

Utprøving og vurdering av metoder for påvisning av patogene bakterier i melk og ost fra gårdsysterier i Midt-Norge

Forfattere: Mehli L, Jakobsen AN, Frøyen OJ, Strand Å, Karlsen H
Institutt for matteknologi, fakultet for teknologi, NTNU – Norges Teknisk Naturvitenskapelige Universitet, 7491 Trondheim



Øvre Gangstad gård – et godt eksempel på en vellykket småskala matprodusent (foto: Steinar Johansen)

SAMMENDRAG

Prosjektet omfattet utprøving og sammenligning av standard- og hurtigmetoder for påvisning av koliforme bakterier, Enterobacteriaceae, *E. coli* og koagulasepositive stafylokokker.

Prøvematerialet var ystemelk, myse og ost fra fem gårdsysterier i Midt-Norge, både upasteurisert og pasteurisert produksjon. 69 melke- og osteprøver ble analysert med til sammen 14 metoder fordelt på de 4 forskjellige parametrene. I tillegg ble totalt antall aerobe mikroorganismer analysert.

Metodene for kvantifisering av koliforme bakterier og Enterobacteriaceae viste godt samsvar for prøver av ystemelk og myse. Betydelig større variasjon mellom metodene ble påvist ved analyse av ost som er et mindre homogent produkt. *E. coli* ble kun påvist i 4 prøver, alle var prøver av rå melk for pasteurisert produksjon. De 4 prøvene var positive for *E.coli* på minimum 3 av 4 metoder.

Koagulasepositive stafylokokker ble påvist ved 3 metoder. På grunn av arbeidskrevende verifisering av positive prøver virker standardmetodikken (NMKL metode 66) å bli for komplisert og tidkrevende å utføre for et gårdsysteri. Utprøvde hurtigmetoder for påvisning av koagulasepositive stafylokokker samsvarte relativt godt med standardmetoden for prøver av ystemelk og myse, mens også for denne analysen ble det påvist større variasjon mellom metodene ved analyse av osteprøver. Begge hurtigmetodene som ble utprøvd var enkle å bruke, men resultatene på RIDA®COUNT viste seg å være vanskelig å lese av.

Bruk av petrifilm på gårdsysteriet er en enkel og rask metode sammenlignet med standardmetoder. Et gårdsysteri vil dermed raskt få svar på sine mikrobiologiske analyser.

Resultatene viser at rå melk, ystemelk, myse og ost fra småskala ysterier i Midt-Norge, generelt er av god hygienisk kvalitet.

Innhold

1	Innledning.....	1
1.1	Materialer og metoder	1
1.2	Litt om mikroorganismene det ble analysert for	1
1.3	Beskrivelse av analysemetodene	3
1.4	Beskrivelse av utprøvingen	8
1.4.1	Transport og mottak av prøver	8
2	Resultater.....	9
2.1	Gruppe A: Koliforme bakterier og Enterobacteriaceae.....	9
2.2	Gruppe B: Termostabile koliforme bakterier (<i>E. coli</i>)	10
2.3	Gruppe C: Koagulasepositive stafylokokker (<i>Staphylococcus aureus</i>).....	11
2.4	Generell hygienisk kvalitet av melk og ost	12
3	Vurdering og konklusjon.....	12
3.1	Vurdering av metoder.....	13
3.2	Vurdering av hygienisk kvalitet	14
4	Forslag til videre arbeid.....	15
5	Referanseliste	16

1 Innledning

Denne rapporten er en redigert versjon av rapporten *Patogene bakterier. Utprøving og vurdering av metoder for påvisning av patogene bakterier i melk og ost fra gårdsystemer i Midt-Norge* som har vært holdt upublisert mens det videre arbeid med isolater ble fullført. Dette har vært en tidkrevende prosess som høsten 2016 resulterte i artikkelen *The prevalence, genetic diversity and antibiotic resistance of Staphylococcus aureus in milk whey and cheese from artisan farm dairies*, som trykkes i *International Dairy Journal* 2017 (Mehli et al. 2016).

Dette er en sluttrapport for det praktiske arbeidet i prosjektet.

Prosjektet skulle gjennom utprøving og sammenligning av hurtigmetoder og standardmetoder for påvisning av koliforme bakterier, Enterobacteriaceae, *E. coli*, koagulasepositive stafylokokker gi erfaringsgrunnlag til anbefalinger av hvilke hurtigmetoder som kan egne seg på melk/ost og til gårdsystemers egenanalyser. Det ble lagt vekt på å få med så mange aktuelle hurtigmetoder som mulig og med fire ulike analyser (organismer/patogener), sier det seg selv at prosjektet er bredt lagt opp og ikke går i dybden.

Prosjektet har gitt grunnlag for flere bacheloroppgaver og også utvekslingsstudenter har hatt nytte av å bidra i prosjektet. Den økonomiske rammen var kr. 500.000 fordelt som følger: kr. 400.000 fra Økonomisk og administrativt forskningsfond i Midt-Norge, kr. 50.000 i arbeidstimer fra Høgskolen i Sør-Trøndelag (nå fusjonert med NTNU) og kr. 50 000 fra Kompetansenavet på Mære.

1.1 Materialer og metoder

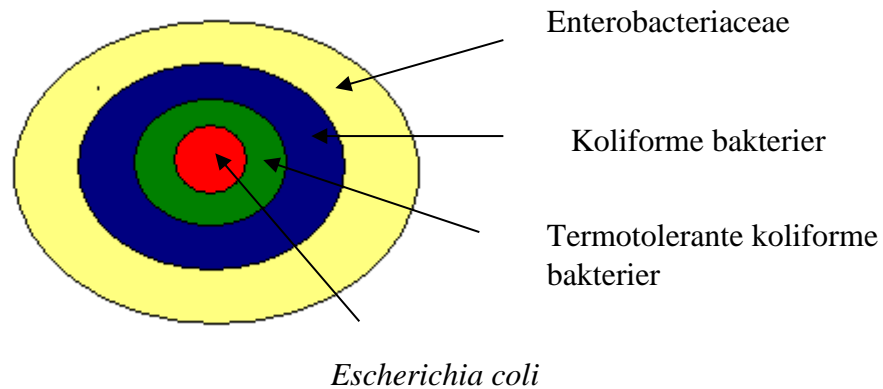
Det ble tatt utgangspunkt i referansemethodene (NMKL) for de aktuelle analysene og disse ble sammenlignet med de utvalgte hurtigmetoder som finnes tilgjengelig. Flere regionale gårdsystemer bidro med analysemateriale. Dette ga oss mulighet til å prøve ut metodene på et flytende (ystemelk) og et fast næringsmiddel (ost). Ostetyperne omfattet både camembert og gouda-lignende ost, der særlig førstnevnte er et typisk eksempel på «risikommatproduksjon». Melke- og osteprøvene ble analysert med til sammen 14 metoder fordelt på 4 forskjellige analyser.

1.2 Litt om mikroorganismene det ble analysert for

Koliforme bakterier er en normal del av en sunn tarmflora hos mennesker og varmblodige dyr og forekommer i store mengder. Påvisning av koliforme bakterier i mat, drikkevann eller på overflater, indikerer svikt i hygieniske forhold. Også mange matforgiftningsbakterier trives i tarm hos mennesker og dyr og påvisning av koliforme indikerer derfor i tillegg muligheten for at matforgiftningsbakterier kan være til stede. Det har liten hensikt å analysere direkte for spesifikke matforgiftningsbakterier før man vet hvilke bakterier man vil analysere for.

Familien **Enterobacteriaceae** (figur 1) omfatter både fekale og ikke-fekale bakterier (som forekommer i jord, vann, planter og grønnsaker) og gir primært informasjon om generell hygienisk kvalitet. Det er en stor heterogen gruppe bakterier som inkluderer patogener som f. eks *Salmonella*, *Shigella*, *Yersinia*, *Escherichia* og *Klebsiella*. Det to sistnevnte forgjærer laktose med produksjon av syre og gass og vil detekteres av testen for koliforme bakterier. De

tre første slektene forgjærer glukose og blir ikke detektert av testen for koliforme bakterier, men av testen Enterobacteriaceae. *Escherichia* og *Klebsiella* er fekale indikatorbakterier og hvis forekomsten av disse er stor indikerer det dårlige hygieniske forhold i produksjon. Men koliforme bakterier kan finnes både i miljøet og i tarmen, og er egentlig ingen fekal indikator (Østensvik 2010). Koliforme bakterier inneholder enzymet β -galaktosidase (GAL) som degraderer laktose til galaktose og glukose.



Figur 1 Gruppering av indikatorbakterier innen Enterobacteriaceae (Østensvik 2010)

Escherichia coli er ett av medlemmene i den store familien av koliforme bakterier. De fleste stammene av *E. coli* er nyttige tarmbakterier, men noen stammer forårsaker matforgiftninger. Påvisning av termotolerante koliforme bakterier gir sterk indikasjon på forurensning med fekalier (avføring) og forsterker muligheten for at matforgiftningsbakterier kan være til stede.

Ved analyse for hele Enterobacteriaceae-familien favner man bredere enn ved analyse for koliforme og *E. coli*. Når disse påvises i samme prøve er de spesifikke indikatorer på fekal (avførings) forurensning.

S. aureus – eller **koagulasepositive stafylokokker** – som er den mest presise betegnelsen på patogene arter av *S. aureus*, har mennesker og varmblodige dyr som hovedreservoar. *S. aureus* er vanlig forekommende i melk fra ku og geit sannsynligvis fordi den ofte er årsak til jurbetennelse. Etersom mennesker er et viktig reservoar for bakterien, vil smitte til matvarer ofte skje ved manuell håndtering av mat. Kontaminasjon kan også skje via uhygienisk produksjonsmiljø eller fra kontaminerte råvarer.

S. aureus klarer seg dårlig i konkurranse med andre bakterier, men har et fortrinn i næringsmidler med høyt saltinnhold og lav vannaktivitet. Bakterien er relativt resistent mot uttørring og kan klare seg godt i produksjonsmiljø.

En del stammer av *S. aureus* kan produsere ett eller flere *S. aureus*-enterotoksin (SE). For at inntak av et næringsmiddel skal kunne forårsake SE-intoksikasjon, må det skje en kontaminering med *S. aureus* og forholdene må ligge til rette for oppformering av bakterien. Jo flere bakterier, desto mer toksin produseres, forutsatt at miljøforholdene ellers (se tabell 1) ligger til rette for det. Bakterien *S. aureus* drepes ved varmebehandling (f.eks. 70 °C i et par minutter), men toksinet som eventuelt er produsert, ødelegges ikke av varmebehandling.

Tabell 1 Forhold som påvirker toksinproduksjon hos *S. aureus*

Ytre forhold	Enterotoksinproduksjon
Temperatur	Over 10 °C (minimum 3-4 timer ved 15-18 °C for forgiftning)
pH	Over pH 4,0
Vannaktivitet Aw	0,86
Saltinnhold	Ved over 10 % under ellers optimale forhold

Modifisert fra Rørvik LM og Granum PE (2007)

Melk som skal benyttes til ysting, må ikke få for lang oppholdstid (3-4 timer) ved temperaturer over 10 °C. Bakterien drepes ved pasteurisering, så har den ikke fått vekstmuligheter før dette, vil varmebehandlingen sikre stafylokokkfri ystemelk. For å unngå stafylokokker i ikke-varmebehandlet melk til ysting er kontroll med jurbetennelse og god melkingshygiene svært viktig. Siden stafylokokker er vanlige også hos mennesker er risikoen for kontaminering til stede over alt hvor melk, myse, utstyr, emballasje og ost er i kontakt med mennesker.

Aerobe mikroorganismer (kimtall) er betegnelse på en analyse som gir et helt generelt bilde av mikrobiell tilstand: er der mye eller lite bakterier til stede? Ystemelk både upasteurisert og pasteurisert er analysert for aerobe mikroorganismer. Denne analysen har ingen hensikt å utføre på myse eller ost fordi tilsatte melkesyrebakterier naturlig nok vil gi svært høye verdier.

1.3 Beskrivelse av analysemetodene

Alle metodene ble anvendt etter produsentens anbefalinger. Ved bruk av NMKL-metodene ble standardmetoder benyttet (nmkl.org). Én av metodene kunne brukes til analyse av både *E.coli* og koliforme bakterier (Simplate).

A. Koliforme bakterier/Enterobacteriaceae

1. NMKL 44
2. 3M™ Petrifilm™ koliforme
3. Simplate (CEc-C1)
4. RIDA®COUNT R1002 Koliforme
5. RIDA®COUNT R1009 *Enterobacteriaceae*
6. 3M™ Petrifilm™ *Enterobacteriaceae*

B. Termotolerante koliforme bakterier (*E.coli*)

1. NMKL125
2. 3M™ Petrifilm™ Select *E.coli*
3. Rapid *E.coli* 2
4. Simplate (CEc-C1)

C. Koagulasepositive stafylokokker (*S.aureus*)

1. a. NMKL66 BP
b. NMKL66 BP-RPF
2. RIDA®COUNT R 1005 (*S.aureus*)
3. 3M™ Petrifilm™ Staph Express Count System (STX)

D. Aerobe mikroorganismer (Totalkim)

1. NMKL 86

Gruppe A: Koliforme bakterier/Enterobacteriaceae

1. **NMKL 44** (Nordisk metodikomite for næringsmidler Nr 44 6. utg. 2004) er en tradisjonell metode for kvantifisering av koliforme bakterier. Prøven støpes inn i et selektivt laktoseholdig medium (rød-fiolettgalleager) og inkuberes ved 30 °C (melk) i 24 t. Typiske kolonier som vokser på rødt-fiolettgalleager og i tillegg produserer gass ved inkubering i brilliantgrønn gallesalt buljong (figur 2) defineres som koliforme bakterier. Metoden kan brukes til alle typer næringsmidler og fôr og er velbrukt til melke- og osteprøver. Kde-metode.

Temperatur: 30 °C

Tid til konfirmering: 2 dager

Validering /godkjenning: NMKL referansemetode



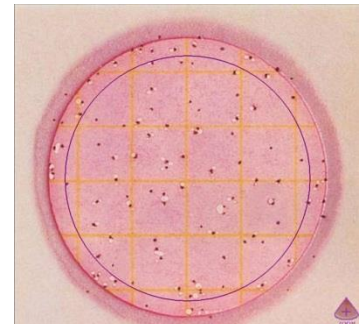
Figur 2: Inkubering i brilliantgrønn gallesalt buljong

2. **3M™ Petrifilm™ koliforme** er et system som inneholder rødt-fiolettgalleager, kaldtvannløselig gel og tetrazolium indikator som letter lesbarheten av resultatet. Systemet kan brukes direkte. Prinsippet for deteksjon av koliforme er syreproduserende kolonier på rødt-fiolettgalleager tilsatt laktose medium, disse vil se ut som røde kolonier med eller uten gassproduksjon (figur 3).

Temperatur: 37 °C

Tid til konfirmering: 24 timer

Validering /godkjenning: AFNOR



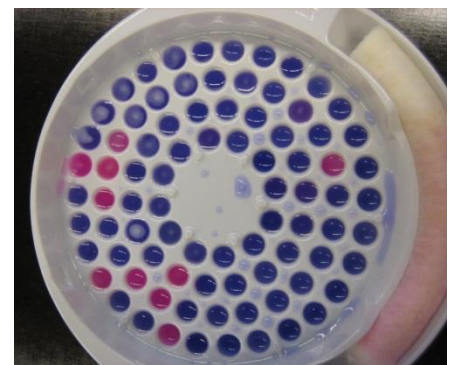
Figur 3: Koliforme på (3M™ Petrifilm (www.interscience.fr))

3. **Simplex** (CEc-Cl) er en enzymatisk metode for detektering og kvantifisering av koliforme/*E. coli* i matprodukter. Koliforme bakterier (+ *E. coli*) produserer β -D-galactosidase (GAL) og *E. coli* kan i tillegg produsere β -D-glucuronidase (GLUC). Substratet i denne metoden består bare av to komponenter, en laktoseanalog som ved nedbryting endrer fargen til mediet (figur 4), og en glucuronsyreanalog der nedbrytingen kan visualiseres under UV-lys (nedbrytes av koliforme) (AOAC, 2005) Simplex har blitt validert til å gi ekvivalente resultater med en enkelt plate.

Temperatur: 37 °C

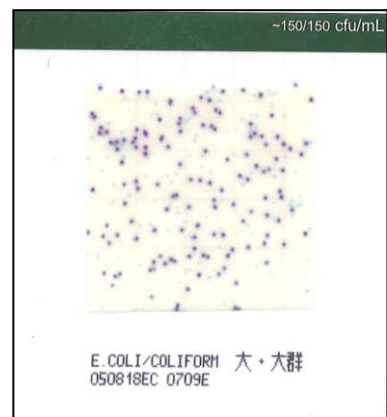
Tid til konfirmering: 24 timer

Validering /godkjenning: 2005.03 MicroVal Certification AOAC, 2005



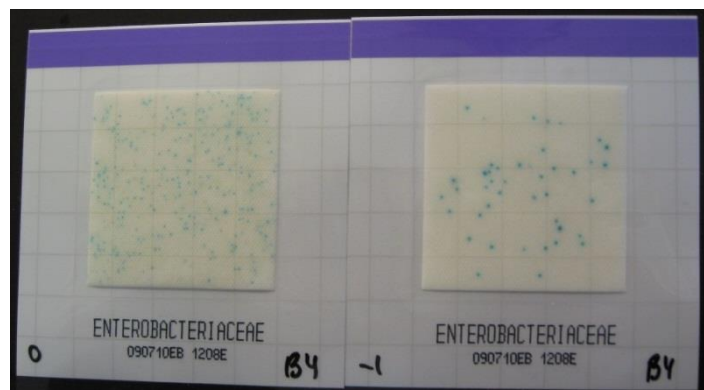
Figur 4: Utslag på koliforme ved bruk av Simplex

4. **RIDA®COUNT R1002 Koliforme** er en modifisert, konvensjonell analyse der gallsalter i rød-fiolettgalleager hemmer vekst av ikke-koliforme bakterier og det spesifikke enzymet β -D-galactosidase omdannes til blå farge og gi blå grønne kolonier (figur 5). Grønne kolonier vil komme opp hvis syreproduksjonen er stor. Prøver med mye melkesyrebakterier kan føre til fargedannelse på hele platen uten at det dannes kolonier grunnet høy enzymaktivitet. Enkelte slekter av Enterobacteriaceae som *Yersinia* eller *Serratia* vil kunne detekteres.
Temperatur: 35 °C
Tid til konfirmering: 24 timer
Validering /godkjenning: AOAC performance tested methodSM 100402



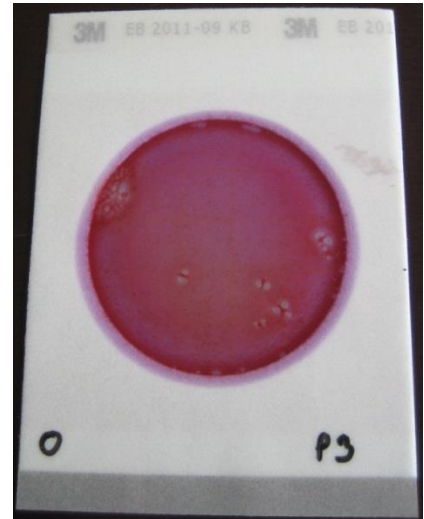
Figur 5: RIDA®COUNT

5. **RIDA®COUNT R1009 Enterobacteriaceae.** Enterobacteriaceae mangler enzymet oxidase og kan bli skilt ut etter det kriteriet (figur 6). Slekter innen Enterobacteriaceae er: *Cedecea*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Hafnia*, *Klebsiella*, *Kluyvera*, *Morganella*, *Proteus*, *Rahnella*, *Salmonella*, *Serratia*, *Shigella* og *Yersinia* (R-Biopharm.com)
Temperatur: 35 °C
Tid til konfirmering: 24 timer
Validering /godkjenning: Nei



Figur 6: Bruk av RIDA®COUNT på frosne melkeprøver

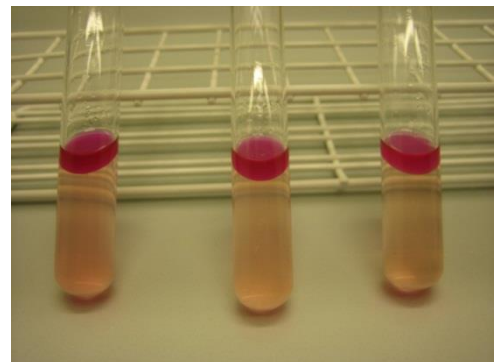
6. **3M™ Petrifilm™ Enterobacteriaceae** Count plate detekterer slekter i familien Enterobacteriaceae (se pkt 5 over). Dette ses som røde med omkransende gule soner på grunn av syreproduksjon (figur 7). Enkelte av dem kan være gassproduserende. Bakterier som produserer gass eller syre anses som positive.
Temperatur: 37 °C
Tid til konfirmering: 24 timer
Validering /godkjenning: AFNOR



Figur 7: Bruk av 3M™ Petrifilm™ Enterobacteriaceae på frosne melkeprøver

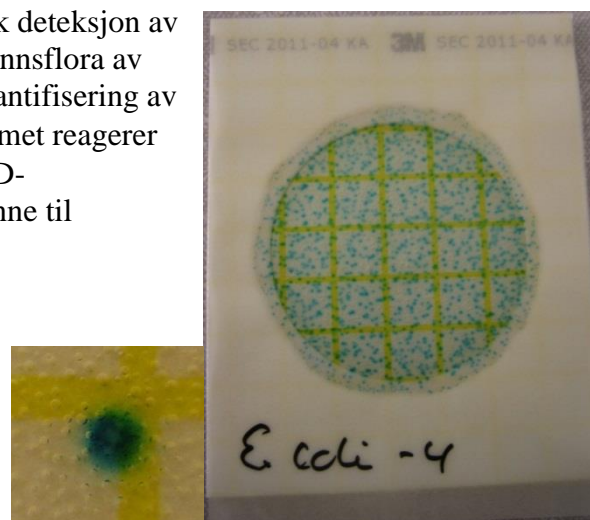
Gruppe B: Termotolerante koliforme bakterier (*E.coli*)

1. **NMKL125** er en metode til bestemmelse av termotolerante koliforme bakterier i næringsmidler og for. Termotolerante koliforme bakterier gir i løpet av 24t ved 44,5 °C typiske kolonier på rød-fiolett galleagar. Positive kolonier produserer gass i laktoseholdig substrat og er indolpositive (figur 8).
Temperatur: 44,5 °C
Tid til konfirmering: 72 timer
Validering /godkjenning: NMKL



Figur 8: Indolpositiv reaksjon

2. **3M™ Petrifilm™ Select *E.coli*** gir spesifikk deteksjon av *E.coli* på 24 t, spesielt der det er høy bakgrunnsflora av koliforme bakterier. Metoden baseres på kvantifisering av β -glucuronidase produserende *E.coli*. Enzymet reagerer med BCIG (5-bromo- 4-kloro- 3-indolyl- β -D-glucuronide). Fargeendringen gir mørkegrønne til blågrønne kolonier (figur 9).
Temperatur: 42 °C
Tid til konfirmering: 24 timer
Validering /godkjenning: AFNOR



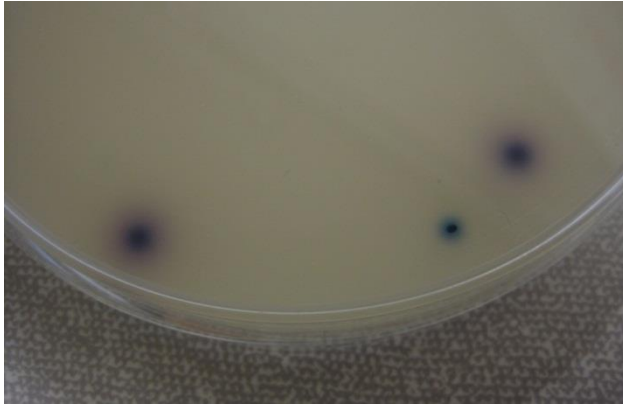
Figur 9: (høyre) Referansekultur av *E.coli* utprøvd på 3M™ Petrifilm™ Select *E.coli*. (venstre): nærbilde av fargeendring.

3. **Rapid *E.coli* 2** er et selektivt medium basert på fargeomslag for direkte kvantifisering uten påfølgende verifisering. Mediet kan detektere både *E.coli* og koliforme samtidig. Mediet er tilsatt to kromogene substrater (GAL og GLUC) og *E.coli* kan produsere begge enzymer og vil derfor danne lilla kolonier (figur 10).

Temperatur: 44,5 °C

Tid til konfirmering: 24 timer

Validering /godkjenning: AFAQ/AFNOR sertifisering



Figur 10: Prøve av rå melk innstøpt i Rapid *E.coli* 2

4. **Simplex (CEc-Cl). Se A3**

Temperatur: 37 °C

Tid til konfirmering: 24 timer

Validering /godkjenning: 2005.03 MicroVal Certification AOAC, 2005

Gruppe C: Koagulasepositive stafylokokker (*S.aureus*)

1. **NMKL 66** (Nordisk metodikkomite for næringsmidler Nr 66 5. utg., 2009)

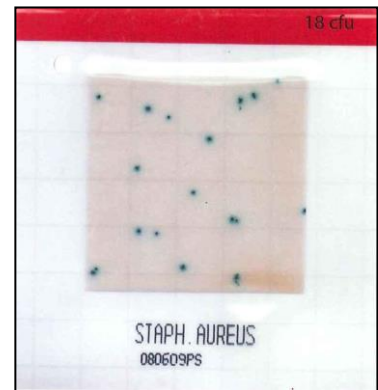
Koagulasepositive stafylokokker (de viktigste er *S.aureus*, *S. intermedius* og *S. hyicus*) defineres i denne metoden som Gram-positive, katalasepositive kokker som vokser med typiske eller mistenkelige kolonier på Baird-Parker agar og som er positive i koagulasetest, eller som vokser med typiske kolonier på Baird-Parker agar tilsatt Rabbit-plasma-fibrinogen. Etter inkubering telles kolonier med karakteristisk utseende. Ved bruk av BP (a) må et utvalg av disse konfirmeres ved å teste for koagulaseproduksjon. Ved bruk av BP-RPF (b) testes det for koagulaseproduksjon direkte på skålen.

Temperatur: 37 °C

Tid til konfirmering: 24 timer

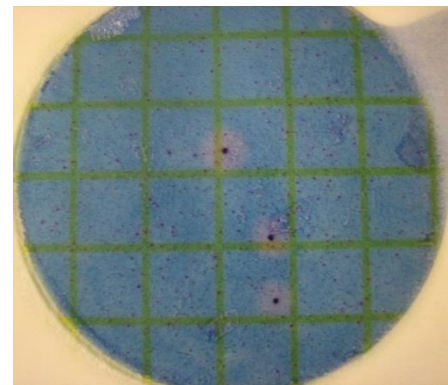
Validering /godkjenning: NordVal (NMKL)

2. **RIDA®COUNT R 1005 (*S. aureus*)**. Metoden kombinerer et standard medie til vekst med tillegg av kromoforer i mediet. Enzymaktivitet i prøven kan forstyrre og forsterke bakgrunnssignal. Etter ny forbedring av systemet vil *S. aureus* opptre som svarte kolonier med blå halo. Bare slike kolonier bør telles (figur 11). Det vil være nødvendig med videre konfirmering av nøyaktig identitet.
Temperatur: 35 °C
Tid til konfirmering: 24 timer, 48 timer
Validering /godkjenning: Nei



Figur 11: Referansekultur av *S. aureus* utprøvd på RIDA®COUNT R 1005 (*S.aureus*)

1. **3M™ Petrifilm™ Staph Express Count System (STX)** er et system som består av Petrifilm Staph Express count plate og en Petrifilm Staph Express disk pakket separat. Systemet kan brukes umiddelbart og inneholder kaldvannsløselig gel. Fargen i gelen er selektiv og spesifikk for *S. aureus*. Rød-fiolette kolonier indikerer *S.aureus*. Hvis andre kolonier var tilstede i samme prøve ble verifiseringsdisk brukt (NordVal) Petrifilm Staph Express disk inneholder touluidin blå-O som fremmer visualisering av DNase (*S. aureus*). Positiv reaksjon kan tilsi tilstedeværelse av *S. aureus*. Metoden ble bare delvis utprøvd og da uten verifisering.
Temperatur: 37 °C
Tid til konfirmering: 24 timer
Validering /godkjenning: NordVal (NMKL)



Figur 12: Verifisering av stafylokokker etter at Petrifilm Staph Express disk er lagt på.

1.4 Beskrivelse av utprøvingen

Fem gårdsysterier beliggende i Trøndelag, Møre og Romsdal, tre som pasteuriserte ystemelken og to som ikke pasteuriserte deltok i prosjektet. Hver produsent leverte melkeprøver fra 3 ulike ystinger og hver gang av ystemelk før, og ystemelk etter pasteurisering, myse og 2 oster. Av de to ostene ble én lagret fram til holdbarhetstidens utløp før analyse. De som produserer av upasteurisert melk leverte naturlig nok bare én ystemelkprøve. Ostene var bløt ost (Camembert) fra 3 produsenter og fast ost fra 2 produsenter.

1.4.1 Transport og mottak av prøver

Transporten ble organisert slik det fungerte best for ysteriet. Vi mottok prøvene enten direkte eller hentet disse hos TINE Midt-Norge, Tunga. Det ble ikke benyttet kjøletransport, men prøvene ble sendt i isoporesker med fryseelement. Umiddelbart etter ankomst ble det målt temperatur i prøvene (figur 13) og de ble oppbevart på kjølerom fram til analysetidspunkt, maksimum et par timer etter ankomst. Temperaturen i de mottatte prøvene av ystemelk og

myse viste et gjennomsnitt på 1,6 °C ved ankomst, varierende fra 0 °C til 4 °C. Noen prøver var litt frosne ved ankomst. Osteprøvene hadde et gjennomsnitt på 3,2 °C, varierende fra 2 °C til 6 °C (to prøver).

Ved mottak ble prøvene kodet. Det var ikke alltid mulig å holde ysteriets identitet skjult ved prøvetakingstidspunktet, men ved avlesning av resultater var identifikasjon umulig. Ostene kunne av naturlige grunner ikke anonymiseres på samme måte ved prøvebehandling, men i likhet med de våte prøvene, var identifisering umulig ved avlesningstidspunktet.



Figur 13: Temperaturmåling ved mottak av melkeprøver

2 Resultater

2.1 Gruppe A: Koliforme bakterier og Enterobacteriaceae

Alle metodene som ble prøvd ut ved kvantifisering av koliforme i melke- og myseprøver viste samsvarende, men lave verdier (tabell 2). Det gjør en sammenligning mer komplisert.

I alle prøvene av rå melk til osteproduksjon der det ble påvist og kvantifisert koliforme bakterier, ble de påvist på alle metoder. I myse fra upasteurisert osteproduksjon ble det bare påvist spor av koliforme bakterier (0-12 kde/ml) i 5 av de 6 prøvene på alle metodene. Ved kvantifisering av koliforme i ost er det større variasjon mellom metodene (tabell 2). I salgsklar ost (pasteurisert og upasteurisert) var 10 av 15 prøver negative for koliforme bakterier på alle metodene. I de siste fem osteprøvene ble koliforme bakterier påvist med en eller flere av metodene, men med store variasjoner mellom metodene. Én prøve påvirket gjennomsnittsverdien mest (tabell 2). Videre statistisk bearbeiding av resultatene vil gi svar på om det er signifikante forskjeller.

Tabell 2: Gjennomsnittlige verdier (kde/ml) av koliforme bakterier fra forskjellige melke- og osteprøver analysert med 4 forskjellige metoder

Analyserte prøver (n)	Standard- og hurtigmetoder til analyse av koliforme bakterier			
	NMKL44 (standard)	3M™ Petrifilm™	Simplate	RIDA® COUNT
Rå melk til pasteuriserte produkter (n=9)	29	15	48	68
Rå melk/ySTEMELK til upasteuriserte produkter (n=6)	2	8	8	12
Pasteurisert ySTEMELK (n=9)	0	0	0	0
Myse fra produksjon av upasteuriserte produkter (n=6)	11	5	22	9
Myse fra produksjon av pasteuriserte produkter (n=9)	0	0	0	1
Salgsklar ost (n=15)	191	30	9	54
Ost ved utgått holdbarhet (n=15)	109	37	6	64

Tabell 3: Gjennomsnittlige verdier (kde/ml) av Enterobacteriaceae og koliforme bakterier fra frosne melke- og myseprøver.

Analyserte prøver	Metoder til analyse av frosne melkeprøver		
	3M™ Petrifilm™ koliforme	3M™ Petrifilm™ Enterobacteriaceae	RIDA®COUNT
Rå melk til pasteuriserte produkter	8	8	3
Rå melk/ySTEMELK til upasteuriserte produkter	5	4	3
Pasteurisert ySTEMELK	0	0	0
Myse fra produksjon av upasteuriserte produkter	4	8	0
Myse fra produksjon av pasteuriserte produkter	5	0	0

Det var i utgangspunktet lav forekomst (0-15 kde/ml) av koliforme bakterier i melk og myseprøver (se tabell 2 kolonne 2). Det var også lav forekomst (0-8 kde/ml) av koliforme i de frosne prøvene (tabell 3).

Enterobacteriaceae ble dyrket fra frosne prøver og man valgte å analysere på 3M™ Petrifilm™ koliforme bakterier samtidig, for å se hvilken innvirkning frysing hadde på melke- og myseprøvene. Det viste seg at frysing hadde liten effekt på disse prøvene (tabell 2 kolonne 2 og tabell 3 kolonne 1) med unntak av verdiene for rå melk.

2.2 Gruppe B: Termostabile koliforme bakterier (*E. coli*)

E. coli ble bare påvist i 4 av 9 prøver av rå melk før pasteurisering og da i størrelsesorden 2-5 kde/ml analysert med NMKL 125. De 4 prøvene var positive for *E. coli* på minimum 3 av 4 metoder. Det ble ikke påvist *E. coli* i rå melk til upasteurisert osteproduksjon (tabell 4). Det ble heller ikke påvist *E. coli* i noen av de andre melke-, myse, og osteprøvene.

Tabell 4: Forekomst av koliforme og indol-positive termotolerante koliforme (*E. coli*) i melke- og osteprøver analysert med henholdsvis NMKL 44 og NMKL 125.

Analyserte prøver	Ysting av upasteurisert melk		Ysting av pasteurisert melk	
	Indol-positive termotolerante koliforme (<i>E. coli</i>)	Koliforme	Indol-positive termotolerante koliforme (<i>E. coli</i>)	Koliforme
Rå melk	0 %	50 %	45 %	67 %
Pasteurisert melk	---	---	0 %	0 %
Myse	0 %	83 %	0 %	0 %
Salgsklar ost	0 %	33 %	0 %	11 %
Ost ved utgått holdbarhet	0 %	33 %	0 %	11 %

2.3 Gruppe C: Koagulasepositive stafylokokker (*Staphylococcus aureus*)

Koagulasepositive stafylokokker ble påvist ved 3 metoder. Ved bruk av NMKL 66 var det nødvendig med verifisering av resultatet ved å ta ut enkeltkolonier for oppdyrking og videre identifisering. Det var ikke nødvendig ved bruk av RIDA®COUNT. Metoden 3M STX ble bare delvis utprøvd og da uten verifisering.

Pasteurisert melk og myse fra samme type produksjon hadde nesten uten unntak samsvarende lave verdier eller ingen koagulasepositive stafylokokker (tabell 5). I rå melk og i myse fra produksjon av upasteuriserte produkter ble det påvist stafylokokker i størrelsesorden 30-670 kde/ml. Osteprøver analysert med standardmetoden viste lav forekomst. Det var godt samsvar mellom resultatet på de to agartypene som ble brukt i metoden NMKL 66 (tabell 5) på alle prøvetypene. Resultatet på RIDA®COUNT 48 t og 3M STX av melkeprøvene samsvarte godt med standardmetoden (tabell 5), mens det var større variasjoner mellom metoden ved analyse av myse- og osteprøver.

Det ble tatt ut minst 5 kolonier til verifisering av hver analyseprøve. I prøver der noen av de uttatte kolonier ikke var positive ble totalantall redusert med en tilsvarende faktor. I prøver der resultatet var uleselig, ble verdien redusert til 0. I rå melk gjaldt det én prøve.

Tabell 5: Gjennomsnittlige verdier (kde/ml) av koagulasepositive stafylokokker/*Staphylococcus aureus* fra melke-, myse-, og osteprøver analysert med en standardmetode (NMKL 66) og 2 forskjellige hurtigmetoder

Analyserte prøver	Metoder til analyse av koagulasepositive stafylokokker (kde/ml)				
	NMKL66		RIDA®COUNT		3MSTX
	BP	BP-RPF	24 t	48 t	
Rå melk til pasteuriserte produkter	341	674	117	419	320
Rå melk/ystemelk til upasteuriserte produkter	197	349	60	109	144
Pasteurisert ystemelk	0	0	12	26	20
Myse fra produksjon av upasteuriserte produkter	110	344	44	77	31
Myse fra produksjon av pasteuriserte produkter	0	6	12	17	4
Salgsklar ost	10	16	58	188	96
Ost ved utgått holdbarhet	0	31	112	122	122

Det ble totalt tatt ut 284 isolater av mulige *S. aureus* fra BP- og BP-RPF agar. Disse ble gramfarget og testet med hensyn på koagulase- og katalaseaktivitet samt vekst på peptonagar tilsatt acriflavin. Av de antatte *S. aureus*-isolatene var 125 isolater positive på alle fire testene. Disse ble senere analysert for toksinproduksjon og for mulig slektskap mellom bakteriekulturene, se Mehli et al. (2016).

2.4 Generell hygienisk kvalitet av melk og ost

Fra de fem gårdsystemene ble det samlet inn totalt 69 prøver. Koliforme *E. coli*, koagulasepositive stafylokokker og aerobe mikroorganismer ble analysert med til sammen 15 forskjellige metoder. Alle analyseresultater lå innenfor grenseverdier gitt i Forordning 2073/2005 *Mikrobiologiske kriterier for næringsmidler* (*E. coli* og Koagulasepositive stafylokker) eller i *Mikrobiologiske retningslinjer* fra Næringsmiddeltilsynet 2002 (koliforme og totalkim). Aerobe mikroorganismer (totalkim) ble analysert i rå melk som en generell indikator på mikrobiologisk kvalitet. Kimtallsverdiene lå mellom $2,8 \times 10^3$ og $2,9 \times 10^4$ kde/ml.

Det ble bare påvist *E. coli* i 45 % av rå melk prøvene til pasteurisert produksjon (tabell 4). Som forventet ble det ikke påvist koliforme bakterier i pasteurisert ystemelk (tabell 4).

Koagulasepositive stafylokokker ble påvist i rå melk til upasteurisert ost og i rå melk til pasteurisert ost i henholdsvis 50 % og 89 % av prøvene (tabell 6). I myse fra upasteurisert produksjon var 33 % av prøvene positive for *S. aureus* (tabell 6). De var fra samme ystinger der det var påvist *S. aureus* i rå melk.

Tabell 6: Forekomst av *S. aureus* ved produksjon av pasteurisert og upasteurisert ost beregnet med NMKL 66 (BP-agar med verifisering).

Analyserte prøver	Ysting av upasteurisert melk	Ysting av pasteurisert melk
Rå melk	50 %	89 %
Pasteurisert melk	---	0 %
Myse	33 %	0 %
Salgsklar ost	0 %	11 %
Ost ved utgått holdbarhet	0 %	0 %

I kun én osteprøve fra pasteurisert produksjon (salgsklar ost) ble det påvist *S. aureus* (tabell 6). I 7 av 30 osteprøver ble resultatet redusert til 0 på grunn av uklar verifisering.

3 Vurdering og konklusjon

I dette prosjektet ble det valgt å prøve ut metodene på naturlige prøver som melk og ost. De fleste studier som er gjort på sammenligning av metoder er gjort på et stort antall referansestammer. Det gir klare svar på hvilke stammer som lar seg detektere på de enkelte metodene. Imidlertid vil naturlige prøver gi en bedre representativ test enn ved bruk av referansemateriale på grunn av at det er større diversitet i den naturlige bakterieflora (Hauge m.fl. 2010).

3.1 Vurdering av metoder

Koliforme/Enterobacteriaceae

Analyse for Enterobacteriaceae eller koliforme bakterier er den mest vanlige metoden for å teste hygienisk kvalitet i en rekke produkter. Det var godt samsvar mellom metodene ved kvantifisering av koliforme bakterier med unntak av osteprøvene. Testene baserer seg på forskjellige deteksjonsprinsipp, vekst med hensyn på forgjæring av laktose og gassproduksjon (NMKL 44, 3M Petrifilm) og deteksjon av GAL (Simplat, RIDA®COUNT). Noen GAL+ bakteriesterammer forgjærer ikke laktose (Østensvik 2010), og kan gi falske positive resultater. Bruk av petrifilm på gårdsystemet er en enkel og rask metode sammenlignet med standardmetoder. Gårdsystemet vil raskt få svar på sine analyser. Det krever imidlertid erfaring i bruk hvis en vil unngå for stor variasjon i avlesning av resultater. Fordelen etter hvert vil være rask bruk av resultatene under produksjon.

Ved bruk av NMKL 44 er det enkelt å se typiske kolonier. Metoden krever imidlertid verifisering og en vil ikke få resultatet før etter minimum 2 dager. Metoden er arbeidskrevende, og krever bruk av generelt laboratorieutstyr og god sterilteknikk. 3M Petrifilm koliforme ga resultatet etter 24 t uten verifisering og det var enkelt å se koloniene. RIDA®COUNT består av flere lag, bl.a. næring og fargestoff som gir blå kolonier. Av og til ble koloniene vanskelige å telle fordi de lå gjemt i lagene. Simplat var en enkel metode både å bruke og å lese av. Fargeforandringen i mediet var godt synlig ved innhold av koliforme i prøven. Prøvens innhold kunne av og til gi svake fargeforandringer uten at det var koliforme bakterier i prøven. Simplat vil ofte gi høyere verdier (pga MPN-metoden) enn kde-baserte metoder, spesielt for lave verdier (Hauge m.fl. 2010).

Termostabile koliforme bakterier /E.coli

E.coli ble påvist på minimum 3 av 4 metoder. De tre hurtigmetodene i utprøvingen bruker et enzymatisk system for påvisning. For å minske bakgrunnseffekt fra andre bakterier for deteksjon av *E.coli*, utnyttet enzymet β -glucuronidase (GLUC). *E.coli* er en av de få i Enterobacteriaceae som har dette enzymet og GLUC er til stede i mer enn 97 % av *E.coli* isolater (Maheux m. fl. 2008). Identifiseringsmetoder som bare baserer seg på aktiviteten av ett enkelt enzym kan mangle robusthet og kan føre til feil svar siden enzymatisk aktivitet kan være forbigående og reguleres av miljøfaktorer (Maheux m.fl. 2008). Bakteriesterammer i denne utprøvingen kommer fra forskjellige lokaliteter i Midt-Norge og vil sannsynligvis ikke være like. Dette er delvis identifiserte isolater og det er mulig at det finnes GLUC negative *E. coli* i miljøet og at deteksjon vil bli avhengig av vekstmediet (Maheux m. fl. 2008). NMKL 125 metoden baseres på at positive kolonier produserer gass i laktoseholdig substrat og er indolpositive. Noen *E.coli* stammer produserer heller ikke indol og vil derfor ikke gi en positiv indoltest i NMKL (Hauge m.fl. 2010).

Koagulasepositive stafylokokker

Koagulasepositive stafylokokker ble i hovedsak testet ut på NMKL 66, RIDA®COUNT og i begrenset omfang 3M STX Staph Express System. Imidlertid ble metoden prøvd ut så mye at fordelene ble lagt merke til.

Ved bruk av NMKL 66 anbefales det at det blir brukt flere medier, i denne utprøvingen ble det brukt BP-agar og BP-RPF agar. Metoden krever verifisering av koloniene med flere tester,

gramfarging, analyse av katalase- og koagulaseaktivitet og mulig vekst på peptonagar tilsatt acriflavin. Dette tar tid. Dersom det ikke ble tatt ut kolonier til verifisering, ble resultatet satt til 0. Dette gjaldt i hovedsak skåler med få kolonier. Dersom noen av koloniene var negative for en eller flere av de ovennevnte testene, ble de regnet som negative og resultatet av kvantifiseringen ble redusert tilsvarende. NMKL 66 er derfor en omfattende metode, mye for- og etterarbeid og krever personell med erfaring med metoden. RIDA®COUNT er en metode som er enkel å bruke, men som igjen viser seg å være vanskelig å lese av på grunn av den lagvise strukturen i systemet. Metoden krever ingen verifisering.

Metodene samsvarte godt på prøvetypene i dette forprosjektet. Ved bruk av RIDA®COUNT og 3M STX Staph Express System ble koloniene ikke verifisert. Det skulle ikke heller være nødvendig (NordVal) selv om 3M Petrifilm anbefaler dette ved bruk av Staph Express System. Dette kan imidlertid ført til forhøyede kdc/ml.

3.2 Vurdering av hygienisk kvalitet

Datagrunnlaget er begrenset siden utprøvingen omfattet 5 ysterier som hver leverte 4-5 prøver (rå melk, pasteurisert melk, myse og 2 oster) fra tre ulike ystinger i en 5-måneders vinterperiode. Resultatene er vurdert etter krav i Forordning 2073/2005 *Mikrobiologiske kriterier for næringsmidler, Mikrobiologiske retningslinjer* (2002) og i forhold til det som er faren med *S. aureus*, nemlig enterotoksinproduksjon. Totalkim indikerer at melken er av generelt meget god kvalitet. Resultatene ligger godt under forskriftens krav på 100 000 bakterier per ml (10^5).

Det er ikke uvanlig å finne koliforme/*E.coli* i rå melk men når videreforedling av melken foregår i omgivelser så nær ett av hovedreservoarene for disse bakteriene, innebærer det en stor utfordring. I en spørreundersøkelse fra Sverige var det mange av produsentene som enten ikke hadde, eller ikke hadde tenkt på en fysisk barriere mellom fjøs og meieri (Rosengren m. fl. 2010). Når koliforme bakterier påvises i myse kan det tyde på reinfeksjon av ystemelken eller at eventuell pasteurisering har sviktet. Verdiene for koliforme bakterier lå godt under grensene som bare gjelder ost av varmebehandlet melk og som er henholdsvis 1×10^5 for myke oster og 5×10^3 for modnet ost. Koliforme bakterier dør ut i ost som lagres lenger enn ca. 6 måneder.

Når koliforme bakterier påvises, indikerer det uhygieniske forhold og/eller svikt i hygienetiltak. Påvises termotolerante koliforme og *E.coli* indikerer det muligheter for at matforgiftningsbakterier også kan være til stede og at forurensningen i dette tilfellet har fekal opprinnelse (Østensvik 2010). I dette prosjektet ble termotolerante koliforme bare påvist i noen få prøver av rå melk som senere skulle varmebehandles.

Det ble påvist koagulasepositive stafylokokker i enkelte prøver av rå melk og ost, men antallet ligger langt under grenseverdiene på 10^3 - 10^4 bakterier pr. ml. Nivået av *S. aureus* er høyest under 1-3 dager etter produksjon, og reduseres signifikant under lagring (Little 2008; Jakobsen m.fl. 2010). Grensen for at *S. aureus* skal produsere nok toksin til å gi forgiftning ligger på 10^4 - 10^6 bakterier pr. ml. Ingen prøver oppnådde slike verdier i dette prosjektet. Det kan ofte være store variasjoner mellom gårdsysterier pga forskjellig hygienisk praksis og besetningens karakteristika (Jakobsen m.fl.2010). De 125 isolatene i dette prosjektet ble senere analysert for å se på eventuelt slektskap mellom bakterienestammene og mulig enterotoksinproduksjon (Mehli et al. 2016).

Rå melk, ystemelk, myse og ost fra småskala ysterier er generelt av god kvalitet. Det begrensede omfanget og det at prøveperioden foregikk over et kort tidsrom i en kald årstid, må tas i betraktning. I en lignende studie i England (Little et al. 2008) viste at mesteparten av osten (98 %) fra rå melk, termisert eller pasteurisert var av tilstrekkelig kvalitet i forhold til regelverk. I Irland ble det også gjennomført en studie blant gårdsysterier med hensyn på ostekvalitet (O'Brien med fl. 2009). Den viste blant annet at *S. aureus* var tilstede i 48 % av prøvene mens i dette forprosjektet ble det bare påvist i en prøve (1 av 15).

4 Forslag til videre arbeid

Flere av disse metodene som har vært til utprøving kan egne seg til bruk for produsenter for selv å holde kontroll med den hygieniske kvaliteten der det kan være større risiko. Mikrobiell testing på gården er ofte brukt i forbindelse med påvisning av mastitt på kyr, og en kan dermed komme raskt i gang med antibiotika-behandling hvis nødvendig. Testing «på gården» gjør at det går kort tid fra prøven tas ut til tiltak kan settes inn. Hvordan påvirkes produsenten når mikrobiell kontroll utføres på gården? Blir produsenten mer oppmerksom på hva som kan gi problemer i produksjon? Innsending av prøver til sentrale analysefirma med påfølgende resultat tar for lang tid men er nødvendig for kvalitetskontroll. Videre arbeid med bruk av hurtigmetoder for lokale produsenter, vil gi kunnskap om risiko på den enkelte gård og gi enda tryggere lokale produkter.

5 Referanseliste

- AOAC International, 2005.** Official method 2005.03. Detection and confirmed quantitation of coliforms and *E. coli* in foods Simplate Coliforms and *E. coli* Color indicator. http://www.aoac.org/omarev1/2005_03.pdf2005
- Hauge SJ, Nesbakken T, Skjerve E, Dommarsnes K, Østensvik Ø. 2010.** Evaluation of the Simplate method for enumeration of *Escherichia coli* in swab samples from beef and lamb carcasses. International journal of Food microbiology 142: 229-233
- Jakobsen RA, Heggebø R, Sunde EB, Skjervheim M. 2010.** *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes* in Norwegian raw milk cheese production Food Microbiology, doi: 10.1016/j.fm.2010.10.017
- Jørgensen HJ, Mørk T, Rørvik LM. 2005.** The occurrence of *Staphylococcus aureus* on a farm with small-scale production of raw milk cheese. Journal of Dairy Science 88: 3810-3817
- Little CL, Rhoades JR, Sahoo SK, Harris J, Greenwood M, Mithani V, Grant K, McLauchlin J. 2008.** Microbiological quality of retail cheeses made from raw, thermized or pasteurized milk in the UK. Food Microbiology 25: 304-312
- Maheux AF, Huppé V, Boissinot M, Picard FJ, Bissonnette L, Bernier J-L T, Bergeron MG. 2008.** Analytical limits of four β -glucuronidase and β -galactosidase-based commercial culture methods used to detect *Escherichia coli* and total coliforms. Journal of Microbiological methods 75: 506-514
- Mehli L, Hoel S, Thomassen GMB, Jakobsen AN & Karlsen H (2016)** The prevalence, genetic diversity and antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* in milk, whey, and cheese from artisan farm dairies. International Dairy Journal, 65, 20-27. <http://dx.doi.org/10.1016/j.idairyj.2016.10.006>
- O'Brien M, Hunt K, McSweeney S, Jordan K. 2009.** Occurrence of foodborne pathogens in Irish farmhouse cheese. Food Microbiology 26: 910-914
- Rosengren Å, Fabricius A, Guss B, Sylvén S, Lindqvist R. 2010.** Occurrence of foodborne pathogens and characterisation of *Staphylococcus aureus* in cheese on farm-dairies. International Journal of Food Microbiology 144:263-269
- Rørvik LM og Granum PE** *Staphylococcus aureus* kap 17 i Granum PE (red.) *Matforgiftning* 3. utgave 2007
- Østensvik Ø 2010.** Koliforme bakterier: Hva er egentlig det? Foredrag MIKRO seminar 22.-24. september, Rica Hotell, Bergen