

Nachweis von *Cronobacter* spp. mit dem Innovate™ System und dem RapiScreen™-Kit für Milchprodukte

Einleitung

Bei der Spezies *Cronobacter* handelt es sich um gramnegative Bakterien, die natürlich in der Umwelt vorkommen. *Cronobacter* kann in Trockenlebensmitteln wie pulverförmiger Säuglingsnahrung, Milchpulver, Kräutertees und Stärke überleben, sogar während des gesamten Trocknungsprozesses. Es ist bekannt, dass sie schwere und oft lebensbedrohliche Infektionen bei Säuglingen verursachen.

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 muytjensii* und *Cronobacter sakazakii* in verschiedenen Hafermilchprodukten zu validieren, um die Gleichwertigkeit mit herkömmlichen Plattentechniken aufzuzeigen.

Gerät, Zubehör und Reagenzien

- Sterile Impfösen
- Sterile Pipetten und Spitzen
- Inkubatoren für eine Temperatur von 30 °C oder 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)
- GasPak™ EZ-Beutelsystem zur Erzeugung einer anaeroben Gasumgebung, mit Anzeige
- 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 muytjensii*, ATCC Nr. 51329
 - *Cronobacter sakazakii*, ATCC Nr. 29544
- Getestete Milchprodukttypen
 - ESL-Schokoladenmilch
 - Fettarme ESL-Milch
 - ESL-Ausgangsmilch
 - Barista-H-Milch
 - H-Schokoladenmilch
 - H-Ausgangsmilch



Methoden

Cronobacter-Kulturen wurden vorbereitet, indem die ATCC-Pellets rehydratisiert, auf TSA-Platten verteilt und 24 Stunden lang bei der entsprechenden Temperatur gezüchtet wurden (jeweils 30 ± 1 °C und 35 ± 1 °C für *C. muytjensii* und *C. sakazakii*). Kolonien wurden ausgewählt und zahlreiche 10-fache Verdünnungen wurden in DPBS hergestellt. Keimzahlen wurden vorbereitet, um eine Konzentration von <100 KBE zu identifizieren.

Zur Bestimmung der ATP-Ausgangswerte wurde jedes Milchprodukt zunächst 48 Stunden lang bei 32 °C inkubiert. Die Proben wurden gemischt und 25 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.

Sobald die Ausgangswerte festgelegt und die Kulturen vorbereitet waren, wurde jeder Produkttyp dreifach bei <100 KBE pro Behälter inokuliert (zum Vergleich wurde auch eine hohe Anreicherungsmenge inokuliert). Die Mikroorganismen wurden mit einer Spritze durch die Oberseite des Behälters angereichert. Dies wurde mit Shoe Goo verschlossen. Ein nicht-inokulierter Behälter wurde mit jedem inokulierten Satz als Negativkontrolle inkubiert. Positivkontrollen wurden durch Inokulation von Trypton-Soja-Brühe erstellt. Proben für *C. muytjensii* wurden bei 30 ± 1 °C inkubiert, während Proben für *C. sakazakii* bei 35 ± 1 °C für insgesamt zwei Tage inkubiert wurden. An Tag 1 und 2 wurden jeweils Aliquoten aus den Behältern entnommen und auf dem Innovate System mit dem RapiScreen-Kit für Milchprodukte getestet. Parallel dazu wurden 10 µl jeder Produktprobe auf TSA-Platten inokuliert und 24 Stunden lang zur Wachstums- und Morphologiebestätigung inkubiert.

Ergebnisse

Bei allen getesteten Milchtypen wurde ein Wachstum sowohl hoher als auch geringer Anreicherungsmengen beider *Cronobacter*-Spezies nach einer Inkubation von 24 Stunden mit dem Innovate System und dem RapiScreen-Kit für Milchprodukte (Tabellen 1 und 2) festgestellt. Typische RLU-Werte lagen im Bereich zwischen 40.000 und 175.000 und wiesen auf ein robustes Wachstum sowie eine robuste ATP-Produktion hin, selbst wenn sie mit <100 KBE angereichert waren. Die nicht-inokulierten Kontrollen hatten Ausgangswerte zwischen 6 und 25 KBE, was typisch für ordnungsgemäß verarbeitete H- und ESL-Produkte ist.

Der Nachweis von *Cronobacter* auf Platten wurde dagegen erst nach einer Inkubation von 48 Stunden beobachtet. Das Wachstum aller positiven Proben auf dem Innovate System wurde durch eine Kulturplattierung bestätigt, auch jenes mit niedrigen Anreicherungsmengen (<100 KBE). Selbst mit hohen Mengen angereicherte Kulturen konnten erst nach 48 Stunden bestätigt werden. Mit dieser Standardmethode konnte die Kontamination nach 24 Stunden bei keinem Probenotyp nachgewiesen werden, mit dem Innovate System und dem RapiScreen-Kit für Milchprodukte hingegen schon.

Tabelle 1. Nachweis von *Cronobacter muytjensii* in verschiedenen Hafermilchprodukttypen

<i>C. muytjensii</i> Nachweis (Stunden)				
Produkttyp	Innovate System		Plattierung	
	Hohe KBE-Anreicherung	Geringe KBE-Anreicherung	Hohe KBE-Anreicherung	Geringe KBE-Anreicherung
ESL Original	24 Std.	24 Std.	48 Std.	48 Std.
H Original	24 Std.	24 Std.	48 Std.	48 Std.
ESL Schokolade	N.d.	24 Std.	N.d.	48 Std.
ESL fettarm	N.d.	24 Std.	N.d.	48 Std.
H Barista	N.d.	24 Std.	N.d.	48 Std.
H Schokolade	N.d.	24 Std.	N.d.	48 Std.
Nicht inokuliert	-	-	-	-

Tabelle 2. Nachweis von *Cronobacter sakazakii* in verschiedenen Hafermilchprodukttypen

<i>C. sakazakii</i> Nachweis (Stunden)				
Produkttyp	Innovate System		Plattierung	
	Hohe KBE-Anreicherung	Geringe KBE-Anreicherung	Hohe KBE-Anreicherung	Geringe KBE-Anreicherung
ESL Original	24 Std.	24 Std.	48 Std.	48 Std.
H Original	24 Std.	24 Std.	48 Std.	48 Std.
ESL Schokolade	N.d.	24 Std.	N.d.	48 Std.
ESL fettarm	N.d.	24 Std.	N.d.	48 Std.
H Barista	N.d.	24 Std.	N.d.	48 Std.
H Schokolade	N.d.	24 Std.	N.d.	48 Std.
Nicht inokuliert	-	-	-	-

Schlussfolgerungen

Wie den obigen Tabellen (Tabellen 1 und 2) entnommen werden kann, wurden sowohl *C. muytjensii* als auch *C. sakazakii* mit dem Innovate System nach einer Inkubation von 24 Stunden in allen mit den Organismen angereicherten Produkten nachgewiesen. Bei der herkömmlichen Plattierungsmethode wurden positive Ergebnisse nach 48 Stunden für alle getesteten Proben erzielt.

Die Ergebnisse für das Wachstum an Tag 3 und darüber hinaus wurden aufgrund des übermäßigen Wachstums beider Organismen in allen Produkten nicht vervollständigt. An Tag 2 waren alle Produktbehälter aufgebläht. Aus diesem Grund wurden die Behälter nach Tag 2 entsorgt, um die Gefahr zu verhindern, dass die Produkte innerhalb des Inkubators explodieren. In ähnlicher Weise wurden aufgrund des schnellen Wachstums beider Organismen in allen Hafermilchprodukten nur die niedrigen Anreicherungen für die ESL-Schokoladen-, fettarme ESL-, Barista-H- und H-Schokoladenmilchtypen getestet.



Zusammenfassung

Die aseptische Verarbeitung von Hafermilchprodukten 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*-Kontamination (<100 KBE pro Behälter) festgestellt werden. Dies war 24 Stunden schneller als der Nachweis unter Verwendung von Standard-Plattierungsmethoden und hat bewiesen, dass das schnelle mikrobielle Innovate-Screeningsystem die Referenzmethode bei der Verwendung zum Nachweis von *Cronobacter* übertroffen hat.

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