



Autor: Dr. Marianne Erbs

## **Untersuchungen von Lebensmitteln auf das emetische *Bacillus cereus* Toxin Cereulid**

Anzahl untersuchte Proben: 202  
Anzahl beanstandete Proben: 16 (8%)  
Beanstandungsgründe: *B. cereus*-Toleranzwertüberschreitung (16) davon (1) mit Cereulid-Befund (1.31 µg/kg)

### **Ausgangslage**

*Bacillus cereus* (*B. cereus*) sind ubiquitäre Erdbodenkeime, die durch pflanzliche oder tierische Produkte in die Lebensmittelkette gelangen können. Pathogene *B. cereus* können beim Menschen zwei Formen einer gastrointestinalen Erkrankung hervorrufen, welche durch verschiedene Toxine ausgelöst werden. Die diarrhöische Form wird durch hitzelabile Enterotoxine verursacht, welche erst im Darm nach Verzehr *B. cereus*-kontaminierter Lebensmittel gebildet werden. Die entsprechenden Krankheitssymptome, wie Bauchkrämpfe und Durchfall, treten 6–15 Stunden nach Aufnahme des kontaminierten Lebensmittels auf. In solchen Fällen können hohe Keimzahlen an *B. cereus* im betroffenen Lebensmittel mittels kultureller Methoden, sowie Enterotoxine in Stuhlproben von Erkrankten anhand von kommerziell erhältlichen Testkits nachgewiesen werden. Die emetische (Erbrechen verursachende) Erkrankung hingegen wird durch das hitzestabile und bereits im Lebensmittel gebildete Toxin Cereulid ausgelöst. Voraussetzung hierfür ist, dass nach entsprechender Vermehrung genügend Keime eines cereulidbildenden *B. cereus* Stammes im Lebensmittel vorliegen. Bereits eine halbe bis sechs Stunden nach Verzehr eines kontaminierten Lebensmittels kommt es zu Übelkeit und Erbrechen. Häufig führen Fehler in der Zubereitung der Speisen, insbesondere Fehler im Temperaturmanagement, zu solch hohen Keimzahlen. Emetische *B. cereus* Stämme vermehren sich vor allem in vorgekochten stärkehaltigen Speisen wie z.B. Reis, Teigwaren und Kartoffelstock, die nicht ausreichend gekühlt, bei zu tiefen Temperaturen warmgehalten oder zu lange bei Raumtemperatur stehen gelassen werden. In Folge solcher Fehler können allfällig vorhandene Sporen, die den Erhitzungsprozess überlebt haben, auskeimen und sich aufgrund fehlender bakterieller Konkurrenzflora nahezu ungehindert vermehren. Bei Keimzahlen von über  $10^5$  *B. cereus* Zellen pro Gramm Lebensmittel können Toxinmengen vorliegen, die gastrointestinale Symptome auslösen.

Da ein nachträgliches Erhitzen emetische *B. cereus* im Lebensmittel reduzieren bzw. abtöten kann, reichen kulturellen Methoden nicht immer aus um den Erreger und damit die Ursache einer solchen Lebensmittelvergiftung aufzuspüren. Gefragt ist dann die chemische Analytik um allfällig vorhandenes Cereulid zu bestimmen. Kommerziell erhältliche Testsysteme hierzu sind nicht erhältlich. In unserem Labor wurden deshalb geeignete Methoden zum molekularbiologischen Nachweis des für das Cereulid verantwortlichen *ces*-Gens in *B. cereus* und zum direkten chemischen Nachweis des Cereulid-Toxins mittels LC-MSMS implementiert. Untersuchungen von Lebensmitteln auf cereulidbildende *B. cereus* Stämme und Cereulid sowie das Vorhandensein der wichtigsten Diarrhö-Toxingene in den gewonnenen *B. cereus* Stämmen wurden 2013 im BAG Bulletin 32 publiziert.

## Untersuchungsziele

Durch das Untersuchen von Verdachtsproben aus Betriebshygienekontrollen von Restaurationsbetrieben der Jahre 2013 und 2014 sollte die Häufigkeit des Vorhandenseins des Cereulid-Toxins abgeschätzt werden.

## Gesetzliche Grundlagen

Für vorgekochte Lebensmittel (sogenannte hitzebehandelte, kalt oder aufgewärmt genussfertige Lebensmittel) besteht in der Schweizerischen Hygieneverordnung (HyV) ein Toleranzwert von 1000 koloniebildenden Einheiten (KbE) *B. cereus* pro Gramm Lebensmittel.

Gemäss Art. 10 des Lebensmittelgesetzes dürfen Lebensmittel Inhaltsstoffe, Zusatzstoffe, Fremdstoffe und Mikroorganismen (wie Bakterien, Hefen, Schimmelpilze oder Viren) nur soweit enthalten, als dadurch die Gesundheit nicht gefährdet werden kann.

## Prüfverfahren

Mit der Inbetriebnahme eines neuen Massenspektrometers Ende 2013 konnte die Nachweisgrenze der LC-MSMS-Methode deutlich gesenkt werden. Eine quantitative Bestimmung von Cereulid bis in den Spurenbereich von 150 ng/kg wurde somit möglich.

## Ergebnisse

### Betriebshygieneprobe

Im Jahr 2013 wurden 25 Lebensmittelproben, welche den Toleranzwert für *B. cereus* von 1000 KbE pro Gramm Lebensmittel überschritten hatten, auf Cereulid untersucht. Dabei handelte es sich vorwiegend um vorgekochte Lebensmittel wie Teigwaren-, Gemüse- und Reisgerichte. 16 dieser Lebensmittelproben wurden im Rahmen von Routine-Betriebshygienekontrollen in Basler Restaurationsbetrieben erhoben und neun wurden aus anderen Kantonen zur Untersuchung eingeschickt. In diesen 25 mit *B. cereus* kontaminierten Lebensmitteln, die Keimzahlen zwischen 1000 und 3.1 Mio KbE *B. cereus* pro Gramm Lebensmittel aufwiesen, liess sich kein Cereulid nachweisen (Nachweisgrenze 20 µg/kg). Demzufolge wurden die *B. cereus* Stämme in diesen Lebensmittelproben nicht auf das Vorhandensein des *ces*-Gens untersucht.

Im 2014 wurden sowohl Toleranzwert überschreitende Lebensmittelproben als auch sämtliche erhobenen Reis- und Teigwarenproben aus unseren Betriebshygienekontrollen auf Cereulid untersucht (Total 195 Proben). Als stärkehaltige Lebensmittel standen Reis und Teigwaren speziell im Fokus. In 179 dieser Proben (92%) betrug der Keimgehalt <100 KbE *B. cereus*/g. Vier Proben (2%) wiesen nachweisbare Keimzahlen bis zum Toleranzwert von 1000 KbE/g auf. Damit waren 183 Proben (94%) innerhalb der gesetzlichen Limite. Zwölf Lebensmittel (6%) waren mit Keimzahlen über dem Toleranzwert belastet. Von externen Lebensmittelkontrollbehörden wurden uns zudem sieben weitere Lebensmittelproben mit Keimzahlen gleich oder höher als 1000 KbE/g zur Cereulidbestimmung überwiesen. Somit wurden 2014 insgesamt 202 Proben auf Cereulid untersucht, darunter 16 Proben mit Toleranzwertüberschreitungen (siehe Tabelle unten).

Lebensmittel	Anzahl Proben ohne TWÜ	Anzahl Proben mit TWÜ
Teigwarengericht	112	3
Reisgericht	70	4
Gemüsespeise	1	4
Sonstige	2	3
Fleischgericht	1	1
Süssspeise	-	1
<b>Total</b>	<b>186</b>	<b>16</b>

TWÜ = Überschreitung des Toleranzwertes für *B. cereus* von 1000 KbE pro Gramm Lebensmittel

Cereulid konnte in keiner der 186 Proben mit gesetzeskonformen Keimzahlen detektiert werden. Die insgesamt 23 Lebensmittel mit Keimzahlbelastungen von mindestens 100 KbE *B. cereus*/g sind in der untenstehenden Tabelle aufgeführt. In einem dieser Lebensmittel konnte Cereulid nachgewiesen werden. Die betroffene Risotto-Probe aus einem Basler Restaurationsbetrieb fiel durch eine hohe Keimzahl an *B. cereus* ( $>5.8 \cdot 10^6$  KbE/g) und eine erhebliche Toleranzwertüberschreitung eines weiteren Verderbniserregers auf. Lebensmittel, die eine solch gravierende Keimbelastung aufweisen, gelten als verdorben und können eine Gesundheitsgefährdung darstellen. Die schlechten Ergebnisse der mikrobiologischen Untersuchungen wurden durch den Nachweis von 1.31 µg Cereulid pro kg Risotto bestätigt. Dem betroffenen Betrieb, welcher sich durch erhebliche Hygienemängel kennzeichnete, wurde eine sofortige Mängelbehebung verfügt sowie die Ermittlung der Ursachen dieser Missstände und das Ergreifen von geeigneten Korrekturmaßnahmen.

Lebensmittel	<i>B. cereus</i> KbE/g <sup>1</sup>	Cereulid im Lebensmittel <sup>2</sup> µg/kg
Couscous erhitzt	<b>2.3·10<sup>4</sup></b>	n.n.
Kürbissuppe	<b>1.1·10<sup>3</sup></b>	n.n.
Gemüsemischung erhitzt	<b>1.1·10<sup>3</sup></b>	n.n.
Bouillon erhitzt	<b>2.8·10<sup>3</sup></b>	n.n.
Nudeln erhitzt	<b>5.9·10<sup>3</sup></b>	n.n.
Gemüse gemischt	1.0·10 <sup>3</sup>	n.n.
Kokosschaum Espuma	<b>3.8·10<sup>3</sup></b>	n.n.
Reis mit Erbsen erhitzt	<b>2.5·10<sup>3</sup></b>	n.n.
Risotto erhitzt	<b>&gt;5.8·10<sup>6</sup></b>	1.31
Sauce Gorgonzola, erhitzt	<b>1.1·10<sup>4</sup></b>	n.n.
Reissuppe erhitzt	<b>1.4·10<sup>5</sup></b>	n.n.
Pouletcurry-Salat	<b>2.9·10<sup>3</sup></b>	n.n.
Risotto erhitzt	<1.0·10 <sup>3</sup>	n.n.
Erbsen erhitzt	<b>1.8·10<sup>5</sup></b>	n.n.
Reis vorgekocht	<1.0·10 <sup>3</sup>	n.n.
Reis erhitzt	<1.0·10 <sup>3</sup>	n.n.
Spaghetti vorgekocht	1.0·10 <sup>3</sup>	n.n.
Spätzli vorgekocht	1.0·10 <sup>3</sup>	n.n.
Nudeln vorgekocht	<b>8.9·10<sup>7</sup></b>	n.n.
Karotten vorgekocht	<b>&gt;1.0·10<sup>4</sup></b>	n.n.
Risotto vorgekocht	<b>&gt;1.5·10<sup>6</sup></b>	n.n.
Knoblauchsuppe vorgekocht	<b>5.5·10<sup>4</sup></b>	n.n.
Kabis-Schweinefleisch-Zubereitung vorgekocht	1.0·10 <sup>3</sup>	n.n.

1. Toleranzwertüberschreitungen sind fett markiert

2. n.n. = nicht nachweisbar

## Verdachtsprobe bei einem Krankheitsausbruch

Im 2014 befassten wir uns auch mit einem weiteren Fall aus Deutschland, bei welchem es in vier Kindertagesstätten sowie einer Schule zu einer Erkrankung mit massivem Erbrechen bei insgesamt 60 Kindern, Schülern und Erziehern kam. Die Symptome traten ein bis zwei Stunden nach dem Mittagessen auf. Die plötzliche Massenerkrankung hatte einen Grosseinsatz von mehreren Rettungs- und Notarztwagen zur Folge. Mehr als 20 Kinder wurden in verschiedenen Krankenhäusern ambulant behandelt. Mehrere Kindertagesstätten wurden nach dem Vorfall zeitweise geschlossen. Alle betroffenen Einrichtungen wurden von einem Catering-Unternehmen mit einem Nudelgericht beliefert. Aufgrund der sehr kurzen Inkubationszeit und der klinischen Symptome wurden hitzestabile Toxine von *Staphylococcus aureus* oder *B. cereus* als mögliche Infektionsquelle angenommen. Erste mikrobiologische Analysen der deutschen Lebensmittelkontrollbehörden umfassten verschiedene Rückstellproben aus dem Catering-Betrieb und den betroffenen Institutionen sowie rohe und gekochte Einzelbestandteile des Nudelgerichts. Lediglich in einer Rücklaufprobe aus einer betroffenen Kindertagesstätte wurde *B. cereus* in den Nudeln nachgewiesen und zwar in einer Konzentration von nur 100 KbE/g. Alle anderen Untersuchungen waren negativ. Weitere Ermittlungen im deutschen Untersuchungsamt zeigten das Vorhandensein des *ces*-Gens in dem aus den inkriminierten Nudeln isolierten *B. cereus* Stamm auf. Anhand unserer chemischen Methode konnten wir einen Cereulidgehalt von 252 µg/kg in der Nudelprobe nachweisen. Diesen Gehalt schätzen wir als hoch ein. Gemäss der Fachliteratur braucht es 10 µg Cereulid pro kg Lebensmittel, um eine Erkrankung beim Menschen auszulösen. Es hat sich nachher herausgestellt, dass der Caterer zwei Tage alte Nudeln in die frische Charge eingearbeitet hatte. Bei dem hohen Cereulidbefund ist anzunehmen, dass die Kühlkette bei der zwei Tage alten Charge unterbrochen wurde und der emetische *B. cereus* Keim sich entsprechend vermehren und Cereulid produzieren konnte. Die Keime wurden vermutlich bei der Vermischung und Wiedererwärmung mit der frischen Charge Nudeln zum Teil abgetötet.

## **Schlussfolgerungen**

Vorgekochte Speisen aus Restaurationsbetrieben in der Schweiz überschreiten selten den Toleranzwert für *B. cereus* (ca. 1%). In etwa jedem fünften der *B. cereus* belasteten Lebensmittel sind die isolierten Stämme emetisch. Dies zeigen sowohl hausinterne Untersuchungen als auch Literaturangaben. Auch wenn cereulidbildende *B. cereus* Stämme in Lebensmitteln insgesamt selten sind, können Intoxikationen durch das emetische Cereulid schwere Vergiftungen, zum Teil mit Leberversagen, und vereinzelt sogar mit Todesfällen, bewirken. Im Normalfall halten die Symptome jedoch weniger als 24 Stunden an und die Betroffenen erholen sich rasch wieder, ohne medizinische Hilfe in Anspruch zu nehmen. Der hier vorgestellte Vorfall aus Deutschland ist zum Glück gut ausgegangen. Die Ursachenermittlung der Massenerkrankung zeigt auf, dass Verdachtsfälle von *B. cereus*-Lebensmittelintoxikationen bzw. -toxiinfektionen innerhalb weniger Stunden mittels chemischen Nachweis des Cereulids abgeklärt werden können. Die *B. cereus* Toxinanalytik bleibt im Kantonalen Laboratorium Basel-Stadt ein Schwerpunkt und steht den kantonalen Lebensmittelkontrollbehörden der Schweiz und allen anderen im öffentlichen Dienst stehenden Gesundheitsbehörden zur Verfügung.