

Kulturunabhängige Identifikation von Sporenbildnern in Milch mittels MALDI-TOF-MS

C. Wind

Einleitung

Innerhalb weniger Jahre hat die MALDI-TOF-MS die mikrobiologische Untersuchung revolutioniert (MALDI-TOF = Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation - Time Of Flight, MS = Massenspektrometrie). Wo früher mit klassischen Verfahren ein bis mehrere Tage benötigt wurden, können mit dieser innovativen Technik Bakterienisolate in weniger als 15 Minuten identifiziert werden. Neben dem Einsatz der koloniebasierten Standardidentifizierung wurde von einer kulturunabhängigen Identifizierung von Bakterien (*Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*) in Milch berichtet [1].

Hitzeresistente Sporenbildner (HRS – Heat resistant sporeformers) in ultrahoherhitzter Milch

Bei der Herstellung von ultrahoherhitzter Milch (UHT-Milch/H-Milch) können bei unzureichender Erhitzung so genannte hitzeresistente Sporenbildner überleben und sich anschließend in der Milch vermehren. Die kulturelle Isolierung dieser Keime, die der Art *Bacillus sporothermodurans* zuzuordnen sind, ist z.T. nur auf bestimmten Nährmedien möglich und bis zum Erhalt sichtbarer Kolonien können mehrere Tage vergehen. Anschließend sind weitere Bestätigungstests erforderlich. Am CVUA Freiburg wurde in ersten Versuchen getestet, ob ein Nachweis von sporenbildenden Mikroorganismen mittels MALDI-TOF-MS direkt aus UHT-Milch ohne vorherige Isolierung möglich ist.

Rechtlicher Hintergrund

Die Verordnung (EG) Nr. 853/2004 beinhaltet spezifische Hygienevorschriften für Lebensmittel tierischen Ursprungs. Die Vorgaben für die Ultrahoherhitzung von Milch sehen dabei eine Behandlung vor

- in Form kontinuierlicher Wärmezufuhr bei hoher Temperatur für kurze Zeit (nicht weniger als 135 °C bei geeigneter Heißhaltezeit), so dass bei Aufbewahrung in einer sterilen, verschlossenen Packung bei Umgebungstemperatur **keine lebensfähigen Mikroorganismen oder Sporen, die sich im behandelten Erzeugnis vermehren können, vorhanden sind, und**
- die ausreicht, um sicherzustellen, dass die Erzeugnisse nach einer Inkubation in verschlossenen Packungen bei 30 °C für 15 Tage oder bei 55 °C für 7 Tage oder nach Anwendung einer anderen Methode, bei der erwiesen ist, dass die geeignete Wärmebehandlung durchgeführt wurde, **mikrobiologisch stabil** sind.

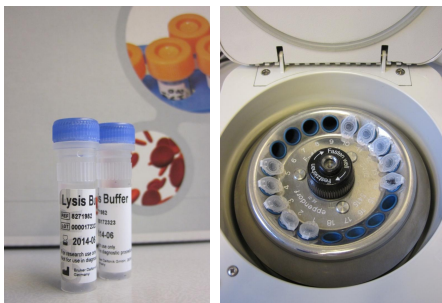
Trotz der rechtlichen Anforderungen an UHT-Milch gibt es Einzelfälle, in denen hohe Keimzahlen an *Bacillus sporothermodurans* nachgewiesen werden. Es handelt sich dabei um eine unerwünschte Kontamination, gesundheitliche Gefahren bestehen jedoch nicht. [2, 3]

Material und Methoden

Ultrahoherhitzte Milch wurde künstlich mit Reinkulturen von sporenbildenden Mikroorganismen (*Bacillus sporothermodurans*, *Bacillus cereus*) beimpft. Die Milchproben, welche Keimgehalte bis zu 10^7 koloniebildende Einheiten (KbE) pro ml Milch enthielten, wurden einer Probenaufarbeitung mit einem kommerziellen Aufreinigungs-Kit (Sepsityper™ Kit, Fa. Bruker) unterzogen. Durch mehrere Lyse- und Waschschriffe wurden die massenspektrometrische Messung störende Milchbestandteile, wie beispielsweise Milchfett und -proteine, entfernt. Die am Ende dieser Aufarbeitung als Pellets vorliegenden Bakterienzellen wurden in einem Extraktionsverfahren mit Ethanol, Ameisensäure und Acetonitril behandelt, um die für die Identifizierung mittels MALDI-TOF-MS erforderlichen bakteriellen Proteine freizusetzen (Abbildung 1).

Zur Erweiterung der Datenbank wurden eigene Datenbankeinträge mit Stämmen der Bakterienart *Bacillus sporothermodurans* erzeugt (Abbildung 2). Anschließend folgte die Messung und Identifizierung der Proben mittels MALDI-TOF-MS (MALDI microflex LT/SH System, Fa. Bruker).

Lyse + Zentrifugation (2 x)



Waschung + Zentrifugation



Extraktion



Abbildung 1: Darstellung verschiedener Schritte bei der Probenaufarbeitung zur Identifikation von Sporenbildnern in Milch

Ergebnisse und Schlussfolgerungen

Es konnte gezeigt werden, dass der Nachweis von Sporenbildnern der Arten *Bacillus sporothermodurans* bzw. *Bacillus cereus* bei Anwendung geeigneter Aufbereitungsverfahren direkt aus inokulierter Milch ohne vorherige kulturelle Isolierung der Bakterien möglich ist. Bei der Messung im MALDI-TOF-Massenspektrometer wurden Reinkulturen von sporenbildenden Mikroorganismen in allen Proben ab einem Keimgehalt von 10^5 KbE/ml nachgewiesen und korrekt identifiziert. Zur Aufarbeitung von UHT-Milch (Fettgehalte 1,5 und 3,5 %) erwies sich der Sepsityper™ Kit als geeignet.

Bei der kulturellen Isolierung von *Bacillus sporothermodurans* sind bis zum Auftreten sichtbarer Bakterienkolonien Bebrütungszeiten von bis zu 5 Tagen erforderlich, gefolgt von einer Bestätigung der Kolonien z.B. mit molekularbiologischen Methoden (PCR). Die hier dargestellte Probenaufarbeitung mit anschließender massenspektrometrischer Identifizierung ermöglicht ein Ergebnis bereits nach ca. 2 Stunden. Die Dauer der Untersuchung ist deutlich verkürzt und der Arbeitsaufwand reduziert.

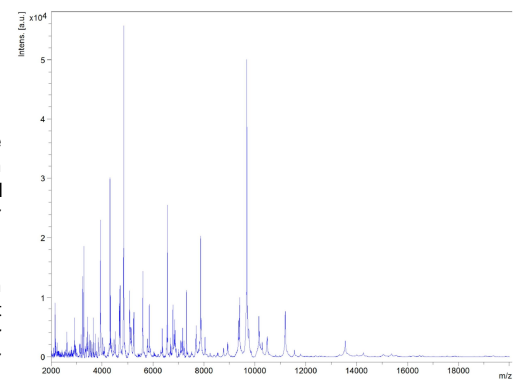


Abbildung 2: Massenspektrum von *Bacillus sporothermodurans*

Literatur:

1. Barreiro JR, Braga PA, Ferreira CR, Kostrzewa M, Maier T, Wegemann B, Boettcher V, Eberlin MN, dos Santos MV (2012): Nonculture-based identification of bacteria in milk by protein fingerprinting. *Proteomics*, 2012 Aug. 12(17): 2739-45
2. Scheldemann P., Herman L., Foster S., Heyndrickx M. (2006): *Bacillus sporothermodurans* and other highly heat-resistant spore formers in milk. *Journal of Applied Microbiology* 101, 542-555
3. Hammer P., Suhren G., Heeschen W. (1996): Vorkommen hitzeresistenter mesophiler Sporenbildner in UHT-Milch. *dmz* 16/96, 738-744
4. Verordnung (EG) Nr. 853/2004 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 29. April 2004 mit spezifischen Hygienevorschriften für Lebensmittel tierischen Ursprungs (ABl. L 139/55), in der gültigen Fassung

Anschrift der Verfasser:

Chemisches und Veterinäruntersuchungsamt Freiburg, Am Moosweiher 2, 79108 Freiburg, e-mail: poststelle@cvuafr.bwl.de

55. Arbeitstagung des Arbeitsgebietes Lebensmittelhygiene der DVG vom 23. bis 26. 09. 2014 in Garmisch-Partenkirchen



Baden-Württemberg