

Afslutningsrapport

Bacillus cereus' betydning i danske mejeriprodukter

Mejeribrugets ForskningsFond

Rapport nr. 1998-19

September 1998



mejeriforeningen

danish dairy board

Slutrapport for projektet:

Bacillus cereus' betydning i danske mejeriprodukter

Kirsten Jørgensen

Formålet med undersøgelsen var over et år at belyse forekomsten, kontaminationsgraden og årstidsvariationen af psykrotrofe *Bacillus cereus* i danske mejeriprodukter opbevaret ved 7°C indtil sidste holdbarhedsdag. For at belyse forskellen mellem mejerier indgik der tre forskellige mejerier i undersøgelsen, disse var placeret geografisk forskelligt og var meget forskellige i størrelse. Der blev undersøgt tre forskellige produkter; sødmælk, letmælk og piskefløde for at se, om der var hold i den gamle påstand om, at *B. cereus* følger fløden. For at belyse indflydelsen af mejeriernes generelle hygiejniske standard på indholdet af *B. cereus*, blev antallet af disse sat i relation til kimtallet fratrukket antallet af *B. cereus* (non *B. cereus*, NBC). Det har hidtil været den generelle opfattelse, at *B. cereus* klarer sig dårligt i konkurrence med andre mikroorganismer, og derfor ikke opformerer, hvis der forekommer andre kim. Det er fra hollandsk side påstået, at man ved hjælp af biotypning kan påvise mejerispecifikke stammer, derfor blev de *B. cereus* stammer, der blev isoleret i denne undersøgelse, biotypebestemt med henblik på at påvise, om noget lignende gjorde sig gældende under danske forhold. For yderligere at bekræfte eller afkræfte denne teori, blev de isolerede stammers plasmidprofiler bestemt, ligesom der blev foretaget RIBO-typning. Nogle af de isolerede stammer blev ligeledes undersøgt for evnen til at danne enterotoksin og evnen til at vokse ved 37°C, da begge disse egenskaber er nødvendige for at *B. cereus* fra mejeriprodukter skal udgøre et problem, da det er den herskende opfattelse at enterotoksinet hovedsagelig dannes i tarmkanalen. Evnen til enterotoksindannelse blev undersøgt med Western Blot, i et Verocelle assay og ved anvendelse af PCR.

Resultater

Bacillus cereus blev isoleret fra 257 (56%) af 458 prøver. I 120 (47%) prøver oversteg antallet af *Bacillus cereus* 10^3 /mL. Der blev påvist signifikant forskel i prævalensen af *B. cereus* mellem sommer og vinter, da gennemsnitligt 78% af prøverne indeholdt *B. cereus* i sommerhalvåret, medens dette kun var tilfældet for 32% af prøverne i vinterhalvåret. Antallet af *B. cereus* samt totalkim viste også markante årstidsforskelle. Desuden fandtes der periodevis svingninger i prævalensen af *B. cereus* for de enkelte mejerier, dvs. disse havde af

og til et problem med opformering af *B. cereus* i produktionsapparatet. Der fandtes ingen signifikant forskel i forekomsten af *B. cereus* mellem mejerierne, men for totalkim fandtes der signifikante forskelle mellem disse, dette betyder, at såfremt man kan bruge antallet af andre kim som et udtryk for hygiejnen på det enkelte mejeri, influerer disse ikke på forekomsten af *B. cereus* hvilket var meget overraskende, da man hidtil har antaget, at forekomst af andre mikroorganismer undertrykte opformeringen af *B. cereus*. Der var ikke forskel i prævalensen af *B. cereus* i de tre prøvetyper, men det gennemsnitlige antal af *B. cereus* var signifikant højere i piskefløde. Samtidig var antallet af totalkim signifikant lavere i piskefløde end i sød- og letmælk. Denne signifikant højere forekomst af antallet af *B. cereus* på sidste holdbarhedsdag, kan derfor skyldes en bedre germination og en hurtigere vækst i dette produkt, dette kan igen skyldes den højere pasteuriseringstemperatur, der anvendes til fløde. Et af mejerierne havde en signifikant lavere forekomst af *B. cereus*, på dette mejeri blev fløden opbevaret ved 65°C i ca. en time inden pasteurisering. Det forhold, at der ikke var forskel i prævalensen mellem mejerierne, og at der var samme prævalens i produkterne, undtaget fløden fra det ene mejeri, tyder på at indholdet er uafhængigt af mejeri og produkttype, således at den væsentligste kontaminationskilde af *B. cereus* stammer fra den rå mælk. Dette understøttes også af, at det ene mejeri kunne nedbringe antallet af *B. cereus* i fløde ved en opbevaring ved 65°C inden pasteurisering.

På produktionsdagen var Bacillus floraen domineret af *B. subtilis* og *B. licheniformis*, men disse kunne ikke vokse ved 7°C og er derfor uden betydning for holdbarheden af de tre konsummælksprodukter. For de fleste produkters vedkommende kunne *B. cereus* ikke detekteres på produktionsdagen. For piskefløde var indholdet i alle prøver med en enkelt undtagelse mindre end ti kim pr. mL på dag 1. Dette medførte dog ikke at forekomsten af *B. cereus* var mindre på sidste dagen. Det skal endvidere bemærkes, at der kun var en enkelt prøve, der indeholdt mere end 10³ pr. mL inden dag syv. Det er således på de sidste dage i holdbarheden, at antallet af *B. cereus* øges kraftigt. Det er derfor muligt at sikre, at konsummælksprodukter kun indeholder et begrænset antal *B. cereus* hvis holdbarhedstiden om sommeren blev nedsat til 5 dage, og det samtidig blev sikret at mælken blev opbevaret ved 5°C.

Der er foretaget biotypning af 125 isolater ved hjælp af 8 biotypningskriterier: Stivelseshydrolyse, laktose-, sakkarose- og salicinforgæring, evnen til at udnytte citrat som eneste

kulstofkilde samt nedbrydning af urinstof og L-arginin samt nedbrydning af nitrat under anaerobe forhold under luftproduktion. Denne traditionelle typningsmetode har vist sig meget anvendelig, idet det diskriminatoriske indeks var $D=0.94$, hvis en enkelt testdifference er afgørende for placeringen i to forskellige biotyper. Dette betyder at to epidemiologisk forskellige stammer med 94% sandsynlighed vil have forskellige biotyper. Den dominerende biotype udgør 15% af testpopulationen, og det er derfor forholdsvis let at skelne mellem forskellige stammer. Repetérbarheden på den enkelte biotypebestemmelse var 70%, hvilket var at forvente ($0,95^{(7)} = 0,70$). En typningsmetode bør have en repetérbarhed på mindst 90%, og biotypning ved enkeltbestemmelse er derfor ikke en tilstrækkelig pålidelig metode. Til biotypning af *B. cereus* bør der foretages to enkeltbestemmelsesr af hver test. Testkriterier der ikke stemmer overens, kontrolleres ved yderligere to enkeltbestemmelser. Repetérbarheden på denne fremgangsmåde blev undersøgt på 14 stammer. Repetérbarheden var 100%. Ved undersøgelse af et større antal stammer er det beregnet, at repetérbarheden vil falde til 0.98, hvilket er yderst tilfredsstillende. Hvis der anvendes to testdifferencer til at skelne mellem forskellig biotyper falder det diskriminatoriske index til 0.89, og forekomsten af den dominerende biotype øges til 20% af testpopulationen. Fra mælk blev der isoleret signifikant flere stammer, der var stivelsesnedbrydende og salicinforgærende. Desuden kan signifikant færre mælkestammer anvende citrat som eneste kulstofkilde, forgære salicin og vokse i 7% salt. Fundene tyder på at mælk understøtter væksten af andre biotyper end letmælk og piskefløde.

Opgørelse af fund af biotyper på de enkelte mejerier viste, at biotype 4 var isoleret fra alle tre mejerier. Biotype 5, biotype 12 og biotype 33 var kun isoleret fra hvert sit mejeri. Umiddelbart understøtter dette den hollandske hypotese om, at der findes mejerispecifikke stammer, men denne teori kunne modbevises ved plasmidscreening af stammerne, hvor stammer med samme biotype havde forskellige plasmidprofil.

Ved plasmidscreening af 156 stammer isoleret fra dette projekt og stammer fra andre kilder blev det påvist at 82% af stammerne indeholdt plasmider og kunne types ved denne metode. Reproducerbarheden var 90%. I undersøgelsen er der kun medtaget plasmider på under 40Kb, da større plasmider let tabes under oprensningen. Plasmidscreening kan anvendes til at underinddele stammer med samme biotype, men bør formentlig ikke anvendes alene.

I forbindelse med isolation af stammer af *B. cereus* fra konsummælksprodukter blev der observeret stammer, der hæmmede hinanden. Det blev fastslået, at der sandsynligvis er tale om et stof af peptikkarakter, da hæmningszonen var følsom overfor trypsin. Det formodede bacteriocin var temmelig bredskpektret da det foruden *Bacillus* også hæmmede andre Grampositive bakterier, heriblandt *Staphylococcus aureus*.

Der er udført toksinbestemmelse ved Western Blot, i et Verocelle assay og ved anvendelse af et primersæt, der skulle kunne detektere enterotoksinet ved PCR. Der er fundet 116 stammer der var enterotoksinproducerende i Verocelle assayet, dette svarer til at 74% af de undersøgte stammer danner enterotoksin. Der blev undersøgt 40 stammer isoleret fra mælk, og af disse var 16 (40%) enterotoksin dannende. Undersøgelsen viser, at et stort antal stammer der var enterotoksinproducerende ved anvendelse af Western Blot og Verocelle assay var negative, når der blev anvendt PCR. En mulig forklaring på dette kan være, at der findes variationer i enterotoksinsekvensen fra stamme til stamme. Ved sammenligning mellem celler der var cytotoxiske i Verocelle assayet, blev det vist at de 75% var positive ved anvendelse af Western Immunoblot. Der var stammer, der var isoleret fra store udbrud der både var negative ved anvendelse af Western Immunoblot og PCR. Den bedste måde at detektere enterotoksinet på er derfor for nuværende anvendelse af Verocelle assay. Meget tyder endvidere på, at der findes mindst en anden enterotoksisk faktor end den hidtidige beskrevne. Dette kan forklare de negative reaktioner i PCR-testen med kendte positive stammer.

Det blev forsøgt at påvise det emetiske toksin i et Hep-2 celle assay, der i litteraturen er angivet, at kunne detektere det emetiske toksin, dette mislykkedes.

Det formodes at diarresyndromet opstår ved, at en patogen stamme indtages og efterfølgende producerer enterotoksin i tarmkanalen. Dette betyder, at en stamme for at være patogen både må kunne vokse i tarmkanalen ved 37°C samt danne enterotoksin. Ved en screeningsundersøgelse blev det påvist at 38 ud af 40 mælkeisolater kunne vokse ved 37°C under anaerobe forhold. Væksten af disse mælkeisolater var generelt mere moderat end væksten af mesofile stammer. I projektet er der isoleret *B. thuringiensis* stammer der dannede biopesticider, men som også dannede enterotoksin.

Konklusion

Forekomst af *B. cereus* i letmælk, sødmælk og piskefløde er hovedsagelig et problem i den varme årstid i de sidste dage af holdbarheden. Den væsentligste kontaminationskilde er fra den rå mælk, men de enkelte mejerier har indimellem et problem med opformering af *B. cereus* i produktionsapparatet. Forekomst af mejerispecifikke stammer er ikke noget problem, hvilket understøtter, at den væsentligste kontaminationskilde er den rå mælk. En del af de isolerede stammer er kan både danne enterotoksin og vokse anaerobt ved 37°C, hvilket gør, at produkter hvori disse findes er potentielt patogener, specielt i de sidste dage af holdbarheden hvor antallet øges meget. Der synes at være flere varianter af enterotoksinet. Biotypning er en nem og billig måde til at typebestemme psykrotrofe *B. cereus* fra pasteuriserede mælkeprodukter.

Sammendrag

I en periode på et år blev der udtaget 458 prøver fra sødmælk, skummet mælk og fløde fra tre danske mejerier. Prøverne blev opbevaret ved 7°C i 8 dage inden de blev undersøgt for *Bacillus cereus* og andre aerobe mikroorganismer. Der blev desuden udtaget 115 prøver af rå mælk fra indvejningstankene på de tre mejerier og disse blev undersøgt for forekomsten af psykrotrofe *B. cereus*. *B. cereus* blev isoleret fra 257 (56%) af de 458 prøver af pasteuriserede mælkeprodukter. Der kunne ikke påvises forskel på den procentvise forekomst af *B. cereus* positive prøver fra sødmælk, letmælk og fløde. Derimod var middelantallet af *B. cereus* i fløde signifikant højere i fløde end de andre produkter. Der blev ikke påvist signifikante forskelle mellem mejerierne. Prævalensen af *B. cereus* i sommerperioden og vinterperioden var henholdsvis 72 og 28%. Ligeledes var antallet af *B. cereus* signifikant højere om sommeren end om vinteren. I 120 af de 257 prøver fra pasteuriseret mælk der var positive, var antallet af *B. cereus* fra 10^3 til 10^5 pr ml. Der kunne isoleres psykrotrofe *B. cereus* fra 29 af de 115 prøver af rå mælk, svarende til 25%.

De isolerede *B. cereus* stammer blev karakteriseret ved biotypning ved brug af 8 forskellige kriterier. Biotype 4 blev isoleret fra alle tre mejerier. Biotype 5, biotype 12 og biotype 33 blev hver isoleret fra hver sit mejeri. Dette kunne umiddelbart tyde på at der findes mejerispecifikke stammer, med ved plasmidscreening kunne det påvises at stammerne havde forskellige profiler. Der blev derfor ikke påvist mejerispecifikke stammer i denne

undersøgelse.

Evnen til at danne enterotoksin blev undersøgt ved Western blot, i et Verocelle assay og ved PCR. I Verocelle assayet kunne 116 (74%) af de undersøgte stammer danne enterotoksin. Af de 40 stammer der var isoleret fra mejeriprodukter kunne de 16 danne enterotoksin. Af de 40 isolater fra mejeriprodukter kunne de 38 af stammerne vokse anaerobt ved 37°C, en evne der er nødvendig for at kunne forårsage levnedsmiddelforgiftning.

Summary

During a one year period 458 samples of pasteurized full fat milk, low fat milk (1.5% milk fat) and double cream were collected from three Danish dairies. The milk samples were stored at 7°C for 8 days before they were examined for the presence of *Bacillus cereus* and other aerobic microorganisms. In addition, 115 raw milk samples taken from the weighing tanks at the three dairies were examined for the psychrotrophic *Bacillus cereus*. *B. cereus* were isolated from 257 (56%) of the 458 pasteurized milk samples, and no differences between full fat milk, low fat milk and double cream were observed as regards the percentage of *B. cereus* positive samples. However, the mean count of *B. cereus* was significantly higher in double cream than the other products. No significant differences were observed between the dairies. The prevalence of *B. cereus* in pasteurized milk products during the summer and winter periods was 72 and 28%, respectively, and the mean counts of *B. cereus* were significantly higher during summer as well. In 120 of the 257 samples of pasteurized milk found to be positive, the viable count of *B. cereus* obtained was in the range between 10^3 and 3×10^5 cfu/ml. Psychrotrophic *B. cereus* was detected in 29 of 115 samples of raw milk (25%).

The isolated *B. cereus* strains were characterized by biotyping using 8 different criteria. Biotype 4 was isolated from all three dairies. Biotype 5, biotype 12 and biotype 33 was isolated from one dairy each. This could have been an indication of dairy specific strains, but the plasmid profiles of the strains were different, so in this investigation there were no dairy specific strains.

The ability to produce the enterotoxin was examined by using Western blot, a Verocell assay and by PCR. In the Verocell assay 116 (74%) of the strains examined produced enterotoxin.

Sixteen of 40 *B. cereus* isolates from milk produced enterotoxin. Examination of the ability of this 40 isolates to grow anaerobic at 37°C showed that 38 isolates were able to do this and they therefore have the potential to cause food poisoning.

Aknowledgement

Mejeribrugets forskningsFond og FØTEK 1 takkes for at have støttet projektet.

Litteraturliste:

Jørgensen, K.: Use of plasmid analysis to characterize *Bacillus cereus*. In: Seminar on *B. cereus* in milk and milk products. Ede. The Netherlands: 13-14/10-93:13.

Jørgensen, K. Use of plasmid analysis to characterize *B. cereus* isolated from dairy products. In: Contamination of milk and dairy products with pathogenic and sporeforming bacteria. 23--24/4, Fermoy, Ireland 1992.

Larsen, H.D.: *Bacillus cereus* i danske mejeriprodukter. Levnedsmiddelforskning 94.

Larsen, H.D., Trolle, G. & Jørgensen, K.: The occurrence of *Bacillus cereus* in Danish pasteurized milk. 7th IUMS Congress of Bacteriology and Applied Microbiology.

Damgaard, P.H., Larsen, H.D., Hansen, B.M., Bresciani, J. and K. Jørgensen. Enterotoxin producing strains of *Bacillus thuringiensis* isolated from food. Letters in Applied Microbiology. 1996, **23**, 146-150.

Larsen, H.D. & Jørgensen, K.: The occurrence of *Bacillus cereus* in Danish pasteurized milk. Int. J. Food Microbiology. 1997, **34**, 179-186.

Jørgensen, K.: Forekomst af *Bacillus cereus* i konsummælksprodukter opbevaret ved 7°C til sidste holdbarhedsdag. Mælkeritidende. 1997, 70-71.

