

Zum Vorkommen von koagulasepositiven Staphylokokken in Hackfleisch und Versuche zum Enterotoxinnachweis

H.-J. SINELL, D. KUSCH, F. UNTERMANN

Institut für Lebensmittelhygiene der Freien Universität Berlin
Bundesrepublik Deutschland

Ursprünglich rechnete man die Staphylokokken-Lebensmittelvergiftungen zu den sogenannten »Unspezifischen« Lebensmittelvergiftungen. Mit zunehmender Häufigkeit dieser Erkrankung zeichnete sich ein immer klarer zu definierender Symptomenkomplex ab, der durch die Zeichen einer typischen Intoxikation charakterisiert ist: Kurze Inkubationszeit, Erbrechen, Durchfälle und unter Umständen Kreislaufkollaps. Nach den Angaben des National Communicable Disease Center, Atlanta, USA, haben Staphylokokken 1967 in den Vereinigten Staaten nächst den Salmonellen und Clostridium perfringens die häufigsten Lebensmittelvergiftungen verursacht. Als Quellen der Vergiftungen werden immer wieder genannt: Milcherzeugnisse, vor allem Käse aus nicht pasteurisierter Milch, Speiseeis, Cremefüllungen. Häufiger wird auch Fleisch erwähnt (DACK, 1963).

Untersuchungen über das Vorkommen von *koagulasepositiven* Staphylokokken sind zwar mehrfach durchgeführt worden (JAY, 1961, 1962a, b; HOFFMANN, 1963; VAN HOOF u. DEDEKEN, 1967; SINELL u. KUSCH, 1969). Bekanntlich ist der positive Ausfall der Koagulasereaktion jedoch lediglich ein Verdachtsmoment, nicht aber ein Beweis für das Vermögen eines Stammes, Enterotoxine, zu bilden (EVANS u. NIVEN, 1950; MOSSEL, 1956; FLIS *et al.*, 1966).

Um die hygienischen bzw. toxikologischen Eigenschaften eines Stammes eindeutig zu charakterisieren, bedarf es also eines zweifelsfreien Toxinnachweises. Hierfür existieren verschiedene Methoden, von denen der Tierversuch u.a. mit Rhesusaffen noch am zuverlässigsten, aber auch am aufwendigsten ist. Daneben sind zahlreiche andere biologische Nachweisverfahren beschrieben worden, wie die Wirkung auf Hühnerembryonen (KIENIT u. PREUNER 1959), Gewebekulturen (KORBECKI u. JELJASZEWICZ 1956, URBACH *et al.* 1969), Froschspermien (MEESER u. STOJANOW 1968), und vor allem verschiedene serologische Tests (CASMAN 1958, CASMAN u. BENNET 1965, HALL *et al.*

1963, GENIGEORGIS u. SADLER 1966, JOHNSON *et al.* 1967, SILVERMAN *et al.* 1969).

Der direkte Toxinnachweis ist für die Lebensmitteluntersuchung insbesondere deshalb das einzig brauchbare Verfahren, weil ein kulturell negativer Befund nicht für das Freisein eines Lebensmittels von Enterotoxinen beweisend ist. Da das Toxin widerstandsfähig gegen Erhitzung ist, können durch entsprechende technologische Behandlungsverfahren die begleitenden Keime zerstört worden sein, während das stabilere Toxin in dem Lebensmittel noch vorhanden ist.

Unsere Untersuchungen verfolgten folgende Ziele:

- 1) Wie häufig kommen koagulasepositive Staphylokokken in Hackfleisch vor?
- 2) Wo kommen sie her?
- 3) Lässt sich an Stämmen aus Hackfleisch sowie an weiteren zum Vergleich herangezogenen Staphylokokken-Isolaten mit den in der Literatur beschriebenen Verfahren eine Bildung von Enterotoxinen nachweisen?

MATERIAL UND METHODIK

Hackfleischproben

57 Proben Schabefleisch (Rind), 59 Proben Hackfleisch (Rind), 52 Proben zubereitetes Hackfleisch (Schwein) wurden aus verschiedenen Fleischwarenbetrieben angekauft und unmittelbar danach bakteriologisch untersucht. 25 Proben waren tiefgefroren.

Aufbereitung zur bakteriologischen Untersuchung

5 g Material in 45 ml physiol. NaCl mit 0,1 % Caseinpepton homogenisieren und in steigenden Zehnerpotenzen auf verschiedene Nährböden im Oberflächenkulturverfahren ausspateln.

Nährböden

Selektivmedien zur Anzüchtung von Eigelbpositiven Staphylokokken: TPEY-Agar (CRISLEY *et al.*, 1964) und KRAPER (SINELL u. BAUMGART, 1967). Eigelbpositive Kolonien wurden isoliert und auf ihr weiteres biochemisches Verhalten unter Berücksichtigung von Koagulasebildung, Hämolysemuster, Fibrinolyse, Mannitspaltung und Antibiotogramm überprüft. Die Typisierung erfolgte mit dem internationalen Basissatz, der folgende Phagen umfasste:

Gruppe I:	29, 52, 52A, 79, 80, 825
Gruppe II:	3A, 3B, 3C, 55, 71
Gruppe III:	6, 7, 42E, 47, 53, 75, 77, 83A
Gruppe IV:	42D
Gruppe M:	78, 81

Vergleichsstämme

184 Stämme aus menschlichem Patientenmaterial (Rachenabstriche, Sputumproben, eitrige Prozesse, Gallensaft, Urin, Mastitis) wurden vergleichend zu den Stämmen aus Fleisch geprüft.

Enterotoxinnachweis

Der Nachweis beschränkte sich zunächst auf Enterotoxin B und wurde später auf die Toxine A und C ausgedehnt. Antiseren standen uns von Prof. M. S. BERGDOLL, Madison und DR. E. CASMAN, Washington, zur Verfügung. Für den Nachweis des Enterotoxins B verwendeten wir ein Serum eigener Herstellung.

Hierzu wurden Kaninchen mit gereinigtem Toxin immunisiert. Die Herstellung des Toxins aus Kulturflüssigkeit von ATCC-Stamm 14 458 ist bei SINELL, UNTERMANN und BAUMGART (1969) beschrieben und lehnt sich weitgehend an die Angaben von SCHANTZ *et al.* (1965) an. Mit Toxin der zweiten Reinigungsstufe wurden Kaninchen nach den Angaben von KATO *et al.* (1966) immunisiert. In wöchentlichen Abständen wurden 5, 5, 20, 100, 400 Mikrogramm intramuskulär injiziert. Boosterung nach 6 Wochen mit 1,7 mg. Eine Woche später Blutentnahme. Weitere Boosterungen des gleichen Serumspenders in dreimonatigen Abständen mit Dosen von 2,4 mg.

Zum Nachweis der Enterotoxin B-Bildung wurden die fraglichen Stämme nach den gleichen Verfahren aufbereitet, wie bei der Toxinherstellung beschrieben. Ein Teil der Stämme wurde in Brain-Heart-Infusion 24 Stunden bei 37° C geschüttelt. Danach Kulturüberstand gegen Carbowax 20:1 einengen, anschliessend je 12 Stunden gegen 3 % Carbowax in dest. Wasser, bzw. anschliessend nur dest. Wasser dialysieren. Bei der Untersuchung der Dialysate mit den entsprechenden Anti-Enterotoxinseren wurde die Micro-Slide-Technik (nach WADSWORTH, 1957) bevorzugt. Gelegentlich wendeten wir die Diffusionstechnik nach OUDIN (CROWLE 1961) und die Immunelektrophorese an.

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

I. Vorkommen und Eigenschaften der aus Hackfleisch isolierten Stämme

Eigelbpositive Staphylokokken fanden sich auf dem TPEY- (bzw. KRANEP-) Agar in folgender Häufigkeit: Schabefleisch 63,4 % (42,1 %), Hackfleisch 74,6 % (44,0 %), zubereitetes Hackfleisch 75,0 % (59,7 %). Insgesamt sind 1896 eigelbpositive Stämme isoliert worden, davon 772 auf KRANEP (92,1 % koagulasepositiv) und 1124 auf TPEY (66,8 % koagulasepositiv). Ein paarweiser statistischer Vergleich ergab, dass koagulasepositive Staphylokokken auf beiden Nährmedien mit der gleichen Rate

Tabelle 1. Biochemisches Verhalten und Zugehörigkeit zu Lysogruppen von Hackfleisch- und Humanstämmen

	Koagulase-positive				Koagulase-negative				
	Hackfleisch- stämme		Human- stämme		Hackfleisch- stämme		Human- stämme		
anaerobe Mannitspaltung	+	166	93,8 %	152	99,3 %	31	77,5 %	17	54,8 %
	-	11	6,2 %	1	0,7 %	9	22,5 %	14	45,2 %
Pigmentation	goldgelb	105	59,3 %	76	49,6 %	4	10,0 %	3	9,7 %
	elfenbein	53	29,9 %	53	34,7 %	13	32,5 %	6	19,4 %
	weiss	18	10,2 %	13	8,5 %	21	52,5 %	21	67,7 %
	zitroneng.	1	0,6 %	11	7,2 %	2	5,0 %	1	3,2 %
Hämolysemuster		69	39,0 %	88	57,5 %	—	—	—	—
		62	35,1 %	46	30,0 %	—	—	1	3,2 %
		13	7,3 %	10	6,5 %	—	—	—	—
		11	6,2 %	3	2,0 %	32	80,0 %	30	96,8 %
		8	4,5 %	4	2,6 %	—	—	—	—
		7	3,9 %	1	0,7 %	4	10,0 %	—	—
		4	2,3 %	1	0,7 %	—	—	—	—
Fibrinolyse	+	113	64,0 %	130	85,0 %	—	—	—	—
	-	64	36,0 %	23	15,0 %	40	100 %	31	100 %
Antibiotika- empfindlichkeit	empfindl.	119	67,2 %	30	19,6 %	29	72,5 %	13	42,0 %
	resistent	58	32,8 %	123	80,4 %	11	27,5 %	18	58,0 %
Lysogruppen	I	23	13,0 %	39	28,9 %	1	3,8 %	—	—
	I M	9	5,3 %	26	17,0 %	—	—	—	—
	II	22	12,4 %	9	5,9 %	3	7,7 %	—	—
	III	33	18,3 %	41	26,7 %	—	—	—	—
	III M	7	3,9 %	1	0,7 %	3	7,7 %	—	—
	IV	1	0,6 %	—	—	—	—	—	—
	I, III	8	4,5 %	5	3,0 %	3	7,7 %	—	—
	I, III, M	23	13,0 %	7	4,5 %	5	11,5 %	—	—
	I, II, M	—	—	1	0,7 %	—	—	—	—
	II, III, M	1	0,6 %	—	—	—	—	—	—
Nicht typisierbar	M	9	5,3 %	3	2,2 %	—	—	—	—
		41	23,1 %	16	10,4 %	25	61,6 %	31	100 %

Tabelle 2. Nachweis von Enterotoxin A, B und C bei Staphylokokken-Stämmen verschiedener Herkunft

Herkunft der Stämme	Anzahl	Enterotoxin			Enterotoxin-typ				
		pos.	A	B	C	AB	AC	CD	ABC
klin. Untersuchungsmat. v. Mensch	34	14	4	4	2	4	—	—	—
Hackfleisch	30	6	3	1	2	—	—	—	—
Milch	32	2	1	1	—	—	—	—	—
Tiefkühl-Gerichte	31	3	2	—	1	—	—	—	—

anwachsen. Die beobachteten Unterschiede in dem Anteil koagulasepositiver Stämme an den eigeblpositiven sind signifikant.

Ein Überblick über das Verhalten im Hinblick auf die sonstigen biochemischen Reaktionen und das Lysisspektrum sowie ein Vergleich mit den vom Menschen isolierten Stämmen ist in Tabelle I zusammengefasst.

Versucht man die bei den Staphylokokkenstämmen unterschiedlicher Herkunft nachgewiesenen Reaktionen zusammenfassend zu betrachten, so lassen sich folgende deutliche Unterschiede hervorheben. Die Antibiotikaresistenz der aus Hackfleisch isolierten Stämme ist wesentlich geringer als bei den aus Patientenmaterial herrührenden Humanstämmen. Auch die übrigen Eigenschaften erwecken den Eindruck, als sei die Reichhaltigkeit des Fermentspektrums bei den Humanstämmen grösser. Gerade dies aber ist ein Mass für die Virulenz (PULVERER, 1963). Andererseits zeigen die Fleischstämmen auch nicht das Verhalten, das allgemein als charakteristisch für die Herkunft vom Tier angesehen wird (JAY, 1961; MEYER, W., 1966; PULVERER, 1966): Antibiotikaempfindlichkeit, negative Eigelbreaktion, α -Hämolyse und Fibrinolyse negativ; besonders aber das Lysisspektrum liess, soweit die Stämme typisierbar waren, deutlich werden, dass die aus Hackfleisch herrührenden Stämme offenbar überwiegend infolge einer Kontamination durch den Menschen in das Material hineingelangt sind.

II. Versuche zum Enterotoxinnachweis

Die Ergebnisse der Prüfung auf Enterotoxinbildungsvermögen sind in der Tabelle II zusammengestellt. Diese enthält neben Staphylokokken aus Hackfleisch auch Stämme, die aus anderen Quellen isoliert worden sind. Wie man sieht, werden unter den aus Krankheitsprozessen herrührenden Stämmen viel häufiger Enterotoxinbildner gefunden, als unter den Lebens-

mittelstämmen. Das hier vorgelegte Material ist natürlich viel zu gering, als dass es einen halbwegs zuverlässigen epidemiologischen Schluss zuliesse. Daran ändert auch die Tatsache nichts, dass wir ähnliche Relationen gefunden haben, wie sie an einem ungleich umfänglicheren Material von CASMAN *et al.* (1967) für die Vereinigten Staaten ermittelt worden sind.

Leider standen uns noch keine Stämme zur Verfügung, die aus frischen Fällen von Lebensmittelvergiftungen isoliert worden waren. Lediglich einige alte Sammlungsstämmen konnten wir untersuchen, die vor Jahren aus verdächtigem Lebensmitteln isoliert worden waren. Hier liess sich eine Enterotoxinbildung jedoch in keinem Fall mit den uns zur Verfügung stehenden Seren mehr nachweisen. Das kann nicht verwundern, da die Fähigkeit zur Enterotoxinbildung im Verlaufe mehrfacher Kulturpassagen schliesslich verloren gehen kann. Dies hängt sowohl mit den Eigenschaften der verwendeten Kulturmedien als auch damit zusammen, dass innerhalb einer genetisch homogenen Population stets Varianten mit unterschiedlichem Toxinbildungsvermögen abgespalten werden (SUGIYAMA *et al.*, 1960). Damit wird auch das Risiko eines falschen Ergebnisses selbst bei ganz frischen Isolaten offenbar. Als günstigste Methode für den Nachweis bei Vergiftungen mit Staphylokokkenenterotoxin wird man daher, wie schon einleitend erwähnt, nicht den kulturellen Nachweis, sondern den direkten Toxinnachweis im Lebensmittel selbst ansehen müssen, wie er von CASMAN u. BENNET (1965) und HALL *et al.* (1965) beschrieben ist.

LITERATURVERZEICHNIS

- Casman, E. P.: Serologic Studies of Staphylococcal Enterotoxin. Public Health Rep. 73, 599 (1958)
- Casman, E. P. and Bennet, R. W.: Detection of Staphylococcal Enterotoxin in Food. Appl. Microbiol. 13, 181 (1965).
- Casman, E. P., Bennet, R. W., Dorsey, A. E. and Issa, J. A.: Identification of a Fourth Staphylococcal Enterotoxin, Enterotoxin D. J. Bacteriol. 94, 1875 (1967).
- Casman, E. P.: Staphylococcal Food Poisoning. Health Lab. Sci. 4, 199 (1967).
- Crisley, F. D., Angelotti, R. and Foter, M. J.: Multiplication of Staphylococcus aureus in Synthetic Cream Fillings and Pies. Public Health Rep. 79, 369 (1964).
- Crowle, A. J.: Immunodiffusion. Academic Press, New York 1961.
- Dack, G. M.: Problems in Foodborne Diseases, in: Slanez, L. W. et al.: »Microbiological Quality of Foods« Academic Press, New York and London, 1963.
- Evans, J. B. and Niven, C. F., Jr.: A Comparative Study of Known Foodpoisoning Staphylococci and Related Varieties. J. Bact. 59, 545 (1950).
- Flis, I., Lenkiewicz, E. und Lojkiewicz: Das Vorkommen enterotoxischer Staphylokokkenstämmen im Bindehautsack des menschlichen Auges. Arch. Lebensmitt. Hyg. 17, 156 (1966).
- Genigeorgis, C. and Sadler, W. W.: Immunofluorescent Detection of Staphylococcal Enterotoxin B. I. Detection in Culture Media. J. Food Sci. 31, 441 (1966).
- Hall, H. E., Angelotti, R. and Lewis, K. H.: Quantitative Detection of Staphylococcal Enterotoxin B in Food by Gel-Diffusion Methods. Public Health Rep. 78, 1089 (1963).

- Hall, H. E., Angelotti, R. and Lewis, K. H.: Detection of the Staphylococcal Enterotoxins in Food. *Health Lab. Sci.* 2, 179 (1965).
- Hoffmann, G.: Funde von Staphylokokken in Fleisch- und Wurstwaren. *Mh. Vet. med.* 18, 952 (1963).
- Jay, J. M.: Some Characteristics of Coagulase-positive Staphylococci from Market Meats Relative to Their Origin into the Meats. *Food Sci.* 26, 631 (1961).
- Jay, J. M.: Further Studies on Staphylococci in Meats. III. Occurrence and Characteristics of Coagulase-positive Strains from a Variety of Nonfrozen Market Cuts. *Appl. Microbiol.* 10, 247 (1962a).
- Jay, J. M.: Further Studies on Staphylococci in Meats. IV. The Bacteriophage Pattern and Antibiotic Sensitivity of Isolates from Nonfrozen Meats. *Appl. Microbiol.* 10, 252 (1962b).
- Johnson, H. M., Hall, H. E. und Simon, M.: Enterotoxin B: Serological Assay in Cultures by Passive Haemagglutination. *Appl. Microbiol.* 15, 815 (1967).
- Kato, E., Khan, M., Kujovich, L. and Bergdoll, M. S.: Production of Enterotoxin A. *Appl. Microbiol.* 14, 966 (1966).
- Kienitz, M. und Preuner, R.: Über den Nachweis des Staphylokokken-Enterotoxins. *Zbl. Bakt. Orig.* 174, 56 (1959).
- Korbecki, M. und Jelaszewicz, J.: Action of Staphylococcal Toxins in Cell Cultures. *J. Infect. Dis.* 115, 205 (1965).
- Meeser u. Stojanow: Erarbeitung eines empfindlichen und spezifisch-biologischen Testes zum Nachweis von Staphylokokken-Enterotoxin. *FBM Milchstandard* 10, 176 (1968).
- Meyer, W.: Differenzierungsschema für Standortvarianten von *Staphylococcus aureus*. *Zbl. Bakt. I Orig.* 201, 465 (1966).
- Mossel, D. A. A.: Aufgaben und Durchführung der modernen, hygienisch-bakteriologischen Lebensmittelüberwachung. *Wien. tierärztl. Mschr.* 43, 312/596 (1956)
- Pulverer, G.: Pathogene Staphylokokken bei Mensch und Tier sowie im Freiland. *Med. Habil.-Schr. Köln* 1963.
- Pulverer, G.: Vergleich pathogener Staphylokokken von Mensch und Tier. *Zbl. Bakt. I Orig.* 201, 27 (1966).
- Schantz, E. J. et al.: Purification of Staphylococcal Enterotoxin B. *Biochemistry* 4, 1011 (1965)
- Silverman, S. J., Knott, A. R., Howard, M.: Rapid, Sensitive Assay for Staphylococcal Enterotoxin and a Comparison of Serological Methods. *Appl. Microbiol.* 16, 1019 (1968).
- Sinell, H.-J., Baumgart, J.: Selektivnährböden mit Eigelb zur Isolierung von pathogenen Staphylokokken aus Lebensmitteln. *Zbl. Bakt. I Orig.* 204, 248 (1967).
- Sinell, H.-J. und Kusch, D.: Selektivzüchtung von koagulase-positiven Staphylokokken aus Hackfleisch. *Arch. Hyg.* 153, 56 (1969).
- Sinell, H.-J., Untermann, F. und Baumgart, J.: Versuche zum Nachweis von Enterotoxin B bei koagulase-positiven Staphylokokken. *Zbl. Bakt. I Orig.* (im Druck).
- Sugiyama, H., Bergdoll, M. S. and Dack, G. M.: In Vitro Studies on Staphylococcal Enterotoxin Production. *J. Bacteriol.* 80, 265 (1960).
- Urbach, H., Oehring, H. und Brunneemann, H.: Versuche zum Nachweis des Staphylokokken-Enterotoxins mit Hilfe von Zellkulturen. *Arch. Hyg.* 152, 504 (1969).
- Van Hoof, J. und Dedeken, L.: Microbiologische kwaliteit van vers gehakt. *Vlaams Dierge-neeskunding Tijdschrift* 36, 216 (1967).
- Wadsworth, C.: A Slide Microtechnique for the Analysis of Immune Precipitates in Gel. *Intern. Arch. Allergy Appl. Immunol* 10, 355 (1957).