

XIII. Kongress der Europäischen Fleischforscher in
Rotterdam, Niederlande, August 20-26, 1967

B₁

SCHNELLMETHODE ZUR BESTIMMUNG VON STAPHYLOKOKKEN
ENTEROTOXIN IN FLEISCHERZEUGNISSE

Iwan Stojanow und Nikola Nestorow

Technologisches Forschungsinstitut für Fleischwirtschaft
Bulgarien, Sofia 2, Malaschewska No. 10.

Bei gewissen Herstellungs- und Erhaltungsbedingungen können das Fleisch und die Fleischerzeugnisse einen ausgezeichneten Nährboden zur Entwicklung enterotoxinbildender Staphylokokken und Anhäufung von Enterotoxin darstellen.

In der technologischen Verarbeitung vieler Arten von Fleischwaren, wie Brühwürste, Wienerwürste, Bockwürste u.a. wird ein grosser Teil der Staphylokokken abgetötet, jedoch verbleiben ihre wärmebeständige Stoffwechselprodukte.

Sehr oft können solche Fleischerzeugnisse Staphylokokkenenterotoxikosen hervorrufen.

Der Nachweis von Staphylokokken Enterotoxin in den Lebensmitteln mit Hilfe serologischer Methoden nach der Einführung der Gel-Difusionstechnik (Bergdoll und Mitarb. 1959; Read und Mitarb. 1965a; Hall und Mitarb. 1965; Weirether und Mitarb. 1966) stellt einen unwiederruflichen Erfolg im Vergleich zu demselben Zweck verwendeten biologischen Testen dar, Kienitz (1958, 1962 und 1964).

Die Ausführung aller diesen Methoden erfordert eine Zeitspanne von 7 bis 14 Tagen, während nach der von Weirether und Mitarb. (1966) modifizierte Methode nur 4 - 16 Std. und bei der Microliter Hemmagglutination- Inhibitions Verfahren nach Morse und Mah (1967), sogar dazu nur 3 Std. notwendig sind.

Bei der Beurteilung der Staphylokokkenenterotoxinbestimmungsmethoden möchte eine nachträgliche Zeit zu Toxin extrahieren aus dem Lebensmittel beachtet werden, die nach Read und Mitarb. (1965 a,b) über 100 Std. beträgt.

Die Erforschung von verschiedener Typen Staphylokokken Ente-

rotoxinen (Casman und Mitarb., 1963; Bergdoll und Mitarb. 1965) bestätigt die von Kienitz und Ritzerfeld (1964) geäußerte Auffassung, dass zum Nachweis von Staphylokokken Enterotoxin ein kombiniertes Verfahren durchzuführen ist.

In der früheren Untersuchungen konnte die Empfindlichkeit der Spermatozoiden der Wirbeltiere und besonders der Amphibien gegen das Staphylokokken Enterotoxin festgestellt werden (Stojanow 1963, 1965).

Bei ähnlichen Untersuchungen wurde eine leichtdurchführbare Methode zur Extrahieren von Enterotoxin aus Fleisch und andere Lebensmitteln erarbeitet (Stojanow 1966).

In der vorliegenden Arbeit werden die Ergebnisse von der Anwendung einer kombinierten (serologische Verfahren und biologische Test) Methode zum Nachweis von Staphylokokken Enterotoxin in Fleischerzeugnisse berichtet.

MATERIAL UND METHODE

Bakterien Kulturen:

Angewendet wurden die Staphylokokken Stämme S-6 und 196, welche als starke Enterotoxinbildner bekannt sind (Surgalla, 1951; Dack, 1956 Bergdoll und Mitarb. 1959).

Nährmedium und Wachstum von bakterien Kulturen

Das erforderliche Wachstum der Ausgangskultur wurde auf den flüssigen Nährmedium von Surgalla und Mitarb., (1951) und N-Z-Amine nach Bergdoll und Mitarb. (1961) gewährleistet.

Mit 2% einer stark gewachsenen 16 Std. Kultur im gleichen Nährmedium $6-9 \times 10^6$ /ml. wurden jeweils 80 gr. gehacktes Rindfleisch, Kalbfleisch.

rotoxinen (Casman und Mitarb., 1963; Bergdoll und Mitarb. 1965) bestätigt die von Kienitz und Ritzerfeld (1964) geäußerte Auffassung, dass zum Nachweis von Staphylokokken Enterotoxin ein kombiniertes Verfahren durchzuführen ist.

In der früheren Untersuchungen konnte die Empfindlichkeit der Spermatozoiden der Wirbeltiere und besonders der Amphibien gegen das Staphylokokken Enterotoxin festgestellt werden (Stojanow 1963, 1965).

Bei ähnlichen Untersuchungen wurde eine leichtdurchführbare Methode zur Extrahieren von Enterotoxin aus Fleisch und andere Lebensmitteln erarbeitet (Stojanow 1966).

In der vorliegenden Arbeit werden die Ergebnisse von der Anwendung einer kombinierten (serologische Verfahren und biologische Test) Methode zum Nachweis von Staphylokokken Enterotoxin in Fleischerzeugnisse berichtet.

MATERIAL UND METHODE

Bakterien Kulturen:

Angewendet wurden die Staphylokokken Stämme S-6 und 196, welche als starke Enterotoxinbildner bekannt sind (Surgalla, 1951; Dack, 1956 Bergdoll und Mitarb. 1959).

Nährmedium und Wachstum von bakterien Kulturen

Das erforderliche Wachstum der Ausgangskultur wurde auf den flüssigen Nährmedium von Surgalla und Mitarb., (1951) und N-Z-Amine nach Bergdoll und Mitarb. (1961) gewährleistet.

Mit 2% einer stark gewachsenen 16 Std. Kultur im gleichen Nährmedium $6-9 \times 10^6$ /ml. wurden jeweils 80 gr. gehacktes Rindfleisch, Kalbfleisch.

- 3 - (B₁)

Schweinefleisch und Schaffleisch beimpft und für 8, 24 und 48 Std. mit und ohne Bewegung (72 U/Min.) bei 37°C kultiviert.

Staphylokokken Enterotoxin

Zur Durchführung der Untersuchungen wurde 20, 70 und 98% gereinigtes Staphylokokken Enterotoxin (Bergdoll und Mitarb. 1959) von beide Typen A und B angewendet.

Herstellung von antienterotoxischen Seren

Gesunde Kaninchen (2-2.5 kg.) wurden durch Injektionen auf 5 Wegen (Sc., i.v., i.p., i.m. und in der Pfoten) in 3 Monaten 75 mg., 70% gereinigtes Staphylokokken Enterotoxin mit und ohne Freundschs Adjuvans appliziert.

Nach Feststellung des Titers über 1:100, 10 Tage nach der letzten Injektion und 12 Stunden nach der letzten Fütterung wurden die Tiere unter streng sterilen Kautelen entblutet. Das Serum wurde zentrifugiert, durch Seitz-Filter filtriert und mit Merthiolat 1:10.000 konserviert.

Ringpräzipitationstest

Dieser Test wurde nach der Methode von Sirotinina (1962) mit homologen antienterotoxischem Serum bestimmt. Die Präzipitations-Reaktion wird so ausgeführt, dass das klare enterotoxische Serum in Uhlenhut-Röhrchen mit klarem Extrakt überschichtet wird. Die Ablesung erfolgt nach 20 Minuten und endgültig nach 2 Stunden bei Zimmertemperatur.

Gel-Diffusionstest nach Oeding (1953)

Der übliche Gel-Diffusions-test in Röhrchen nach Oeding von Crowle (1961) beschrieben, wurde zur quantitativen Toxinbestimmung angewandt. Die Wanderung in mm. der von Staphylokokken Enterotoxin erzeugten spezifischen Präzipitationsbänder nach unten bestimmt die Menge des Toxins in Mikrogramm/gr..

Spermien Test nach Stojanow (1965)

Das Sperma von Amphibien (Rana asculenta, Rana ridibunda Pallas, Rana temporaria, Linne) wurde folgendermassen gewonnen:männlichen Froschen wurden 2.5 bis 5 ml.Hypophysen - Vorderlappenhormon, welches 5-10 E Folistiman enthält in den dorsalen Sack gespritzt. Eine Stunde später erfolgt die Spermaentnahme.

Die Ermittlung der Anzahl der beweglichen Spermien, die normalerweise zwischen 95 - 100 % variiert, beschliesst die Spermiovorbereitung Zu 0.02 ml. starkbeweglichen, mit einer Mikropipette abgemessenen Sperma, wurde eine äquivalente Menge einer Enterotoxinenthaltenden Fraktion zugegeben.

Die Zeit bis zum Aufhören der Bewegung ergibt die Menge des Enterotoxins.

Gel-Filtration

Die Molekularsieb-Chromatographie wurde mit Dextran Gel:Sephadex G-50, G-75 und G-100 (Pharmacia Uppsala-Schweden), oder Polyacrilamid, Bio-Gel P-60 oder P-100 (Calbiochem - Luzern, Schweiz) ausgeführt. Auf Gelpackungen 800 - 1000 ml.. Volumen wurden 10-20 ml. konzentriertes Extrakt aufgetragen und mit 0.02 m Na₂HPO₄.12 H₂O, pH 6.8 Puffer einige Stunden eluiert. Das Eluat wurde im Probensammler in Fraktionen a 12 ml. gesammelt.

Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmungen wurden mit der Lowry Methode (1951) bei einer Wellenlänge 660-750 mu mit einem UVISPEK H11 Spektralphotometer ausgeführt.

ERGEBNISSE

Die erfolgreiche Durchführung der Versuche zum Nachweis von Staphy-

- 5 - (B₁)

lokokken Enterotoxin in verschiedene Fleischarten erforderte als Voraussetzung Fleischn die eine bestimmte Menge Toxin enthielten. Dies wurde folgendermasse erreicht:

A/ durch Zugabe von verschiedenen Mengen 20,70 und 98% gereinigtem Staphylokokken Enterotoxin zu entsprechendes Gehacktes (Rind-, Kalb-, Schweine-, Schaffleisch)

B/ durch Vermischen einer stark wachsender 24 Std. Bouillon Kultur ($90-100 \times 10^9/\text{ml.}$) von der enterotoxinbildender Staphylokokken Stamm S-6 bzw. 196 in äquivalenter Menge (v/v) mit Gehacktes (Rind-, Kalb-, Schweine- und Schaffleisch)

C/ durch Infizieren von Gehacktes Fleisch mit enterotoxinbildender Staphylokokken der Stämme S-6 bzw. 196, so dass eine ausreichende Menge Enterotoxin gesichert wurde.

Isolierung und Reinigung von Staphylokokken Enterotoxin aus Fleisch

Eine besonders wichtige Vorbedingung, sowohl für den qualitativen serologischen Nachweis, als auch für die quantitative Bestimmung von Staphylokokken Enterotoxin ist seine erfolgreiche Isolierung aus dem Extrakt der verschiedene Fleischarten, welcher ein kompliziertes Gemisch, hauptsächlich von Proteinen, Kohlenhydraten und Fetten unterschiedlicher Struktur und Molekulargewicht darstellt.

Für eine ordnungsgemässe Vorbereitung und Durchführung des Ge-Filtrations Verfahrens erlangt diese Feststellung eine grosse Bedeutung. Vielfach wurden Proben Gehacktes (Rind-, Kalb-, Schweine- und Schaffleisch) nach dem in A,B,C Methodik bearbeitet.

Die Isolierung und Reinigung von Staphylokokken Enterotoxin aus dem Fleisch wurde nach Schema in Fig. 1 ausgeführt, wobei sich folgende drei Reinigungsstufen ergaben:

RSE-1 Überstehende Flüssigkeit im Zentrifugat nach Ausfällen mit Esbach-Reagenz. RSE-2 Überstehende Flüssigkeit bei eine weitere Zentrifugierung die schon dialysiert und konzentriert ist.

- 6 - (B₁)

RSE -3 Enterotoxinenthaltende Fraktion der Gel-Filtration.

Um die Elutionskurve des Staphylokokken Enterotoxins zu erhalten und zur Bestimmung des Toxins in den Einzelfractionen wurden vorherige Modellfiltrationen mit gereinigtem Enterotoxin auf Gel-Packungen mit Sephadex G-50, G-75, G-100 sowie Bio-gel P-60 und P-100 vorgenommen. Auf Fig. 2 ist die grafische Darstellung einer Gel-Filtration von 10 ml. 100 µg/ml. 70% gereinigtem Staphylokokken Entero-toxin Typ B gegeben. Als eluierendes Mittel wurde 0.02 m Phosphatpuffer mit pH 6.8 und Durchflusgeschwindigkeit 5 ml./Min. benutzt. Wie aus Fig. 2 zu ersehen ist, scheidet das Enterotoxin aus Gel-Molekularsieb zwischen 500 und 700 ml. aus, wobei die Toxinspitze bei 630 ml. liegt.

Die Protein- und Enterotoxinmenge einzelner Proben, die laut Schema in Fig. 1 behandelt wurden, sind in Tabelle 1 aufgezeigt.

Das Vorhandensein von Eiweis in den einzelnen Fraktionen wurde durch den Absorptionswert nach Lowry und Mitarb. (1951) durch den Vergleich des Toxins mit einer Kurve, die mit Rinderserumalbumin gewonnen wurde bestimmt. So konnte festgestellt werden, das bei bestimmten Parametern von RSE-1,2 und Gel-Filtrations technik (Gelbett 4.5 x 50 cm. Sephadex G-50; G-100, Bio-Gel P-60 und P-100), das Enterotoxin in demselben Röhrchen des Fraktionssammlers erscheint.

Aus Tabelle 1 ist zu ersehen, dass abgesehen davon welches Fleischart nach welche Methode (A,B oder C) mit Enterotoxin angereichert wurde, erscheint das letzte in Fraktionen zwischen 576-660 ml.

Der Inhalt der Röhrchen in gerannte Elutions Bereich wurde in Chargen zusammengebracht und durch Ring-Präzipitations-Test (RPT) mit homologen antienterotoxischen Serum überprüft.

Die mittels (RPT), als positiv gekenzeichnete Proben wurden mit

Spermien Test (SPT) zur quantitativen Enterotoxinbestimmung herangezogen.

Durch den farbige Saurepräzipitation mittels Esbach-Reagenz wurde nicht nur die Ausfällung aus dem Fleischextrakt von Ballaststoffen, sondern auch die markierte Eluierung von Staphylokokken Enterotoxin durch Gel-Bett gewährleistet. Die Enterotoxinenthaltende Fraktion lief im Chromatographyseule bei allen beobachteten Fällen 1 - 1.5 cm. vor der gelben Fraktion von Esbach-Reagenz.

Nachweis von Staphylokokken Enterotoxin in Fleischextrakt

In den Versuchen wurden verschiedene Arten Gehacktes (Rind-, Kalb-, Schweine-, Schaffleisch) angewendet.

Die erwähnte Produkte bzw. Extrakte wurden mit Staphylokokken Enterotoxin beider Typen A und B angereichert, entweder durch Zugabe von 20,70 und 98 % gereinigtem Toxin, Enterotoxinenthaltende Staphylokokken Bouillon, oder durch Kultivieren von enterotoxinbildende Stämme S-6 und 196.

Auf Tabelle 2 sind die Ergebnisse von 10,25 und 100 µg/ml Toxinzugabe zu Extrakten von Gehacktes (Rind-, Kalb-, Schweine- und Schaffleisch) dargestellt.

Aus der erwähnte Tabelle 2 ist zu ersehen, dass mit gereinigtem Staphylokokken Enterotoxin versetztes Gehacktes (Rind-, Kalb-, Schweine-, und Schaf-,) mittels beide Verfahren Double-Gel-Diffusion-Test/DGDT/ und Spermien Test /SPT/zu ermitteln ist.

Die statistische Bearbeitung der Ergebnisse (von insgesamt 64 Versuche), lassen erkennen, dass während (DGDT) - 93.98% erbrachte, mittels (SPT) -92.40 der in Gehacktes zugegebene gereinigtem Staphylokokken Enterotoxin nachzuweisen ist.

Die verschiedene Arten Gehacktes weisen unterschiedliche Wechsel -

beziehungen der Hauptbestandteilen: Fleischeiweis und Fetten, auf, welcher der Toxinnachweisresultate beeinflussen.

Die Versuchsergebnisse zur Nachweis von Staphylokokken Enterotoxin in Gehacktes (Rind-, Kalb-, Schweine- und Schaffleisch) durch vermischen mit äquivalente Menge Enterotoxinenthaltende N-Z-Amine Bouillon sind in Tabelle 3 dargestellt.

Wie aus genannte Tabelle zu ersehen ist, zeigt Probe B/3 (Gehacktes Schweine Fleisch) welches reicher an Fetten^x ist ca. 30% weniger von der wirklich vorhandene Menge des Stahylokokken Enterotoxins.

Die Bildung von Staphylokokken Enterotoxin in Gehacktes mit Enterotoxinbildner infiziert und bei optimale Temperaturbedingungen aufbewahrt ist in Tabelle 4 gezeigt.

Alle vier Arten Gehacktes die mit gleiche Impfmengen einer stark wachsender Staphylokokken Kultur (S-6, 196) infiziert wurden, lassen eine ziemlich gesätzmässig reproduzierbar Enterotoxinanheufung mit ca. 50% innerhalb 24 Std. erkennen.

Schnelligkeit der Methode zur quantitativen Bestimmung von Staphylokokken Enterotoxin in Fleisch

Bei einer Anzahl von Versuchen wurde die Infizierung von Fleisch (Rind-, Kalb-, Schweine und Schaf-,) mit stark enterotoxinbildenden Staphylokokkenstämmen S-6 und 196 durchgeführt.

Aus den Ergebnissen (Tabelle 4) ist zu ersehen, dass während beim kombinierte: serologisch-biologischer Test 8 Std. nach Beginn der Untersuchung von Gehacktes (B/1 - B/4) 26-30 ug/gr. Staphylokokken

X Fettquantitäten in Probe B/3 - Gehacktes Schweinefleisch lag durchschnittlich in 8.6 % höher als bei alle übrige Proben.

Enterotoxin bestimmt werden konnte, brachte der Double Gel-Diffusion Test nach 174 Std. einen Wert von 25 - 30 $\mu\text{g}/\text{gr}$.

Die Anwendung der Plattentest nach Ouchterlony wies nach 7-10 Tagen Aufbewahrung bei Zimmertemperatur die charakteristische Präzipitationsbänder auf.

Aufbau der Standardkurve zur quantitativen Bestimmung von Staphylokokken Enterotoxin

Basierend auf der Beobachtung, dass das Staphylokokken Enterotoxin sich hemmend auf die Motilität von Spermatozoiden auswirkt haben wird dieses Phänomen zur biologischen Bestimmung des erwähnten Enterotoxin benutzt.

Die Empfindlichkeit von Frosch-Spermatozoiden gegenüber verschiedenen Konzentrationen 98%, 70%, 20% des gereinigten Staphylokokken Enterotoxins Typ A und B wurde mehrfach überprüft. Die statistischen Mittelwerte für 6 festgelegte Konzentrationen (10, 20, 40, 80, 160 und 320 $\mu\text{g}/\text{gr}$.) Enterotoxin ergaben die Parameter eine Standardkurve. Aus erwähnte Kurve (Fig. 3) ist zu ersehen, dass während 10 μg 98% gereinigtem Staphylokokken Enterotoxins die Bewegung von Frosch Spermatozoiden in 1.200 Sekunden zum Stillstand bringt, 320 $\mu\text{g}/\text{ml}$. denselben Effekt augenblicklich ergeben.

D I S K U S S I O N

Das Vorhandensein von verschiedenartige Proteinverbindungen im Fleischextrakt erschwert sowohl die serologische (unspezifische Präzipitation) als auch die biologische Bestimmung des Toxins (Einwirkung von Schutzkoloiden).

Die Angaben von Hibnick und Bergdoll (1959) über den chemische Struktur und das Molekulargewicht von Staphylokokken Enterotoxin ermöglichen die Versuche von Baird-Parker und Joseph (1964) und Frea und Mitarb. (1963) für die Reinigung und Fraktionierung von Staph. Enterotoxin Typ B unter Anwendung von Filtration durch Dextran-Gel.

Die von uns benutzte Gel-Filtrationstechnik gewährleistete die Gewinnung von Enterotoxinhaltende Proben RSE-3 im befriedigend gereinigtem Zustand über 2.000 x im Vergleich mit dem ursprünglichen Extrakt des Phosphat Puffers.

Die Einführung von Bio-Gel P-10 als dialysierende und konzentrierende Mittel ermöglichte die erfolgreiche Erfassung von Enterotoxinmengen die unter 1 Mikrogramm pro gr/ml. Produkt liegen.

Die Ergebnisse sind leicht reproduzierbar bei Anwendung einer gut vorbereitete Gel-Packung und genaue Ausführung der Methodik.

Zusammenfassung

Ausgeprüft wurde eine Schnellbestimmungsmethode des Staphylokokken Enterotoxin im Fleisch.

Durch vorherige Isolierung und Bereinigung des Staphylokokken Enterotoxins aus dem Fleisch ermöglicht dieses Verfahren einen qualitativen, serologischen Nachweis durch den Ring-Präzipitationstest und seine quantitative Bestimmung durch Spermatozoidentest innerhalb von 6-8 Stunden.

Das Verfahren lässt den Nachweis von Staphylokokken Enterotoxin der Typen A und B in Mengen unter 1 mkg/ 1g zu.

A FAST METHOD FOR DETERMINATION OF STAPHYLOCOCOUS INTEROTOXIN IN MEAT PRODUCTS

Ivan Stoyanov and Nicola Nestorov

S U M M A R Y

A fast method for determination of the Staphylococcus interotoxin in meat (beef, veal, pork and rutton) was investigated. With this method by a preliminary isolation and cleaning of the Staphylococcus interotoxin from the meat, it becomes possible to evaluate its qualitative serological determination using the ring precipitative test, and its quantitative determination using the spermosoidal test, for 6 to 8 hours. The method permits evaluation of Staphylococcus interotoxin of types A and B in quantities smaller than one microgram to gram product.

UNE METHODE RAPIDE POUR LA DETERMINATION DE L'ENTEROTOXINE STAPHYLOCOQUE DANS LES PRODUITS DE VIANDE

Ivan Stoyanov et Nicola Nestorov

R E S U M E

Une méthode rapide pour la détermination de l'entérotoxine Staphylocoque dans la viande (boeuf, veau, porc et mouton) a été étudiée. Cette mthode, par l'isolation et le nettoyage préalable de l'entérotoxine Staphylocoque de la viande rend possible la preuve qualitative sérologique à l'aide du test de précipitation, ainsi que son détermination quantitative à l'aide du test spermatosoïque pour 6-8 heures en tout. La méthode permet la détermination de l'entérotoxine Staphylocoque de deux types A et B dans des quantités inférieures de un microgramme per gramme produit.

- 13 - (B₁)
Schema

zur Isolierung und Nachweis von Staphylokokken Enterotoxin
aus Lebensmitteln (Fleisch und Fleischprodukten)

80 gr. (Fleisch bzw. Wurst) fein zermahlen, mit
100 ml. 0.02 m Na₂HPO₄ bei pH 6.8 versetzt und
1 Std. bei 37°C aufbewahrt, 30 Minuten auf 85°C
erhitzen und auf 40°C abkühlen

A u s f a l l e n

Esbach-Reagenz (1:2) zugeben und 30 Minuten bei
37°C stehen lassen

Z e n t r i f u g i e r e n

3.000 U/30 Minuten

Fettschicht abnehmen

Bei 4°C eine Stunde aufbewahren und Fettschicht
abnehmen, danach die überstehende Flüssigkeit ab-
dekantieren.

Z e n t r i f u g i e r e n

mit 1 n NaOH auf pH 6.8 einstellen und bei 10.000
U/Minute, 20 Minuten lang zentrifugieren

Dialyse und Konzentrierung

überstehende Flüssigkeit abdekantieren und mit Bio-
Gel P-10 dialysieren und konzentrieren

Gel-Filtration

entweder mit Sephadex G-50, G-100 oder Bio-Gel P-60, P-100

Dialyse und Konzentrierung

Die enterotoxinverdächtige Fraktionen werden mit Bio-Gel P-10
dialysiert und konzentriert

Ring-Präzipitations Test

Zur qualitativen Enterotoxinbestimmung mittels anti-
enterotoxischem Serum

Spermien Test

RSE^x-1

RSE -2

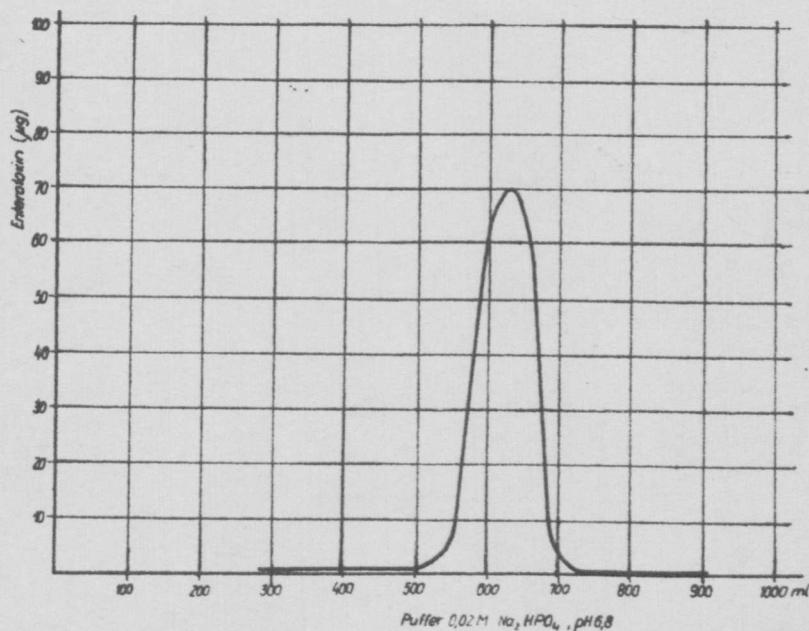
RSE -3

Extraktion und Reinigung von Staphylokokken Enterotoxin aus Gehacktes (Rind¹-, Kalb²-, Schweine³-, Schafffleisch⁴)

Tabelle 1

Produkt	RSE ^x -3 Elutions Volumen /ml/	Fraktion	Absorbtion bei 750 mu Protein/mg	RPT Ring-Prä- zipit.Test	SPT Spermien Test Enterotox. ug/gr.
A/1 Rind-,	576-612	4	12.4	++	23.5
A/2 Kalb-,	600-636	3	26.3	+++	24.0
A/3 Schwein-,	588-636	5	47.0	+++	22.5
A/4 Schaff-,	612-648	6	38.0	+++	24.0
B/1 Rind-,	600-648	5	27.0	+++	26.0
B/2 Kalb-,	624-660	6	16.0	+++	36.0
B/3 Schwein-,	612-648	6	38.2	+++	42.0
B/4 Schaff-,	612-660	5	14.7	+++	34.0
C/1 Rind-,	588-624	6	18.0	+++	74.0
C/2 Kalb-,	612-636	6	22.0	+++	77.0
C/3 Schwein-,	624-660	6	34.0	+++	61.0
C/4 Schaff-,	600-648	6	27.0	+++	75.0

x- Reinigungsstufe des Enterotoxins



Gel-Filtraten von Enterotoxinenthaltenden Lebensmitteln
mit Bio-Gel P-100

Fig. 2

Darstellung einer Gel-Filtration von 10 ml. 100 µg/gr 70%
gereinigtem Staphylokokken-Enterotoxin Typ B (Stamm 3-6)
auf einem Gelbett $4.5 \times 44 = 391 \text{ cm}^3$. Bio-Gel P-100 gege-
ben. Eluierendes Mittel 0.02 m Phosphatpuffer, pH 6.8,
Durchflussgeschwindigkeit 5 ml./Min.

Enterotoxingehalt (Mikrogramm) von Gehacktes (Rind-, Kalb-, Schwein-, Schaf-,) mit 10,25 und 100 $\mu\text{g}/\text{gr.}$, 20% gereinigtem Staphylokokken Enterotoxin (Typ B) versetzt.

Tabelle 2

Produkt	10 $\mu\text{g}/\text{gr.}$			25 $\mu\text{g}/\text{gr.}$			100 $\mu\text{g}/\text{gr.}$		
	N a c h w e i s v e r f a h r e n								
	RPT ¹	DGDT ²	SPT ³	RPT	DGDT	SPT	RPT	DGDT	SPT
A/1 Rind-,	+	9.8	9.5	++	23.9	23.5	+++	98.7	95.0
A/2 Kalb-,	+	9.2	9.0	+++	24.1	24.0	++++	95.5	90.8
A/3 Schwein-,	+	8.7	8.3	+	22.3	22.5	++	91.0	90.0
A/4 Schaf-,	+	9.5	9.3	++	24.5	24.0	+++	93.0	95.0

RPT - Ring- Präzipitation Test

DGDT - Double Gel Diffusion Test/Enterotoxin in $\mu\text{g}/\text{gr.}$

SPT - Spermien Test/Enterotoxin in $\mu\text{g}/\text{gr.}$

Enterotoxingehalt von Fleisch nach vermischen^x einer 24 Std. Bouillon Kultur (N-Z-Amine 90-100.10⁹ Keime/ml.) der enterotoxinbildender Staphylokokken Stamm S-6 mit äquivalenter Menge Gehacktes

Tabelle 3

No.	Produkt Gehacktes	Nachweisverfahren / Enterotoxin / $\mu\text{g/ gr.}$		
		RPT ¹	DGDT ²	SPT ³
B/1	Rind-,	+++	41.5	39.0
B/2	Kalb-,	++++	46.2	45.0
B/3	Schwein-,	++	31.0	30.0
B/4	Schaf-,	++++	46.0	42.0
	N-Z-Amine- Bouillon	++++	96.0	90.0

x - Die Enterotoxinbestimmung erfolgte sofort nach dem Vermischen

1 - Ring-Präzipitation Test

2 - Double Gel Diffusion Test

3 - Spermien Test

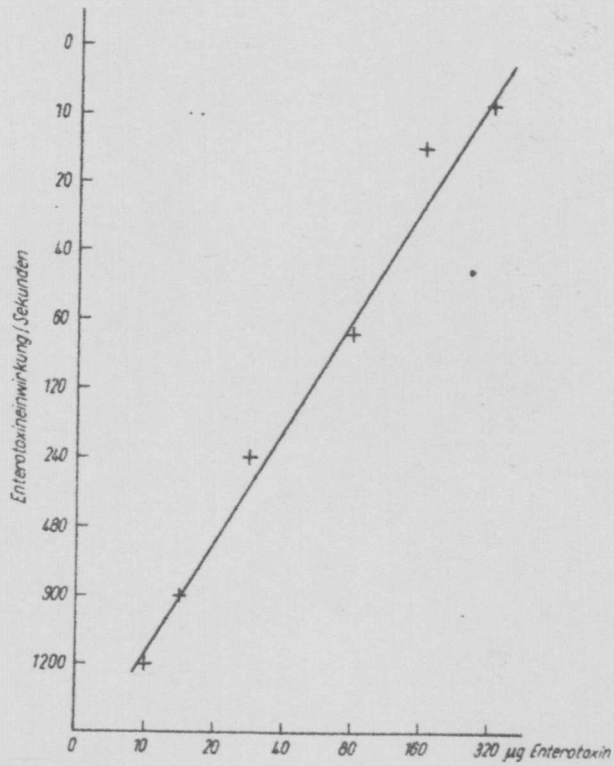


Fig. 3 Standardkurve zur quantitativen Enterotoxinbestimmung mittels Amphibien Spermatozoiden.

- 19 - (B₁)

Enterotoxingehalt ($\mu\text{g}/\text{gr.}$) von Gehacktes (Rind-, Kalb-, Schwein-, und Schafffleisch) infiziert mit 2% Bouillonkultur von enterotoxinbildende Staphylokokken und bebrütet bei 37°C für 48 Std.

Tabelle 4

Produkt	Stunden	Double Gel-Diffusionstest		RPT ¹	SPT ² /ug.
		Röhrchen Test (Oeding)	Plattentest (Ouchterlony)		
B/1 Rind-,	8	25/ug.	-	+	26/ug.
B/1 "-	24	48/ug.	+	++	45/ug.
B/1 "-	48	95/ug.	+	++	90/ug.
B/2 Kalb-,	8	28/ug.	+	++	30/ug.
B/2 "-	24	65/ug.	+	+++	63/ug.
B/2 "-	48	98/ug.	+	+++	106/ug.
B/3 Schwein-	8	27/ug.	-	+	29/ug.
B/3 "-	24	52/ug.	-	++	50/ug.
B/3 "-	48	110/ug.	+	+++	100/ug.
B/4 Schaf-,	8	30/ug.	-	+	28/ug.
B/4 "-	24	62/ug.	+	+++	60/ug.
B/4 "-	48	75/ug.	+	+++	70/ug.

1 - Ring-Präzipitation Test

2 - Spermien Test.

L I T E R A T U R

1. Baird-Parker, A.C. and Joseph, R.L. Nature (Lond.) 202, 570, (1964)
2. Bergdoll, M.S., Surgalla, M.J. and Dack, G.M. J. Immunology 83, 334, (1959)
3. Bergdoll, M.S., Sugiyama, H. and Dack, G.M. J. Biochem. Microbiol. Techn. 3, 41, (1961)
4. Casman, E.P., Bergdoll, M.S., Robinton, J.J. Bacteriol. 85, 717, (1963)
5. Crowle, A.J. Immunodiffusion Academic Press N.Y. and Lond. (1961)
6. Dack, G.M., Food Poisoning Chicago (1956)
7. Frea, J.I., Mc.Coy, E. and Strong, F.M. J. Bacteriol. 86, 1308, (1963)
8. Hall, H.E., Angelotti, R., and Lewis, K.H. Publ. Hlth. Rep. 78 1089, (1963)
9. Hibnick, H. and Bergdoll, M.S. Arch. Biochem. Biophys. 85, 72, (1959)
10. Kienitz, M. und Preuner, R. Zbl. Bakt., I Abt. Orig. 173, 203, (1958a)
11. Kienitz, M. und Preuner, R. Zbl. Bact. Orig. 174, 56, (1958b)
12. Kienitz, M. Die enteralen Staphylokokken Infektionen des Kindes Krager, Basel N.Y. (1962)
13. Kienitz, M. und Ritzerfeld, W. im "Staphylokokken in Klinik und Praxis"- L. Grün Stuttgart (1964)
14. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. J. biol. Chem. 193, 265, (1951).
15. Morse, S.A. and Mah, R.A. J. Appl. Microbiol. 15, 58, (1967)
16. Read, R.B., Pritchard, W.L., Bradshaw, J., and Black, L.A. J. of Dairy Sci. 48, 411, (1965).
17. Read, R.B., Bradshaw, J., Pritchard, W.L. and Black, L.A. J. of Dairy Sci. 48, 420, (1965)
18. Sirotinina, O.N. J. Mikrob. Epid. Immunol. 33, 90, (1962)
19. Stojanow, I. 3. Inten. milchwirtschaftl. Fachtagung der DDR Berlin September (1964).
20. Stojanow I. Wirtschaftspatent der DDR 44088 (1965)
21. Stojanow I. Wirtschaftspatent der DDR 50358 (1966)
22. Surgalla, M.S., Kadavy, J.L., Bergdoll, M.S. and Dack, G.M. J. Infect. Diseases. 89, 180 (1951)
23. Weirether, F.J., Lewis, E.E., Rosenwald, A.J. and Lincoln, R.E. J. Appl. Microbiol. 14, 284, (1966)