactaridi*), *C. condimenti* und *C. universalis* (IVERSEN et al., 2008; JOSEPH et al., 2012a).

Im Hinblick auf die Überwachung und Prävention lebensmittelbedingter Erkrankungen, verursacht durch *Cronobacter* spp., ist eine schnelle und sichere Identifizierung essentiell. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Variabilität und relative Häufigkeit verschiedener *Cronobacter*-Spezies in Säuglingsnahrungsmitteln sowie einigen anderen Lebensmitteln

des deutschen Marktes und des Produktionsumfeldes von Säuglingsnahrung herstellenden Betrieben zu bestimmen. Zudem sollten die verschiedenen Differenzierungsmöglichkeiten untereinander verglichen und auf ihre Routinetauglichkeit getestet werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden am Institut für Tierärztliche Nahrungsmittelkunde, Professur für Milchwissenschaften der Justus-Liebig-Universität Gießen, insgesamt 259 *Cronobacter*-Isolate aus unterschiedlicher Herkunft mit unterschiedlichen Methoden analysiert.

Mittels MALDI-TOF MS konnten alle Isolate auf Genusebene als *Cronobacter* spp. identifiziert werden.

Anhand von verschiedenen biochemischen Reaktionen konnten insgesamt 82,2% (213 von 259) der Isolate als Spezies *C. sakazakii* identifiziert werden. Dabei handelte es sich bei der Mehrzahl der Isolate um Biotyp 1 (39,8%) und Biotyp 2 (37,0%). Es folgten mit abnehmender Häufigkeit die Biotypen 8a (1,9%), 8 (0,8%) und 13 (0,8%). Fünf der als *C. sakazakii* identifizierten Isolate (1,9%) konnten keinem Biotyp eindeutig zugeordnet werden. Als zweithäufigste Spezies mit einem Anteil von 13,9% (36 von 259) der Isolate war *C. malonaticus* mit den Biotypen 5 (10,0%) und 9 (3,9%) vertreten. Neun Isolate (3,5%) wurden als *C. turicensis* (Biotyp 16) identifiziert, ein Isolat (0,4%) erwies sich als *C. mytjensii* (Biotyp 15).

Neben der biochemischen Charakterisierung wurden alle Isolate mit einer Spezies-spezifischen PCR, basierend auf dem *rpoB*-Gen, untersucht. Dabei wurden insgesamt 83,8% (n=217) der Isolate als *C. sakazakii*, 12,7% (n=33) als *C. malonaticus*, 3,1% (n=8) als *C. turicensis* und 0,4% (n=1) als *C. mytjensii* identifiziert.

Die Amplifizierung des Spezies-spezifischen Bereiches des *rpoB*-Gens lieferte bei 88,8% (n=230) der Isolate übereinstimmende Ergebnisse mit denen der biochemischen Untersuchung. 11,2% (n=29) der Isolate konnten nicht durch die Spezies-spezifische PCR identifiziert werden. Die häufigsten Unterschiede wurden für die genetisch eng verwandten Spezies *C. sakazakii* und *C. malonaticus* festgestellt. Ausgewählte Isolate (n=26) wurden mittels partieller *rpoB*-Gen-Sequenzanalyse untersucht und mit zwölf *Cronobacter*-Typstämmen der NCBI-Datenbank für *Cronobacter* verglichen. Allerdings traten auch hier Differenzierungsprobleme für die genetisch eng verwandten Spezies *C. sakazakii* und *C. malonaticus* auf, sodass keine eindeutige Identifizierung möglich war.

Mittels MLST wurden 14 Isolate untersucht. Bis auf drei Isolate konnten alle einem Sequenztyp und somit einer Spezies eindeutig zugeordnet werden. Die MLST bestätigte die Speziesidentität von zehn Isolaten in Übereinstimmung mit den Ergebnissen der biochemischen Untersuchung. Vier Isolate konnten nicht bestätigt werden. Insgesamt wurden elf verschiedene Sequenztypen (STs) nachgewiesen. Darunter befanden sich sieben STs, die erstmals im Rahmen dieser Studie beschrieben wurden. Ein Isolat aus Säuglingsnahrung wurde als *C. sakazakii* ST4 identifiziert.

Zur Darstellung der klonalen Beziehungen zwischen den verschiedenen Isolaten wurden 135 Isolate mittels Makrorestriktionsanalyse untersucht. Bei den untersuchten Isolaten handelte es sich um die Spezies *C. sakazakii* (n=105), *C. malonaticus* (n=23) und *C. turicensis* (n=7). Insgesamt konnten 99 verschiedene PFGE-Typen unterschieden und eine große genetische Vielfalt bei den Spezies *C. sakazakii*, *C. malonaticus* und *C. turicensis* dargestellt werden.

Zusammenfassend kamen die Spezies *C. sakazakii* und *C. malonaticus* überwiegend in Säuglingsnahrungsmitteln vor, während *C. turicensis* nur in pflanzlichen Lebensmitteln nachgewiesen wurde. Ein Isolat erwies sich als *C. mytjensii*, dieses stammte aus einer Eiernudelprobe mit Basilikum.

Wie die im Rahmen der vorliegenden Arbeit ermittelten Ergebnisse zeigen, stellt *C. sakazakii* die vorherrschende Spezies innerhalb der untersuchten Proben dar.

Durch die taxonomische Klassifizierung von *Cronobacter* spp. ist die Routinediagnostik nach wie vor mit einem erheblichen Nachweis- und Differenzierungsaufwand verbunden. Hinsichtlich der Speziesdifferenzierung, besonders zwischen den Spezies *C. sakazakii* und *C. malonaticus*, besteht weiterhin Bedarf an einer einfachen, zuverlässigen und kostengünstigen Methode. Solange keine Hinweise auf Unterschiede bezüglich der pathogenen Eigenschaften zwischen den Spezies existieren, ist eine Speziesdifferenzierung von *Cronobacter* spp. unter praktischen und rechtlichen Gesichtspunkten in der Routineuntersuchung derzeit noch nicht erforderlich. Im Hinblick auf die wissenschaftliche Charakterisierung der Gattung *Cronobacter* scheint eine Kombination mehrerer Methoden unverzichtbar.

7 SUMMARY

Cronobacter spp. (formerly known as *Enterobacter sakazakii*) are facultative anaerobic, peritrichous, Gram-negative rods of the *Enterobacteriaceae* family. They are opportunistic pathogens that may cause serious general diseases, especially in newborns and infants, but also in immunocompromised and elderly patients. Clinical pictures of *Cronobacter* spp. infections manifest themselves among others in meningitis, necrotising enterocolitis and septicaemia.

The most important source of infection for infants is primarily contaminated powdered infant formulae (FAO/WHO, 2004; FRIEDEMANN, 2008). Therefore, *Cronobacter* spp. are, in accordance with European Union regulation (EC) No 2073/2005 of 15. November 2005 on microbiological criteria for food, as amended by European Union regulation (EC) No 1441/2007 and No 365/2010, defined as a food safety criterion.

In addition to powdered infant formulae, *Cronobacter* spp. has been isolated from a large number of foods of plant and animal origin. Also *Cronobacter* spp. may be found in different environmental samples, such as vacuum cleaner bag contents of private households or in the production environment of food-producing factories.

Based on new genetic and biochemical findings, the former species *Enterobacter sakazakii* was re-classified taxonomically by the new genus *Cronobacter* (IVERSEN et al., 2008). In the meantime, this taxonomy has been established temporarily and the new genus *Cronobacter* currently (June 2017) contains seven species: *Cronobacter* (*C.*) *sakazakii*, *C. malonaticus*, *C. turicensis*, *C. muytjensii*, *C. dublinensis* with three subspecies (*C. dublinensis* subsp. *dublinensis*, *C. dublinensis* subsp. *lausannensis*, *C. dublinensis* subsp. *lactaridi*), *C. condimenti* and *C. universalis* (IVERSEN et al., 2008, JOSEPH et al., 2012a).

Regarding the monitoring and prevention of food-borne diseases caused by *Cronobacter* spp., rapid and reliable identification is essential. The aim of this work was to investigate the variability and relative frequency of different *Cronobacter*-species in infant formulae as well as other foods available on the German market and the production environment of infant formula manufacturing factory and to show the frequency

distribution of the individual species. In addition, the various differentiation possibilities should be compared with one another and tested for their practicability.

In this study a total of 259 *Cronobacter* isolates from different origin were analyzed using different methods at the Chair of Dairy Science, Institute of Veterinary Food Science, Justus-Liebig University Giessen.

By MALDI-TOF MS, all isolates could be unambiguously assigned to the genus *Cronobacter* spp..

A total of 82.2% (213 of 259) of the isolates could be identified as species *C. sakazakii* with different biochemical reactions. The majority of the isolates were biotype 1 (39.8%) and biotype 2 (37.0%). The biotypes 8a (1.9%), 8 (0.8%) and 13 (0.8%) followed with decreasing frequency. Five of the isolates identified as *C. sakazakii* (1.9%) could not be clearly assigned to any biotype. As the second most common species with a share of 13.9% (36 of 259) of the isolates, *C. malonaticus* was present with the biotypes 5 (10.0%) and 9 (3.9%). Nine isolates (3.5%) were identified as *C. turicensis* (biotype 16), one isolate (0.4%) was found as *C. muytjensii* (biotype 15).

In addition to the phenotypic characterization, all isolates were examined with a species-specific PCR based on the *rpoB* gene. A total of 83.8% (n=217) of the isolates were identified as *C. sakazakii*, 12.7% (n=33) as *C. malonaticus*, 3.1% (n=8) as *C. turicensis* and 0.4 % (n=1) as *C. muytjensii*.

The amplification of the species-specific region of the *rpoB* gene showed consistent results with those of the biochemical study at 88.8% (n=230) of the isolates. 11.2% (n=29) of the isolates could not be identified by the species-specific PCR. The most frequent differences were found for the genetically closely related species *C. sakazakii* and *C. malonaticus*. Selected isolates (n=26) were analyzed by partial *rpoB* gene sequence analysis and compared with twelve *Cronobacter* strains of the NCBI database for *Cronobacter*. By this method it was not possible to differentiate between the genetically closely related species *C. sakazakii* and *C. malonaticus*.

By MLST, 14 isolates were examined. Except for three, all isolates could be uniquely assigned to a sequence type and thus to a species. The MLST confirmed the species identity of ten isolates in accordance with the results of the identification by biochemical methods. Four isolates could not be confirmed. A total of eleven different sequence types

(STs) were detected including seven STs, which were described for the first time in this study. One isolate from infant formulae was identified as *C. sakazakii* ST4.

To demonstrate the clonal relationships between the different isolates, 135 isolates were examined by PFGE analysis. Investigated isolates were the species *C. sakazakii* (n=105), *C. malonaticus* (n=23) and *C. turicensis* (n=7). A total of 99 different PFGE types were distinguished and a high genetic diversity could be presented in the species *C. sakazakii*, *C. malonaticus* and *C. turicensis*.

The species *C. sakazakii* and *C. malonaticus* are predominantly found in infant formulae, whereas *C. turicensis* has been detected only for isolates from plant foods. One isolate which came from an egg noodle sample with basil proved to be *C. mytjensii*.

As the results in the present study show, *C. sakazakii* represents the predominant species within the analyzed samples.

By the taxonomic classification of *Cronobacter* spp. the routine diagnosis is still associated with a considerable detection and differentiation effort. With respect to the species differentiation, particularly between the species *C. sakazakii* and *C. malonaticus*, there is still a need for a simple, reliable and cost-effective method. As long as no evidence of differences in the pathogenic properties between the species exists, a species differentiation of *Cronobacter* spp. under practical and legal aspects in the routine examination currently is not necessary. With regard to the scientific characterization of the genus *Cronobacter*, a combination of several methods seems indispensable.

8 LITERATURVERZEICHNIS

- BALDWIN, A., M. LOUGHLIN, J. CAUBILLA-BARRON, E. KUCEROVA, G. MANNING, C. DOWSON und S. FORSYTHE (2009):
Multilocus sequence typing of *Cronboacter sakazakii* and *Cronobacter malonaticus* reveals stable clonal structures with clinical significance which do not correlate with biotypes.
BMC Microbiol, 9, 223
- BAR-OZ, B., A. PREMINGER, O. PELEG, C. BLOCK und I. ARAD (2001):
Enterobacter sakazakii infection in the newborn.
Acta Paediatr., 90, 356-358
- BLAŽKOVÁ, M., B. JAVŮRKOVÁ, J. VLACH, S. GÖSELOVÁ, L. KARAMONOVÁ, P. OGRODZKI, S. FORSYTHE und L. FUKAL (2015):
Diversity of O Antigens within the Genus *Cronobacter*: from Disorder to Order.
Appl Environ Microbiol, 81, 5574-5582
- BLOCK, C, O. PELEG, N. MINSTER, B. BAR-OZ, A. SIMHON, I. ARAD und M. SHAPIRO (2002):
Cluster of neonatal infections in Jerusalem due to unusual biochemical variant of *Enterobacter sakazakii*.
Eur J Clin Microbiol Infect Dis., 21, 613-616
- BLV, Bundesamt für Lebensmittelsicherheit und Veterinärwesen (2016):
Öffentliche Warnung: Enterobakterien (*Cronobacter*) in Bimbosan Säuglingsanfangsnahrung.
https://www.blv.admin.ch/dam/blv/de/dokumente/oeffentliche-warnungen/ow-bimbosansaegulingsanfangsnahrung.pdf.download.pdf/%C3%B6ffentliche_Warnung_Bimbosan_S%C3%A4uglingsanfangsnahrung.pdf (Stand: Juni 2017)
- BRADY, C., I. CLEENWERCK, S. VENTER, T. COUTINHO und P. DE VOS (2013):
Taxonomic evaluation of the genus *Enterobacter* based on multilocus sequence analysis (MLSA): Proposal to reclassify *E. nimipressuralis* and *E. amnigenus* into *Lelliottia* gen. nov. as *Lelliottia nimipressuralis* comb. nov. and *Lelliottia amnigena* comb. nov., respectively, *E. gergoviae* and *E. pyrinus* into *Pluralibacter* gen. nov. as *Pluralibacter gergoviae* comb. nov. and *Pluralibacter pyrinus* comb. nov., respectively, *E. cowanii*, *E. radincitans*, *E. oryzae* and *E. arachidis* into *Kosakonia* gen. nov. as *Kosakonia cowanii* comb. nov., *Kosakonia radincitans* comb. nov., *Kosakonia oryzae* comb. nov. and *Kosakonia arachidis* comb. nov., respectively, and *E. turicensis*, *E. helveticus* and *E. pulveris* into *Cronobacter* as *Cronobacter zurichensis* nom. nov., *Cronobacter helveticus* comb. nov. and *Cronobacter pulveris* comb. nov., respectively, and emended description of the genera *Enterobacter* and *Cronobacter*
Syst Appl Microbiol, 36, 309-319

- BRENGI, S. P., S. B. O'BRIEN, M. PICHEL, C. IVERSEN, M. ARDUINO, N. BINSZTEIN, B. JENSEN, F. PAGOTTO, E. M. RIBOT, R. STEPHAN, N. CERNELA, K. COOPER und S. FANNING (2012):
Development and validation of a PulseNet standardized protocol for subtyping isolates of *Cronobacter* species.
Foodborne Pathog Dis, 9, 861-867
- BRENNER, D. J. (1974):
DNA reassociation for the clinical differentiation of enteric bacteria.
Public Health Lab, 32, 118-130
- BRENNER, D. J., J. J. FRAMER III, F. W. HICKMAN, M. A. ASBURY und A. G. STEIGERWALT (1977):
Taxonomic and nomenclature changes in *Enterobacteriaceae*.
Center for Disease Control, Atlanta, GA, USA
- BREEUWER, P., A. LARDEAU, M. PETERZ und H. M. JOOSTEN (2003):
Desiccation and heat tolerance of *Enterobacter sakazakii*.
J Appl Microbiol, 95, 967-973
- CABASSI, C.S., S. TADDEI, G. PREDARI, G. GALVANI, F. GHIDINI, E. SCHIANO und S. CAVIRANI (2004):
Bacteriologic findings in ostrich (*Struthio camelus*) eggs from farms with reproductive failures.
Avian Dis, 48, 716-722
- CARTER, L., L. A. LINDSEY, C. J. GRIM, V. SATHYAMOORTHY, K. G. JARVIS, G. GOPINATH, C. LEE, J. A. SADOWSKI, L. TRACH, M. PAVA-RIPOLL, B. A. McCARDELL, B. D. TALL und L. HU (2013):
Multiplex PCR assay targeting a diguanylate cyclase-encoding gene, *cgcA*, to differentiate species within the genus *Cronobacter*.
Appl Environ Microbiol, 79, 734-737
- CAUBILLA-BARRON, J. und S. J. FORSYTHE (2007):
Dry stress and survival time of *Enterobacter sakazakii* and other *Enterobacteriaceae* in dehydrated powdered infant formula.
J Food Prot, 9, 2111-2117
- CDC, Centers for Disease Control and Prevention (2002):
Enterobacter sakazakii infections associated with the use of powdered infant formula – Tennessee, 2001
MMWR Morb Mortal Wkly Rep, 51, 298-300
- CDC, Centers for Disease Control and Prevention (2011):
FDA and CDC Update: Investigation of *Cronobacter* bacteria illness in infants.
http://www.cdc.gov/media/releases/2011/s1230_Cronobacter.html (Stand: Juni 2017)

- CETINKAYA, E., S. JOSEPH, K. AYHAN und S. J. FORSYTHE (2013):
Comparison of methods for the microbiological identification and profiling of *Cronobacter* species from ingredients used in the preparation of infant formula.
Mol Cell Probes, 27, 60-64
- CHAVES-LÓPEZ, C., M. DE ANGELIS, M. MARTUSCELLI, A. SERIO, A. PAPARELLA und G. SUZZI (2006):
Characterization of the *Enterobacteriaceae* isolated from an artisanal Italian ewe's cheese (Pecorino Abruzzese).
J Appl Microbiol, 101, 353-360
- CHEN, Y., K. LAMPEL und T. HAMMACK (2012):
Bacteriological Analytical Manual, Chapter 29, *Cronobacter*.
<http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm289378.htm>
(Stand: Juni 2017)
- CHON, J.-W., K.-Y. SONG, S.-Y. KIM, J.-Y. HYEON und K.-H. SEO (2012):
Isolation and characterization of *Cronobacter* from desiccated foods in Korea.
J Food Sci, 77, 354-358
- CLARK, N.C., B.C. HILL, C. M. O'HARA, O. STEINGRIMSSON und R.C. COOKSEY (1990):
Epidemiologic typing of *Enterobacter sakazakii* in two neonatal nosocomial outbreaks.
Diagn Microbiol Infect Dis, 13, 467-472
- COIGNARD, B., V. VAILLANT, J.-P. VINCENT, A. LEFLÈCHE, P. MARIANI-KURKDJIAN, C. BERNET, F. L'HÉRITTEAU, H. SÉNÉCHAL, P. GRIMONT, E. BINGEN und J.-C. DESENCLOS (2006):
Infections sévères à *Enterobacter sakazakii* chez des nouveau-nés ayant consommé une préparation en poudre pour nourrissons.
Bull Epidemiol Hebd (Paris), N° 2-3, 10-13
- CORTI, G., I. PANUNZI, M. LOSCO und R. BUZZI (2007):
Postsurgical osteomyelitis caused by *Enterobacter sakazakii* in a healthy young man.
J Chemother, 19, 94-96
- DERZELLE, S. und F. DILASSER (2006):
A robotic DNA purification protocol and real-time PCR for the detection of *Enterobacter sakazakii* in powdered infant formulae.
BMC Microbiol, 6, 100
- DRUDY, D., M. O'ROURKE, M. MURPHY, N. R. MULLANE, R. O'MAHONY, L. KELLY, M. FISCHER, S. SANJAQ, P. SHANNON, P. WALL, M. O'MAHONY, P. WHITE und S. FANNING (2006a):
Characterization of a collection of *Enterobacter sakazakii* isolates from environmental and food sources.
Int J Food Microbiol, 110, 127-134
- DRUDY D., N. R. MULLANE, T. QUINN, P. G. WALL und S. FANNING (2006b):
Enterobacter sakazakii : An emerging pathogen in powdered infant formula.
Clin Infect Dis, 42, 996-1002

EDELSON-MAMMEL, S. G. und R. L. BUCHANAN (2004):

Thermal inactivation of *Enterobacter sakazakii* in rehydrated infant formula.
J Food Prot, 67, 60-63

EDELSON-MAMMEL, S. G., M. K. PORTEOUS und R. L. BUCHANAN (2005):

Survival of *Enterobacter sakazakii* in dehydrated powdered infant formula.
J Food Prot, 68, 1900-1902

EFSA, European Food Safety Authority (2004):

Opinion of the scientific panel on biological hazards on a request from the Commission related to the microbiological risks in baby formulae and follow-on formulae.
EFSA J, 113, 1-35

EL-SHAROUD, W. M., S. O'BRIEN, C. NEGREDO, C. IVERSEN, S. FANNING und B. HEALY (2009):

Characterization of *Cronobacter* recovered from dried milk and related products.
BMC Microbiol, 9, 24

EMERY, C.L. und L.A. WEYMOUTH (1997):

Detection and clinical significance of extended-spectrum beta-lactamases in a tertiary-care medical center.
J Clin Microbiol, 35, 2061-2067

FAO/WHO (2004):

Enterobacter sakazakii and other microorganisms in powdered infant formula: Meeting report
Microbiological Risk Assessment Series No. 6
<http://www.who.int/foodsafety/publications/mra6-enterobacter-sakazakii/en/>
(Stand: Juni 2017)

FAO/WHO (2006):

Enterobacter sakazakii and *Salmonella* in powdered infant formula: Meeting report
Microbiological Risk Assessment Series No. 10
<http://www.who.int/foodsafety/publications/micro/mra10/en/> (Stand: Juni 2017)

FAO/WHO (2008):

Enterobacter sakazakii (*Cronobacter* spp.) in powdered follow-up formulae: Meeting report
Microbiological Risk Assessment Series No. 15
http://www.who.int/foodsafety/publications/mra_followup/en/ (Stand: Juni 2017)

FARMER, J.J. III, M. A. ASBURY, F. W. HICKMAN, DON J. BRENNER, und THE ENTEROBACTERIACEAE STUDY GROUP (1980):

Enterobacter sakazakii: A new species of “*Enterobacteriaceae*” isolated from clinical specimens
Int J Syst Bacteriol, 30, 569-584

FDA, U.S. Food and Drug Administration (2002):

Isolation and enumeration of *Enterobacter sakazakii* from dehydrated powdered infant formula

<http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm114665.htm>
(Stand: Juni 2017)

FDA, U.S. Food and Drug Administration (2003):

Contaminants and natural toxicants subcommittee meeting. *Enterobacter sakazakii* contamination in powdered infant formula. Draft charge and questions.

www.fda.gov/OHRMS/DOCKETS/AC/03/minutes/3939m1_summary%20Minutes.doc
(Stand: Juni 2017)

FDA, Food and Drug Administration (2003):

FDA field survey of powdered formula manufacturing

http://www.fda.gov/ohrms/dockets/ac/03/slides/3939s1_Zink.ppt (Stand: Juni 2017)

FRANCO, A. A., L. HU, C. J. GRIM, G. GOPINATH, V. SATHYAMOORTHY, K. G. JARVIS, C. LEE, J. SADOWSKI, J. KIM, M. H. KOTHARY, B. A. McCARDELL und B. D. TALL (2011):

Characterization of putative virulence genes on the related RepFIB plasmids harbored by *Cronobacter* spp.

Appl Environ Microbiol, 77, 3255-3267

FRICKER-FEER, C., N. CERNELA, S. BOLZAN, A. LEHNER und R. STEPHAN (2011):

Evaluation of three commercially available real-time PCR based systems for detection of *Cronobacter* species.

Int J Food Microbiol, 146, 200-202

FRICKER-FEER, C., R. STEPHAN und A. LEHNER (2012):

Genetic diversity of multiple *Cronobacter* spp. isolates from cultural positive powdered infant formulae, ingredients and environment samples – consequences for epidemiological studies in processing plants.

Milchwissenschaft, 67, 250-253

FRIEDEMANN, M. (2008):

Gesundheitliches Gefährdungspotenzial von *Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter* spp. nov.) in Säuglingsnahrung.

Bundesgesundheitsbl. 51, 664-674

GAKUYA, F.M., M. N. KYULE, P. B. GATHURA und S. KARIUKI (2001):

Antimicrobial resistance of bacterial organisms isolated from rats.

East Afr Med J, 78, 646-649

GALLAGHER, P.G. und W.S. BALL (1991):

Cerebral infarctions due to CNS infection with *Enterobacter sakazakii*.

Pediatr Radiol, 21, 135-136

- GIČOVÁ, A., M. ORIEŠKOVÁ, L. OSLANECOVÁ, H. DRAHOVSKÁ und E. KACLÍKOVÁ (2013):
Identification and characterization of *Cronobacter* strains isolated from powdered infant foods.
Lett Appl Microbiol, 58, 242-247
- GONZÁLEZ, S., G. J. FLICK, F. M. ARRITT, D. HOLLIMAN und B. MEADOWS (2006):
Effect of high-pressure processing on strains of *Enterobacter sakazakii*.
J Food Prot, 69, 935-937
- GOSNEY, M. A., M. V. MARTIN, A. E. WRIGHT und M. GALLAGHER (2006):
Enterobacter sakazakii in the mouths of stroke patients and its association with aspiration pneumonia.
Eur J Intern Med, 17, 185-188
- GRIM, C. J., M. H. KOTHARY, G. GOPINATH, K. G. JARVIS, J. GRIM, C. J. JEAN-GILLES BEAUBRUN, M. McCLELLAND, B. D. TALL und A. A. FRANCO (2012):
Identification and characterization of *Cronobacter* Iron Acquisition Systems.
Appl Environ Microbiol, 78, 6035-6050
- GUILLAUME-GENTIL, O., V. SONNARD, M.C. KANDHAI, J.D. MARUGG und H. JOSTEN (2005):
A simple and rapid cultural method for detection of *Enterobacter sakazakii* in environmental samples.
J Food Prot, 68, 64-69
- GURTLER, J. B., J. L. KORNACKI und L. R. BEUCHAT (2005):
Enterobacter sakazakii: A coliform of increased concern to infant health.
Int J Food Microbiol, 104, 1-34
- HAMBY, S. E., S. JOSEPH, S. J. FORSYTHE und N. CHUZHANOVA (2011):
In Silico identification of pathogenic strains of *Cronobacter* from Biochemical data reveals association of inositol fermentation with pathogenicity.
BMC Microbiol, 11, 204
- HAMILTON, J. V., M. J. LEHANE und H. R. BRAIG (2003):
Isolation of *Enterobacter sakazakii* from midgut of *Stomoxys calcitrans*.
Emerg Infect Dis, 9, 1355-1356
- HARIRI, S., S. JOSEPH und S. J. FORSYTHE (2013):
Cronobacter sakazakii ST4 Strains and Neonatal Meningitis, United States
Emerg Infect Dis, 19, 175-177
- HARTMANN, I.; P. CARRANZA, A. LEHNER, R. STEPHAN, L. EBERL und K. RIEDEL (2010):
Genes involved in *Cronobacter sakazakii* biofilm formation.
Appl Environ Microbiol, 76, 2251-2261

HASSAN, A.A., Ö. AKINEDEN, C. KRESS, S. ESTUNINGSIH, E. SCHNEIDER und E. USLEBER (2007):

Characterization of the gene encoding the 16S rRNA of *Enterobacter sakazakii* and development of a species-specific PCR method.

Int J Food Microbiol, 116, 214-220

HAWKINS, R.E., C.R. LISSNER und J.P. SANFORD (1991):

Enterobacter sakazakii bacteremia in an adult.

South Med J, 84, 793-795

HOCHÉL, I., H. RŮŽIČKOVÁ, L. KRÁSNÝ und K. DEMNEROVÁ (2012):

Occurrence of *Cronobacter* spp. in retail foods.

J Appl Microbiol, 112, 1257-1265

HOLLAND, R. D., J. G. WILKES, F. RAFII, J. B. SUTHERLAND, C. C. PERSONS, K. J. VOORHEES und J. O. LAY, JR. (1996):

Rapid identification of intact whole bacteria based on spectral patterns using matrix-assisted laser desorption/ionization with time-of-flight mass spectrometry.

Rapid Commun Mass Spectrom, 10, 1227-1232

HYEON, J.Y., C. PARK, I. S. CHOI, P. S. HOLT und K. H. SEO (2010):

Development of multiplex real-time PCR with internal amplification control for simultaneous detection of *Salmonella* and *Cronobacter* in powdered infant formula.

Int J Food Microbiol, 144, 177-181

ICMSF, International Commission on Microbiological Specifications for Foods (2002):

Microorganisms in Foods 7: Microbiological Testing in Food Safety Management.

Springer Science + Business Media, New York, USA

ISO/TS 22964:2006(E), IDF/RM 210:2006(E):

Milk and milk products - Detection of *Enterobacter sakazakii*.

International Standard Organisation, Genf, Schweiz

IVERSEN, C. und S.J. FORSYTHE (2003):

Risk profile of *Enterobacter sakazakii*, an emergent pathogen associated with infant milk formula.

Trends Food Sci Technol, 14, 443-454

IVERSEN, C., P. DRUGGAN und S.J. FORSYTHE (2004a):

A selective differential medium for *Enterobacter sakazakii*, a preliminary study.

Int J Food Microbiol, 96, 133-139

IVERSEN, C. und S.J. FORSYTHE (2004b):

Isolation of *Enterobacter sakazakii* and other *Enterobacteriaceae* from powdered infant formula milk and related products.

Food Microbiol, 21, 771-777

IVERSEN, C., M. LANE und S.J. FORSYTHE (2004c):

The growth profile, thermotolerance and biofilm formation of *Enterobacter sakazakii* grown in infant formula milk.

Lett Appl Microbiol, 38, 378-382

- IVERSEN, C., M. WADDINGTON, S. L. W. ON und S. FORSYTHE (2004d):
Identification and phylogeny of *Enterobacter sakazakii* relative to *Enterobacter* and *Citrobacter* species.
J Clin Microbiol, 42, 5368-5370
- IVERSEN, C., M. WADDINGTON, J. J. FARMER III und S. J. FORSYTHE (2006):
The biochemical differentiation of *Enterobacter sakazakii* genotypes.
BMC Microbiol, 6, 94
- IVERSEN C. und S.J. FORSYTHE (2007):
Comparison of Media for the Isolation of *Enterobacter sakazakii*.
Appl Environ Microbiol, 73, 48-52
- IVERSEN, C., A. LEHNER, N. MULLANE, E. BIDLAS, I. CLEENWERCK, J. MARUGG, S. FANNING, R. STEPHAN und H. JOOSTEN (2007a):
The taxonomy of *Enterobacter sakazakii*: proposal of a new genus *Cronobacter* gen. nov. and descriptions of *Cronobacter sakazakii* comb. nov., *Cronobacter sakazakii* subsp. *sakazakii*, comb. nov., *Cronobacter sakazakii* subsp. *malonaticus* subsp. nov., *Cronobacter turicensis* sp. nov., *Cronobacter mytjensii* sp. nov., *Cronobacter dublinensis* sp. nov. and *Cronobacter genomospecies* I.
BMC Evol Biol, 7, 64
- IVERSEN, C., A. LEHNER, N. MULLANE, J. MARUGG, S. FANNING, R. STEPHAN und H. JOOSTEN (2007b):
Identification of “*Cronobacter*” spp. (*Enterobacter sakazakii*)
J Clin Microbiol, 45, 3814-3816
- IVERSEN, C., N. MULLANE, B. MCCARDELL, B. D. TALL, A. LEHNER, S. FANNING, R. STEPHAN und H. JOOSTEN (2008a):
Cronobacter gen. nov., a new genus to accommodate the biogroups of *Enterobacter sakazakii*, and proposal of *Cronobacter sakazakii* gen. nov., comb. nov., *Cronobacter malonaticus* sp. nov., *Cronobacter turicensis* sp. nov., *Cronobacter mytjensii* sp. nov., *Cronobacter dublinensis* sp. nov., *Cronobacter genomospecies* 1, and of three subspecies, *Cronobacter dublinensis* subsp. *dublinensis* subsp. nov., *Cronobacter dublinensis* subsp. *lausannensis* subsp. nov. and *Cronobacter dublinensis* subsp. *lactaridi* subsp. nov.
Int J. Syst Evol Microbiol, 58, 1442-1447
- IVERSEN, C., P. DRUGGAN, S. SCHUMACHER, A. LEHNER, C. FEER, K. GSCHWEND, H. JOOSTEN und R. STEPHAN (2008b):
Development of a novel screening method for the isolation of “*Cronobacter*” spp. (*Enterobacter sakazakii*).
Appl Environ Microbiol, 74, 2550-2553
- IVERSEN, C., A. LEHNER, C. FRICKER-FEER, K. GSCHWEND und R. STEPHAN (2009):
Genotyping of *Cronobacter* (*Enterobacter sakazakii*) strains isolated from an infant formula processing plant.
Arch Lebensmittelhyg, 60, 66-72

JARADAT Z. W., Q. O. ABABNEH, I. M. SAADOUN, N. A. SAMARA und A. M. RASHDAN (2009):

Isolation of *Cronobacter* spp. (formerly *Enterobacter sakazakii*) from infant food, herbs and environmental samples and the subsequent identification and confirmation of the isolates using biochemical, chromogenic assays, PCR and 16S rRNA sequencing. *BMC Microbiol*, 9, 225

JARVIS, K. G.; C. J. GRIM, A. A. FRANCO, G. GOPINATH, V. SATHYAMOORTHY, L. HU, J. A. SADOWSKI, C. S. LEE und B. D. TALL (2011):

Molecular characterization of *Cronobacter* lipopolysaccharide O-Antigen gene clusters and development of serotype-specific PCR assays. *Appl Environ Microbiol*, 77, 4017-4026

JAVŮRKOVÁ, B., M. BLAŽKOVÁ, L. FUKAL und P. RAUCH (2012):

Rapid detection of genus *Cronobacter* in powdered infant formula milk. *Eur Food Res Technol*, 234, 1099-1104

JIMENEZ, E.B. und C. GIMENEZ (1982):

Septic shock due to *Enterobacter sakazakii*. *Clin Microbiol Newsl*, 4, 30

JØKER, R. N., T. NØRHOLM und K. E. SIBONI (1965):

A case of neonatal meningitis caused by a yellow *Enterobacter*. *Dan Med Bull*, 12, 128-130

JOSEPH, S., und S. J. FORSYTHE (2011):

Predominance of *Cronobacter sakazakii* Sequence Type 4 in Neonatal Infections. *Emerg Infect Dis*, 17, 1713-1715

JOSEPH, S., E. CETINKAYA, H. DRAHOVSKA, A. LEVICAN, M. J. FIGUERAS und S. J. FORSYTHE (2012a):

Cronobacter condimenti sp. nov., isolated from spiced meat, and *Cronobacter universalis* sp. nov., a species designation for *Cronobacter* sp. *genomospecies* 1, recovered from a leg infection, water and food ingredients. *Int J Syst Evol Microbiol*, 62, 1277-1283

JOSEPH, S., H. SONBOL, S. HARIRI, P. DESAI, M. McCLELLAND und S.J. FORSYTHE (2012b):

Diversity of the *Cronobacter* genus as revealed by multilocus sequence typing. *J Clin Microbiol*, 9, 3031-3039

JOSEPH, S., P. DESAI, Y. JI, C. A. CUMMINGS, R. SHIH, L. DEGORICIJA, A. RICO, P. BRZOSKA, S. E. HAMBY, N. MASOOD, S. HARIRI, H. SONBOL, N.

CHUZHANOVA, M. McCLELLAND, M. R. FURTADO und S. J. FORSYTHE (2012c): Comparative Analysis of Genome Sequences Covering the Seven *Cronobacter* Species. *PLoS One*, 7, e49455

- JOSEPH, S., und S. J. FORSYTHE (2012):
Insights into the emergent bacterial pathogen *Cronobacter* spp., generated by multilocus sequence typing and analysis.
Front Microbiol, 3, 397
- JOSEPH, S., S. HARIRI und S. J. FORSYTHE (2013):
Lack of continuity between *Cronobacter* biotypes and species as determined using multilocus sequence typing.
Mol Cell Probes, 27, 137-139
- KANDHAI, M. C., M.W. REIJ, L.G.M. GORRIS, O. GUILLAUME-GENTIL und M. VAN SCHOTHORST (2004):
Occurrence of *Enterobacter sakazakii* in food production environments and households
Lancet, 363, 39-40
- KANDHAI, M. C., M. W. REIJ, C. GROGNOU, M. VAN SCHOTHORST, L. G. M. GORRIS und M. H. ZWIETERING (2006):
Effects of preculturing conditions on lag time and specific growth rate of *Enterobacter sakazakii* in reconstituted powdered infant formula.
Appl Environ Microbiol, 72, 2721-2729
- KANG, E. S., Y. S. NAM und K. W. HONG (2007):
Rapid detection of *Enterobacter sakazakii* using TaqMan real-time PCR assay.
J Microbiol Biotechnol, 17, 516-519
- KARAMONOVÁ, L., P. JUNKOVÁ, D. MIHALOVÁ, B. JAVŮRKOVÁ, L. FUKAL, P. RAUCH und M. BLAŽKOVÁ (2013):
The potential of matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry for the identification of biogroups of *Cronobacter sakazakii*.
Rapid Commun Mass Spectrom, 27, 409-418
- KIM, H. und L. R. BEUCHAT (2005):
Survival and growth of *Enterobacter sakazakii* on fresh-cut fruits and vegetables and in unpasteurized juices as affected by storage temperature.
J Food Prot, 68, 2541-2552
- KIM, H., J. H. RYU und L. R. BEUCHAT (2006):
Attachment of and biofilm formation by *Enterobacter sakazakii* on stainless steel and enteral feeding tubes.
Appl Environ Microbiol, 72, 5846-5856
- KIM, K. und M. J. LOESSNER (2008):
Enterobacter sakazakii invasion in human intestinal Caco-2 cells requires the host cell cytoskeleton and is enhanced by disruption of tight junction.
Infect Immun, 76, 562-570
- KIM, K., K.-P. KIM, J. CHOI, J.-A. LIM, J. LEE, S. HWANG und S. RYU (2010):
Outer membrane proteins A (*OmpA*) and X (*OmpX*) are essential for basolateral invasion of *Cronobacter sakazakii*.
Appl Environ Microbiol, 76, 5188-5198

KOTHARY, M. H., B.A. McCARDELL, C.D. FRAZAR, D. DEER und B.D. TALL (2007):

Characterization of the zinc-containing metalloprotease encoded by *zpx* and development of a species-specific detection method for *Enterobacter sakazakii*.
Appl Environ Microbiol, 73, 4142-4151

KRAEMER, I. (2008):

Untersuchungen zum Vorkommen von *Enterobacter sakazakii* in Speiseeis mit real-time-PCR-Verfahren.

Diss. med. vet., LMU München, Deutschland

KRESS, C., A.A. HASSAN, Ö. AKINEDEN, E. SCHNEIDER, S. ESTUNINGSIH, H. BECKER und E. USLEBER (2005):

Enterobacter sakazakii in Trockenerzeugnissen auf Milchbasis.

46. Arbeitstagung des Arbeitsgebietes Lebensmittelhygiene der Deutschen

Veterinärmedizinischen Gesellschaft (27.-30. September 2005 in Garmisch-Partenkirchen), Tagungsbericht. Gießen, DVG

KUCEROVA, E., S. W. CLIFTON, X.-Q. XIA, F. LONG, S. PORWOLLIK, L. FULTON, C. FRONICK, P. MINX, K. KYUNG, W. WARREN, R. FULTON, D. FENG, A. WOLLAM, N. SHAH, V. BHONAGIRI, W. E. NASH, K. HALLSWORTH-PEPIN, R. K. WILSON, M. McCLELLAND und S. J. FORSYTHE (2010):

Genome sequence of *Cronobacter sakazakii* BAA-894 and comparative genomic hybridization analysis with other *Cronobacter* species.

PLoS One, 5, e9556

KUCEROVA, E., S. JOSEPH und S. FORSYTHE (2011):

The *Cronobacter* genus: ubiquity and diversity.

Qual Assur Saf Crop Food, 3, 104-122

KUHNERT, P., B. M. KORCZAK, R. STEPHAN, H. JOOSTEN und C. IVERSEN (2009):

Phylogeny and prediction of genetic similarity of *Cronobacter* and related taxa by multilocus sequence analysis (MLSA).

Int J Food Microbiol, 136, 152-158

KURZ, C. (2009):

Vorkommen und Bedeutung von *Enterobacteriaceae* in Säuglingsfertignahrungsmitteln unter besonderer Berücksichtigung von *Enterobacter sakazakii*.

Diss. med. vet. JLU Gießen

VVB Laufersweiler Verlag, Gießen, Deutschland

KUZINA, L. V., J. J. PELOQUIN, D. C. VACEK und T. A. MILLER (2001):

Isolation and identification of bacteria associated with adult laboratory Mexican fruit flies, *Anastrepha ludens* (Diptera: Tephritidae).

Curr Microbiol, 42, 290-294

LAFARGE, V., J. C. OGIER, V. GIRARD, V. MALADEN, J. Y. LEVEAU, A. GRUSS und A. D. DELACROIX-BUCHET (2004):

Raw cow milk bacterial population shifts attributable to refrigeration.

Appl Environ Microbiol, 70, 5644-5650

LAI, K.K. (2001):

Enterobacter sakazakii infections among neonates, infants, children, and adults.

Medicine (Baltimore), 80, 113-122

LAMPEL, K., und Y. CHEN (2009):

Method for the isolation and detection of *Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter*) from powdered infant formula.

Int J Food Microbiol, 136, 179-184

LECLERC, H., D. A. A. MOSSEL, S. C. EDBERG und C.B. STRUIJK (2001):

Advances in the bacteriology of the coliform group: their suitability as markers of microbial water safety.

Annu Rev Microbiol, 55, 201-234

LECLERCQ, A., C. WANEGUE und P. BAYLAC (2002):

Comparison of fecal coliform agar and violet red bile lactose agar for fecal coliform enumeration in foods.

Appl Environ Microbiol, 68, 1631-1638

LEHNER, A., T. TASARA und R. STEPHAN (2004):

16S rRNA gene based analysis of *Enterobacter sakazakii* strains from different sources and development of a PCR assay for identification.

BMC Microbiol, 4, 43

LEHNER, A., K. RIEDEL, L. EBERL, P. BREEUWER, B. DIEP und R. STEPHAN (2005):

Biofilm formation, extracellular polysaccharide production, and cell-to-cell signaling in various *Enterobacter sakazakii* strains: Aspects promoting environmental persistence.

J Food Prot, 68, 2287-2294

LEHNER, A., K. RIEDEL, T. RATTEI, A. RUEPP, D. FRISHMAN, P. BREEUWER, B. DIEP, L. EBERL und R. STEPHAN (2006):

Molecular characterization of the α -glucosidase activity in *Enterobacter sakazakii* reveals the presence of a putative gene cluster for palatinose metabolism.

Syst Appl Microbiol, 29, 609-625

LEHNER, A., C. FRICKER-FEER, K. GSCHWEND und R. STEPHAN (2010):

Identification of *Enterobacteriaceae* and *Cronobacter* spp. in raw milk, milk concentrate and milk powder: prevalence and genotyping.

Arch Lebensmittelhyg, 61, 22-26

LEHNER, A., C. FRICKER-FEER und R. STEPHAN (2011):

Detection, identification and typing methods for *Cronobacter* spp. – a review.

Arch Lebensmittelhyg, 62, 175-180

- LEHNER, A., C. FRICKER-FEER und R. STEPHAN (2012):
Identification of the recently described *Cronobacter condimenti* by an *rpoB*-gene-based PCR system.
J Med Microbiol, 61, 1034-1035
- LEHNER, A.; C. FRICKER-FEER und R. STEPHAN (2013):
Pathogene Mikroorganismen: *Cronobacter*. Taxonomie, Eigenschaften und Präventionsmaßnahmen.
1. Aufl., Behr's Verlag, Hamburg, S. 17-18, 22-30, 37, 63-74
- LI, Y., L. CAO, J. ZHAO, Q. CHENG, F. LU, X. BIE und Z. LU (2012):
Use of *rpoB* gene sequence analysis for phylogenetic identification of *Cronobacter* species.
J Microbiol Methods, 88, 316-318
- LIU, Y., X. CAI, X. ZHANG, Q. GAO, X. YANG, Z. ZHENG, M. LUO und X. HUANG (2006):
Real time PCR using TaqMan and SYBR Green for detection of *Enterobacter sakazakii* in infant formula.
J Microbiol Methods, 65, 21-31
- MAIDEN, M.C. J., J. A. BYGRAVES, E. FEIL, G. MORELLI, J. E. RUSSELL, R. URWIN, Q. ZHANG, J. ZHOU, K. ZURTH, D. A. CAUGANT, I. M. FEAVERS, M. ACHTMAN und B. G. SPRATT (1998):
Multilocus sequence typing: A portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms.
Proc Natl Acad Sci U S A, 95, 3140-3145
- MANGE, J.-P., R. STEPHAN, N. BOREL, P. WILD, K.S. KIM, A. POSPISCHIL und A. LEHNER (2006):
Adhesive properties of *Enterobacter sakazakii* to human epithelial and brain microvascular endothelial cells.
BMC Microbiol, 6, 58
- MILED-BENNOUR, R., T. C. ELLS, F.J. PAGOTTO, J.M. FARBER, A. KÉROUANTON, T. MEHEUT, P. COLIN, H. JOOSTEN, A. LECLERCQ und N. GNANOU BESSE (2010):
Genotypic and phenotypic characterization of a collection of *Cronobacter (Enterobacter sakazakii)* isolates.
Int J Food Microbiol, 139, 116-125
- MILUPA NUTRICIA GMBH (2012):
Milupa Deutschland informiert über den laufenden Rückruf zu Aptamil pre (Mindesthaltbarkeitsdatum 11.01.2014) 26.07.2012 – 14:24
<http://www.presseportal.de/pm/53080/2296044>, (Stand: Juni 2017)
- MITTAL, R., Y. WANG, C. J. HUNTER, I. GONZALEZ-GOMEZ und N. V. PRASADARAO (2009):
Brain damage in newborn rat model of meningitis by *Enterobacter sakazakii*: a role for outer membrane protein A.
Lab Invest, 89, 263-277

- MOHAN NAIR, M. K. und K. S. VENKITANARAYANAN (2006):
Cloning and sequencing of the *ompA* gene of *Enterobacter sakazakii* and development of an *ompA*-targeted PCR for rapid detection of *Enterobacter sakazakii* in infant formula. *Appl Environ Microbiol*, 72, 2539-2546
- MOHAN NAIR, M. K. und K. VENKITANARAYANAN (2007):
Role of bacterial *ompA* and host cytoskeleton in the invasion of human intestinal epithelial cells by *Enterobacter sakazakii*. *Pediatr Res*, 62, 664-669
- MOHAN NAIR, M. K., K. VENKITANARAYANAN, L. K. SILBART und K. S. KIM (2009):
Outer membrane protein A (*ompA*) of *Cronobacter sakazakii* binds fibronectin and contributes to invasion of human brain microvascular endothelial cells. *Foodborne Pathog Dis*, 6, 495-501
- MOLLET, C., M. DRANCOURT und D. RAOULT (1997):
rpoB sequence analysis as a novel basis for bacterial identification. *Mol Microbiol*, 26, 1005-1011
- MOSSO, M. A., M. C. DE LA ROSA, C. VIVAR und M. R. MEDINA (1994):
Heterotrophic bacterial populations in the mineral waters of thermal springs in Spain. *J Appl Bacteriol*, 77, 370-381
- MOZROVÁ, V., N. BŘEŇOVÁ, J. MRÁZEK, D. LUKEŠOVÁ und M. MAROUNEK (2014):
Surveillance and characterisation of *Cronobacter* spp. in Czech retail food and environmental samples. *Folia Microbiol (Praha)*, 59, 63-68
- MRAMBA, F., A. BROCE und L. ZUREK (2006):
Isolation of *Enterobacter sakazakii* from stable flies, *Stomoxys calcitrans* L. (Diptera: Muscidae). *J Food Prot*, 69, 671-673
- MULLANE, N. R., D. DRUDY, P. WHYTE, M. O'MAHONY, A.G.M. SCANNELL, P.G. WALL und S. FANNING (2006):
Enterobacter sakazakii: biological properties and significance in dried infant milk formula (IMF) powder. *Int J Dairy Technol*, 59, 102-111
- MULLANE, N. R., P. WHYTE, P. G. WALL, T. QUINN und S. FANNING (2007):
Application of pulsed-field gel electrophoresis to characterise and trace the prevalence of *Enterobacter sakazakii* in an infant formula processing facility. *Int J Food Microbiol*, 116, 73-81
- MULLANE, N. R., P. O'GAORA, J. E. NALLY, C. IVERSEN, P. WHYTE, P. G. WALL, und S. FANNING (2008a):
Molecular analysis of the *Enterobacter sakazakii* O-antigen gene locus. *Appl Environ Microbiol*, 74, 3783-3794

MULLANE, N. R., B. HEALY, J. MEADE, P. WHYTE, P. G. WALL und S. FANNING (2008b):

Dissemination of *Cronobacter* spp. (*Enterobacter sakazakii*) in a powdered milk protein manufacturing facility.

Appl Environ Microbiol, 74, 5913-5917

MUYTJENS, H.L., H. C. ZANEN, H. J. SONDERKAMP, L. A. KOLLÉE, I. K. WACHSMUTH und J. J. FARMER III (1983):

Analysis of eight cases of neonatal meningitis and sepsis due to *Enterobacter sakazakii*.

J Clin Microbiol, 18, 115-120

MUYTJENS, H. L., J. VAN DER ROS-VAN DE REPE und H. A. M. VAN DRUTEN (1984):

Enzymatic profiles of *Enterobacter sakazakii* and related species with special reference to the α -glucosidase reaction and reproducibility of the test system.

J Clin Microbiol, 20, 684 – 686

MUYTJENS, H.L., H. ROELOFS-WILLEMSE und G.H.J. JASPAR (1988):

Quality of powdered substitutes for breast milk with regard to the members of the family *Enterobacteriaceae*.

J Clin Microbiol, 26, 743-746

NAZAROWEC-WHITE, M. und J. M. FARBER (1997a):

Enterobacter sakazakii: a review.

Int J Food Microbiol, 34, 103-113

NAZAROWEC-WHITE, M. und J. M. FARBER (1997b):

Thermal resistance of *Enterobacter sakazakii* in reconstituted dried-infant formula.

Lett Appl Microbiol, 24, 9-13

NAZAROWEC-WHITE, M. und J. M. FARBER (1999):

Phenotypic and genotypic typing of food and clinical isolates of *Enterobacter sakazakii*.

J Med Microbiol, 48, 559-567

NORIEGA, F. R., K.L. KOTLOFF, M. A. MARTIN und R. S. SCHWALBE (1990):

Nosocomial bacteremia caused by *Enterobacter sakazakii* and *Leuconostoc mesenteroides* resulting from extrinsic contamination of infant formula.

Pediatr Infect Dis J, 9, 447-449

ONGRÁDI, J. (2002):

Vaginal infection by *Enterobacter sakazakii*.

Sex Transm Infect, 78, 467-468

PAGOTTO, F.J., M. NAZAROWEC-WHITE, S. BIDAWID und J.M. FARBER (2003):

Enterobacter sakazakii: Infectivity and enterotoxin production in vitro and in vivo.

J Food Protect, 66, 370-375

PANGALOS, G. (1929):

Sur un bacille chromogène isolé par hémoculture.

Comptes Rendus Seances Soc Biol, 100, 1097

- PAVA-RIPOLL, M., R. E. G. PEARSON, A. K. MILLER und G. C. ZIOBRO (2012):
Prevalence and relative risk of *Cronobacter* spp., *Salmonella* spp., and *Listeria monocytogenes* associated with the body surfaces and guts of individual filth flies.
Appl Environ Microbiol, 78, 7891-7902
- PAVLOVIC, M., R. KONRAD, I. HUBER und U. BUSCH (2011):
Identifizierung von Mikroorganismen. Einsatz von MALDI-TOF-MS in der
Lebensmittelanalytik.
DLR Spezial, Lebensmittelanalytik März 2011
- PRIBYL, C., R. SALZER, J. BESKIN, R. J. HADDAD, B. POLLOCK, R. BEVILLE, B.
HOLMES und W. J. MOGABGAB (1985):
Aztreonam in the treatment of serious orthopedic infections.
Am J Med, 78, 51-56
- RAGHAV. M. und P.K. AGGARWAL (2007):
Purification and characterization of *Enterobacter sakazakii* enterotoxin.
Can J Microbiol, 53, 750-755
- RESTAINO, L., E. W. FRAMPTON, W. C. LIONBERG und R. J. BECKER (2006):
A chromogenic plating medium for the isolation and identification of *Enterobacter sakazakii* from foods, food ingredients, and environmental sources.
J Food Prot, 69, 315-322
- RIEDEL, K. und A. LEHNER (2007):
Identification of proteins involved in osmotic stress response in *Enterobacter sakazakii* by
proteomics.
Proteomics, 7, 1217-1231
- SANJAQ, S. (2008):
Enterobacter sakazakii - Risikoprofil und Untersuchungen zum Nachweis in
Säuglingsnahrungen.
Diss. oec. troph. JLU Gießen
VVB Laufersweiler Verlag, Gießen, Deutschland
- SCHAUER, K., A. LEHNER, R. DIETRICH, I. KLEINSTEUBER, R. CANALS, K.
ZURFLUH, K. WEINER und E. MÄRTLBAUER (2015)
A *Cronobacter turicensis* O1 antigen-specific monoclonal antibody inhibits bacterial
motility and entry into epithelial cells.
Infect Immun, 83, 876-887
- SCHMID, M., C. IVERSEN, I. GONTIA, R. STEPHAN, A. HOFMANN, A.
HARTMANN, B. JHA, L. EBERL, K. RIEDEL und A. LEHNER (2009):
Evidence for a plant-associated natural habitat for *Cronobacter* spp.
Res Microbiol, 160, 608-614
- SEE, K. C., H.A. THAN und T. TANG (2007):
Enterobacter sakazakii bacteraemia with multiple splenic abscesses in a 75-year-old
woman: a case report.
Age and Ageing, 36, 595-596

- SEO, K.H. und R.E. BRACKETT (2005):
Rapid, specific detection of *Enterobacter sakazakii* in infant formula using a real time PCR assay.
J Food Prot, 68, 59-63
- SINGAMSETTY, V. K., Y. WANG, H. SHIMADA und N. V. PRASADARAO (2008):
Outer membrane protein A expression in *Enterobacter sakazakii* is required to induce microtubule condensation in human brain microvascular endothelial cells for invasion.
Microb Pathog, 45, 181-191
- SIMMONS, B.P., M.S. GELFAND, M. HAAS, L. METTS und J. FERGUSON (1989):
Enterobacter sakazakii infections in neonates associated with intrinsic contamination of a powdered infant formula.
Infect Control Hosp Epidemiol, 10, 398-401
- SONBOL, H., S. JOSEPH, C. M. McAULEY, H. M. CRAVEN und S. J. FORSYTHE (2013):
Multilocus sequence typing of *Cronobacter* spp. from powdered infant formula and milk powder production factories.
Int Dairy J, 30, 1-7
- STEIGERWALT, A. G.; G. R. FANNING, M. A. FIFE-ASBURY und D. J. BRENNER (1976):
DNA relatedness among species of *Enterobacter* and *Serratia*.
Can J Microbiol, 22 121-137
- STEPHAN, R., S. VAN TRAPPEN, I. CLEENWERCK, M. VANCANNEYT, P. DE VOS und A. LEHNER (2007):
Enterobacter turicensis sp. nov. and *Enterobacter helveticus* sp. nov., isolated from fruit powder.
Int J Syst Evol Microbiol, 57, 820-826
- STEPHAN, R., S. VAN TRAPPEN, I. CLEENWERCK, C. IVERSEN, H. JOOSTEN, P. DE VOS und A. LEHNER (2008):
Enterobacter pulveris sp. nov., isolated from fruit powder, infant formula and an infant formula production environment.
Int J Syst Evol Microbiol, 58, 237-241
- STEPHAN, R., D. ZIEGLER, V. PFLÜGER, G. VOGEL und A. LEHNER (2010):
Rapid genus- and species-specific identification of *Cronobacter* spp. by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry.
J Clin Microbiol, 48, 2846-2851

- STEPHAN, R., C. J. GRIM, G. R. GOPINATH, M. K. MAMMEL, V. SATHYAMOORTHY, L. H. TRACH, H. R. CHASE, S. FANNING und B. D. TALL (2014)
Re-examination of the taxonomic status of *Enterobacter helveticus*, *Enterobacter pulveris* and *Enterobacter turicensis* as members of the genus *Cronobacter* and their reclassification in the genera *Franconibacter* gen. nov. and *Siccibacter* gen. nov. as *Franconibacter helveticus* comb. nov., *Franconibacter pulveris* comb. nov. and *Siccibacter turicensis* comb. nov., respectively.
Int J Syst Evol Microbiol, 64, 3402-3410
- STOLL, B. J., N. HANSEN, A. A. FANAROFF und J. A. LEMONS (2004):
Enterobacter sakazakii is a rare cause of neonatal septicemia or meningitis in VLBW infants.
J Pediatr, 144, 821-823
- STOOP, B., A. LEHNER, C. IVERSEN, S. FANNING und R. STEPHAN (2009):
Development and evaluation of *rpoB* based PCR systems to differentiate the six proposed species within the genus *Cronobacter*.
Int J Food Microbiol, 136, 165-168
- STRYDOM, A., M. CAMERON und R. C. WITTHUHN (2011):
PCR-RFLP analysis of the *rpoB* gene to distinguish the five species of *Cronobacter*.
Food Microbiol, 28, 1472-1477
- STRYDOM, A., M. CAMERON und R. C. WITTHUHN (2012):
Phylogenetic analysis of *Cronobacter* isolates based on the *rpoA* and 16S rRNA genes.
Curr Microbiol, 64, 251-258
- SUN, Y., M. WANG, H. LIU, J. WANG, X. HE, J. ZENG, X. GUO, K. LI, B. CAO und L. WANG (2011):
Development of an O-Antigen serotyping scheme for *Cronobacter sakazakii*.
Appl Environ Microbiol, 77, 2209-2214
- SUN, Y., N. P. ARBATSKY, M. WANG, A. S. SHASHKOV, B. LIU, L. WANG und Y. A. KNIREL (2012):
Structure and genetics of the O-antigen of *Cronobacter turicensis* G3882 from a new serotype, *C. turicensis* O2, and identification of a serotype-specific gene.
FEMS Immunol Med Microbiol, 66, 323-333
- TAMURA, K., G. STECHER, D. PETERSON, A. FILIPSKI und S. KUMAR (2013):
MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0.
Mol Biol Evol, 30, 2725-2729
- TENOVER, F. C., R.D. ARBEIT, R. V. GOERING, P. A. MICKELSEN, B. E. MURRAY, D. H. PERSING und B. SWAMINATHAN (1995):
Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by Pulsed-Field Gel Electrophoresis: Criteria for bacterial strain typing.
J Clin Microbiol, 33, 2233-2239

- TERRAGNO, R., A. SALVE, M. PICHEL, S. EPSZTEYN, S. BRENGI und N. BINSZTEIN (2009):
Characterization and subtyping of *Cronobacter* spp. from imported powdered infant formulae in Argentina.
Int J Food Microbiol, 136, 193-197
- TOWNSEND, S., J.C. BARRON, C. LOC-CARRILLO und S. FORSYTHE (2007):
The presence of endotoxin in powdered infant formula milk and the influence of endotoxin and *Enterobacter sakazakii* on bacterial translocation in the infant rat.
Food Microbiol, 24, 67-74
- TOWNSEND, S., E. HURRELL und S. FORSYTHE (2008):
Virulence studies of *Enterobacter sakazakii* isolates associated with a neonatal intensive care unit outbreak.
BMC Microbiol, 8, 64
- TURCOVSKÝ, I., K. KUNIKOVÁ, H. DRAHOVSKÁ und E. KACLÍKOVÁ (2011):
Biochemical and molecular characterization of *Cronobacter* spp. (formerly *Enterobacter sakazakii*) isolated from foods.
Antonie van Leeuwenhoek, 99, 257-269
- URMENYI, A.M. und A.W. FRANKLIN (1961):
Neonatal death from pigmented coliform infection.
Lancet, 1, 313-315
- URWIN, R., und M. C. J. MAIDEN (2003):
Multi-locus sequence typing: a tool for global epidemiology.
Trends Microbiol, 11, 479-487
- VAN ACKER, J., F. DE SMET, G. MUYLDERMANS, A. BOUGATEF, A. NAESSENS und S. LAUWERS (2001):
Outbreak of necrotizing enterocolitis associated with *Enterobacter sakazakii* in powdered milk formula.
J Clin Microbiol, 39, 293-297
- WANG, Z., L. RUSSON, L. LI, D. C. ROSER und S. R. LONG (1998):
Investigation of spectral reproducibility in direct analysis of bacteria proteins by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry.
Rapid Commun Mass Spectrom, 12, 456-464
- WEISBURG, W. G., S. M. BARNES, D. A. PELLETIER und D. J. LANE (1991):
16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study.
J Bacteriol, 173, 697-703
- WHO/FAO (2007):
Guidelines on safe preparation, storage and handling of powdered infant formula.
http://www.who.int/foodsafety/publications/micro/pif_guidelines.pdf (Stand: Juni 2017)

WILLIAMS, T. L., S. R. MONDAY, S. G. EDELSON-MAMMEL, R. BUCHANAN und S. M. MUSSER (2005):

A top-down proteomics approach for differentiating thermal resistant strains of *Enterobacter sakazakii*.
Proteomics, 5, 4161-4169

XU, X., Q. WU, J. ZHANG, Y. YE, X. YANG und X. DONG (2014):

Occurrence and characterization of *Cronobacter* spp. in powdered formula from Chinese Retail Markets.
Foodborne Pathog Dis, 11, 307-312

ZHU, S., S. RATERING, S. SCHNELL und R. WACKER (2011):

Matrix-assisted laser desorption and ionization-time-of-flight mass spectrometry, 16S rRNA gene sequencing, and API 32E for Identification of *Cronobacter* spp.: A comparative study.
J Food Prot, 74, 2182-2187

ZOGAJ, X., W. BOKRANZ, M. NIMTZ und U. RÖMLING (2003):

Production of cellulose and curli fimbriae by members of the family *Enterobacteriaceae* isolated from the human gastrointestinal tract.
Infect Immun, 71, 4151-4158

ANHANG

Tabelle 33: Ergebnisübersicht der untersuchten Isolate

Isolat-Bezeichnung	Probennummer	Erreger Nr.	Herkunftsland	Art der Probe	Biotyp	Biochemische Spezieszuordnung	ppv B-Gen PCR	Partiell-ppv B-Gen Sequenzanalyse	Spezies gemäß MLST	HAALDI-TOPIKAS	Berechnungswert	PFGE-Typ
Indonesische Säugetierhaltung												
84-2003	1	E1	Indonesien	Folgentürung	2	C. ramosi	C. solozochi	C. solozochi	f	f	/	813
74-2003	2	E1	Indonesien	Folgentürung	2	C. ramosi	C. solozochi	C. solozochi	f	f	Oryzokante pp.	3,25
104-2003	3	E1	Indonesien	Folgentürung	2	C. ramosi	C. solozochi	C. solozochi	f	f	Oryzokante pp.	2,104
334-2003	4	E1	Indonesien	Folgentürung	1	C. ramosi	C. solozochi	C. solozochi	f	f	Oryzokante pp.	2,261
364-2003	5	E1	Indonesien	Folgentürung	9	C. nedjariense	C. emborvansae	C. emborvansae	C. medfordense	C. medfordense	Oryzokante pp.	2,374
864-2006	5	E1	Indonesien	Folgentürung	5	C. nedjariense	C. solozochi	C. solozochi	f	f	Oryzokante pp.	2,116
364-2003	5	E1	Indonesien	Folgentürung	9	C. nedjariense	C. emborvansae	C. emborvansae	f	f	/	/
865-2003	5	E1	Indonesien	Folgentürung	2	C. ramosi	C. solozochi	C. solozochi	f	f	Oryzokante pp.	2,374
866-2006	5	E1	Indonesien	Folgentürung	2	C. ramosi	C. solozochi	C. solozochi	f	f	Oryzokante pp.	2,166
866-2006	5	E1	Indonesien	Folgentürung	5	C. nedjariense	C. solozochi	C. solozochi	f	f	Oryzokante pp.	2,107
374-2003	6	E1	Indonesien	Folgentürung	5	C. nedjariense	C. emborvansae	C. emborvansae	C. medfordense	C. medfordense	Oryzokante pp.	2,377
374-2006	6	E1	Indonesien	Folgentürung	2	C. ramosi	C. solozochi	C. solozochi	f	f	Oryzokante pp.	2,407
374-2003	6	E1	Indonesien	Folgentürung	2	C. ramosi	C. solozochi	C. solozochi	f	f	/	846
374-2006	6	E1	Indonesien	Folgentürung	2	C. ramosi	C. solozochi	C. solozochi	f	f	Oryzokante pp.	2,342
374-2003	6	E1	Indonesien	Folgentürung	2	C. ramosi	C. solozochi	C. solozochi	f	f	/	/
374-2006	6	E1	Indonesien	Folgentürung	2	C. ramosi	C. solozochi	C. solozochi	f	f	Oryzokante pp.	2,193
384-2003	7	E1	Indonesien	Folgentürung	1	C. ramosi	C. solozochi	C. solozochi	C. solozochi	C. solozochi	Oryzokante pp.	2,285
384-2006	7	E1	Indonesien	Folgentürung	1	C. ramosi	C. solozochi	C. solozochi	f	f	Oryzokante pp.	2,206
384-2003	7	E1	Indonesien	Folgentürung	1	C. ramosi	C. solozochi	C. solozochi	f	f	/	/
384-2006	7	E1	Indonesien	Folgentürung	1	C. ramosi	C. solozochi	C. solozochi	f	f	Oryzokante pp.	3,29
384-2003	7	E1	Indonesien	Folgentürung	1	C. ramosi	C. solozochi	C. solozochi	f	f	Oryzokante pp.	2,284
384-2006	7	E1	Indonesien	Folgentürung	1	C. ramosi	C. solozochi	C. solozochi	f	f	Oryzokante pp.	3,25
394-2003	7	E1	Indonesien	Folgentürung	1	C. ramosi	C. solozochi	C. solozochi	f	f	Oryzokante pp.	2,286
394-2006	7	E1	Indonesien	Folgentürung	2	C. ramosi	C. solozochi	C. solozochi	f	f	Oryzokante pp.	2,419
204-2006	8	E2	Indonesien	Folgentürung	2	C. ramosi	C. solozochi	C. solozochi	f	f	Oryzokante pp.	2,407
204-2006	8	E2	Indonesien	Folgentürung	2	C. ramosi	C. solozochi	C. solozochi	f	f	Oryzokante pp.	2,407
64-2006	9	E2	Indonesien	Folgentürung	1	C. ramosi	C. solozochi	C. solozochi	f	f	Oryzokante pp.	2,124
64-2006	10	E2	Indonesien	Folgentürung	1	C. ramosi	C. solozochi	C. solozochi	f	f	Oryzokante pp.	2,283
BE-206/1-04	11	E1	Indonesien	Aufgabenklärung	*	C. ramosi	C. solozochi	C. solozochi	f	f	Oryzokante pp.	3,16
BE-206/2-104 E	11	E1	Indonesien	Aufgabenklärung	*	C. ramosi	C. solozochi	C. solozochi	f	f	Oryzokante pp.	3,16
BE-206/2-104 G	11	E1	Indonesien	Aufgabenklärung	*	C. ramosi	C. solozochi	C. solozochi	f	f	Oryzokante pp.	3,16

totale Bereicherung	Problemmummer	Boresteller Nr.	Berichtsfähig	Art der Probe	Biologische Spezifizierung	Pop B-Gen PCR	Intervalle pro B-Gen Sequenzanalyse	Spezies gemäß MLST	MAALD-TOP MS Bewertungsschl	PFGE-Typ
EB-2667-04	E1	Inoreisen	Aufgangsauftrag	C. salmonelli	/	C. salmonelli	/	/	/	/
EB-2717-1-04	E1	Inoreisen	Aufgangsauftrag	C. salmonelli	/	C. salmonelli	/	/	/	B17
EB-2714-004	E1	Inoreisen	Aufgangsauftrag	C. salmonelli	/	C. salmonelli	C. salmonelli	/	Crosskolonne pp.	2,217
EB-2716-1-04	E1	Inoreisen	Aufgangsauftrag	C. salmonelli	/	C. salmonelli	/	/	/	B17
EB-2492-006	E1	Inoreisen	Aufgangsauftrag	C. salmonelli	/	C. salmonelli	/	/	Crosskolonne pp.	2,144
EB-384-2008	E1	Inoreisen	Aufgangsauftrag	C. salmonelli	/	C. salmonelli	/	/	/	/
EB-104-2006	E1	Inoreisen	Aufgangsauftrag	C. salmonelli	/	C. salmonelli	n. l.	/	/	/
EB-377-2006	E1	Inoreisen	Aufgangsauftrag	C. salmonelli	/	C. salmonelli	/	/	/	/
EB-249-2006	E1	Inoreisen	Aufgangsauftrag	C. salmonelli	/	C. salmonelli	/	/	/	/
EB-884-2008	E1	Inoreisen	Aufgangsauftrag	C. salmonelli	/	C. salmonelli	/	/	/	/
EB-894-2006	E1	Inoreisen	Aufgangsauftrag	C. salmonelli	/	C. salmonelli	/	/	/	/
EB-106/6-2006	E1	Inoreisen	Aufgangsauftrag	C. salmonelli	/	C. salmonelli	/	/	Crosskolonne pp.	2,183
EB-106/2-2006	E1	Inoreisen	Aufgangsauftrag	C. salmonelli	/	C. salmonelli	/	/	/	/
EB-106/3-2006	E1	Inoreisen	Aufgangsauftrag	C. salmonelli	/	C. salmonelli	n. l.	/	/	B62
EB-106/5-2006	E1	Inoreisen	Aufgangsauftrag	C. salmonelli	/	C. salmonelli	C. salmonelli	/	Crosskolonne pp.	2,166
EB-106/7-2006	E1	Inoreisen	Aufgangsauftrag	C. salmonelli	/	C. salmonelli	/	/	/	ME
EB-106/1-2006	E1	Inoreisen	Aufgangsauftrag	C. salmonelli	/	C. salmonelli	/	/	Crosskolonne pp.	2,256
EB-716/4-2006	E1	Inoreisen	Aufgangsauftrag	C. salmonelli	/	C. salmonelli	/	/	/	B53
EB-716/2-2006	E1	Inoreisen	Aufgangsauftrag	C. salmonelli	/	C. salmonelli	C. salmonelli	/	Crosskolonne pp.	2,234
EB-716/3-2006	E1	Inoreisen	Aufgangsauftrag	C. salmonelli	/	C. salmonelli	/	/	Crosskolonne pp.	2,021
EB-716/2006	E1	Inoreisen	Aufgangsauftrag	C. salmonelli	/	C. salmonelli	/	/	Crosskolonne pp.	2,245
EB-716/1-2006	E1	Inoreisen	Aufgangsauftrag	C. salmonelli	/	C. salmonelli	/	/	/	/
EB-716/5-2006	E1	Inoreisen	Aufgangsauftrag	C. salmonelli	/	C. salmonelli	/	/	/	/
EB-39/2-2006	E1	Inoreisen	Aufgangsauftrag	C. salmonelli	/	C. salmonelli	/	/	Crosskolonne pp.	2,265
EB-39/1-2006	E1	Inoreisen	Aufgangsauftrag	C. salmonelli	/	C. salmonelli	/	/	Crosskolonne pp.	2,287
EB-307/2-2006	B2	Inoreisen	Aufgangsauftrag	C. salmonelli	/	C. salmonelli	C. salmonelli	/	/	ME

Lehr-Bezeichnung	Prüfungsnummer	Exzeder-Nr.	Rechtskreisland	Art der Probe	Butyp	Biotechnische Spezialisierung	Typ E-Gem FCRS	partielle ryp-B-Gem Spezialisierung	Spezies gemäß MLST	MALDI-TOF MS Bewertungskatl.	FFCSC-Top	
IB-3097-2/06	E2	E2	Dänemark	Folgentrang	2	C. sebacici	C. sebacici	/	/	Crowebacter spp.	2,24	/
IB-3098-2/06	E2	E2	Dänemark	Folgentrang	5	C. ernianiformis	C. ernianiformis	/	/	Crowebacter spp.	2,044	/
IB-3107-2/06	E2	E2	Dänemark	Folgentrang	1	C. sebacici	C. sebacici	/	/	/	/	/
IB-3108-2/06	E2	E2	Dänemark	Folgentrang	2	C. sebacici	C. sebacici	/	/	/	/	/
IB-3109-2/06	E3	E3	Dänemark	Folgentrang	1	C. sebacici	C. sebacici	/	/	/	/	/
IB-3109-2/06	E3	E3	Dänemark	Folgentrang	2	C. sebacici	C. sebacici	/	/	Crowebacter spp.	2,062	/
IB-3109-2/06	E4	E4	Dänemark	Folgentrang	8	C. sebacici	C. sebacici	/	/	Crowebacter spp.	2,429	S10
IB-3110/09	E4	E4	Dänemark	Folgentrang	1	C. sebacici	C. sebacici	/	/	Crowebacter spp.	2,413	/
Türkische Süngelgattung												
DB-3-34	E5	E5	Dutschland	Folgentrang	2	C. sebacici	C. sebacici	/	/	Crowebacter spp.	2,069	S7
DB-34b	E5	E5	Dutschland	Anfangstrang	1	C. sebacici	C. sebacici	/	/	/	/	/
DB-31a	E7	E7	Dutschland	Folgentrang	5	C. ernianiformis	C. ernianiformis	C. sebacici	/	Crowebacter spp.	2,165	S27
DB-32c	E7	E7	Dutschland	Folgentrang	2	C. sebacici	C. sebacici	/	/	Crowebacter spp.	2,281	S47
DB-31a	E8	E8	Dutschland	Folgentrang	2	C. sebacici	C. ernianiformis	n. i.	/	Crowebacter spp.	2,25	S20
DB-36/04	E7	E7	Dutschland	Folgentrang	2	C. sebacici	C. sebacici	/	/	Crowebacter spp.	2,459	S47
DB-37c	E8	E8	Dutschland	Folgentrang	2	C. sebacici	C. sebacici	/	/	Crowebacter spp.	2,264	S74
DB-38a	E7	E7	Dutschland	Folgentrang	1	C. sebacici	C. ernianiformis	n. i.	C. sebacici	Crowebacter spp.	2,353	S75
DB-38b	E5	E5	Dutschland	Folgentrang	1	C. sebacici	C. ernianiformis	/	/	Crowebacter spp.	2,217	S19
DB-41c	E7	E7	Dutschland	Folgentrang	1	C. sebacici	C. sebacici	/	/	Crowebacter spp.	2,429	S77
DB-43/04	E7	E7	Dutschland	Folgentrang	2	C. sebacici	C. sebacici	/	/	Crowebacter spp.	2,417	S47
DB-45a	E8	E8	Dutschland	Folgentrang	2	C. sebacici	C. sebacici	/	C. sebacici	Crowebacter spp.	2,353	S13
DB-44b	E7	E7	Dutschland	Folgentrang	1	C. sebacici	C. sebacici	/	/	Crowebacter spp.	2,288	S1
DB-45/04	E7	E7	Dutschland	Folgentrang	1	C. sebacici	C. sebacici	/	/	Crowebacter spp.	2,226	S6
DB-45/04	E7	E7	Dutschland	Folgentrang	1	C. sebacici	C. ernianiformis	n. i.	C. sebacici	Crowebacter spp.	2,047	S6
DB-45/01-05	E5	E5	Dutschland	Folgentrang	2	C. sebacici	C. sebacici	/	/	/	/	S43
DB-45/01-05	E5	E5	Dutschland	Folgentrang	2	C. sebacici	C. sebacici	/	/	Crowebacter spp.	2,157	/
DB-45/04-05	E5	E5	Dutschland	Folgentrang	2	C. sebacici	C. sebacici	/	/	/	/	/
DB-45/07-05	E5	E5	Dutschland	Folgentrang	2	C. sebacici	C. sebacici	/	/	/	/	/
DB-45/08-05	E5	E5	Dutschland	Folgentrang	2	C. sebacici	C. sebacici	/	/	/	/	/
DB-45/09-05	E5	E5	Dutschland	Folgentrang	2	C. sebacici	C. sebacici	/	/	/	/	/

Titel/Bezeichnung	Programmnr.	Hersteller Nr.	Einbaueinheit	Art der Probe	Beipr.	Biochemische Spezialuntersuchung	ppp B-Gem PCR	partielle ppp B-Gem Sequenzanalyse	Spezies gemäß MLST	MLD1 TOP JIS Bevölkerungszahl	EPCC-73p	
20-45-01-05	40	E5	Deutschland	Folgentierung	2	2. rabzucht	2. abzucht	/	/	Crowbeater 199	2.319	843
20-45-01-05	40	E5	Deutschland	Folgentierung	2	2. rabzucht	2. abzucht	/	/	Crowbeater 199	2.371	901
20-45-01-05	40	E5	Deutschland	Folgentierung	2	2. rabzucht	2. abzucht	/	/	Crowbeater 199	2.415	844
20-71-01-05	41	E6	Deutschland	Folgentierung	1	2. rabzucht	2. abzucht	/	/	/	/	/
20-71-02-05	41	E6	Deutschland	Folgentierung	1	2. rabzucht	2. abzucht	/	/	Crowbeater 199	2.119	821
20-71-03-05	41	E6	Deutschland	Folgentierung	1	2. rabzucht	2. abzucht	/	/	/	/	/
20-71-04-05	41	E6	Deutschland	Folgentierung	1	2. rabzucht	2. abzucht	/	/	Crowbeater 199	2.223	822
20-74-01-05	42	E10	Deutschland	Folgentierung	2	2. rabzucht	2. abzucht	/	/	/	/	845
20-74-02-05	42	E10	Deutschland	Folgentierung	2	2. rabzucht	2. abzucht	/	/	Crowbeater 199	2.177	846
20-74-03-05	42	E10	Deutschland	Folgentierung	2	2. rabzucht	2. abzucht	/	/	Crowbeater 199	2.43	845
20-74-04-05	42	E10	Deutschland	Folgentierung	2	2. rabzucht	2. abzucht	/	/	Crowbeater 199	2.402	845
20-80-01-05	43	E11	Deutschland	Folgentierung	2	2. rabzucht	2. abzucht	/	/	Crowbeater 199	2.305	871
20-80-02-05	43	E11	Deutschland	Folgentierung	2	2. rabzucht	2. abzucht	/	/	Crowbeater 199	2.305	871
20-80-03-05	43	E11	Deutschland	Folgentierung	2	2. rabzucht	2. abzucht	/	/	Crowbeater 199	2.191	871
20-80-07-05	43	E11	Deutschland	Folgentierung	2	2. rabzucht	2. abzucht	/	/	Crowbeater 199	2.407	871
20-80-08-05	43	E11	Deutschland	Folgentierung	2	2. rabzucht	2. abzucht	/	/	/	/	/
20-81-01-05	44	E12	Deutschland	Folgentierung	2	2. rabzucht	2. abzucht	/	/	Crowbeater 199	2.108	851
20-84-01-05	45	E13	Deutschland	Folgentierung	5	2. wd/ortas	2. wd/ortas	/	/	Crowbeater 199	2.385	M14
20-84-06-05	45	E13	Deutschland	Folgentierung	5	2. wd/ortas	2. wd/ortas	/	/	Crowbeater 199	2.311	M14
20-84-04-05	45	E13	Deutschland	Folgentierung	5	2. wd/ortas	2. wd/ortas	/	/	Crowbeater 199	2.293	M14
20-84-04-05	45	E13	Deutschland	Folgentierung	5	2. wd/ortas	2. wd/ortas	/	/	Crowbeater 199	2.322	M14
20-89-01-05	46	E17	Deutschland	Folgentierung	1	2. rabzucht	2. abzucht	/	/	Crowbeater 199	2.421	859
20-89-06-05	46	E17	Deutschland	Folgentierung	1	2. rabzucht	2. abzucht	/	/	Crowbeater 199	2.464	859
20-123-05-05	47	E6	Deutschland	Folgentierung	1	2. rabzucht	2. abzucht	/	/	/	/	/
20-123-03-05	47	E6	Deutschland	Folgentierung	1	2. rabzucht	2. abzucht	/	/	Crowbeater 199	2.04	876
20-123-04-05	47	E6	Deutschland	Folgentierung	1	2. rabzucht	2. abzucht	/	/	Crowbeater 199	2.318	876
20-125-01-05	48	E17	Deutschland	Folgentierung	2	2. rabzucht	2. abzucht	/	/	Crowbeater 199	2.111	/
20-125-04-05	48	E17	Deutschland	Folgentierung	2	2. rabzucht	2. abzucht	/	/	Crowbeater 199	2.132	859
20-125-07-05	48	E17	Deutschland	Folgentierung	1	2. rabzucht	2. abzucht	/	/	Crowbeater 199	2.18	859
20-141-01-05	49	E14	Deutschland	Folgentierung	1	2. rabzucht	2. abzucht	/	/	/	/	/

Titel Beschreibung	Probennummer	Herstellung Zn	Herzschwand	Art der Probe	Blauap	Biochemische Bioschmelzeanwendung	Pro B/Cen PCR	partielle rpo B-Gen Sequenzanalyse	Spezies gemäß MLST	MALDI-TOF MS	Zweckungszahl	FBGE-Typ
D3-141a1-05	45	H-4	Deutschland	Folgerührung	1	C. subzoshi	C. subzoshi	/	/	/	/	/
D3-141a2-05	45	H-4	Deutschland	Folgerührung	1	C. subzoshi	C. subzoshi	/	/	/	/	/
D3-143a1-05	50	H7	Deutschland	Folgerührung	1	C. subzoshi	C. subzoshi	/	/	/	/	/
D3-143a2-05	50	H7	Deutschland	Folgerührung	2	C. subzoshi	C. subzoshi	n. l.	/	/	/	/
D3-143b1-05	50	H7	Deutschland	Folgerührung	5	C. melnikowae	C. melnikowae	/	/	/	/	/
D3-144a1-05	51	H7	Deutschland	Folgerührung	1	C. subzoshi	C. subzoshi	/	/	Cronokaster spp.	2,145	/
D3-144a2-05	51	H7	Deutschland	Folgerührung	1	C. subzoshi	C. subzoshi	/	/	Cronokaster spp.	2,693	/
D3-153a1-05	52	H5	Deutschland	Folgerührung	1	C. subzoshi	C. subzoshi	/	/	Cronokaster spp.	3,09	/
D3-153b1-05	52	H5	Deutschland	Folgerührung	1	C. subzoshi	C. subzoshi	/	/	/	/	/
D3-163a1-05	53	H-4	Deutschland	Folgerührung	2	C. subzoshi	C. subzoshi	/	/	/	/	/
D3-163b1-05	53	H-4	Deutschland	Folgerührung	2	C. subzoshi	C. subzoshi	/	/	/	/	/
D3-165a1-05	54	H-4	Deutschland	Folgerührung	2	C. subzoshi	C. subzoshi	/	/	/	/	/
D3-165b1-05	54	H-4	Deutschland	Folgerührung	1	C. subzoshi	C. subzoshi	/	/	Cronokaster spp.	2,461	S27
D3-165c1-05	54	H-4	Deutschland	Folgerührung	2	C. subzoshi	C. subzoshi	/	/	/	/	S72
D3-168a1-05	55	H5	Deutschland	Folgerührung	1	C. subzoshi	C. subzoshi	/	/	Cronokaster spp.	2,139	/
D3-168b1-05	55	H5	Deutschland	Folgerührung	1	C. subzoshi	C. subzoshi	/	/	Cronokaster spp.	2,317	/
D3-168c1-05	55	H5	Deutschland	Folgerührung	2	C. subzoshi	C. subzoshi	/	/	Cronokaster spp.	2,256	/
D3-169a1-05	55	H5	Deutschland	Folgerührung	2	C. subzoshi	C. subzoshi	/	/	/	/	/
D3-169b1-05	56	H6	Deutschland	Folgerührung	2	C. subzoshi	C. subzoshi	/	/	Cronokaster spp.	2,465	/
D3-169c1-05	56	H6	Deutschland	Folgerührung	1	C. subzoshi	C. subzoshi	/	/	Cronokaster spp.	2,421	/
D3-169d1-05	56	H6	Deutschland	Folgerührung	1	C. subzoshi	C. subzoshi	/	/	/	/	/
D3-172a1-05	57	H7	Deutschland	Folgerührung	2	C. subzoshi	C. subzoshi	/	/	/	/	/
D3-172b1-05	57	H7	Deutschland	Folgerührung	2	C. subzoshi	C. subzoshi	/	/	/	/	/
D3-172c1-05	57	H7	Deutschland	Folgerührung	2	C. subzoshi	C. subzoshi	/	/	Cronokaster spp.	2,4E	/
D3-183a1-05	58	H5	Deutschland	Folgerührung	2	C. subzoshi	C. subzoshi	/	/	/	/	/
D3-183b1-05	58	H5	Deutschland	Folgerührung	2	C. subzoshi	C. subzoshi	/	/	/	/	/
D3-183c1-05	58	H5	Deutschland	Folgerührung	2	C. subzoshi	C. subzoshi	/	/	/	/	/
D3-183d1-05	58	H5	Deutschland	Folgerührung	1	C. subzoshi	C. subzoshi	/	/	/	/	/
D3-183e1-05	58	H5	Deutschland	Folgerührung	1	C. subzoshi	C. subzoshi	/	/	/	/	/

Seal-Bezeichnung	Probenummer	Hersteller Nr.	Herkunftsland	Art der Probe	Beispiel	Biologische Speziesanreicherung	Pro-Bio PCR	Verteilung in B. Com. Sequenzanalyse	Spezies gemäß MLST	MALDI-TOF MS	Bewertungsschl.	PFGE-Typ
DE-5957-06	83	H5	Deutschland	Feignadfrang	1	C. sakazakii	C. sakazakii	/	/	/	/	f
DE-5914-05	89	H15	Deutschland	Feignadfrang	2	C. sakazakii	C. sakazakii	/	/	Chromobacter spp.	2,294	867
DE-5925-06	89	H15	Deutschland	Feignadfrang	2	C. sakazakii	C. sakazakii	/	/	Chromobacter spp.	2,182	867
DE-5934-05	80	H15	Deutschland	Feignadfrang	2	C. sakazakii	C. sakazakii	/	/	Chromobacter spp.	2,818	f
DE-5920-05	89	H15	Deutschland	Feignadfrang	2	C. sakazakii	C. sakazakii	/	/	Chromobacter spp.	2,17	f
DE-205971-05	81	H16	Deutschland	Feignadfrang	1	C. sakazakii	C. sakazakii	/	/	/	/	f
DE-205025-05	81	H16	Deutschland	Feignadfrang	2	C. sakazakii	C. sakazakii	/	/	Chromobacter spp.	2,199	f
DE-207074-05	81	H16	Deutschland	Feignadfrang	2	C. sakazakii	C. sakazakii	/	/	Chromobacter spp.	2,45	f
DE-205044-05	81	H16	Deutschland	Feignadfrang	2	C. sakazakii	C. sakazakii	/	/	Chromobacter spp.	2,38	f
DE-211474-05	82	H6	Deutschland	Feignadfrang	5	C. mediterranea	C. sakazakii	/	/	Chromobacter spp.	2,886	f
DE-211075-05	82	H6	Deutschland	Feignadfrang	5	C. mediterranea	C. sakazakii	/	/	/	/	f
DE-211077-05	82	H6	Deutschland	Feignadfrang	5	C. mediterranea	C. sakazakii	/	/	Chromobacter spp.	2,455	f
DE-212402-06	83	H5	Deutschland	Feignadfrang	8a	C. sakazakii	C. sakazakii	/	/	/	/	f
DE-212074-05	83	H5	Deutschland	Feignadfrang	8a	C. sakazakii	C. sakazakii	/	/	Chromobacter spp.	2,215	f
DE-25351-05	84	H7	Deutschland	Feignadfrang	9	C. mediterranea	C. mediterranea	/	/	/	/	305
DE-25352-05	84	H7	Deutschland	Feignadfrang	9	C. mediterranea	C. mediterranea	/	/	Chromobacter spp.	2,11	f
DE-25353-05	84	H7	Deutschland	Feignadfrang	9	C. mediterranea	C. mediterranea	/	/	Chromobacter spp.	2,015	f
DE-2522-05	85	H15	Deutschland	Feignadfrang	1	C. sakazakii	C. sakazakii	/	/	Chromobacter spp.	3,31	f
DE-2582	86	H7	Deutschland	Feignadfrang	1	C. sakazakii	C. sakazakii	/	/	Chromobacter spp.	2,666	f
DE-24673-05	87	H6	Deutschland	Feignadfrang	2	C. sakazakii	C. sakazakii	/	/	/	/	f
DE-2531-05	88	H8	Deutschland	Feignadfrang	1	C. sakazakii	C. sakazakii	/	/	/	/	f
DE-252-05	88	H8	Deutschland	Feignadfrang	1	C. sakazakii	C. sakazakii	/	/	/	/	f
DE-2535-05	88	H8	Deutschland	Feignadfrang	1	C. sakazakii	C. sakazakii	/	/	/	/	f
DE-2515-05	89	H8	Deutschland	Feignadfrang	1	C. sakazakii	C. sakazakii	/	/	/	/	f
DE-2581-05	89	H17	Deutschland	Aufzuganreicherung	2	C. sakazakii	C. sakazakii	/	/	Chromobacter spp.	2,882	f
DE-2621-05	79	H17	Deutschland	Feignadfrang	1	C. sakazakii	C. sakazakii	/	/	Chromobacter spp.	2,868	f
DE-2643-05	71	H17	Deutschland	Feignadfrang	1	C. sakazakii	C. sakazakii	/	/	Chromobacter spp.	2,401	f
DE-2713-05	72	H6	Deutschland	Feignadfrang	1	C. sakazakii	C. mediterranea	n. l.	/	Chromobacter spp.	2,453	f
DE-2751-05	73	H15	Deutschland	Feignadfrang	1	C. sakazakii	C. mediterranea	/	/	Chromobacter spp.	2,216	f
DE-2771-05	74	H15	Deutschland	Feignadfrang	1	C. sakazakii	C. sakazakii	/	/	Chromobacter spp.	2,008	f
DE-2802-05	75	H5	Deutschland	Feignadfrang	1	C. sakazakii	C. sakazakii	/	/	Chromobacter spp.	2,437	f
DE-285974-06	76	H5	Deutschland	Feignadfrang	9	C. mediterranea	C. mediterranea	/	/	Chromobacter spp.	2,387	f

Inhalt Beschreibung	Probennummer	Hersteller / Fr.	Bestandteil	Art der Probe	Buryp	Biologische Spezialisierung	Pro-B-Gem P.C.S.	Partiells m.p.P. Gem. Separationsfr.	Spezies gemäß MLST	MLD/OCF/MS	Bewertungseinheit	PFGE-Typ
DB-367b-c-05	77	H6	Deutschland	Folienurzug	1	C. salzcocki	C. salzcocki	/	/	Crowdsource pp.	2,384	/
DB-318f-05	78	H14	Deutschland	Folienurzug	2	C. salzcocki	C. salzcocki	/	/	Crowdsource pp.	2,384	/
DB-329f-c-05	79	H14	Deutschland	Folienurzug	1	C. salzcocki	C. salzcocki	/	/	Crowdsource pp.	2,11	SS3
DB-367d-06	80	H6	Deutschland	Folienurzug	1	C. salzcocki	C. salzcocki	/	/	/	/	/
DB-367f-c-05	81	H9	Deutschland	Folienurzug	2	C. salzcocki	C. salzcocki	/	/	/	/	/
DB-370f-L06	82	H7	Deutschland	Folienurzug	2	C. salzcocki	C. salzcocki	/	/	Crowdsource pp.	2,285	/
DB-372fB-06	83	H14	Deutschland	Folienurzug	1	C. salzcocki	C. salzcocki	/	/	/	/	SS8
DB-375f-05	84	H18	Deutschland	Aufgussurzug	1	C. salzcocki	C. salzcocki	/	/	Crowdsource pp.	2,066	SS8
DB-382-2N	85	H9	Deutschland	Folienurzug	1	C. salzcocki	C. salzcocki	/	/	/	/	SS8
DB-382-2Dy	86	H9	Deutschland	Folienurzug	2	C. salzcocki	C. salzcocki	/	/	/	/	/
2/60	86	Z. A.	Deutschland	k. A.	1	C. salzcocki	C. salzcocki	/	/	/	/	/
37862	87	Z. A.	Deutschland	k. A.	1	C. salzcocki	C. salzcocki	/	/	/	/	/
EE 13H	88	Z. A.	Deutschland	k. A.	1	C. salzcocki	C. salzcocki	/	/	/	/	/
295474	89	Z. A.	Deutschland	k. A.	1	C. salzcocki	C. salzcocki	/	/	/	/	/
294174	90	Z. A.	Deutschland	k. A.	2	C. salzcocki	C. salzcocki	/	/	/	/	/
294474	91	Z. A.	Deutschland	k. A.	2	C. salzcocki	C. salzcocki	/	/	/	/	/
294874	92	Z. A.	Deutschland	k. A.	2	C. salzcocki	C. salzcocki	/	/	/	/	/
391274	93	Z. A.	Deutschland	k. A.	2	C. salzcocki	C. salzcocki	/	/	/	/	/
2564-54E	94	Z. A.	Deutschland	k. A.	2	C. salzcocki	C. salzcocki	/	/	/	/	/
DB-341	95	H5	Deutschland	Folienurzug	5	C. mal-amaricus	C. salzcocki	/	/	Crowdsource pp.	2,046	MI
DB-342	95	H5	Deutschland	Folienurzug	5	C. mal-amaricus	C. salzcocki	C. salzcocki	/	Crowdsource pp.	2,079	MI
DB-343	95	H5	Deutschland	Folienurzug	5	C. mal-amaricus	C. salzcocki	/	/	Crowdsource pp.	2,288	MI
DB-344	95	H5	Deutschland	Folienurzug	5	C. mal-amaricus	C. salzcocki	/	/	/	/	/
DB-345	95	H5	Deutschland	Folienurzug	5	C. mal-amaricus	C. salzcocki	/	/	/	/	/
DB-346	95	H5	Deutschland	Folienurzug	5	C. mal-amaricus	C. salzcocki	/	/	/	/	/
DB-346	95	H5	Deutschland	Folienurzug	5	C. salzcocki	C. salzcocki	/	/	Crowdsource pp.	2,351	SS
DB-348	95	H5	Deutschland	Folienurzug	1	C. salzcocki	C. salzcocki	/	/	/	/	/
DB-349	95	H5	Deutschland	Folienurzug	1	C. salzcocki	C. salzcocki	/	/	/	/	/
DB-349	95	H5	Deutschland	Folienurzug	1	C. salzcocki	C. salzcocki	/	/	/	/	/
DB-3411	95	H5	Deutschland	Folienurzug	1	C. salzcocki	C. salzcocki	/	/	/	/	/

Inhalt/Bezeichnung	Produktname	Hersteller Nr.	Herkunftsland	Art der Probe	Blutgrp.	Biologische Spezifizierung	790 B-Gem PCR	partielle rpoB-Gen Sequenzanalyse	Spezies gemäß MIST	MALDI-TOF MS	Bewertungsschl.	EFRE-79
Säuregärfleischbrötchen												
DB-7347-06	96	E7	Deutschland	Milchtkornenerzeugnis	8	<i>C. sakazakii</i>	<i>C. sakazakii</i>	/	/	Cronobacter spp.	2,417	S24
DB-7349-06	96	E7	Deutschland	Milchtkornenerzeugnis	1	<i>C. sakazakii</i>	<i>C. sakazakii</i>	/	<i>C. sakazakii</i>	Cronobacter spp.	2,365	S24
DB-6096-65	97	E19	Deutschland	Milchtkornenerzeugnis	9	<i>C. malvarius</i>	<i>C. malvarius</i>	/	/	Cronobacter spp.	2,329	M6
DB-6084-66	97	E19	Deutschland	Milchtkornenerzeugnis	9	<i>C. malvarius</i>	<i>C. malvarius</i>	/	/	Cronobacter spp.	2,303	M6
DB-6092-65	97	E19	Deutschland	Milchtkornenerzeugnis	9	<i>C. malvarius</i>	<i>C. malvarius</i>	/	/	/	/	/
DB-6863-65	98	E19	Deutschland	Milchtkornenerzeugnis	8a	<i>C. sakazakii</i>	<i>C. sakazakii</i>	/	/	Cronobacter spp.	2,389	/
DB-6865-66	98	E19	Deutschland	Milchtkornenerzeugnis	9	<i>C. malvarius</i>	<i>C. malvarius</i>	/	/	Cronobacter spp.	2,394	M6
DB-6863-65	98	E19	Deutschland	Milchtkornenerzeugnis	9	<i>C. malvarius</i>	<i>C. malvarius</i>	/	/	/	/	/
Produktionsinfek. Saugnapfentwurfgerät												
Sn 33	99	E5	Deutschland	Produktionsanfallprobe	13	<i>C. sakazakii</i>	<i>C. sakazakii</i>	/	/	/	/	S7
Sn 34	100	E5	Deutschland	Produktionsanfallprobe	1	<i>C. sakazakii</i>	<i>C. sakazakii</i>	/	/	/	/	S4
Sn 35	101	E5	Deutschland	Produktionsanfallprobe	2	<i>C. sakazakii</i>	<i>C. sakazakii</i>	/	/	/	/	S54
Sn 36	102	E5	Deutschland	Produktionsanfallprobe	2	<i>C. sakazakii</i>	<i>C. sakazakii</i>	/	/	/	/	S48
Sn 37	103	E5	Deutschland	Produktionsanfallprobe	2	<i>C. sakazakii</i>	<i>C. sakazakii</i>	/	/	/	/	S73
Sn 38	104	E5	Deutschland	Produktionsanfallprobe	2	<i>C. sakazakii</i>	<i>C. sakazakii</i>	/	/	/	/	S73
Trockenbackwaren												
M6	105	E20	Kasachen	Weizenmehlbröckchen	5	<i>C. malvarius</i>	<i>C. malvarius</i>	/	/	Cronobacter spp.	2,397	M12
S190	106	E21	China	Weizenmehlbröckchen	1	<i>C. sakazakii</i>	<i>C. sakazakii</i>	/	/	/	/	S18
S191	107	E22	Deutschland	Hartweizenmehlflecken mit Paprika	16	<i>C. turicensis</i>	<i>C. turicensis</i>	/	<i>C. turicensis</i>	Cronobacter spp.	2,148	T2
S160	108	E22	Deutschland	Hartweizenmehlflecken mit Paprika	16	<i>C. turicensis</i>	<i>C. turicensis</i>	/	<i>C. turicensis</i>	Cronobacter spp.	2,107	T6
S140	109	E23	Deutschland	Eiermehl mit Basillbun	15	<i>C. magisteri</i>	<i>C. magisteri</i>	/	<i>C. magisteri</i>	Cronobacter spp.	2,5	/
S47	110	E24	Deutschland	Eiermehl	1	<i>C. sakazakii</i>	<i>C. sakazakii</i>	/	/	Cronobacter spp.	2,115	S70
S151	111	E25	Deutschland	Eiermehl	1	<i>C. sakazakii</i>	<i>C. sakazakii</i>	/	<i>C. sakazakii</i>	Cronobacter spp.	2,021	S35
S173	112	E26	Italien	Hartweizenmehlflecken	1	<i>C. sakazakii</i>	<i>C. sakazakii</i>	/	/	Cronobacter spp.	2,142	S31
S190	113	E27	Deutschland	Eiermehl	1	<i>C. malvarius</i>	<i>C. malvarius</i>	n. i.	/	Cronobacter spp.	2,129	S32
S196	114	E27	Deutschland	Eiermehl	1	<i>C. sakazakii</i>	<i>C. sakazakii</i>	/	/	Cronobacter spp.	2,13	S30
S184	115	E28	Italien	Hartweizenmehlflecken mit Basilikum, Fenchel und Zedaira	2	<i>C. sakazakii</i>	<i>C. sakazakii</i>	/	/	Cronobacter spp.	2,382	S53
S105	116	E29	Deutschland	Eiermehl	2	<i>C. sakazakii</i>	<i>C. sakazakii</i>	/	/	/	/	S65
S132	117	E29	Deutschland	Eiermehl	1	<i>C. sakazakii</i>	<i>C. sakazakii</i>	/	/	Cronobacter spp.	2,329	S49
S153	118	E29	Deutschland	Eiermehl	1	<i>C. sakazakii</i>	<i>C. malvarius</i>	n. i.	/	Cronobacter spp.	2,127	S31

Leiter Bezeichnung	Probenummer	Hersteller (V)	Erkennungsd.	Art der Probe	BEI Typ	Biochemische Speziesbezeichnung	pro B-Gen PCR	partielle pro B-Gen Sequenzanalyse	Spezies gemäß MLST	MAALDI-TOF-MS	Berechnungszahl	PFGE-Typ
Fertiglat												
02E	119	H31	Darstellung	Zerfalls lt.	2	C. sakazakii	C. sakazakii	/	/	/	/	SS
03E	120	H32	Darstellung	Zerfalls lt.	16	C. burgensis	C. burgensis	/	C. burgensis	/	/	TA
03E	121	H33	Darstellung	Zerfalls lt.	1	C. sakazakii	C. sakazakii	/	/	/	/	SH4
06F	122	H34	Darstellung	Zerfalls lt.	1	C. sakazakii	C. sakazakii	/	/	/	/	SH7
08E	123	H35	Darstellung	Zerfalls lt.	1	C. sakazakii	C. sakazakii	/	/	/	/	SH9
08E	124	H36	Darstellung	Zerfalls lt.	16	C. burgensis	C. burgensis	/	/	/	/	T1
09E	125	H36	Darstellung	Zerfalls lt.	16	C. burgensis	C. burgensis	/	/	/	/	/
09E	126	H37	Darstellung	Zerfalls lt.	16	C. burgensis	C. burgensis	/	/	/	/	T5
01G	127	H38	Darstellung	Zerfalls lt.	16	C. burgensis	C. burgensis	/	C. burgensis	/	/	T3
01G	128	H39	Darstellung	Zerfalls lt.	16	C. burgensis	C. burgensis	/	/	/	/	T7
Schäufel												
M23	129	H40	Darstellung	Schokoladell.	16	C. burgensis	C. melnikowii	a. 1.	C. burgensis	Chromobacter spp.	2.271	ME
HSF	130	k. A.	k. A.	Schokoladell.	1	C. sakazakii	C. sakazakii	/	/	/	/	SH6
HV2	131	k. A.	k. A.	Schokoladell.	1	C. sakazakii	C. sakazakii	/	/	/	/	SH9
Wasser 1	132	k. A.	k. A.	Wasserpflanzl.	*	C. sakazakii	C. sakazakii	/	/	/	/	SH6
2/65	133	k. A.	k. A.	k. A.	2	C. sakazakii	C. sakazakii	/	/	/	/	/
B01-206c	134	k. A.	k. A.	k. A.	13	C. sakazakii	C. sakazakii	/	/	/	/	/
Samen 1	135	k. A.	k. A.	k. A.	2	C. sakazakii	C. sakazakii	/	/	/	/	/
1008-1991	136	k. A.	k. A.	k. A.	2	C. sakazakii	C. sakazakii	/	/	/	/	/

/ = nicht untersuchte
 k. A. = keine Angabe
 * = keinem B-Gen zuzuordnen
 n. 1. = nicht klassifizierbar

DANKSAGUNG

Allen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, möchte ich an dieser Stelle danken.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Dr. habil. Ewald Usleber für die Überlassung des interessanten Themas, die freundliche Betreuung und Hilfe bei der Anfertigung dieser Arbeit, das entgegengebrachte Vertrauen und die sorgfältige Durchsicht des Manuskripts.

Ebenfalls möchte ich Herrn Dr. Ömer Akineden herzlich für seine wissenschaftliche Unterstützung danken.

Allen Mitarbeitern des Instituts für Tierärztliche Nahrungsmittelkunde, Professur für Milchwissenschaften der Justus-Liebig-Universität Gießen, möchte ich für ihre Hilfsbereitschaft und ihr freundliches Entgegenkommen danken. Ein herzliches Dankeschön vor allem an Cornelia Borchardt und Annette Schaus-Früauff, die nicht nur mit Tatkraft das Gelingen des experimentellen Teils ermöglicht haben, sondern auch für die schönen und lustigen Zeiten in der Frühstückspause.

Auch möchte ich mich recht herzlich bei Christa Zeidler für Ihre Hilfsbereitschaft und Unterstützung bei organisatorischen Angelegenheiten bedanken.

Zusätzlich möchte ich mich bei meiner guten Freundin Sabrina Odenthal bedanken. Ich danke dir dafür, dass du mir immer in allen Lebenslagen mit Rat und Tat zur Seite stehst und sowohl das Studium als auch die Doktorandenzeit in Gießen unvergesslich gemacht hast!

Mein ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern, Gabriele und Uwe Heinrich, meiner Oma Ingeborg Bolz und meinen Großeltern, Helga und Siegfried Heinrich, die mich während der gesamten Anfertigung der Dissertation aufmunternd unterstützt haben, sei es persönlich oder finanziell, die immer an mich geglaubt haben und in allen Belangen hinter mir standen. Vielen Dank.

Zu guter Letzt möchte ich meinem Partner Niklas von Freeden danken, für seine Unterstützung zu Hause, die Ermutigung in schwierigen Zeiten und die vielen lieben, aufmunternden Worte. Du bist wunderbar!

EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

„Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbstständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.“

Vanessa Isabelle Heinrich



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFENBERGRING 15
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

ISBN: 978-3-8359-6598-0



9 17 8 3 8 3 5 19 6 5 9 8 0 11