

Nachweis einer mikrobiellen Kontamination in einem aromatisierten Mahlzeiterersatzgetränk auf Sojabasis mit dem Innovate™ System

Einleitung

Die aseptische Verarbeitung ist eine weitverbreitete Methode bei Lebensmittel- und Getränkeanwendungen. Sie nutzt ultrahohe Temperaturen, um die Sterilität langlebiger, lagerstabiler Produkte zu maximieren. Bei der Herstellung und Produktion kann es jedoch immer noch zu Verunreinigungen kommen.

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. 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 des Wachstums von Mikroorganismen in einem aromatisierten Mahlzeiterersatzgetränk 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)
- Sabouraud-Dextrose-Agar (SDA)-Platten
- Kartoffel-Dextrose-Brühe (PDB)
- 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)
- Ringer-Lösung
- Shoe Goo, klare Schuhreparatur- und Schutzbeschichtung
- PrecisionGlide-Nadeln, 16 Gauge 1½"
- ATP-Positivkontrolle
- Innovate System-Gerät

Testorganismen und Produkte

- Getestete Mikroorganismen
 - *Cronobacter sakazakii*, ATCC Nr. 29544
 - *Bacillus cereus*-Endosporen, ATCC Nr. 11778
 - *Clostridium sporogenes*, vegetativ, ATCC Nr. 7955 (PA 3679)
 - *Pseudomonas aeruginosa*, ATCC Nr. 9027
 - *Pseudomonas putida*, ATCC Nr. 49128
 - *Staphylococcus aureus*, ATCC Nr. 6538
- Getestete Milchprodukttypen
 - Mahlzeiterersatzgetränk auf Sojabasis, aromatisiert

Methoden

1. Kulturvorbereitung

Für *Cronobacter sakazakii*, *Staphylococcus aureus* und *Pseudomonas aeruginosa* wurden Quanti-Cult Plus™-Zellsuspensionen gekauft und zum Testen verwendet. *Clostridium sporogenes* (vegetativ) und *Pseudomonas putida* wurden unter Verwendung von Culti-Loop®-Kulturen (hergestellt von Thermo Fisher Scientific und bereitgestellt von einem Drittlabor) hergestellt. Die Rehydratation und die Inokulation aller Mikroorganismen wurden nach den Anweisungen des Herstellers durchgeführt.

Pseudomonas putida und *Clostridium sporogenes* wurden durch Inokulation einer Aktivkohle-Culti-Loop in 5 ml TSB hergestellt. Die Brühen wurden dann 24 Stunden lang bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde eine zehnfache serielle Verdünnungsreihe unter Verwendung der Ringer-Lösung hergestellt und die Keimzahlen wurden auf TSA-Platten vorbereitet, um eine Konzentration von <100 KBE zu identifizieren. Für *Clostridium sporogenes*-Vegetationsplatten wurde ein GasPak-System zur Inkubation verwendet, um das Wachstum zu gewährleisten. Das eigentliche Inokulum für alle bei der Probenanreicherung verwendeten Mikroorganismen wurde bestimmt, indem jeder Organismus zweifach auf TSA-Platten plattiert wurde. Die Platten wurden bei 35 ± 2 °C inkubiert und nach 24 Stunden gezählt.

Die *Bacillus cereus*-Endosporen-Suspension wurde durch Zugabe eines EZ-Spore™-Pellets zu 10 ml 1X DPBS hergestellt, um eine Konzentration von 10³ KBE/ml zu erhalten. Diese Bakterienpellet-Suspension wurde 30 Minuten lang bei 37 °C inkubiert und dann gut gemischt, um eine homogene Lösung herzustellen. Die *B. cereus*-Suspension wurde dann 30 Minuten lang in einem Wasserbad auf 80 °C erhitzt. Die Probe wurde in sterilem 1X DPBS seriell zehnfach verdünnt und die Keimzahlen auf TSA-Platten vorbereitet, um eine Konzentration von <100 KBE zu identifizieren. Die Platte wurde 24 Stunden lang bei 37 °C inkubiert.

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 von pH-Wert und Hintergrund/Ausgangswert in einen sterilen Behälter überführt.

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 PDB 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 50 µl jeder Produktprobe auf TSA-Platten inokuliert und 24 Stunden lang bei 35 ± 2 °C zur Wachstums- und Morphologiebestätigung inkubiert. GasPak™ EZ-Beutel zur Erzeugung einer anaeroben Gasumgebung wurden verwendet, um Bestätigungsplatten mit verteilten *C. sporogenes* zu inkubieren, damit der Organismus, falls vorhanden, effektiv wachsen konnte. Das auf Bestätigungsplatten beobachtete Wachstum entsprach der Morphologie des zum Anreichern verwendeten Mikroorganismus.

Ergebnisse

Für das ursprüngliche, nicht-inokulierte Produkt zeigten die Tests keine ungewöhnlichen Eigenschaften, welche die Studie beeinträchtigen könnten (siehe Tabelle 1, a, b und c). Der pH-Wert des Produkts war wie für diese Getränke erwartet neutral und es wurde kein Wachstum bei Plattierungsproben beobachtet. Darüber hinaus war der Hintergrund niedrig (395) und über 32 Einzeltests hinweg konsistent (Bereich von 357 bis 481 RLU). Als die Tests für den Ausgangswert durchgeführt wurden, waren die RLU-Ergebnisse noch niedriger und auch hier konsistent, mit durchschnittlich 11 RLU. Infolgedessen wurde der Schwellenwert auf 32 festgelegt.

Beim Testen des angereicherten Produkts wurden *C. sakazakii*, *P. aeruginosa* und *P. putida* jeweils innerhalb von 24 Stunden nach dem Anreichern auf dem Innovate System nachgewiesen (Tabellen 2 und 3). *B. cereus*, *C. sporogenes* und *S. aureus* wurden nach 48 Stunden nachgewiesen. Die RLU-Werte wurden nur für die Tage 1-4 für *C. sakazakii* und *C. sporogenes* erhoben, da die Produktbehälter aufgrund des übermäßigen Wachstums in diesem Produkt und der übermäßigen Gasproduktion undicht wurden. Alle positiven Ergebnisse auf dem Innovate System wurden durch das Verteilen von Produkten auf TSA bestätigt. Eine Zusammenfassung der Ergebnisse ist in Tabelle 3 dargestellt.

Tabelle 1. Produktbewertungen – pH-Wert, Hintergrund, Ausgangswert und Sterilität

a) pH-Wert

| pH-Wert Produktprobe | | | |
|----------------------|------------|------------|--------------|
| Messwert 1 | Messwert 2 | Messwert 3 | Durchschnitt |
| 7,13 | 7,12 | 7,12 | 7,12 |

b) Messwerte für Hintergrund und Ausgangswert

| RLU-Durchschnittswerte (n=32) | | |
|-------------------------------|--------------|---------------|
| Hintergrund | Ausgangswert | Schwellenwert |
| 395 | 11 | 32 |

c) Bestätigung der Sterilität

| Sterilitätsplatten | |
|--------------------|---------------|
| TSA | SDA |
| Kein Wachstum | Kein Wachstum |

Tabelle 2. Nachweis des Wachstums der Mikroorganismen im Laufe der Zeit im aromatisierten Mahlzeiterersatzprodukt auf Sojabasis

*Austritt – Die Gasproduktion durch den Organismus führte zu einer Explosion oder einem Austritt beim

| Produkt hintergrund: 395 RLU | | Produkt-Ausgangswert: 11 RLU | | Schwellenwert: 32 RLU | | | | | | |
|---|---|--|--------------------------------|-----------------------------|--------|--------|--------|----------|----------|----------|
| Organismen-Platten | Ziel-Inokulum Zellen oder *Sporen (KBE) | Ist-Inokulum Zellen oder *Sporen (KBE) | Bestätigung Plattenergebnis | Tage: RLU-Wert (Durchschn.) | | | | | | |
| | | | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 |
| <i>Bacillus cereus</i> -Endosporen | <100 | 28 | Wachstum | 10 | 70 | 33.144 | 1.068 | 2.489 | 2.782 | 1.460 |
| <i>Clostridium sporogenes</i> (vegetativ) | <100 | 20 | Wachstum | 18 | 52.063 | 89.495 | 85.773 | AUSTRITT | AUSTRITT | AUSTRITT |
| <i>Cronobacter sakazakii</i> | <100 | 92 | Wachstum | 39.812 | 56.762 | 60.615 | 14.594 | AUSTRITT | AUSTRITT | AUSTRITT |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | <100 | 138 | Wachstum | 10.141 | 2.338 | 2.590 | 877 | 1.555 | 1.902 | 1.517 |
| <i>Pseudomonas putida</i> | <100 | 59 | Wachstum | 1.010 | 6.842 | 5.232 | 317 | 573 | 37.263 | 14.846 |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | <100 | 35 | Wachstum | 9 | 461 | 7.056 | 892 | 6.821 | 20.111 | 9.441 |
| Blindplatte | Ziel-Inokulum | Ist-Inokulum | Bestätigung Plattenergebnis | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 |
| Negativkontrolle | 0 | 0 | Kein Wachstum | 8 | 12 | 9 | 12 | 8 | 12 | 28 |

Produktbehälter.

Tabelle 3. Zusammenfassung der Nachweisdauer für das Wachstum der Mikroorganismen im Mahlzeiterersatzprodukt

| Produktzeit bis zum Nachweis im Innovate System | | | | | |
|---|----------------------|---------------------|----------------------|------------------|------------------|
| <i>B. cereus</i> | <i>C. sporogenes</i> | <i>C. sakazakii</i> | <i>P. aeruginosa</i> | <i>P. putida</i> | <i>S. aureus</i> |
| 48 Stunden | 48 Stunden | 24 Stunden | 24 Stunden | 24 Stunden | 48 Stunden |

Schlussfolgerungen

Das aromatisierte Mahlzeiterersatzprodukt auf Sojabasis wurde mit einem Zielwert von <100 KBE inokuliert und bei 35 ± 2 °C inkubiert, wobei die Messungen an den Tagen 1-7 durchgeführt wurden. Für die Organismen *B. cereus*, *C. sporogenes*, *C. sakazakii*, *P. aeruginosa*, *P. putida* und *S. aureus* wurden jeweils KBE-Werte von 28, 20, 92, 138, 59 und 35 bestimmt.

Wie den Tabellen (Tabellen 2 und 3) oben entnommen werden kann, wurden *C. sakazakii*, *P. aeruginosa* und *P. putida* jeweils innerhalb von 24 Stunden nach dem Anreichern auf dem Innovate System nachgewiesen. *B. cereus*, *C. sporogenes* und *S. aureus* wurden nach 48 Stunden nachgewiesen. RLU-Werte für *C. sakazakii* und



C. sporogenes konnten nur an den Tagen 1-4 erfasst werden, da die Produktbehälter aufgrund des übermäßigen Wachstums des Produkts und der übermäßigen Gasproduktion undicht wurden. Alle positiven Ergebnisse auf dem Innovate System wurden durch das Verteilen von Produkten auf TSA bestätigt.

Zusammenfassung

Die aseptische Verarbeitung von Produkten 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 waren die Ausgangs-RLU-Werte konstant stabil, was die Festlegung eines positiven/negativen Schwellenwerts ermöglichte. Der Schwellenwert für dieses Produkt wurde auf 32 RLU festgelegt. RLU-Werte oberhalb dieses Schwellenwertes stellten ein positives Ergebnis dar.

Das Signal für das Wachstum aller getesteten Organismen-Kulturen in diesem Produkt zeigte, dass das Signal-Rausch-Verhältnis kein Problem war. Selbst bei einer Inokulation mit niedrigen Mikroorganismen-Mengen (<100 KBE) produzierten die getesteten Proben nach 24 bis 48 Stunden sehr hohe RLU-Werte. Dadurch wurde bestätigt, dass das Innovate System ein nützliches Werkzeug zum Nachweis einer mikrobiellen Kontamination in aromatisierten Mahlzeigersatzprodukten auf Sojabasis wäre.

Auf der Grundlage dieser Ergebnisse empfiehlt Hygiena® die Verwendung des Innovate Systems zum Nachweis einer geringen mikrobiellen Kontamination in Mahlzeigersatzprodukten auf Sojabasis.