

DOI 10.17590/20190916-142347

## **Bacillus cereus-Bakterien in Lebensmitteln können Magen-Darm-Erkrankungen verursachen**

Stellungnahme Nr. 035/2019 des BfR vom 16. September 2019

*Bacillus (B.) cereus* ist der namensgebende Vertreter der sogenannten *B. cereus*-Gruppe, zu der aktuell 18 anerkannte, eng verwandte Spezies gehören, die sich nur durch sehr aufwändige Laboruntersuchungen voneinander unterscheiden lassen. Bei Kontrolluntersuchungen von Lebensmitteln wird daher fast immer nur der sogenannte präsumtive *B. cereus* nachgewiesen, was bedeutet: Es ist ein Bakterium aus der *Bacillus cereus*-Gruppe. Die vorliegende Stellungnahme informiert zu gesundheitlichen Risiken durch Bakterien der *B. cereus*-Gruppe in Lebensmitteln und nennt vorbeugende Maßnahmen, um vor allem der amtlichen Lebensmittelüberwachung in Deutschland eine Grundlage für die Beurteilung von Lebensmitteln zur Verfügung zu stellen.

Das Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR) hat dazu Studien und eigene Untersuchungsergebnisse ausgewertet und stellt fest: Bei jedem präsumtiven *B. cereus*-Stamm ist davon auszugehen, dass er Toxine bilden kann, wenngleich die gebildeten Toxinmengen stark variieren. Diese Toxine können Magen-Darm-Erkrankungen verursachen. Es werden zwei Erkrankungsformen unterschieden, eine, die sich durch Erbrechen zeigt (emetische Erkrankung) und eine, die mit Durchfall einhergeht (Diarrhoetyp). Diese Magen-Darm-Erkrankungen können Menschen aller Altersklassen treffen, sie sind nicht ansteckend und dauern selten länger als 24 Stunden. Schwere Krankheitsverläufe sind sehr selten.

Eine Verunreinigung von Lebensmitteln mit präsumtiven *B. cereus* lässt sich kaum vollständig vermeiden. Denn Überdauerungsformen dieser Bakterien, sogenannte Sporen, können etwa über Erdbodenpartikel oder Staub in Lebensmittel gelangen und auch extreme Bedingungen wie Hitze oder Trockenheit lange überstehen. Meist ist eine anfängliche Verunreinigung von Lebensmitteln mit Sporen gering. Durch unsachgemäße Lagerung können die Sporen jedoch auskeimen, und die Bakterien können sich im Lebensmittel vermehren. *B. cereus* wächst in einem Bereich von 10 bis 50 °C. Bestimmte Kälte-tolerierende Stämme der *Bacillus cereus*-Gruppe können sich jedoch bereits ab Temperaturen von 4 °C vermehren, dann aber deutlich verlangsamt. Es wird in der Regel eine Vermehrung im Lebensmittel auf eine Bakterienzahl von mindestens 10<sup>5</sup> koloniebildenden Einheiten pro Gramm (KbE/g) benötigt, um Toxinmengen im Lebensmittel oder im Dünndarm entstehen zu lassen, die den Menschen krank machen können.

Übliche Hitzebehandlungen wie Kochen oder Pasteurisieren töten zwar die Bakterienzellen ab, ermöglichen aber das Überleben und Auskeimen einzelner Sporen. Eine ausreichende und schnelle Kühlung ( $\leq 7$  °C) bzw. Heißhaltung ( $\geq 65$  °C) nach einer erfolgten Hitzebehandlung von Speisen ist notwendig, um das Auskeimen von Sporen und damit die Vermehrung der Bakterien zu unterbinden.

### **1 Gegenstand der Bewertung**

Zur sogenannten *Bacillus (B.) cereus*-Gruppe gehören aktuell 18 formal anerkannte Spezies, welche eine hohe genetische Ähnlichkeit aufweisen und daher nur schwer voneinander zu unterscheiden sind. Es ist zu erwarten, dass die Anzahl der Spezies, die innerhalb dieser Gruppe unterschieden werden, in Zukunft weiter steigt. Bis zum Jahr 2016 wurden die folgenden Spezies zur *B. cereus*-Gruppe gezählt: *B. cereus (sensu stricto (s.s.))*,

*B. thuringiensis*, *B. weihenstephanensis*, *B. cytotoxicus*, *B. toyonensis*, *B. wiedmannii*, *B. anthracis*, *B. mycooides* und *B. pseudomycooides*. Vor allem zwischen den sechs erst genannten Spezies findet bei der routinemäßig durchgeführten Untersuchung von Lebensmitteln nur selten eine Unterscheidung statt. Einige Labore differenzieren jedoch auch weitergehend, beispielsweise mit Methoden der Mikroskopie, PCR oder FT-IR (Fourier-Transformations-Infrarotspektroskopie).

Zusätzlich zu den bereits genannten Spezies wurden im Jahr 2017 neun weitere Spezies innerhalb der *B. cereus*-Gruppe neu beschrieben (Liu et al., 2017). Diese neuen Spezies lassen sich bislang nur durch Methoden der Gesamtgenomsequenzierung voneinander und von den etablierten Spezies der *B. cereus*-Gruppe abgrenzen. Über die eigentlichen Speziesbeschreibungen hinaus existieren bislang kaum Daten zu diesen neuen Vertretern. In der Literatur (und so auch im vorliegenden Bericht) werden die Begriffe „*B. cereus*-Gruppe“, „*B. cereus (sensu lato (s.l.))*“ und „präsumtiver *B. cereus*“ häufig synonym benutzt. Der Begriff „präsumtiver *B. cereus*“ wird unter anderem auch in einschlägigen DIN EN ISO-Normen<sup>a</sup> verwendet, mit denen keine eindeutige Unterscheidung zwischen den einzelnen Vertretern der *B. cereus*-Gruppe möglich ist.

*B. cereus (s.l.)* mit der Fähigkeit zur Toxinbildung kommen in vielen Lebensmitteln in geringer Keimzahl vor. Zu Erkrankungen des Menschen nach Verzehr kontaminierter Lebensmittel kommt es in der Regel erst, wenn sich diese Bakterien durch unsachgemäße Lagerung der Lebensmittel auf hohe Keimzahlen vermehren konnten und entweder im Lebensmittel oder im menschlichen Darm Toxine gebildet haben.

Um der amtlichen Lebensmittelüberwachung in Deutschland eine Grundlage für die Beurteilung von Lebensmitteln zur Verfügung zu stellen, die mit *B. cereus (s.l.)* kontaminiert sind, hat das BfR vorhandene Literatur und eigene Untersuchungsdaten von Bakterienstämmen der *B. cereus*-Gruppe ausgewertet. Die vorliegende Stellungnahme fasst die wesentlichen Informationen zu den lebensmittelrelevanten *B. cereus (s.l.)*, das von diesen Bakterien ausgehende Gefährdungspotenzial sowie die wichtigsten Präventionsmaßnahmen zusammen. Der Erreger des Milzbrands (*B. anthracis*) und dessen Gefährdungspotenzial ist nicht Gegenstand dieser Stellungnahme.

## 2 Ergebnis

Nach Auswertung der Literatur und der eigenen Untersuchungsergebnisse kommt das BfR zu dem Schluss, dass bei jedem *B. cereus (s.l.)*-Stamm von einem potentiellen Enterotoxinbildner auszugehen ist. Stamm-spezifische Unterschiede in der Toxinbildungsfähigkeit sind vermutlich in der Regulation der Toxinexpression begründet. Es ist deshalb möglich, dass der Verzehr von Lebensmitteln, die sehr hohe Konzentrationen von *B. cereus (s.l.)* (ab  $10^5$  koloniebildende Einheiten pro Gramm (KbE/g)) bzw. Keimzahlen von *B. cytotoxicus* ab  $10^4$  KbE/g enthalten, beim Menschen innerhalb kurzer Zeit Durchfallerkrankungen auslöst. Bei Stämmen der *B. cereus*-Gruppe, die bei der Körpertemperatur des Menschen nur eine eingeschränkte Vermehrungs- bzw. Toxinbildungsfähigkeit besitzen (*B. weihenstephanensis* und *B. mycooides*) ist die Eintrittswahrscheinlichkeit für lebensmittelbedingte Durchfallerkrankungen jedoch gering.

<sup>a</sup> DIN EN ISO 7932:2004, Untersuchung von Lebensmitteln - Horizontales Verfahren zur Zählung von präsumtiven *Bacillus cereus* - Koloniezählverfahren bei 30 Grad Celsius (°C);  
DIN EN ISO 10198:2010, Untersuchung von Lebensmitteln - Bestimmung präsumtiver *Bacillus cereus* in Milch und Milchprodukten - Koloniezählverfahren bei 37 °C;  
DIN EN ISO 21871:2006, Untersuchung von Lebensmitteln - Horizontales Verfahren zur Bestimmung niedriger Zahlen von präsumtiven *Bacillus cereus* in Lebensmitteln - Verfahren der wahrscheinlichsten Keimzahl (MPN) und Nachweisverfahren

Durch das gründliche Waschen pflanzlicher Lebensmittel mit Trinkwasser lässt sich die Keimzahl und damit das gesundheitliche Risiko, wenn überhaupt, nur geringfügig minimieren. Aufgrund der hohen Hitzeresistenz der Sporen ist nur dann von einer sicheren Eliminierung der Sporen auszugehen, wenn starke Erhitzungsverfahren angewandt werden, wie sie beispielsweise bei der Konservenherstellung zum Einsatz kommen (z. B. 121 Grad Celsius (°C), 3 Minuten (min)).

Doch auch bei geringeren Konzentrationen von *B. cereus* (*s.l.*) in einem Lebensmittel (ab etwa  $10^3$  KbE/g) kann ein Erkrankungsrisiko von dem Lebensmittel ausgehen, sofern der Stamm die Fähigkeit zur Cereulid-Bildung besitzt (Nachweis einer Sequenz des *ces*-Gen-Clusters) und die Bedingungen im Lebensmittel bis zu dessen Verzehr seine Vermehrung auf hohe Keimgehalte mit der damit einhergehenden Cereulidbildung begünstigen. Das Risiko lässt sich minimieren, wenn Temperaturen, bei denen sich *B. cereus* (*s.l.*) vermehren, bei der Aufbewahrung von Speisen und milchhaltigen Getränken vermieden werden.

Befindet sich bereits eine relevante Menge an Cereulid im Lebensmittel, so ist davon auszugehen, dass die Gesundheitsschädlichkeit nicht eliminiert werden kann, da Cereulid extrem stabil ist (> 120 min bei 121 °C). Aufgrund der unterschiedlichen Angaben zu möglichen minimalen Intoxikationsdosen lässt sich nach Ansicht des BfR derzeit kein allgemeingültiger Cereulid-Grenzwert in Lebensmitteln ableiten, so dass die lebensmittelrechtliche Beurteilung eines Cereulid-haltigen Lebensmittels nur als Einzelfallbetrachtung durchgeführt werden kann.

Zum Schutz vor lebensmittelbedingten Infektionen und Lebensmittelvergiftungen empfiehlt das BfR bei der Lagerung und Zubereitung von Lebensmitteln in der Gastronomie und anderen Gemeinschaftsverpflegungseinrichtungen sowie in Privathaushalten folgende generelle Regeln der Küchenhygiene einzuhalten:

- Kühlkette leicht verderblicher Lebensmittel einhalten
- Speisen bei der Zubereitung gut durchkochen und beim Wiederaufwärmen ausreichend erhitzen, um vegetative Zellen abzutöten (mindestens 70 °C für zwei Minuten im Inneren des Lebensmittels; im Zweifelsfall die Temperatur mit einem Fleischthermometer überprüfen); das gleiche gilt für das Aufwärmen in der Mikrowelle (auf gleichmäßiges Erwärmen achten, Speisen zwischendurch umrühren)
- warme Speisen und milchhaltige Getränke bei Temperaturen von über 65 °C heißhalten bzw. innerhalb von wenigen Stunden auf unter 7 °C abkühlen (größere Speisemengen dafür in mehrere flache Schalen füllen)
- bei Speisen, die rohe und gekochte Zutaten enthalten, die gekochten Zutaten zunächst ausreichend kühlen, bevor die anderen Zutaten hinzugefügt werden
- Reste gegarter Speisen im Kühlschrank aufbewahren und innerhalb von zwei bis drei Tagen verbrauchen
- Wasser, das zum Einweichen von Trockenpilzen verwendet wird, sorgfältig entsorgen und die Hände sowie alle Gegenstände oder Arbeitsflächen nach Kontakt mit dem Einweichwasser oder den gequollenen Pilzen gründlich reinigen

### 3 Begründung

#### 3.1 Risikobewertung

##### 3.1.1 *Bacillus cereus* und andere Vertreter der *Bacillus cereus*-Gruppe (Mögliche Gefahrenquelle)

***B. cereus* (s.s.)** ist ein ubiquitär vorkommendes grampositives, fakultativ anaerobes, bewegliches, sporenbildendes Stäbchenbakterium. Seine Sporen finden sich im Erdboden, im Wasser, im Darmtrakt von Menschen und Tieren sowie in vielen Lebensmitteln tierischen und vor allem pflanzlichen Ursprungs (EFSA BIOHAZ Panel, 2016). Aufgrund seiner Fähigkeit, unter bestimmten Umständen Toxine zu bilden, besitzt das Bakterium eine große Bedeutung als Erreger von lebensmittelbedingten Erkrankungen. Außerdem kann seine Vermehrung zum Verderb von Lebensmitteln führen.

Einige Stämme von *B. cereus* (s.s.) sind in der Lage, bei ihrer Vermehrung in bestimmten Lebensmitteln ein hitzestabiles emetisches Toxin, das sogenannte Cereulid (ein zyklisches Peptid), zu bilden. Es wird angenommen, dass die Cereulid-Produktion während der exponentiellen Wachstumsphase bei sehr hohen Zellkonzentrationen ( $10^5$  bis  $10^6$  KbE/g) einsetzt und während der stationären Wachstumsphase fortbesteht (Ceuppens et al., 2011; Dommel et al., 2011; Lücking et al., 2009). Geeignete Bedingungen sind neutraler pH-Wert ( $\text{pH} > 5$ ), mittlerer  $a_w$ -Wert<sup>b</sup>, niedrige Salzkonzentration und ausreichend Nährstoffe (Messelhäußer et al., 2014). Unter  $\text{pH} 4,1$  und bei  $a_w$ -Werten unter  $0,92$  sind *B. cereus* (s.s.) nicht in der Lage, sich zu vermehren (EFSA BIOHAZ Panel, 2005). Bei anaeroben Bedingungen ist die Bildung von Cereulid unwahrscheinlich (Jääskeläinen et al., 2004). Eine Übersicht zu Faktoren und Lebensmitteln, welche die Cereulid-Bildung begünstigen, findet sich bei Messelhäußer et al. (2014). Da emetische *B. cereus* (s.s.) in der Regel mesophil sind, liegt der Temperaturbereich, in dem die Cereulid-Bildung prinzipiell möglich ist, wahrscheinlich zwischen  $10\text{ °C}$  und  $48\text{ °C}$  (Carlin et al., 2006; Finlay et al., 2000; Guinebretiere et al., 2010), wobei das Optimum zwischen  $20\text{ °C}$  und  $40\text{ °C}$  liegen dürfte (Agata et al., 2002; Häggblom et al., 2002; Rajkovic et al., 2006). Darüber hinaus variieren die von verschiedenen Stämmen gebildeten Cereulide hinsichtlich ihrer Struktur (18 verschiedene Isocereulide) und Mengen (Häggblom et al., 2002; Marxen et al., 2015; Stark et al., 2013). Außerdem können sich die verschiedenen Isocereulide in ihrer Zytotoxizität deutlich unterscheiden (Marxen et al., 2015).

Der *ces*-Gen-Cluster, welcher für die Bildung von Cereulid notwendig ist, befindet sich auf einem großen Plasmid (Stenfors Arnesen et al., 2008). Die Literaturangaben zum Anteil von emetischen Stämmen bei Lebensmittel-Isolaten sind sehr unterschiedlich und liegen je nach untersuchter Lebensmittelmatrix meist in einem Bereich von  $0\%$  bis  $17\%$  (Biesta-Peters et al., 2016; Ceuppens et al., 2011; Erbslöh, 2007; Messelhäußer et al., 2014; Samapundo et al., 2011; Wehrle et al., 2010).

Die Gene für die Bildung von Durchfall-auslösenden Enterotoxinen sind nicht nur bei *B. cereus* (s.s.) weitaus häufiger verbreitet als der *ces*-Gen-Cluster, sondern finden sich auch bei allen anderen Vertretern der *B. cereus*-Gruppe. Aufgrund von bisher veröffentlichten Studien sowie eigener Untersuchungsergebnisse geht das BfR davon aus, dass alle Stämme der *B. cereus*-Gruppe grundsätzlich die Fähigkeit besitzen, Enterotoxine zu bilden (Ausnahmen siehe unten). Bisher wurden drei bedeutende Enterotoxine bzw. Enterotoxinkomplexe beschrieben, die von *B. cereus* (s.l.) gebildet werden können und im Zusammenhang mit Durchfallerkrankungen stehen. Das sogenannte nicht hämolytische Enterotoxin (Nhe) be-

<sup>b</sup>  $a_w$ -Wert: activity of water; Maß für die Verfügbarkeit von Wasser in Lebensmitteln und/oder Speisen. Je größer der  $a_w$ -Wert, desto mehr Wasser steht dem Wachstum/Stoffwechsel von Bakterien zur Verfügung.

steht aus den Protein-Komponenten NheA, NheB und NheC (kodiert in einem Operon mit den Genen *nheA*, *nheB* und *nheC*). Hämolyisin BL (Hbl) ist zusammengesetzt aus den Komponenten L2 (HblC), L1 (HblD) und B (HblA) (kodiert in einem Operon mit den Genen *hblC*, *hblD* und *hblA*). Bei dem dritten Toxin, Zytotoxin K (CytK), werden zwei Formen unterschieden: CytK-1, welches ausschließlich von der Spezies *B. cytotoxicus* gebildet wird, und CytK-2, welches bei verschiedenen Spezies der *B. cereus*-Gruppe vorkommt und dessen Rolle bei der Verursachung von Durchfallssymptomen noch weitgehend ungeklärt ist (Fagerlund et al., 2004; Guinebretiere et al., 2013). Die Enterotoxin-Gene (*nhe*, *hbl*, *cytK-2*) sind chromosomal verankert und können in unterschiedlichen Kombinationen in allen Spezies der *B. cereus*-Gruppe vorkommen. Das *cytK-1*-Gen liegt hingegen ausschließlich im Chromosom von *B. cytotoxicus* vor. Repräsentative Studien zeigen, dass grundsätzlich alle untersuchten Stämme der *B. cereus*-Gruppe das *nhe*-Operon tragen und dieses ganz überwiegend vollständig vorliegt. Von Guinebretiere et al. (2010) wurden 391 Stämme aller bis 2010 beschriebenen Spezies (7) der *B. cereus*-Gruppe mittels PCR und Southern Blotting untersucht, und bei allen Stämmen wurden die *nhe*-Gene nachgewiesen, darunter auch 38 *ces*-positive Stämme. Bei Wehrle et al. (2010) waren 330 von 331 Stämmen der *B. cereus*-Gruppe *nheA*-positiv, darunter auch 50 *ces*-positive (real-time PCR). Bei dem *nheA*-negativen Stamm handelte es sich um einen Vertreter der Spezies *B. cytotoxicus*, welche eine ungewöhnliche *nhe*-Variante trägt (Fagerlund et al., 2007). In einer anderen Studie von Wehrle et al. (2009) wurden 176 Stämme untersucht (wahrscheinlich gleiches Stamm-Set wie bei Wehrle et al., 2010). Nur bei einem dieser Stämme wurde das vollständige *nhe*-Operon nicht nachgewiesen (*B. cytotoxicus*). Darüber hinaus wurde bei einem Stamm kein *nheB* und bei einem weiteren kein *nheB* und *nheC* nachgewiesen. Unter den *nhe*-positiven Stämmen befanden sich auch 44 *ces*-positive Stämme. Neben den *nhe*-Genen wurde bei allen Stämmen auch die Bildung der entsprechenden Nhe-Toxin-Komponenten mittels ELISA nachgewiesen. In einer Studie von Lindbäck et al. (2010) wurden zwei Stämme beschrieben, die kein NheC bzw. NheA produzieren, da sie ein vorzeitiges Stopcodon im entsprechenden Gen (*nheC* bzw. *nheA*) besitzen. Diese Ergebnisse decken sich mit den Erfahrungen des Labors für Sporenbildner am BfR. Von allen präsumtiven *B. cereus*-Isolaten, die seit 2016 auf *nheA* untersucht wurden, wurde nur bei *B. cytotoxicus* und *B. pseudomycooides* Isolaten kein *nheA* detektiert (real-time PCR Methode wie bei Wehrle et al., 2010). Wie oben beschrieben, liegt der fehlende *nheA*-Nachweis bei *B. cytotoxicus* an einer ungewöhnlichen *nhe*-Variante. Wahrscheinlich ist dies auch bei *B. pseudomycooides* der Fall, da davon auszugehen ist, dass auch die Vertreter dieser Spezies das *nhe*-Operon tragen (vgl. Guinebretiere et al., 2010 und Miller et al., 2018).

Auch bei einem fehlenden PCR-Nachweis eines Toxin-Gens kann die Bildung eines entsprechenden Toxins nicht gänzlich ausgeschlossen werden, da viele beschriebene Methoden nicht alle Sequenzvarianten erfassen (Ceuppens et al., 2013). So konnten Miller et al. (2018) durch Gesamtgenomsequenzierung Toxingene nachweisen, welche mittels PCR nicht detektiert wurden.

Unabhängig von der Präsenz einzelner Enterotoxingene ist die Pathogenität von *B. cereus* (s.s.) stark stammabhängig. Zur Einschätzung des pathogenen Potenzials von Enterotoxinbildnern werden in der Forschung zum einen antikörperbasierte Verfahren (ELISA) zur Bestimmung von gebildeten Toxinmengen genutzt und zum anderen Zytotoxizitätstests eingesetzt. Dabei wurde von Moravek et al. (2006) gezeigt, dass krankheitsassoziierte Stämme tendenziell größere Toxinmengen produzieren. In Studien von Jessberger et al. (2015, 2017) zeigten Kulturüberstände von *B. cereus* (s.s.)-Stämmen unterschiedlich hohe Zytotoxizitäten, wobei den Gruppen, die sich in ihrer Zytotoxizität unterschieden, kein spezieller Genotyp zugeordnet werden konnte. Von Guinebretiere et al. (2008) wurden *B. cereus* (s.s.)-Stämme sowie Stämme anderer Spezies der *B. cereus*-Gruppe in sieben phylogenetische Gruppen unterteilt, die sich anhand eines

Sequenzabschnitts des *panC*-Gens unterscheiden lassen. Gemäß Guinebretiere et al. (2008, 2010) sind diese phylogenetischen Gruppen zum einen durch unterschiedliche Wachstumstemperaturgrenzen und zum anderen durch eine unterschiedliche Zytotoxizität gekennzeichnet. Nach Aussage der Autoren sind Stämme der Gruppe III (Wachstum bei  $\geq 15$  °C bis  $\leq 45$  °C) generell am stärksten zytotoxisch, gefolgt von Stämmen der Gruppen VII ( $\geq 20$  °C bis  $\leq 50$  °C) (ausschließlich *B. cytotoxicus*), IV ( $\geq 10$  °C bis  $\leq 45$  °C) und II ( $\geq 7$  °C bis  $\leq 40$  °C). Gruppe V ( $\geq 8$  °C bis  $\leq 40$  °C) wird als weniger zytotoxisch eingeschätzt, während die Gruppen I<sup>c</sup> ( $\geq 10$  °C bis  $\leq 43$  °C) und VI ( $\geq 5$  °C bis  $\leq 37$  °C) als sehr gering zytotoxisch klassifiziert werden. Jedoch herrscht auch innerhalb der einzelnen Gruppen noch eine deutliche Heterogenität bezüglich der Zytotoxizität. Aufgrund aktuellerer Veröffentlichungen ist zu vermuten, dass *B. cereus* (s.s.) ausschließlich den Gruppen III und IV zuzuordnen sind (Miller et al., 2018).

Anhand von in-vitro-Studien wird angenommen, dass die Expression der Enterotoxin-Gene Zelldichte-abhängig reguliert ist und die Enterotoxin-Produktion erst bei hohen Zelldichten in der späten exponentiellen Wachstumsphase bzw. in der stationären Phase erfolgt (Ceuppens et al., 2011).

***B. cytotoxicus*** ist ein thermotoleranter Vertreter der *B. cereus*-Gruppe (Wachstum bei 50 °C) und besitzt die Fähigkeit zur Bildung des CytK-1 Toxins, welches eine deutlich höhere Zytotoxizität als die CytK-2 Variante zeigt (Fagerlund et al., 2004; Guinebretiere et al., 2013). Aufgrund unterschiedlich hoher Toxin-Expressions-Level sind jedoch nicht alle *B. cytotoxicus*-Stämme stark zytotoxisch. Fagerlund et al. (2007) wiesen bei zwei *B. cytotoxicus*-Stämmen, die im Zusammenhang mit Durchfallerkrankungen aus Gemüsepüree bzw. Kartoffelpüree isoliert wurden, eine hohe Zytotoxizität nach, während ein dritter Stamm (isoliert aus Gewürzen) nur eine geringe Zytotoxizität zeigte. In einer Studie von Heini et al. (2018) war nur eines von neun *B. cytotoxicus*-Isolaten aus Kartoffelpüree-Pulver stark zytotoxisch (deutlich stärker als ein *B. cereus* (s.s.)-Ausbruchs-Referenzstamm), während die anderen acht Isolate eine geringe Zytotoxizität aufwiesen. Durch eine Voranreicherung bei 50 °C wurden *B. cytotoxicus* in einer Untersuchung von Contzen et al. (2014) vor allem in pulverförmigen Kartoffelprodukten oder daraus hergestellten Lebensmitteln detektiert. Anschließende quantitative Untersuchungen auf *B. cytotoxicus* ergaben dabei eine maximale Konzentration von 300 KbE/g.

***B. weihenstephanensis*** ist eine psychrotolerante Spezies (Wachstum auch bei Temperaturen zwischen 4 °C und 7 °C), die häufig in Milchprodukten nachgewiesen wird (Lechner et al., 1998). Es ist bekannt, dass auch bei *B. weihenstephanensis* die Gene für die Bildung von Enterotoxinen (hauptsächlich *nhe* und *hbl*) und selten auch für die Bildung von Cereulid vorhanden sein können (Thorsen et al., 2006). Guerin, Ronning, et al. (2017) wiesen anhand von zwei emetischen *B. weihenstephanensis*-Stämmen nach, dass diese bereits bei 8 °C Cereulid produzieren können, wobei die Cereulid-Produktion bei höheren Temperaturen (10 °C bis 25 °C) deutlich gesteigert war.

Bezüglich nicht-emetischer *B. weihenstephanensis*-Stämme ergab eine Studie von Stenfors et al. (2002), dass 40 von 50 getesteten Stämmen keine bzw. eine geringe Zytotoxizität aufwiesen, während vier Stämme eine mittlere Toxizität besaßen. Jedoch zeigten auch sechs Stämme eine hohe Zytotoxizität, vergleichbar mit *B. cereus* (s.s.)-Ausbruchsstämmen. Bei diesen Tests wurden die *B. weihenstephanensis*-Stämme bei 32 °C angereichert und Verozellen für den Zytotoxizitätsassay verwendet. In einer Veröffentlichung von Guinebretiere et

<sup>c</sup> Die Angabe, dass Gruppe I als niedrig zytotoxisch bewertet wird, ist dem Online-Tool „<https://www.tools.symprevius.org/Bcereus/english.php>“ zu entnehmen, das in der Publikation von Guinebretiere et al. (2008, 2010) beschrieben wird. Tatsächliche Zytotoxizitätsdaten zu Stämmen der Gruppe I (ausschließlich *B. pseudomycooides*) wurden jedoch nicht publiziert.

al. (2010) wurden die untersuchten *B. weihenstephanensis*-Stämme der phylogenetischen Gruppe VI zugeordnet, die generell eine geringe Zytotoxizität zeigte. Auch hier wurden die Stämme bei 32 °C angereichert, jedoch CaCo2-Zellen für den Zytotoxizitätsassay verwendet. Ceuppens et al. (2013) berichten, dass bei 36 °C Inkubationstemperatur psychrotolerante Stämme (Wachstum bei  $\leq 7$  °C) weniger häufig Nhe-Bildung zeigen als mesophile Stämme (Wachstum bei  $> 7$  °C). Dies wird mit einer geringeren Wachstumsrate der psychrotoleranten Stämme bei höheren Temperaturen erklärt. Entsprechend schätzen die Autoren das von diesen Stämmen ausgehende Risiko für eine Durchfallerkrankung als gering ein, da eine Toxinproduktion bei Körpertemperatur kaum stattfinden dürfte. Übereinstimmend berichten auch Miller et al., 2018, dass bei Stämmen der Gruppe VI (Anzucht bei 37 °C) keine Zytotoxizität gegenüber HeLa-Zellen nachweisbar war.

***B. mycoides*** ist wie *B. weihenstephanensis* eine psychrotolerante Spezies und ist von *B. weihenstephanensis* durch eine rhizoide Koloniemorphologie zu unterscheiden. In diesem Zusammenhang ist zu bemerken, dass die rhizoide Koloniemorphologie ein variables Merkmal ist, dessen Ausprägung von den Kultivierungsbedingungen abhängt (Hendriksen and Hansen, 2011). Auf der Grundlage von Gesamtgenomsequenzvergleichen wird von Liu et al. (2015) beschrieben, dass es sich bei *B. mycoides* und *B. weihenstephanensis* um dieselbe Spezies handeln dürfte. Entsprechend der hohen genetischen Ähnlichkeit wird auch *B. mycoides* in die phylogenetische Gruppe VI eingeordnet, die generell eine geringe Zytotoxizität zeigt (Guinebretiere et al., 2010, Miller et al., 2018).

***B. pseudomycoides*** zeigt ebenfalls eine rhizoide Koloniemorphologie, ist aber im Gegensatz zu *B. mycoides* eine mesophile Spezies und lässt sich unter anderem durch das Fehlen der psychrotoleranten *cspA*-Gen-Signatur von *B. mycoides* abgrenzen (Francis et al., 1998; Guinebretiere et al., 2008). Sowohl *nhe*- als auch *hbl*-Gene wurden bereits bei *B. pseudomycoides* nachgewiesen (Guinebretiere et al., 2010; Miller et al., 2018). Gemäß Guinebretiere et al. (2010) gehört *B. pseudomycoides* zur phylogenetischen Gruppe I, der eine geringe Zytotoxizität zugeschrieben wird. Im Widerspruch dazu wurde durch Miller et al. (2018) gezeigt, dass Kulturüberstände (Anzucht bei 37 °C) von *B. pseudomycoides*-Stämmen eine hohe zytotoxische Wirkung gegenüber HeLa-Zellen besitzen.

***B. thuringiensis*** ist bekannt für seine Insektenpathogenität, die von sogenannten parasporalen Kristallen ausgeht, welche während der Sporulation gebildet werden. Die für die Kristallbildung verantwortlichen Gene sind Plasmid-kodiert. Neben dem natürlichen Vorkommen von *B. thuringiensis* werden einige Stämme dieser Spezies in kommerziellen biologischen Insektiziden verwendet. Ähnlich wie *B. cereus* (s.s.) ist *B. thuringiensis* häufig auf pflanzlichen Lebensmitteln zu finden. Die Prävalenz von Enterotoxin-Genen ist bei *B. thuringiensis* wahrscheinlich ähnlich wie bei *B. cereus* (s.s.). Der *ces*-Gen-Cluster für die Cereulid-Bildung wurde hingegen noch nicht bei *B. thuringiensis* nachgewiesen (EFSA BIOHAZ Panel, 2016). Die Zytotoxizität von *B. thuringiensis* scheint stark abhängig vom jeweiligen Stamm zu sein. In einer Studie von Jöhler et al. (2018) wurden 39 *B. thuringiensis*-Stämme untersucht. Davon zeigten neun Stämme eine geringe Zytotoxizität (darunter zwei Biopestizid-Stämme) und 29 eine mittlere Zytotoxizität gegenüber Vero-Zellen (darunter sechs Biopestizid-Stämme). Die meisten dieser Stämme (36) waren darüber hinaus durch eine niedrige Produktion des Enzyms Sphingomyelinase gekennzeichnet, welches möglicherweise den Effekt der Enterotoxine verstärkt. Im Gegensatz zu diesen Ergebnissen zeigte ein einzelner *B. thuringiensis* Stamm (Lebensmittel-Isolat) eine hohe Zytotoxizität (höher als ein *B. cereus* (s.s.) Ausbruchs-Referenzstamm) kombiniert mit einer hohen Sphingomyelinase-Bildung. In einer Scientific Opinion des EFSA BIOHAZ Panels (2016) wird davon ausgegangen, dass die Konzentrationen von *B. cereus* (s.s.) in Lebensmitteln, die ein Risiko für Verbraucher darstellen, auch für *B. thuringiensis* gelten. In der Klassifizierung von

Guinebretiere et al. (2010) kommt *B. thuringiensis* in fast allen phylogenetischen Gruppen vor (außer in den Gruppen I und VII). Das verdeutlicht, dass das Plasmid-kodierte Merkmal der Bildung von parasporalen Kristallen für eine eindeutige Speziesabgrenzung nicht geeignet ist. Entsprechend konnte die Bildung dieser Kristalle bereits bei Stämmen nachgewiesen werden, die aufgrund ihrer Phylogenie einer anderen Spezies als *B. thuringiensis* zugeordnet wurden (Jimenez et al., 2013; Lazarte et al., 2018; Liu et al., 2015; Soufiane and Cote, 2010).

***B. toyonensis*** wurde 2014 als eigenständige neue Spezies beschrieben (Jimenez et al., 2013; Oren and Garrity, 2014). Der Typ-Stamm dieser Spezies wurde 1966 in Japan isoliert und wurde als *B. cereus* var. *toyoi* bezeichnet. Seit 1975 werden Sporen dieses Stammes kommerziell als probiotischer Futtermittelzusatz verwendet, vor allem in der Schweine- und Geflügelhaltung. In der EU wurde ein entsprechendes Produkt 1994 als Futtermittelzusatz zugelassen. Diese Zulassung ist jedoch seit 2013 ausgesetzt (Durchführungsverordnung (EU) Nr. 288/2013), was auf Einschätzungen des EFSA Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed (FEEDAP) von 2012 und 2014 zurückgeht (EFSA FEEDAP Panel, 2012, 2014). Hierin wird aufgeführt, dass der Stamm sowohl Antibiotikaresistenz-Gene (*catQ* und *tet(M)*) als auch das *nhe*- und das *hbl*-Operon trägt. Der Stamm ist außerdem in der Lage, die entsprechenden Enterotoxine zu bilden, jedoch weniger effektiv als die verwendeten *B. cereus* (s.s.)-Kontrollstämme. Gemäß Miller et al. (2018) ist die Spezies *B. toyonensis* der phylogenetischen Gruppe V zuzuordnen.

***B. wiedmannii*** ist eine psychrotolerante Spezies (Wachstum von 5 °C bis 43 °C), welche 2016 beschrieben wurde. Der Typ-Stamm wurde aus Rohmilch isoliert und produziert sowohl Nhe als auch Hbl (Miller et al., 2016). Neben den *nhe*- und *hbl*-Genen wurde auch das *cytK-2*-Gen in *B. wiedmannii*-Stämmen nachgewiesen. Sowohl der Typ-Stamm als auch weitere Stämme dieser Spezies zeigten in Untersuchungen von Miller et al. (2016, 2018) eine Zytotoxizität gegenüber HeLa-Zellen. Gemäß Miller et al. (2016, 2018) ist die Spezies *B. wiedmannii* der phylogenetischen Gruppe II zuzuordnen. Stämme dieser Gruppe zeigten in der Studie von Guinebretiere et al. (2010) gegenüber CaCo-2-Zellen eine höhere Zytotoxizität als Stämme der Gruppen V und eine geringere Zytotoxizität als Stämme der Gruppen III, IV und VII.

### 3.1.2 Erkrankungen durch *Bacillus cereus* (s.l.) (Gefährdungspotenzial/ Charakterisierung der Gefahr und Exposition)

*B. cereus* (s.l.) werden hauptsächlich über Lebensmittel auf den Menschen übertragen. Beim Verzehr von mit *B. cereus* (s.l.) kontaminierten Speisen werden Toxine bzw. vegetative Bakterien oder Sporen aufgenommen, die zu Lebensmittelvergiftungen bzw. Magen-Darm-Infektionen beim Menschen führen können. Es wird davon ausgegangen, dass in den meisten Fällen ein Keimgehalt von mindestens  $10^5$  KBE/g Lebensmittel notwendig ist, um klinisch relevante Toxinmengen zu generieren (Ceuppens et al., 2013; EFSA BIOHAZ Panel, 2016). Die von *B. cereus* (s.l.) hervorgerufenen Magen-Darm-Erkrankungen sind nicht ansteckend und die Symptome dauern selten länger als 24 Stunden. Es sind Menschen aller Altersklassen betroffen. In der Vergangenheit kam es in Einzelfällen zu tödlichen Krankheitsverläufen. Es werden zwei Erkrankungsformen unterschieden, eine emetische Erkrankung (Erbrechenstyp, Intoxikation) und eine Durchfallerkrankung (Diarrhoetyp; Toxiko-Infektion).

Bei der emetischen Erkrankung wird ein im Lebensmittel von vegetativen Zellen gebildetes präformiertes Säure-, Hitze- und Proteolyse-stabiles Toxin (Cereulid) aufgenommen. Durch Bindung von Cereulid an bestimmte Rezeptoren im Magen-Darm-Trakt verursacht es bereits innerhalb von sechs Stunden nach Aufnahme Erbrechen und Übelkeit, wobei die Symptome



meist innerhalb von 24 Stunden von selbst abklingen. Bei schweren Intoxikationen kann Cereulid außerdem Leberschäden und Hirnödeme verursachen (Dierick et al., 2005; Shiota et al., 2010). In Tierversuchen waren die Cereulid-bedingten Leberschäden bei subletalen Dosen reversibel (Yokoyama et al., 1999). Darüber hinaus wird angenommen, dass Cereulid hemmend auf das Immunsystem wirkt, indem es die körpereigenen natürlichen Killerzellen schädigt (Paananen et al., 2002). Schwere Intoxikationen haben selten auch zu Todesfällen geführt (Dierick et al., 2005; Naranjo et al., 2011; Shiota et al., 2010). Eine Intoxikation durch präformiertes Toxin steht häufig im Zusammenhang mit dem Verzehr von stärkehaltigen Lebensmitteln wie Reis und Nudeln. In der Literatur sind jedoch auch emetische Krankheitsfälle in Verbindung mit Milch- und Fleischprodukten beschrieben (Messelhäußer et al., 2014). In aktuellen Veröffentlichungen zu Cereulid-Konzentrationen in Lebensmitteln, die im Zusammenhang mit Intoxikationen untersucht wurden, werden häufig Werte im Bereich von 0,19 bis 15 µg/g (Mikrogramm pro Gramm) Lebensmittel berichtet (Delbrassinne et al., 2012, 2015; Marxen et al., 2015; Messelhäußer et al., 2014). Eine deutlich niedrigere Konzentration von nur 0,003 µg/g Lebensmittel in einer Verdachtsprobe (Reisgericht; Erkrankung mit Cereulid-typischer Symptomatik) wird von Biesta-Peters et al. (2016) beschrieben. Als ein möglicher Grund für die extremen Unterschiede bei gemessenen Cereulid-Konzentrationen, die mit Krankheiten assoziiert werden, wird aufgeführt, dass der Zeitraum zwischen Verzehr des Lebensmittels und der Untersuchung des Lebensmittels auf dessen Cereulid-Gehalt von Fall zu Fall unterschiedlich sein kann. Je nach Lagerung des Lebensmittels ist jedoch auch in diesem Zeitraum eine weitere Cereulid-Produktion (sowie mikrobielles Wachstum) möglich, sodass sich die Cereulid-Gehalte in dem verzehrten und dem untersuchten Lebensmittel unterscheiden können. In der Veröffentlichung von Biesta-Peters et al. (2016) wird außerdem eine Risikobewertung des niederländischen National Institute for Public Health and the Environment zitiert, in der eingeschätzt wird, dass ein Wert von unter 0,0018 µg/g Lebensmittel (0,03 µg/kg Körpergewicht) keinen gesundheitsschädlichen Effekt erzeugt. Basierend auf Tierversuchen wird die minimale Intoxikations-Dosis des Menschen hingegen auf 8-10 µg/kg Körpergewicht geschätzt (EFSA BIOHAZ Panel, 2016). Angaben über *B. cereus*-Gehalte in Lebensmitteln, die mit emetischen Erkrankungen assoziiert wurden, sind sehr unterschiedlich und reichen von  $10^2$  bis  $10^7$  KbE/g (EFSA BIOHAZ Panel, 2016; EFSA BIOHAZ Panel, 2005; Glasset et al., 2016; Messelhäußer et al., 2014). Die sehr niedrigen Keimgehalte erscheinen als Widerspruch zu der Annahme, dass die Cereulid-Produktion erst während der exponentiellen Wachstumsphase bei Zellkonzentrationen von  $10^5$  bis  $10^6$  KbE/g einsetzt (siehe auch 3.1.1). Ein Grund für vergleichsweise niedrige Konzentrationen von *B. cereus* könnte sein, dass in den Lebensmitteln vorhandene vegetative Zellen durch Verarbeitungsschritte reduziert wurden, nachdem bereits Cereulid produziert wurde. Ein weiterer Grund könnte sein, dass Rückstellproben vor der Vermehrung von *B. cereus* im Lebensmittel und der anschließenden Abgabe an Verbraucherinnen und Verbraucher entnommen wurden. Weiterhin ist bekannt, dass die gebildeten Toxinmengen stark von Stammeigenschaften und den Umgebungsbedingungen abhängen (Agata et al., 2002; Apetroaie-Constantin et al., 2008; Carlin et al., 2006; Rajkovic et al., 2006; Stark et al., 2013). Daher besteht die Möglichkeit, dass in Lebensmitteln, die emetische Erkrankungen ausgelöst haben, *B. cereus*-Gehalte unterhalb von  $10^5$  KbE/g bestimmt werden.

Im Lebensmittel gebildetes Cereulid wird durch eine Erhitzung bei 100 °C für 150 min (pH 8,6 bis 10,6) bzw. eine Erhitzung bei 121 °C für 120 min (pH 7) nicht zerstört (Rajkovic et al., 2008).

Beim Diarrhoetyp werden vegetative Zellen und/oder Sporen von *B. cereus* (s./.) über das Lebensmittel aufgenommen. Möglicherweise bereits im Lebensmittel gebildete Enterotoxine spielen bei der Ausbildung von Durchfallsymptomen wahrscheinlich keine Rolle, da sie bei

der Magen-Darm-Passage größtenteils inaktiviert werden, denn die Enterotoxine sind gegenüber Proteinasen und niedrigen pH-Werten empfindlich. Die Enterotoxine sind außerdem hitzelabil und werden durch eine Erhitzung bei 55 °C für 20 min inaktiviert (Ceuppens et al., 2011, 2013). Auch vegetative Zellen werden bei der Magen-Darm-Passage zu einem großen Teil inaktiviert. Wie hoch dieser Anteil ist, hängt jedoch von verschiedenen Faktoren ab (z. B. Wachstumsphase der Bakterien, Eigenschaften des Lebensmittels, Magen-Darm-Milieu), sodass auch vegetative Zellen am Krankheitsgeschehen beteiligt sein könnten (Berthold-Pluta et al., 2015). Aufgenommene Sporen überleben größtenteils die Magen-Darm-Passage und können dann nahe bzw. in direktem Kontakt mit dem Dünndarm-Epithel auskeimen und vegetative Zellen bilden. Es wird angenommen, dass Sporen an Enterozyten anheften können. Der Kontakt zu den Enterozyten fördert wiederum das Auskeimen der Sporen, wodurch die notwendigen hohen Zelldichten entstehen, welche die Genregulationskaskade zur Bildung von Enterotoxinen auslösen (vgl. 3.1.1). Die Fähigkeit, an Enterozyten zu binden, hängt wahrscheinlich auch mit Oberflächeneigenschaften der Sporen zusammen, welche sich zwischen Stämmen unterscheiden können und damit möglicherweise auch einen Teil der unterschiedlichen Pathogenität erklären (Berthold-Pluta et al., 2015). Darüber hinaus wird vermutet, dass der Kontakt von vegetativen Zellen zu Enterozyten zusätzlich die Toxinbildung fördert (Jessberger et al., 2017). Die Enterotoxine bilden Poren in den Membranen der Enterozyten. Infolgedessen kommt es zur osmotischen Lyse der Enterozyten und zu Durchfallsymptomen. Die Krankheitssymptome setzen meist innerhalb von 8 bis 24 Stunden nach Aufnahme des kontaminierten Lebensmittels ein und umfassen wässrigen Durchfall und Bauchschmerzen. In der Regel ist die Erkrankung selbstlimitierend (Messelhäußer and Ehling-Schulz, 2014).

*B. cereus* (*s.l.*) bilden neben den Enterotoxinen weitere potenzielle Virulenzfaktoren, wie z. B. Sphingomyelinasen, Phospholipasen, Hämolytine oder Metalloproteinasen, welche möglicherweise die Wirkung der Enterotoxine verstärken. Angaben über *B. cereus*-Gehalte in Lebensmitteln, die mit Durchfallerkrankungen assoziiert wurden, variieren stark. Bei *B. cereus*-bedingten Ausbrüchen mit Durchfallssymptomatik, die im Zeitraum von 2007 bis 2014 an die EFSA berichtet wurden, enthielten die ursächlichen Lebensmittel in den meisten Fällen Keimzahlen von mehr als  $10^5$  KbE/g. Jedoch gab es auch Ausbrüche, bei denen *B. cereus*-Gehalte von nur  $10^3$  KbE/g nachgewiesen wurden (EFSA BIOHAZ Panel, 2016). In einer Veröffentlichung zu lebensmittelbedingten Ausbrüchen in Frankreich der Jahre 2007 bis 2014 wird berichtet, dass ursächliche Lebensmittel *B. cereus*-Gehalte von  $10^2$  bis  $10^9$  KbE/g enthielten (Glasset et al., 2016). Berücksichtigt man dabei nur die Ausbrüche, in denen ausschließlich Durchfallssymptome auftraten, so liegen die Werte zwischen  $10^3$  und  $10^6$  KbE/g, wobei drei von insgesamt sechs dieser Ausbrüche mit Lebensmitteln in Verbindung standen, die nur  $10^3$  bis  $10^4$  KbE/g enthielten. Wie bereits weiter oben beschrieben, beeinflusst der Zeitpunkt der Probenahme die ermittelten Keimgehalte von an Ausbrüchen beteiligten Lebensmitteln. Die Bakterienkonzentrationen zum Zeitpunkt des Verzehrs können darüber oder darunter liegen.

Zur Häufigkeit der Erkrankung liegen in Deutschland keine verlässlichen Daten vor. Zwischen 2009 und 2015 wurden von den zuständigen Behörden der Länder und der Bundeswehr über BELA<sup>d</sup> jährlich zwei bis sechs lebensmittelbedingte Ausbrüche durch *B. cereus* gemeldet. Von 2015 bis 2017 wurden von Deutschland jährlich drei bis sechs durch *B. cereus* verursachte Ausbrüche an die EFSA übermittelt (Rosner et al., 2016, 2017; Rosner and Schewe, 2015). In dem Zeitraum von 2007 bis 2014 wurden insgesamt 1.127 *B. cereus*-bedingte Ausbrüche von europäischen Staaten an die EFSA übermittelt. Die tatsächliche

<sup>d</sup> Bundeseinheitliches System zur Erfassung von Daten zu Lebensmitteln, die bei Krankheitsausbrüchen beteiligt sind (BELA)

Anzahl von Ausbruchsfällen dürfte aber sowohl in Deutschland als auch in Europa deutlich höher sein.

Da in der Routine-Diagnostik kaum zwischen den in Kapitel 3.1.1 genannten Spezies der *B. cereus*-Gruppe unterschieden wird, kann der Beitrag der einzelnen Spezies zu Krankheitsgeschehen derzeit nicht beurteilt werden.

Bei einem Krankheitsausbruch mit Durchfallssymptomatik bei 44 Erkrankten (davon drei Todesfälle und sechs Fälle mit blutigem Durchfall) in einem Altenheim in Frankreich wurde erstmals *B. cytotoxicus* isoliert. Das Isolat wurde aus Gemüsepüree gewonnen, welches mit  $3 \times 10^5$  KbE/g präsumtiven *B. cereus* kontaminiert war (Lund et al., 2000). Daten zur minimalen Konzentration von *B. cytotoxicus* in einem Lebensmittel, die benötigt wird, um eine Erkrankung auszulösen, sind nicht verfügbar.

Bislang gibt es nur wenige Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen dem Vorkommen von *B. thuringiensis* in Lebensmitteln und Erkrankungen des Menschen (EFSA BIOHAZ Panel, 2016; Jackson et al., 1995; McIntyre et al., 2008).

*B. weihenstephanensis*, *B. mycoides* und *B. pseudomycoides* wurden bislang nicht mit lebensmittelbedingten Erkrankungen in Zusammenhang gebracht (EFSA BIOHAZ Panel, 2016).

In Übereinstimmung mit der Klassifizierung der Zytotoxizität unterschiedlicher phylogenetischer Gruppen anhand der *panC*-Sequenz scheinen die Gruppen II, III und IV häufiger mit Erkrankungen assoziiert zu sein (Glasset et al., 2016; Jessberger et al., 2015; Schmid et al., 2016).

### 3.1.3 Hitzeinaktivierung von *Bacillus cereus* (s.l.) in Lebensmitteln

Übliche Hitzebehandlungen wie Kochen oder Pasteurisieren töten vegetative Bakterienzellen der *B. cereus*-Gruppe ab, ermöglichen aber teilweise das Überleben von Sporen (EFSA BIOHAZ Panel, 2016; Guerin, Dargaigaratz, et al., 2017). Die Reduktion der kompetitiven Mikrobiota durch die Hitzebehandlung unterstützt das Auskeimen der Sporen und das Wachstum vegetativer Zellen. Die Hitzeresistenz der Sporen ist stark abhängig von der Lebensmittelmatrix, in der sich die Sporen befinden. Beispielsweise besteht eine höhere Resistenz von *B. cereus* (s.l.)-Sporen in ölhaltigen Lebensmitteln (van Asselt and Zwietering, 2006). Außerdem ist die Stammvariabilität sehr hoch; so können D-Werte (Dezimalreduktionszeit) bei 90 °C und pH 7 zwischen wenigen Minuten bis > 100 min betragen (EFSA BIOHAZ Panel, 2016). Vor allem die Sporen emetischer Stämme sind stärker hitzeresistent (Ankolekar and Labbe, 2009; Carlin et al., 2006; Hariram and Labbe, 2016; Rajkovic et al., 2006), während die Sporen psychrotoleranter Stämme eine niedrigere Hitzeresistenz zeigen (Luu-Thi et al., 2014).

Die Hitzebehandlung eines Lebensmittels für drei Minuten bei 121 °C würde alle Sporen abtöten (EFSA BIOHAZ Panel, 2005, 2016). Entscheidend für die Inaktivierung der Sporen sind dabei die Temperatur und die Dauer der Hitzeeinwirkung, nicht aber der Druck, da die Sporen extrem resistent gegenüber hohem Druck sind (Nicholson et al., 2000). Temperaturen, die beim Pasteurisieren oder Kochen von Lebensmitteln erreicht werden, reichen hingegen nicht aus, um alle Sporen sicher zu inaktivieren (EFSA BIOHAZ Panel, 2005, 2016). Mildere Temperatur-Behandlungen (70-80 °C für 10 Minuten) können sogar das Auskeimen und Wachstum von *B. cereus* (s.l.) beschleunigen (Samapundo et al., 2014).

### 3.1.4 Risikocharakterisierung

Nach Auswertung der Literatur und der eigenen Untersuchungsergebnisse kommt das BfR zu dem Schluss, dass bei jedem *B. cereus* (*s.l.*)-Stamm von einem potentiellen Enterotoxinbildner auszugehen ist. Die Stamm-spezifischen Unterschiede in der Toxinbildungsfähigkeit sind vermutlich in der Regulation der Toxinexpression begründet. Es ist deshalb möglich, dass der Verzehr von Lebensmitteln, die sehr hohe Konzentrationen von *B. cereus* (*s.l.*) (ab  $10^5$  KbE/g) enthalten, beim Menschen innerhalb von kurzer Zeit Durchfallerkrankungen auslöst. Bei Stämmen der *B. cereus*-Gruppe, die bei der Körpertemperatur des Menschen nur eine eingeschränkte Vermehrungs- bzw. Toxinbildungsfähigkeit besitzen (*B. weihenstephanensis* und *B. mycoides*) ist die Eintrittswahrscheinlichkeit für lebensmittelbedingte Durchfallerkrankungen jedoch gering.

Beim Vorkommen von *B. cytotoxicus* könnten nach Ansicht des BfR aufgrund der höheren Toxizität des CytK-1-Toxins auch schon etwas geringere Keimzahlen im Lebensmittel (ab  $10^4$  KbE/g) ausreichen, um beim Menschen Durchfallerkrankungen auszulösen, auch wenn nicht alle *B. cytotoxicus*-Stämme stark zytotoxisch sind.

Durch das gründliche Waschen pflanzlicher Lebensmittel mit Trinkwasser lässt sich die *B. cereus* (*s.l.*)-Keimzahl und damit das Risiko, wenn überhaupt, nur geringfügig minimieren. Aufgrund der hohen Hitzeresistenz der Sporen ist nur dann von einer sicheren Eliminierung der Sporen auszugehen, wenn starke Erhitzungsverfahren angewandt werden, wie sie beispielsweise bei der Konservenherstellung zum Einsatz kommen (z. B. 121 °C, 3 min).

Doch auch bei geringeren Konzentrationen von *B. cereus* (*s.l.*) in einem Lebensmittel (ab etwa  $10^3$  KbE/g) kann von dem Lebensmittel ein Erkrankungsrisiko ausgehen, sofern der Stamm die Fähigkeit zur Cereulid-Bildung besitzt (Nachweis einer Sequenz des *ces*-Gen-Clusters) und die Bedingungen im Lebensmittel bis zu dessen Verzehr seine Vermehrung sowie die Cereulid-Bildung begünstigen. Das Risiko lässt sich minimieren, wenn Temperaturen, bei denen sich *B. cereus* (*s.l.*) vermehren, bei der Aufbewahrung von Speisen und milchhaltigen Getränken vermieden werden.

Befindet sich bereits eine relevante Menge an Cereulid im Lebensmittel, so ist davon auszugehen, dass die Gesundheitsschädlichkeit nicht eliminiert werden kann, da Cereulid extrem stabil ist (> 120 min bei 121 °C). Aufgrund der unterschiedlichen Angaben zu möglichen minimalen Intoxikationsdosen lässt sich nach Ansicht des BfR derzeit kein allgemeingültiger Cereulid-Grenzwert in Lebensmitteln ableiten, so dass die lebensmittelrechtliche Beurteilung eines Cereulid-haltigen Lebensmittels nur als Einzelfallbetrachtung durchgeführt werden kann.

### 3.2 Weitere Aspekte

Zum Schutz der Bevölkerung vor mikrobiologischen Gefahren in Lebensmitteln hat die Europäische Kommission in der Verordnung (EG) Nr. 2073/2005 verschiedene mikrobiologische Kriterien für Lebensmittel festgelegt. Für präsumtive *B. cereus* in getrockneter Säuglingsnahrung und getrockneten diätetischen Lebensmitteln für besondere medizinische Zwecke, die für Säuglinge unter 6 Monaten bestimmt sind, ist in Anhang I Kapitel 2 Nummer 2.2.11 dieser Verordnung ein Prozesshygienekriterium aufgeführt, dessen Einhaltung der Lebensmittelunternehmer am Ende des Herstellungsprozesses zu kontrollieren hat. Bei unbefriedigenden Ergebnissen hat der Lebensmittelunternehmer bestimmte Maßnahmen zu

ergreifen (Verbesserungen der Herstellungshygiene, Verhinderung der Rekontamination, Auswahl der Rohstoffe).

#### 4 Handlungsrahmen/Maßnahmen

Zum Schutz vor lebensmittelbedingten Infektionen und Lebensmittelvergiftungen empfiehlt das BfR bei der Lagerung und Zubereitung von Lebensmitteln in der Gastronomie und anderen Gemeinschaftsverpflegungseinrichtungen sowie in Privathaushalten folgende generelle Regeln der Küchenhygiene einzuhalten:

- Kühlkette leicht verderblicher Lebensmittel einhalten
- Speisen bei der Zubereitung gut durchkochen und beim Wiederaufwärmen ausreichend erhitzen, um vegetative Zellen abzutöten (mindestens 70 °C für zwei Minuten im Inneren des Lebensmittels; im Zweifelsfall die Temperatur mit einem Fleischthermometer überprüfen); das gleiche gilt für das Aufwärmen in der Mikrowelle (auf gleichmäßiges Erwärmen achten, Speisen zwischendurch umrühren)
- warme Speisen und milchhaltige Getränke bei Temperaturen von über 65 °C heißhalten bzw. innerhalb von wenigen Stunden auf unter 7 °C abkühlen (größere Speisemengen dafür in mehrere flache Schalen füllen)
- bei Speisen, die rohe und gekochte Zutaten enthalten, die gekochten Zutaten zunächst ausreichend kühlen, bevor die anderen Zutaten hinzugefügt werden
- Reste gegarter Speisen im Kühlschrank aufbewahren und innerhalb von zwei bis drei Tagen verbrauchen
- Wasser, das zum Einweichen von Trockenpilzen verwendet wird, sorgfältig entsorgen und die Hände sowie alle Gegenstände oder Arbeitsflächen nach Kontakt mit dem Einweichwasser oder den gequollenen Pilzen gründlich reinigen

#### Weitere Informationen auf der BfR-Website

Verbrauchertipps zum Schutz vor Lebensmittelinfektionen im Privathaushalt, vom 16.1.2008  
[https://www.bfr.bund.de/cm/350/verbrauchertipps\\_schutz\\_vor\\_lebensmittelinfektionen\\_im\\_privathaushalt.pdf](https://www.bfr.bund.de/cm/350/verbrauchertipps_schutz_vor_lebensmittelinfektionen_im_privathaushalt.pdf)

Warmhaltetemperatur von Speisen sollte über 65 °C betragen, vom 14.1.2008  
[https://www.bfr.bund.de/cm/343/warmhaltetemperatur\\_von\\_speisen\\_sollte\\_ueber\\_65\\_grad\\_betragen.pdf](https://www.bfr.bund.de/cm/343/warmhaltetemperatur_von_speisen_sollte_ueber_65_grad_betragen.pdf)

Empfehlungen zur hygienischen Zubereitung von pulverförmiger Säuglingsnahrung  
Stellungnahme Nr. 040/2012 des BfR vom 6. November 2012  
<https://www.bfr.bund.de/cm/343/empfehlungen-zur-hygienischen-zubereitung-von-pulverfoermiger-saeuglingsnaehrung.pdf>



„Stellungnahmen-App“ des BfR

## 5 Referenzen

- Agata, N., Ohta, M., Yokoyama, K., 2002. Production of *Bacillus cereus* emetic toxin (cereulide) in various foods. *International Journal of Food Microbiology* 73, 23-27.
- Ankolekar, C., Labbe, R.G., 2009. Survival during Cooking and Growth from Spores of Diarrheal and Emetic Types of *Bacillus cereus* in Rice. *Journal of Food Protection* 72, 2386-2389.
- Apetroaie-Constantin, C., Shaheen, R., Andrup, L., Smidt, L., Rita, H., Sallinoja-Salonen, M., 2008. Environment driven cereulide production by emetic strains of *Bacillus cereus*. *International Journal of Food Microbiology* 127, 60-67.
- Berthold-Pluta, A., Pluta, A., Garbowska, M., 2015. The effect of selected factors on the survival of *Bacillus cereus* in the human gastrointestinal tract. *Microbial Pathogenesis* 82, 7-14.
- Biesta-Peters, E.G., Dissel, S., Reij, M.W., Zwietering, M.H., in't Veld, P.H., 2016. Characterization and Exposure Assessment of Emetic *Bacillus cereus* and Cereulide Production in Food Products on the Dutch Market. *Journal of Food Protection* 79, 230-238.
- Carlin, F., Fricker, M., Pielat, A., Heisterkamp, S., Shaheen, R., Salonen, M.S., Svensson, B., Nguyen-The, C., Ehling-Schulz, M., 2006. Emetic toxin-producing strains of *Bacillus cereus* show distinct characteristics within the *Bacillus cereus* group. *International Journal of Food Microbiology* 109, 132-138.
- Ceuppens, S., Boon, N., Uyttendaele, M., 2013. Diversity of *Bacillus cereus* group strains is reflected in their broad range of pathogenicity and diverse ecological lifestyles. *FEMS Microbiology Ecology* 84, 433-450.
- Ceuppens, S., Rajkovic, A., Heyndrickx, M., Tsilia, V., van De Wiele, T., Boon, N., Uyttendaele, M., 2011. Regulation of toxin production by *Bacillus cereus* and its food safety implications. *Critical Reviews in Microbiology* 37, 188-213.
- Dierick, K., Van Coillie, E., Swiecicka, I., Meyfroidt, G., Devlieger, H., Meulemans, A., Hoedemaekers, G., Fourie, L., Heyndrickx, M., Mahillon, J., 2005. Fatal family outbreak of *Bacillus cereus*-associated food poisoning. *Journal of Clinical Microbiology* 43, 4277-4279.
- Dommel, M.K., Lucking, G., Scherer, S., Ehling-Schulz, M., 2011. Transcriptional kinetic analyses of cereulide synthetase genes with respect to growth, sporulation and emetic toxin production in *Bacillus cereus*. *Food Microbiology* 28, 284-290.
- EFSA BIOHAZ Panel, 2005. Opinion of the Scientific Panel on Biological Hazards on *Bacillus cereus* and other *Bacillus* spp in foodstuffs. *EFSA Journal* 175, 1-48.
- EFSA BIOHAZ Panel, 2016. Scientific opinion on the risks for public health related to the presence of *Bacillus cereus* and other *Bacillus* spp. including *Bacillus thuringiensis* in foodstuffs. *EFSA Journal* 14, 93.
- EFSA FEEDAP Panel, 2012. Scientific Opinion on Toyocerin (*Bacillus cereus*) as a feed additive for sows, piglets, pigs for fattening, cattle for fattening, calves for rearing, chickens for fattening and rabbits for fattening. *EFSA Journal* 10, 17.
- EFSA FEEDAP Panel, 2014. Scientific Opinion on the safety and efficacy of Toyocerin® (*Bacillus toyonensis*) as a feed additive for rabbits for fattening, chickens for fattening, weaned piglets, pigs for fattening, sows for reproduction, cattle for fattening, and calves for rearing. *EFSA Journal* 12, 17.
- Erbslöh, I., 2007. Vorkommen und Charakterisierung des Toxinbildungsvermögen von *Bacillus cereus*-Isolaten aus ausgewählten Lebensmitteln Tierärztliche Fakultät. Ludwig-Maximilian-Universität München, München, p. 80.

- Fagerlund, A., Brillard, J., Fürst, R., Guinebretiere, M.H., Granum, P.E., 2007. Toxin production in a rare and genetically remote cluster of strains of the *Bacillus cereus* group. *Bmc Microbiology* 7.
- Fagerlund, A., Ween, A., Lund, T., Hardy, S.P., Granum, P.E., 2004. Genetic and functional analysis of the *cytK* family of genes in *Bacillus cereus*. *Microbiology-Sgm* 150, 2689-2697.
- Finlay, W.J.J., Logan, N.A., Sutherland, A.D., 2000. *Bacillus cereus* produces most emetic toxin at lower temperatures. *Letters in Applied Microbiology* 31, 385-389.
- Francis, K.P., Mayr, R., von Stetten, F., Stewart, G., Scherer, S., 1998. Discrimination of psychrotrophic and mesophilic strains of the *Bacillus cereus* group by PCR targeting of major cold shock protein genes. *Applied and Environmental Microbiology* 64, 3525-3529.
- Glasset, B., Herbin, S., Guillier, L., Cadel-Six, S., Vignaud, M., Grout, J., Pairaud, S., Michel, V., Hennekinne, J., Ramarao, N., Brisabois, A., 2016. *Bacillus cereus*-induced food-borne outbreaks in France, 2007 to 2014: epidemiology and genetic characterisation. *Eurosurveillance* 21, 18-28.
- Guerin, A., Dargaignaratz, C., Clavel, T., Broussolle, V., Nguyen-the, C., 2017. Heat-resistance of psychrotolerant *Bacillus cereus* vegetative cells. *Food Microbiology* 64, 195-201.
- Guerin, A., Ronning, H.T., Dargaignaratz, C., Clavel, T., Broussolle, V., Mahillon, J., Granum, P.E., Nguyen-The, C., 2017. Cereulide production by *Bacillus weihenstephanensis* strains during growth at different pH values and temperatures. *Food Microbiology* 65, 130-135.
- Guinebretiere, M.H., Auger, S., Galleron, N., Contzen, M., De Sarrau, B., De Buyser, M.L., Lamberet, G., Fagerlund, A., Granum, P.E., Lereclus, D., De Vos, P., Nguyen-The, C., Sorokin, A., 2013. *Bacillus cytotoxicus* sp nov is a novel thermotolerant species of the *Bacillus cereus* Group occasionally associated with food poisoning. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 63, 31-40.
- Guinebretiere, M.H., Thompson, F.L., Sorokin, A., Normand, P., Dawyndt, P., Ehling-Schulz, M., Svensson, B., Sanchis, V., Nguyen-The, C., Heyndrickx, M., De Vos, P., 2008. Ecological diversification in the *Bacillus cereus* Group. *Environmental Microbiology* 10, 851-865.
- Guinebretiere, M.H., Velge, P., Couvert, O., Carlin, F., Debuyser, M.L., Nguyen-The, C., 2010. Ability of *Bacillus cereus* group strains to cause food poisoning varies according to phylogenetic affiliation (groups I to VII) rather than species affiliation. *Journal of Clinical Microbiology* 48, 3388-3391.
- Hägglom, M.M., Apetroaie, C., Andersson, M.A., Salkinoja-Salonen, M.S., 2002. Quantitative analysis of cereulide, the emetic toxin of *Bacillus cereus*, produced under various conditions. *Applied and Environmental Microbiology* 68, 2479-2483.
- Hariram, U., Labbe, R.G., 2016. Growth and inhibition by spices of growth from spores of enterotoxigenic *Bacillus cereus* in cooked rice. *Food Control* 64, 60-64.
- Heini, N., Stephan, R., Ehling-Schulz, M., Johler, S., 2018. Characterization of *Bacillus cereus* group isolates from powdered food products. *International Journal of Food Microbiology* 283, 59-64.
- Hendriksen, N.B., Hansen, B.M., 2011. Diagnostic properties of three conventional selective plating media for selection of *Bacillus cereus*, *B. thuringiensis* and *B. weihenstephanensis*. *Folia Microbiologica* 56, 535-539.
- Luu-Thi, H., Khadka, D.B., Michiels, C.W., 2014. Thermal inactivation parameters of spores from different phylogenetic groups of *Bacillus cereus*. *International Journal of Food Microbiology* 189, 183-188.

- Jääskeläinen, E.L., Häggblom, M.M., Andersson, M.A., Salkinoja-Salonen, M.S., 2004. Atmospheric oxygen and other conditions affecting the production of cereulide by *Bacillus cereus* in food. *International Journal of Food Microbiology* 96, 75-83.
- Jackson, S.G., Goodbrand, R.B., Ahmed, R., Kasatiya, S., 1995. *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* isolated in a gastroenteritis outbreak investigation. *Letters in Applied Microbiology* 21, 103-105.
- Jessberger, N., Krey, V.M., Rademacher, C., Böhm, M.E., Mohr, A.K., Ehling-Schulz, M., Scherer, S., Märklbauer, E., 2015. From genome to toxicity: a combinatorial approach highlights the complexity of enterotoxin production in *Bacillus cereus*. *Frontiers in Microbiology* 6, 15.
- Jessberger, N., Rademacher, C., Krey, V.M., Dietrich, R., Mohr, A.K., Böhm, M.E., Scherer, S., Ehling-Schulz, M., Märklbauer, E., 2017. Simulating Intestinal Growth Conditions Enhances Toxin Production of Enteropathogenic *Bacillus cereus*. *Frontiers in Microbiology* 8.
- Jimenez, G., Urdiain, M., Cifuentes, A., Lopez-Lopez, A., Blanch, A.R., Tamames, J., Kampf, P., Kolsto, A.B., Ramon, D., Martinez, J.F., Codoner, F.M., Rossello-Mora, R., 2013. Description of *Bacillus toyonensis* sp. nov., a novel species of the *Bacillus cereus* group, and pairwise genome comparisons of the species of the group by means of ANI calculations. *Systematic and Applied Microbiology* 36, 383-391.
- Johler, S., Kalbhenn, E.M., Heini, N., Brodmann, P., Gautsch, S., Bagcioglu, M., Contzen, M., Stephan, R., Ehling-Schulz, M., 2018. Enterotoxin Production of *Bacillus thuringiensis* Isolates From Biopesticides, Foods, and Outbreaks. *Frontiers in Microbiology* 9.
- Lazarte, J.N., Lopez, R.P., Ghiringhelli, P.D., Berón, C.M., 2018. *Bacillus wiedmannii* biovar *thuringiensis*: A Specialized Mosquitocidal Pathogen with Plasmids from Diverse Origins. *Genome Biology and Evolution* 10, 2823-2833.
- Lechner, S., Mayr, R., Francis, K.P., Pruss, B.M., Kaplan, T., Wiessner-Gunkel, E., Stewart, G.S., Scherer, S., 1998. *Bacillus weihenstephanensis* sp. nov. is a new psychrotolerant species of the *Bacillus cereus* group. *International Journal of Systematic Bacteriology* 48 Pt 4, 1373-1382.
- Lindbäck, T., Hardy, S.P., Dietrich, R., Sodring, M., Didier, A., Moravek, M., Fagerlund, A., Bock, S., Nielsen, C., Casteel, M., Granum, P.E., Märklbauer, E., 2010. Cytotoxicity of the *Bacillus cereus* Nhe Enterotoxin Requires Specific Binding Order of Its Three Exoprotein Components. *Infection and Immunity* 78, 3813-3821.
- Liu, Y., Du, J., Lai, Q.L., Zeng, R.Y., Ye, D.Z., Xu, J., Shao, Z.Z., 2017. Proposal of nine novel species of the *Bacillus cereus* group. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 67, 2499-2508.
- Liu, Y., Lai, Q.L., Goker, M., Meier-Kolthoff, J.P., Wang, M., Sun, Y.M., Wang, L., Shao, Z.Z., 2015. Genomic insights into the taxonomic status of the *Bacillus cereus* group. *Scientific Reports* 5, 11.
- Lücking, G., Dommel, M.K., Scherer, S., Fouet, A., Ehling-Schulz, M., 2009. Cereulide synthesis in emetic *Bacillus cereus* is controlled by the transition state regulator AbrB, but not by the virulence regulator PlcR. *Microbiology-Sgm* 155, 922-931.
- Marxen, S., Stark, T.D., Frenzel, E., Ruetschle, A., Luecking, G., Puerstinger, G., Pohl, E.E., Scherer, S., Ehling-Schulz, M., Hofmann, T., 2015. Chemodiversity of cereulide, the emetic toxin of *Bacillus cereus*. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 407, 2439-2453.
- McIntyre, L., Bernard, K., Beniac, D., Isaac-Renton, J.L., Naseby, D.C., 2008. Identification of *Bacillus cereus* Group Species Associated with Food Poisoning Outbreaks in British Columbia, Canada. *Applied and Environmental Microbiology* 74, 7451-7453.
- Messelhäuser, U., Ehling-Schulz, M., 2014. *Bacillus cereus* - Vorkommen, Nachweis und Präventionsstrategien. B. Behr's Verlag, Hamburg.



- Messelhäußer, U., Frenzel, E., Blochinger, C., Zucker, R., Kampf, P., Ehling-Schulz, M., 2014. Emetic *Bacillus cereus* are more volatile than thought: Recent foodborne outbreaks and prevalence studies in Bavaria (2007-2013). *Biomed Research International*.
- Miller, R.A., Beno, S.M., Kent, D.J., Carroll, L.M., Martin, N.H., Boor, K.J., Kovac, J., 2016. *Bacillus wiedmannii* sp nov., a psychrotolerant and cytotoxic *Bacillus cereus* group species isolated from dairy foods and dairy environments. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 66, 4744-4753.
- Miller, R.A., Jian, J.H., Beno, S.M., Wiedmann, M., Kovac, J., 2018. Intraclade Variability in Toxin Production and Cytotoxicity of *Bacillus cereus* Group Type Strains and Dairy-Associated Isolates. *Applied and Environmental Microbiology* 84.
- Moravek, M., Dietrich, R., Bürk, C., Broussolle, V., Guinebretiere, M.H., Granum, P.E., Nguyen-the, C., Märtilbauer, E., 2006. Determination of the toxic potential of *Bacillus cereus* isolates by quantitative enterotoxin analyses. *Fems Microbiology Letters* 257, 293-298.
- Naranjo, M., Denayer, S., Botteldoorn, N., Delbrassinne, L., Veys, J., Waegenare, J., Sirtaine, N., Driesen, R.B., Sipido, K.R., Mahillon, J., Dierick, K., 2011. Sudden Death of a Young Adult Associated with *Bacillus cereus* Food Poisoning. *Journal of Clinical Microbiology* 49, 4379-4381.
- Nicholson, W.L., Munakata, N., Horneck, G., Melosh, H.J., Setlow, P., 2000. Resistance of *Bacillus* endospores to extreme terrestrial and extraterrestrial environments. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 64, 548-572.
- Oren, A., Garrity, G.M., 2014. List of new names and new combinations previously effectively, but not validly, published. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 64, 2184-2187.
- Paananen, A., Mikkola, R., Sareneva, T., Matikainen, S., Hess, M., Andersson, M., Julkunen, I., Salkinoja-Salonen, M.S., Timonen, T., 2002. Inhibition of human natural killer cell activity by cereulide, an emetic toxin from *Bacillus cereus*. *Clinical and Experimental Immunology* 129, 420-428.
- Rajkovic, A., Uyttendaele, M., Ombregt, S.A., Jaaskelainen, E., Salkinoja-Salonen, M., Debevere, J., 2006. Influence of type of food on the kinetics and overall production of *Bacillus cereus* emetic toxin. *Journal of Food Protection* 69, 847-852.
- Rajkovic, A., Uyttendaele, M., Vermeulen, A., Andjelkovic, M., Fitz-James, I., in't Veld, P., Denon, Q., Verhe, R., Debevere, J., 2008. Heat resistance of *Bacillus cereus* emetic toxin, cereulide. *Letters in Applied Microbiology* 46, 536-541.
- Rosner, B., Mikolajetz, U., Schonsky, A., 2016. Gemeinsamer nationaler Bericht des BVL und RKI zu lebensmittelbedingten Krankheitsausbrüchen in Deutschland 2017.
- Rosner, B., Mikolajetz, U., Schonsky, A., 2017. Gemeinsamer nationaler Bericht des BVL und RKI zu lebensmittelbedingten Krankheitsausbrüchen in Deutschland 2017.
- Rosner, B., Schewe, T., 2015. Gemeinsamer nationaler Bericht des BVL und RKI zu lebensmittelbedingten Krankheitsausbrüchen in Deutschland 2017.
- Samapundo, S., Heyndrickx, M., Xhaferi, R., de Baenst, I., Devlieghere, F., 2014. The combined effect of pasteurization intensity, water activity, pH and incubation temperature on the survival and outgrowth of spores of *Bacillus cereus* and *Bacillus pumilus* in artificial media and food products. *International Journal of Food Microbiology* 181, 10-18.
- Samapundo, S., Heyndrickx, M., Xhaferi, R., Devlieghere, F., 2011. Incidence, diversity and toxin gene characteristics of *Bacillus cereus* group strains isolated from food products marketed in Belgium. *International Journal of Food Microbiology* 150, 34-41.
- Schmid, D., Rademacher, C., Kanitz, E.E., Frenzel, E., Simons, E., Allerberger, F., Ehling-Schulz, M., 2016. Elucidation of enterotoxigenic *Bacillus cereus* outbreaks in Austria

- by complementary epidemiological and microbiological investigations, 2013. *International Journal of Food Microbiology* 232, 80-86.
- Shiota, M., Saitou, K., Mizumoto, H., Matsusaka, M., Agata, N., Nakayama, M., Kage, M., Tatsumi, S., Okamoto, A., Yamaguchi, S., Ohta, M., Hata, D., 2010. Rapid Detoxification of Cereulide in *Bacillus cereus* Food Poisoning. *Pediatrics* 125, E951-E955.
- Soufiane, B., Cote, J.C., 2010. *Bacillus thuringiensis* Serovars bolivia, vazensis and navarrensensis meet the description of *Bacillus weihenstephanensis*. *Current Microbiology* 60, 343-349.
- Stark, T., Marxen, S., Rutschle, A., Lucking, G., Scherer, S., Ehling-Schulz, M., Hofmann, T., 2013. Mass spectrometric profiling of *Bacillus cereus* strains and quantitation of the emetic toxin cereulide by means of stable isotope dilution analysis and HEp-2 bioassay. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 405, 191-201.
- Stenfors Arnesen, L.P., Fagerlund, A., Granum, P.E., 2008. From soil to gut: *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins. *FEMS* 32, 579 - 606.
- Stenfors, L.P., Mayr, R., Scherer, S., Granum, P.E., 2002. Pathogenic potential of fifty *Bacillus weihenstephanensis* strains. *Fems Microbiology Letters* 215, 47-51.
- Thorsen, L., Hansen, B.M., Nielsen, K.F., Hendriksen, N.B., Phipps, R.K., Budde, B.B., 2006. Characterization of emetic *Bacillus weihenstephanensis*, a new cereulide-producing bacterium. *Applied and Environmental Microbiology* 72, 5118-5121.
- van Asselt, E.D., Zwietering, M.H., 2006. A systematic approach to determine global thermal inactivation parameters for various food pathogens. *International Journal of Food Microbiology* 107, 73-82.
- Wehrle, E., Didier, A., Moravek, M., Dietrich, R., Martlbauer, E., 2010. Detection of *Bacillus cereus* with enteropathogenic potential by multiplex real-time PCR based on SYBR Green I. *Molecular and Cellular Probes* 24, 124-130.
- Wehrle, E., Moravek, M., Dietrich, R., Burk, C., Didier, A., Martlbauer, E., 2009. Comparison of multiplex PCR, enzyme immunoassay and cell culture methods for the detection of enterotoxinogenic *Bacillus cereus*. *Journal of Microbiological Methods* 78, 265-270.
- Yokoyama, K., Ito, M., Agata, N., Isobe, M., Shibayama, K., Horii, T., Ohta, M., 1999. Pathological effect of synthetic cereulide, an emetic toxin of *Bacillus cereus*, is reversible in mice. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 24, 115-120.