

Nachweis von *Cronobacter sakazakii* in Getränken auf Sojabasis mit dem Innovate™ System und dem RapiScreen™-Kit für Milchprodukte

Einleitung

Cronobacter sakazakii ist ein bewegliches, gramnegatives, nicht-sporenbildendes, stäbchenförmiges coliformes Bakterium aus der Familie der *Enterobacteriaceae* der Gattung *Cronobacter*. Dieses Bakterium war an Ausbrüchen von Neugeborenenenerkrankungen (Frühgeborene), in Einzelfällen von stark immungeschwächten Personen und bei älteren Menschen beteiligt, verursacht jedoch selten Krankheiten bei gesunden Erwachsenen. *Cronobacter* kann in Trockenlebensmitteln wie pulverförmiger Säuglingsnahrung, Milchpulver, Kräutertees und Stärke überleben, sogar während des gesamten Trocknungsprozesses.

Um dieses Risiko zu minimieren, ist es wichtig, das Endprodukt auf eine Kontamination durch Mikroorganismen zu testen. Das schnelle mikrobielle Innovate™-Screeningsystem wurde für den schnellen Nachweis von Mikroorganismen in einer Reihe von Produkten entwickelt, einschließlich Milch und Säuglingsnahrung. Zum Nachweis sehr geringer Mengen an Verunreinigungen in diesen Arten von Produkten ist ein Anreicherungsschritt erforderlich, um sicherzustellen, dass genügend ATP für den Nachweis vorhanden ist. In der Regel wird ein Produkt in seiner eigenen Verpackung inkubiert, um das ATP von kontaminierten mikrobiellen Zellen anzureichern. Zur Bestimmung positiver Ergebnisse werden vordefinierte Ausgangswerte von nicht kontaminierten Produkten verwendet.

Ziel

Ziel dieser Studie war es, das Innovate System unter Verwendung des RapiScreen™-Kits für Milchprodukte für den Nachweis von *Cronobacter sakazakii* in verschiedenen Proteingetränkeprodukten auf Sojabasis zu validieren, um die Gleichwertigkeit mit herkömmlichen Plattentechniken aufzuzeigen.

Gerät, Zubehör und Reagenzien

- Sterile Impfösen
- Sterile Pipetten und Spitzen
- Inkubatoren für eine Temperatur von 35 °C ± 2 °C
- Alkoholtupfer
- RapiScreen-Kit für Milchprodukte (enthält Reagenzien, Polypropylen (PP)-Fläschchen, Mikrotiterplatten)
- Kartoffel-Dextrose-Agar (PDA)
- Trypton-Soja-Agar (TSA)-Platten
- Trypton-Soja-Brühe (TSB)
- pH-Meter und Elektroden (d. h. InLab®-Sensoren von Mettler Toledo)
- Spritzen, 1 ml und 3 ml
- Phosphatgepufferte Kochsalzlösung nach Dulbecco – DPBS (1X)
- Shoe Goo, klare Schuhreparatur- und Schutzbeschichtung
- PrecisionGlide-Nadeln, 16 Gauge 1½"
- ATP-Positivkontrolle
- Innovate System-Gerät

Testorganismen und Produkte

- Mikroorganismen
 - *Cronobacter sakazakii*, ATCC Nr. 29544
- Getestete Milchprodukttypen
 - Komplettproteingetränk auf Sojabasis, Schokolade
 - Komplettproteingetränk auf Sojabasis, Vanille
 - H-Shake auf Sojabasis, Schokolade
 - H-Shake auf Sojabasis, Vanille

Methoden

1. Kulturen

Kulturen von *Cronobacter sakazakii* wurden vorbereitet, indem ein lyophilisierter Organismus auf TSA-Platten plattiert wurde. Kulturen wurden in TSB hergestellt und 24 Stunden lang bei 35 ± 1 °C gezüchtet. Anschließend wurde eine zehnfache serielle Verdünnungsreihe unter Verwendung von DPBS hergestellt und Keimzahlen auf TSA-Platten vorbereitet, um eine Konzentration von <100 KBE zu identifizieren. Das eigentliche Inokulum für den beim Anreichern von Proben verwendeten Organismus wurde bestimmt, indem es zweifach auf TSA-Platten plattiert wurde. Die Platten wurden bei 35 ± 2 °C inkubiert und nach 24 Stunden gezählt.

2. Bewertung von pH-Wert

Die in Bezug auf den pH-Wert bewerteten Produkte wurden dreifach gemessen, um die Genauigkeit der Messungen zu gewährleisten. Das zur Messung von Produkten verwendete pH-Meter wurde vor dem Gebrauch kalibriert. Dies zeigte, dass zusätzliche Tests nicht erforderlich waren, um zu bestätigen, dass das RapiScreen-Kit für Milchprodukte in der Lage ist, die Produkte ausreichend zu neutralisieren.

3. Bestimmung von Hintergrund- und Ausgangs-RLU

Zur Bestimmung der ATP-Ausgangswerte wurde jedes Produkt zunächst 24 Stunden lang bei 37 °C inkubiert. Die Proben wurden gut gemischt und 20 ml jedes Produkts zum Testen in einen sterilen Behälter überführt. Die Tests sowohl in Bezug auf den pH-Wert als auch für Hintergrund-/Ausgangswerte wurden mit dem RapiScreen-Kit für Milchprodukte ausgeführt.

Die Hintergrund-ATP-Menge jedes Produkts wurde bestimmt, indem eine Prüfung unter Verwendung einer ATX-Pufferlösung anstelle von rekonstituiertem ATX-Reagenz durchgeführt wurde. Die Prüfung wurde dann unter Verwendung von rekonstituiertem ATX wiederholt, um den Abbau des Hintergrund-ATP-Signals zu ermöglichen. Diese Ergebnisse werden als Ausgangs-RLU-Werte bezeichnet. Die Ausgangs-RLU-Werte sollten niedrig und konsistent sein, um zu zeigen, dass das Hintergrund-RLU-Signal vollständig abgebaut wurde. Ein stabiler Ausgangs-RLU-Wert ermöglicht die Festlegung eines Schwellenwert-Cutoff-Werts (positiv/negativ) zur Identifizierung kontaminierter Proben.

- Ausgangswertprotokoll: Dosieren Sie 60 µl ATX – schütteln Sie 10 Minuten lang – befolgen Sie die Anweisungen von RapiScreen für Milchprodukte zum Nachweis
- Hintergrundprotokoll: Dosieren Sie 60 µl ATX-Puffer – schütteln Sie 10 Minuten lang – befolgen Sie die Anweisungen von RapiScreen für Milchprodukte zum Nachweis

Sobald die Ausgangswerte festgelegt und die Kulturen vorbereitet waren, wurde jeder Produkttyp zweifach bei <100 KBE pro Behälter inokuliert. Die Mikroorganismen wurden mit einer Spritze durch die Oberseite des Behälters angereichert. Dies wurde mit Shoe Goo-Kleber verschlossen. Ein nicht-inokulierter Behälter wurde mit jedem inokulierten Satz als Negativkontrolle inkubiert. Positivkontrollen wurden durch Inokulation von TSB oder DPBS mit 100 µl der <100 KBE-Kultur vorbereitet.

Die Proben wurden bis zu sieben Tage bei 35 ± 2 °C inkubiert. An den Tagen 1-7 wurden jeweils Aliquoten aus den Behältern entnommen und auf dem Innovate System mit dem RapiScreen-Kit für Milchprodukte getestet. Parallel dazu wurden jeden Tag 10 µl jeder Produktprobe auf TSA-Platten inokuliert und 24 Stunden lang bei 35 ± 2 °C zur Wachstums- und Morphologiebestätigung inkubiert.

Ergebnisse

Bei allen getesteten Getränketypen wurde ein Wachstum geringer Anreicherungsmengen von *Cronobacter sakazakii* nach einer Inkubation von 24 Stunden mit dem Innovate System und dem RapiScreen-Kit für Milchprodukte (Tabelle 1) festgestellt. RLU-Werte waren im Bereich zwischen 1.600 und 81.000 und wiesen auf ein robustes Wachstum sowie eine robuste ATP-Produktion hin, selbst wenn sie mit <100 KBE angereichert

waren. In keinem der vier inokulierten Produkte wurden nach Tag 3 Daten erfasst, da das Produkt infolge übermäßiger Gasbildung austrat. Alle positiven Ergebnisse auf dem Innovate System wurden durch das Verteilen von Produkten auf TSA bestätigt. Die nicht-inokulierten Kontrollen hatten Ausgangswerte zwischen 3 und 14 KBE, was typisch für ordnungsgemäß verarbeitete H-Produkte ist.

Tabelle 1. Nachweis von *Cronobacter sakazakii* in verschiedenen Getränkeprodukten auf Sojabasis
 *Austritt – Die Gasproduktion durch den Organismus führte zu einer Explosion oder einem Austritt beim Produktbehälter.

Produkt Hintergrund: N.a.		Produkt-Ausgangswert: N.a.		Schwellenwert: N.a.						
<i>C. sakazakii</i>	Ziel-Inokulum	Ist-Inokulum	Bestätigung Plattenergebnis	Tage: RLU-Wert (Durchschn.)						
	Zelle Nr. KBE	Zelle Nr. KBE		1	2	3	4	5	6	7
Schokolade auf Sojabasis (SBC)	<100	90	Wachstum	4.379	2.861	1.601	Austritt*	Austritt	Austritt	Austritt
Vanille auf Sojabasis (SBV)	<100	90	Wachstum	32.269	45.726	8.208	Austritt	Austritt	Austritt	Austritt
H-Schokolade (UC)	<100	90	Wachstum	31.496	31.367	Austritt	Austritt	Austritt	Austritt	Austritt
H-Vanille (UV)	<100	90	Wachstum	65.270	81.627	5.553	Austritt	Austritt	Austritt	Austritt
Blindplatte	Ziel-Inokulum	Ist-Inokulum	Bestätigung Plattenergebnis	1	2	3	4	5	6	7
SBC-Negativkontrolle: 35 °C	0	0	Negativ	5	4	4	4	6	4	5
SBV-Negativkontrolle: 35 °C	0	0	Negativ	13	11	10	12	12	14	14
UC-Negativkontrolle: 35 °C	0	0	Negativ	5	5	3	5	6	4	4
UV-Negativkontrolle: 35 °C	0	0	Negativ	12	10	9	8	12	11	11

Schlussfolgerungen

Wie der obigen Tabelle (Tabelle 1) entnommen werden kann, wurde *C. sakazakii* mit dem Innovate System und dem RapiScreen-Kit für Milchprodukte nach einer Inkubation von 24 Stunden in allen angereicherten Produkten nachgewiesen. Wie bei der traditionellen Plattierungsmethode wurden bei allen getesteten Proben positive Ergebnisse mit der erwarteten Morphologie erhalten.

Die Ergebnisse für das Wachstum an Tag 4 und darüber hinaus wurden bei inokulierten Produkten aufgrund des übermäßigen Wachstums des Organismus in allen Produkten nicht vervollständigt. An Tag 3 waren alle Produktbehälter aufgebläht und an Tag 4 gab es aufgrund einer übermäßigen Gasproduktion Austritte, was ein Hinweis für das Wachstum der Organismen war.



Zusammenfassung

Die aseptische Verarbeitung von Getränkeprodukten auf Sojabasis kann dazu beitragen, das Risiko einer mikrobiellen Kontamination der Produkte zu verringern. Dies zeigt sich deutlich in den niedrigen Ausgangswerten für den ATP-Nachweis in nicht-inokulierten Proben. Darüber hinaus konnte mit dem Innovate System und dem RapiScreen-Kit für Milchprodukte nach 24 Stunden eine geringe *Cronobacter sakazakii*-Kontamination (<100 KBE pro Behälter) festgestellt werden. Es wurden sehr hohe RLU-Werte von *C. sakazakii* in Komplettprotein-Schokolade auf Sojabasis, Vanille auf Sojabasis, H-Vanille und H-Schokolade nachgewiesen. Dadurch wurde gezeigt, dass das Innovate System ein nützliches Werkzeug beim Nachweis von *C. sakazakii* bei all diesen Produkttypen wäre.

Auf der Grundlage dieser Ergebnisse empfiehlt Hygiena® die Verwendung des Innovate Systems zum Nachweis geringer Mengen von *Cronobacter* in H-Milchprodukten.