

UNIVERSITETET FOR MILJØ- OG BIOVITENSKAP



Forord

Denne oppgaven er skrevet som en avsluttende masteroppgave ved Universitetet for Miljø- og Biovitenskap (UMB), Institutt for kjemi, bioteknologi og matvitenskap (IKBM). Arbeidet med oppgaven er utført ved Nofima Mat, Ås, våren 2010.

Jeg ønsker å takke stipendiat ved Nofima Mat, Elin Røssvoll for god hjelp og godt samarbeid under hele prosessen, samt forsker og veileder Solveig Langsrud for god hjelp og veiledning.

En stor takk rettes også til Trond Møretrø for god veiledning.

Takk til veileder på IKBM, Helge Holo.

Videre ønsker jeg å takke Lars W. Hjerpekjøn og Mette H. Røine for hjelp til korrekturlesing.

Ås, mai 2010

Marianne Røine

Sammendrag

Oppgaven er en del av forskningsprosjektet ”Bedre mattrygghet i hjemmet gjennom risikoanalyse av forbrukerhåndtering av mat og evaluering av risikoreduserende tiltak”, et samarbeid mellom Nofima Mat og SIFO (statens institutt for forbruksforskning). En casestudie utført ved Nofima Mat, hvor 45 frivillige forbrukere ble tildelt temperaturlogger viste at gjennomsnittlig temperatur for kjøttpålegg var 6,2 °C, og at pålegget daglig ble utsatt for temperaturer over 20 °C i gjennomsnittlig 47 minutter (Røssvoll 2010).

Hensikten med masteroppgaven var å se på bakterievekst og toksindannelse ved gjentatte korte opphold ved romtemperatur, og ved lagring ved ulike temperaturer.

De patogene mikroorganismene *Bacillus cereus*, *Bacillus weihenstephanensis*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* og *Yersinia enterocolitica* ble valgt fordi de har evnen til å vokse ved kjøleskapstemperaturer. Bakteriene ble lagret ved 4 og 8 °C i ti dager (*S. aureus* ble lagret ved 8 og 12 °C). Skålene ble inkubert ved 25 °C daglig i henholdsvis 30 minutter, en time og to timer. Bakterievekst og toksindannelse ble sammenliknet med skåler inkubert ved 4 og 8 °C gjennom hele forsøksperioden. Forsøkene viste at daglige uttak ved 25 °C øker mikrobiell vekst i produktet, og forringer holdbarheten til matvarene betraktelig.

B. cereus, *B. weihenstephanensis* og *S. aureus* ble undersøkt for toksindannelse ved de samme betingelsene som for bakterievekst. Forsøkene viste relativt liten toksinproduksjon, både for *B. weihenstephanensis* og *S. aureus*, selv om antall bakterier var tilstrekkelig for toksinproduksjon.

Abstract

This study is a part of a larger research project between Nofima Mat and The National Institute for Consumer Research. The focus of the project is to achieve better food safety in the domestic environment, by risk analysis of consumer food handling and evaluation of risk-reducing measures. A case study was performed at Nofima Mat with 45 volunteers, where they received a temperature logger to bring with them in the Easter and Christmas holiday of 2009 and 2010. The temperature loggers were to be treated as cold cuts of boiled ham during the vacation. Average temperature in which the cold cuts were stored varied greatly from 2, 9°C to 12, 0 °C with a total sample mean of 6, 2 °C. The cold cuts were exposed to room temperature every day for up to 113 minutes, with the total sample mean being 47 minutes (Røssvoll 2010).

The aim of this study was to evaluate bacterial growth and production of toxins, for elected pathogenic bacteria, at different periods of incubation at room temperature (25 °C). Bacterial growth with incubation at 25 °C was compared to bacterial growth at continuous storage at refrigerator temperatures (4 and 8 °C).

The pathogenic bacteria *Bacillus cereus*, *Bacillus weihenstephanensis*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* and *Yersinia enterocolitica* were chosen because of their ability to grow at refrigerator temperatures. The bacteria were incubated on agar plates at 4 and 8 °C for 10 days. *S. aureus* was stored at 8 and 12 °C. The plates were exposed to room temperature (25 °C) every day for 30 minutes, 1 hour and 2 hours, respectively, and compared to the plates incubated at constant temperature of 4 and 8 °C throughout the study.

The results indicated that short term storage at room temperature increase the microbial growth in cold cuts, and reduce the shelf-life of the products.

B. cereus, *B. weihenstephanensis* and *S. aureus* were analyzed for production of toxins at the same conditions as the agar plates for growth investigation. The study showed very little production of toxins.

Innholdsfortegnelse

1. INNLEDNING	1
2. TEORI	3
2.1. Kjøling og oppbevaring av påleggsprodukter.....	3
2.2. Matbårne sykdomsfremkallende bakterier	4
2.3. <i>Bacillus cereus</i> og <i>B. weihenstephanensis</i>	4
2.3.1. Egenskaper	5
2.3.2 Påvisningsmetoder.....	5
2.3.3. Betingelser for vekst og toksindannelse.....	5
2.3.4. <i>B. cereus</i> og <i>B. weihenstephanensis</i> relatert til mat	6
2.3.5. Symptomer og sykdomsforløp	7
2.3.6. Utbrudd.....	7
2.4. <i>Listeria monocytogenes</i>	8
2.4.1. Egenskaper	8
2.4.2. Påvisningsmetoder.....	8
2.4.3. Betingelser for vekst.....	9
2.4.4. <i>L. monocytogenes</i> relatert til mat	9
2.4.5. Symptomer og sykdomsforløp	9
2.4.6. Utbrudd.....	11
2.5. <i>Staphylococcus aureus</i>	11
2.5.1. Egenskaper	11
2.5.2. Påvisningsmetoder.....	12
2.5.3. Betingelser for vekst og toksindannelse.....	13
2.5.4. <i>S. aureus</i> relatert til mat	13
2.5.5. Symptomer og sykdomsforløp	13
2.5.6. Utbrudd.....	14
2.6. <i>Yersinia</i> spp	14
2.6.1. Egenskaper	15
2.6.2. Påvisningsmetoder.....	15
2.6.3. Betingelser for vekst.....	15
2.6.4. <i>Y. enterocolitica</i> relatert til mat.....	16
2.6.5. Symptomer og sykdomsforløp	16
2.6.6. Utbrudd.....	17
3. MATERIALER OG METODER	18
3.1. Bakteriestammer	18
3.1.1. Oppbevaring og oppdyrking av bakterier.....	19
3.2. Medier	20
3.3. Løsninger	20

3.4. Vekstforløp i suspensjon ved konstant temperatur	20
3.4.1. Opparbeidelse av bakteriekultur og bestemmelse av celletall	21
3.4.2. Bestemmelse av celletall i suspensjon	21
3.5. Etablering av metode for bestemmelse av celletall på agaroverflate	22
3.6. Vekstforløp på agaroverflate ved varierende temperatur	22
3.6.1. Bestemmelse av celletall	23
3.6.2. Bestemmelse av celletall på agarskåler	23
3.6.3. Bestemmelse av toksindannelse	24
3.7. Statistisk analyse	30
4. RESULTATER	31
4.1. Vekstforløp i suspensjon ved konstant temperatur	31
4.1.1. <i>Bacillus cereus</i> og <i>B. weihenstephanensis</i>	31
4.1.2. <i>Listeria monocytogenes</i>	31
4.1.3. <i>Staphylococcus aureus</i>	31
4.1.4. <i>Yersinia enterocolitica</i> O:3	33
4.2. Vekstforløp på agaroverflate ved varierende temperatur	35
4.2.1. Bestemmelse av celletall	35
4.2.2. <i>Bacillus cereus</i> og <i>B. weihenstephanensis</i>	36
4.2.3. <i>Listeria monocytogenes</i>	39
4.2.4. <i>Staphylococcus aureus</i>	43
4.2.5. <i>Yersinia enterocolitica</i>	47
4.3. Bestemmelse av toksindannelse	51
4.3.1. <i>Bacillus cereus</i> og <i>B. weihenstephanensis</i> emetisk toksin	51
4.3.2. <i>Staphylococcus aureus</i> - enterotoksiner	52
5. DISKUSJON	56
6. KONKLUSJON	63
7. VIDERE ARBEID	64
8. REFERANSER	65
9. VEDLEGGSLISTE	i

1. INNLEDNING

Kjøling og korrekt oppbevaring av påleggsprodukter er svært viktig. En ubrutt kjølekjede er en forutsetning for at produkter som kjøttpålegg og røkelaks skal være trygge å spise helt fram til holdbarhetsdatoen.

Dersom denne type mat spises etter endt holdbarhet, eller oppbevares ved for høy temperatur kontinuerlig eller i perioder, kan ikke produsenten garantere for tryggheten ved produktet. En større forbrukerundersøkelse utført av Nofima Mat i samarbeid med SIFO (statens institutt for forbruksforskning) viser at opptil 44 % bruker kjøttpålegg som er utgått på dato (upubliserede resultater).

Det ble utført en casestudie ved Nofima Mat, hvor 45 frivillige forbrukere fikk utdelt temperaturlogger i jule- og påskeferiene i 2009 og 2010. Loggeren skulle følge en kjøttpåleggspakke, og ble tatt ut sammen med kjøttpålegget ved måltidene i 11 dager. Gjennomsnittlig påskemåltid var i 2009 62 minutter, og 30 minutter i 2010. Gjennomsnittlig temperatur i løpet av 11 dager var henholdsvis 6,3 °C i 2009, og 5,74 °C i 2010. Julen 2009 var gjennomsnittlig måltid på 50,2 minutter, med gjennomsnittlig temperatur på 6,44 °C (Røssvoll 2010).

Opgaven er en del av prosjektet ”Bedre mattrygghet i hjemmet gjennom risikoanalyse av forbrukerhåndtering av mat og evaluering av risikoreducerende tiltak”, og er et samarbeid mellom Nofima Mat og SIFO. Prosjektets mål er å redusere forekomst av næringsmiddelbåren sykdom som skyldes feil håndtering av mat hos forbruker gjennom fareanalyse og evaluering av mulige risikoforebyggende tiltak. Forskningen finansieres av Norges forskningsråd, fondet for forskningsavgift på landbruksprodukter, og forskningsmidler over jordbruksavtalen.

Det finnes mange undersøkelser utført på bakterievekst ved konstant kjøletemperatur. Derimot er ikke bakterievekst ved gjentatte korte perioder ved romtemperatur undersøkt. Produsentene har god kontroll med kjølekjeden fram til forbruker, men det er liten kjennskap til hvordan produktene behandles i hjemmet. Ved gjennomsnittlig måltid på 47 minutter (Røssvoll 2010), oppnår pålegget høy temperatur før det settes tilbake i kjøleskapet.

Målet med denne oppgaven er å se på effekten av gjentatte korte perioder ved høyere temperaturer med hensyn på bakterievekst og toksindannelse, for utvalgte patogene mikroorganismer.

2. TEORI

2.1. Kjøling og oppbevaring av påleggsprodukter

En ubrutt kjølekjede fram til siste holdbarhetsdag er en viktig forutsetning for at ferdigmat som kjøttpålegg og røkelaks skal være trygg å spise. Dersom denne type mat spises etter holdbarhetstidens utløp, oppbevares periodevis eller konstant ved høy temperatur, kan ikke produsentene garantere for tryggheten. Varmebehandlede påleggsprodukter er ofte emballert i beskyttende atmosfære (gasspakket eller vakuumpakket), noe som reduserer vekst av bakterier under lagring. Når forseglingen brytes vil bakterier på produktet kunne vokse raskere. Næringsmiddelprodusenten Nortura (tidligere Gilde og Prior) opplyser om på sine nettsider at kjøttpålegg er holdbart tre til fem dager etter åpning, men at holdbarheten avhenger av oppbevaringstemperatur, tilgang på oksygen, antall ganger det tas ut av kjøleskapet, lysforhold og renhold i kjøleskapet, og personlig hygiene (Gilde).

I en stor forbrukerundersøkelse utført av Nofima Mat i samarbeid med SIFO (statens institutt for forbruksforskning) viste resultatene at 44 % fortsetter å bruke kjøttpålegg som for eksempel skivet kokt skinke, selv om den er utgått på dato. 6 % av forbrukerne oppga at de alltid bruker kjøttpålegget over utløpsdato. 17 % svarte at de ofte bruker kjøttpålegg som er gått ut på dato uten videre og 21 % gjør det samme av og til. 56 % av forbrukerne kaster imidlertid kjøttpålegget når holdbarheten er utgått. Prosentene var fordelt 17 % alltid, 17 % ofte, og 22 % kaster av og til kjøttpålegget etter endt holdbarhet uten videre. 78 % av forbrukerne oppgir at de lukter, ser og smaker på kjøttpålegget før de benytter det videre etter endt holdbarhet, hvorav 36 % mener de alltid gjør det, og 16 % lukter, ser og smaker på pålegget av og til (upubliserte resultater).

Temperaturen i kjøleskapet skal optimalt være mindre enn 4,4 °C (U.S. Department of Agriculture 2005). Resultatene fra forbrukerundersøkelsen utført av Nofima Mat og SIFO viste at 43 % av norske forbrukere ikke kjenner til kjøleskapstemperaturen hjemme på kjøkkenet (upubliserte resultater). Undersøkelse med temperaturloggere utført av Nofima Mat viste at gjennomsnittstemperaturen i kjøleskapet hos 45 forbrukere varierte fra 2,9 til 12,0 °C. Total gjennomsnittstemperatur lå på 6,2 °C (Røssvoll 2010).

2.2. Matbårne sykdomsfremkallende bakterier

Det finnes mange bakterier som er sykdomsfremkallende for mennesker, og som assosieres med mat. Eksempler på dette er *Aeromonas*, *Bacillus*, *Brucella*, *Campylobacter*, *Clostridium botulinum*, *Clostridium perfringens*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Plesiomonas*, *Pseudomonas cocovenenans*, *Salmonella*, *Shigella*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus*, *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio vulnificus* og *Yersinia enterocolitica* (Baird-Parker et al. 1996).

En del av disse er mesofile, det vil si at de vokser ved temperaturer rundt 30 - 40 °C. (Adams & Moss 2000b).

De psykrotrofe bakteriene vokser ved lave temperaturer, og mange vokser og trives i kjøleskapet. Disse kan deles inn i to underkategorier; obligate psykrofile og fakultative psykrofile bakterier. De obligate psykrotrofe bakteriene kan vokse ned til - 5 °C, med optimumstemperaturer på 12 - 15 °C, og vokser i liten grad over 20 °C. Bakterier i denne gruppen finnes i polarområder, og marint miljø. Fakultative psykrotrofe bakterier vokser ved de samme lave temperaturene som de obligate, med optimal veksttemperatur ved 25 - 30 °C, og høyere maksimumstemperatur (30 - 35 °C) (Adams & Moss 2000b).

Eksempler på psykrotrofe bakterier er *Aeromonas*, *B. cereus*, *B. weihenstephanensis*, *L. monocytogenes* og *Y. enterocolitica* (Granum, P.E. 2007).

2.3. *Bacillus cereus* og *B. weihenstephanensis*

Bacillus består av 51 bakteriearter og finnes mange steder i naturen, som jord og planter, dyr og mennesker. Bakteriene deles inn i tre grupper basert på sporens morfologi og sporangium. De fleste baciller er ikke humanpatogene, men særlig tre arter er viktige i matforgiftningssammenheng. Disse er *Bacillus subtilis*, *Bacillus thuringiensis* og *B. cereus*. Disse tilhører gruppe 1A, sammen med *B. mycosides*, *B. pseudomyces* og *B. weihenstephanensis* (Bhunia 2008; Granum, P. E. 2007).

B. cereus kan forårsake to ulike sykdommer hos mennesker og dyr; emetisk type og diarétypen. I tillegg kan den være årsak til systemiske infeksjoner hos immunosuppressive personer (Bhunja 2008).

2.3.1. Egenskaper

Bacillus cereus og *B. weihenstephanensis* er Gram positive, bevegelige, sporedannende bakterier som vokser både under aerobe og anaerobe forhold. De er konkurransesvake, men vokser godt i fravær av konkurrerende bakterieflora. Når mat varmebehandles, for eksempel pasteuriseres, vil mye av den konkurrerende vegetative bakteriefloraen elimineres, mens *Bacillus*-sporer kan overleve. Dersom sporene germinerer, vil de kunne vokse godt i fravær av konkurrenter og eventuelt også danne giftstoffer i maten (Granum, P. E. 2007; Lechner et al. 1998).

Bacillus weihenstephanensis skiller seg hovedsaklig fra *Bacillus cereus* ved at den kan vokse ved lave temperaturer, men ikke ved 43 °C. I tillegg kan den skilles ved ulik rDNA-sekvens og tilstedeværelse av kuldesjokkprotein A (*cspA*) ved bruk av polymerase kjedereaksjon (PCR) (Granum, P. E. 2007; Lechner et al. 1998).

2.3.2 Påvisningsmetoder

Bakteriene påvises ved utsæd på selektivt medium, som for eksempel polymyxin-eggeplomme mannitol-bromthymol agar (PEMBA) og på blodagar. Sporer kan påvises på agarskåler ved oppvarming av matvaren (75 – 80 °C i 10 – 15 minutter) deretter utsæd på agarskåler. Andel sporer i forhold til vegetative *Bacillus* påvises ved sammenlikning av skåler med og uten varmebehandling (Bhunja 2008; Granum, P. E. 2007).

2.3.3. Betingelser for vekst og toksindannelse

B. cereus vokser i et stort temperaturområde, med optimal veksttemperatur mellom 25 og 37 °C. Psykrotrofe arter kan vokse ned til 3 °C, og vokser sjelden ved 43 °C (Drobniewski 1993). De fleste stammene vokser ikke over pH 4,5, men noen ekstreme stammer er identifisert, med vekst fra pH 2- 10 (Drobniewski 1993; Schoeni & Wong 2005). *B. cereus* er salttolerant, og kan vokse med 1,5 – 2 % (w/w) NaCl (Martinez et al. 2007)

Emetisk toksin, cereulide, produseres i slutten av den eksponensielle vekstfasen, og i stasjonærfasen. For at cereulide skal dannes, må bakterien være tilstede i matvaren i høyt antall. (Finlay et al. 2000; Finlay et al. 2002) Finlay et. al fant i 2000 at den nederste grensen for emetisk toksinproduksjon var 12 °C, og at bakteriene ikke produserte toksin over 37 °C (Finlay et al. 2000). Thorsen et. al fant i 2009 at psykroftrofe stammer av *B. cereus* og *B. weihenstephanensis* kan produsere emetisk toksin ned til 8 °C, selv om mengden cereulide produsert i studien var svært lav (Thorsen et al. 2009). Maksimal mengde cereulide er vist produsert mellom 12 og 22 °C. Cereulide er varmemestabil, og aktivt i et stort pH-område (2 – 11) (Bhunia 2008).

2.3.4. *B. cereus* og *B. weihenstephanensis* relatert til mat

De fleste psykrotolerante *B. cereus* og *B. weihenstephanensis* isoleres fra melk og andre meieriprodukter (Christiansson et al. 1989; Dufrenne et al. 1994; Larsen & Jørgensen 1999; Sutherland & Murdoch 1994). *B. cereus* får melken til å koagulere, uten å senke pH. Råmelk kontamineres ofte på gården, fra for eksempel skitne jur. Likevel er melk sjelden årsak til matforgiftning dersom den er oppbevart ved <6 °C. Isolerte stammer er ofte psykrotrofe *B. weihenstephanensis*, som ikke kan produsere enterotoksiner ved 37 °C, og gi sykdom hos mennesker (Granum, P. E. 2007). På grunn av at cereulide ikke dannes i større grad ved mindre enn 8 °C, er emetisk intoksikasjon også lite trolig (Thorsen et al. 2009).

Emetisk *B. cereus* assosieres ofte med stivelsesrike produkter, som ris og pasta, i tillegg til kjøtt, fjærfe, og morsmelkserstatning. (Bhunia 2008). I Norge er kjøttkaker i brun saus, fiken, melk og grillet kylling eksempler på emetisk utbrudd forårsaket av *B. cereus* (Granum, P. E. 2007).

Få matvarer kan utelukkes helt med tanke på matforgiftning av *B. cereus*. Felles for de fleste matvarene som har vært kilde til utbrudd, er at de har gjennomgått en form for varmebehandling. Sporene overlever, og germinerer når andre bakterier er borte (Granum, P. E. 2007).

2.3.5. Symptomer og sykdomsforløp

Emetisk type matforgiftning forårsakes av preformert emetisk toksin (cereulide) i matvaren. Intoksikasjoner er rapportert ved konsentrasjoner på 0,1 – 1,28 µg cereulide per g matvare (Agata et al. 2002), eller 8 – 10 µg cereulide per kg kroppsvekt (Jaaskelainen et al. 2003; Paananen et al. 2002). Typiske symptomer er kvalme etterfulgt av oppkast og magekramper 1 – 6 timer etter inntak (Turnbull 1981). Sykdommen er som regel selvbegrensende, og varer fra 6 – 24 timer. Inntak av store mengder toksin kan forårsake leversvikt, fordi toksinet ikke brytes ned i leveren og ødelegger samtidig mitokondriene (Dierick et al. 2005; Mahler et al. 1997). I noen tilfeller forekommer diaré etter oppkast, fordi mange emetiske stammer også produserer enterotoksiner i tarmen (Bhunja 2008; Granum, P. E. 2007)

2.3.6. Utbrudd

B. cereus er ikke meldepliktig til MSIS, mørketallene når det gjelder utbrudd er derfor store. I Norge er *B. cereus* en viktig årsak til matforgiftninger. I 2009 var *B. cereus* mistenkt som smittestoff i tre varslede næringsmiddelbårne utbrudd. Bakterien lå med dette på 5. plass over mistenkte smittestoffer i 2009 (Nygård et al. 2010). Hvor mange av disse som er forårsaket av emetisk toksin er uvisst.

Det største utbruddet av *B. cereus*- intoksikasjon i Norge fra 1990 og fram til 2005 var i kjøttkaker i brun saus, med omtrent 70 personer syke (Granum, P. E. 2007).

Selv om intoksikasjon med *Bacillus*- toksin som oftest er lite alvorlige finnes det eksempler på tilfeller med dødelig utgang. I Belgia i 2003 fikk kveldsmaten fatale følger. Fem barn ble syke etter å ha spist pastasalat som hadde stått i kjøleskapet i tre dager. De begynte med oppkast, hvorav en fikk leversvikt og døde 13 timer etter inntak av maten. *B. cereus* ble isolert fra salaten, bollen og oppkastet til den avdøde. Stammene viste seg å være cytotoxiske ved PCR, selv om det ikke ble påvist cereulide i salaten. Kjøleskapet der pastasalaten stod, viste seg å holde 14 °C (Dierick et al. 2005).

Et annet utbrudd med leversvikt forårsaket av emetisk toksin fant sted i Sveits i 1997. Far og sønn spiste spagetti og pesto, som var laget fire dager tidligere. Begge fikk akutt gastroenteritt, hvorav sønnen utviklet leversvik og døde to dager senere. Det ble funnet høye

cereulidekonsentrasjoner i pannen benyttet til oppvarming av retten, og i guttens galle og lever (Mahler et al. 1997).

2.4. *Listeria monocytogenes*

Listeria omfatter seks arter, *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *L. welshimeri*, *L. seeligeri*, *L. ivanovii* og *L. grayi*. *L. monocytogenes* er human- og dyrepatogen, *L. ivanovii* er dyrepatogen, mens de andre er ansett som apatogene (Bhunias 2008).

L. monocytogenes består av 13 serovarianter, hvorav 1/2a, 1/2b og 4b er ansvarlige for 98 % av utbruddene. Serovariant 4B er ansett som den mest virulente (Bhunias 2008).

2.4.1. Egenskaper

L. monocytogenes er en Gram positiv, 1 – 2 µm lang, kokkoid, hemolytisk bakterie. Den isoleres fra jord, vann, kloakk, planterester og fôr. *L. monocytogenes* er bevegelig ved hjelp av flageller, hvor ekspresjonen er temperaturavhengig. Maksimum flagellækspresjon er ansett å være 4 – 30 °C, minimum ekspresjon ved 37 °C (Bhunias 2008).

2.4.2. Påvisningsmetoder

Den vanligste påvisningsmetoden av *L. monocytogenes* i Norge er NMKL (Nordisk Metodikkomité for Næringsmidler) metode 136. Metoden omfatter både påvisning og kvantifisering av *L. monocytogenes* i næringsmidler. Kvalitativ metode består av to-trinns anrikning, hvorav den første i buljong med redusert selektivitet, deretter en selektiv buljong. Kulturene plates ut på et spesifikt isoleringsmedium (ALOA) og blodagar (LMBA). Morfologiske og biokjemiske analyser benyttes for å bekrefte presumptive kolonier (Nordisk Metodikkomité for Næringsmidler 2007).

Kvantitativ metode består i å så bakteriesuspensjonen direkte ut (eventuelt fortynnet) på selektiv agar (ALOA, LMBA). Presumptive kolonier telles, og bekreftes ved biokjemiske og morfologiske analyser (Nordisk Metodikkomité for Næringsmidler 2007).

2.4.3. Betingelser for vekst

L. monocytogenes er fakultativt anaerob, og overlever i svært mange miljøer. De er tilpasningsdyktige, og overlever i et stort pH-område (4,1 – 9,6) og ved høy saltkonsentrasjon (10 %) (Bhunia 2008). I tillegg kan de overleve lange perioder i frossen eller tørket mat. Bakteriene vokser mellom pH 6 og 9, og ved temperaturer mellom 1 og 45 °C. Optimal veksttemperatur er mellom 30 og 37 °C (Schuchat et al. 1991). *L. monocytogenes* kan etablere reservoarer i næringsmiddelbedrifter, og kontaminere matvaren derfra (Rørvik 2007).

2.4.4. *L. monocytogenes* relatert til mat

Bakterien er isolert fra mange ulike matvarer. Ofte påvises *L. monocytogenes* i rå kylling, men også i kjøtt, kjøttdeig, rå, røkt og gravet fisk, rakefisk, reker, ost, grønnsaker og varmebehandlet kjøttpålegg. Antallet bakterier isolert fra matvaren er normalt lavt (<100 kde per g). Ved utbrudd av listeriose er det funnet høyt antall bakterier, $10^7 - 10^9$ kde per g matvare (Rørvik 2007).

Risikoprodukter er først og fremst ferdigmat med lang holdbarhetstid, og hvor konkurrerende flora er eliminert for eksempel under varmebehandling. I og med at *L. monocytogenes* kan vokse under anaerobe forhold (for eksempel i vakuumpakkede produkter) og ved kjøletemperatur, vil bakterier som smitter produktet etter varmebehandlingstrinnet vokse opp (Rørvik 2007). Ifølge EU-direktiv 2073/2005 skal ikke ferdigmat til spedbarn og mat til medisinske formål inneholde *L. monocytogenes* i 25 g matvare når det settes ut i markedet. Videre skal annen ferdigmat hvor *L. monocytogenes* kan vokse, ikke påvise bakterien produksjonsdagen, heller ikke overstige 100 kde per g matvare ved endt holdbarhet. I produkter hvor *L. monocytogenes* ikke kan vokse, kan inntil 100 kde per g påvises produksjonsdagen (COMMISSION REGULATION (EC) No 2073/2005: of 15 November 2005 on microbiological criteria for foodstuffs 2005).

2.4.5. Symptomer og sykdomsforløp

Listeriose rammer i hovedsak personer med nedsatt immunforsvar, underliggende sykdommer og tilstander. Risikogruppene er gravide i siste trimester og deres fostre, nyfødte, eldre og personer med nedsatt immunforsvar av ulike årsaker. Disse kan være kreft, diabetes, HIV/AIDS, alkoholisme og behandling med ulike medisiner som kan virke

immunosuppressivt. Friske personer kan også rammes av listeriose, men dette er sjeldnere (Rørvik 2007). 1 – 5 % av friske personer regnes som smittebærere (Bhunia 2008). Gravide kan overføre sykdom til foster uten å selv bli syke (Rørvik 2007).

Infektiv dose til *L. monocytogenes* er ikke kjent, den påvirkes av ulike faktorer. Faktorene som påvirker den infektive dosen er miljøet (matvaren den finnes i), virulensen til den aktuelle bakterien og vertens immunstatus (McLauchlin et al. 2004). Den infektive dosen ansees som høy, da det er isolert med enn 100 kde per gram matvare i tidligere utbrudd. Undersøkelser gjort på friske aper viste at apene trengte 10^9 bakterieceller for å bli syke, mens de som ble inokulert med 10^7 bakterieceller var friske smittebærere, og skilte *L. monocytogenes* ut i feces (Farber et al. 1991). Det er dermed grunn til å tro at den infeksiøse dosen for mennesker finnes rundt 10^6 – 10^9 bakterieceller. Den infektive dosen antas å være lavere for immunosuppressive personer (Rørvik 2007).

Listeriose kan deles inn i invasiv og ikke-invasiv sykdom. Ved invasiv listeriose passerer *L. monocytogenes* den intestinale barrieren ved hjelp av et transportsystem, og føres videre til lever, milt og lymfeknuter. Antall bakterier reduseres vanligvis i lever og milt. Bakterier som overlever kan komme over i blodbanen og utvikle blodforgiftning, eller spre seg til og infisere sentralnervesystemet eller morkaken og foster. Inkubasjonstiden ved invasiv listeriose ansees å være omtrent 30 dager (Rørvik 2007). Symptomene ved invasiv listeriose er blant annet feber, hodepine, meningitt, sepsis og encephalitt (Bhunia 2008). Gravide kan få fra influensaliknende symptomer til sepsis. Bakteriemi og intrauterin infeksjon fører vanligvis til abort, for tidlig fødsel, dødfødsel eller infeksjon hos det nyfødte barnet (Rørvik 2007).

Ved ikke-invasiv sykdom opptrer listeriose som febril gastroenteritt. Inkubasjonstiden for denne varianten er omtrent 20 timer, men kan variere fra 6 timer – 10 dager. Symptomer på febril gastroenteritt er feber, hodepine, kvalme, oppkast, magesmerter og vandig diaré (Bhunia 2008).

Varigheten ved listeriose er lenger enn de fleste andre matbårne sykdommer. Ved ukomplisert sykdom, som meningitt eller sepsis er varigheten et par uker, mens for immunosuppressive personer kan den vare i mange uker. Dødsraten ved listeriose er høy. Behandling foregår ofte med en kombinasjon av aminopenicillin og aminoglycosid (Rørvik 2007).

2.4.6. Utbrudd

Hvert år får folkehelseinstituttet melding om 10 – 50 tilfeller av listeriose i Norge. Vanligvis oppstår smitten i Norge, i motsetning til mange andre matbårne sykdommer, hvor smitte fra utlandet er vanligere. Noe av årsaken til at flesteparten smittes i Norge er at sykdommen rammer personer med allerede underliggende tilstander, disse er relativt sjelden utenlands (Nygård et al. 2010).

I 2009 ble 31 tilfeller av listeriose meldt til MSIS. Ett av disse var svangerskapsrelatert. De fleste tilfeller av listeriose i Norge er sporadiske. Det er registrert tre større utbrudd i Norge. Det første var i Trondheim i 1992. Åtte personer ble registrert syke, hvorav en døde. Smittekilden var varmebehandlet kjøttpålegg (Nygård et al. 2010).

Det andre utbruddet var i Ålesund i 2005. Tre personer ble meldt syke mens de var innlagt på sykehuset. Smittekilden var påleggskutteren på sykehuskjøkkenet. Siste registrerte utbrudd var ved Rikshospitalet – Radiumhospitalet i 2007. Fem av 21 smittede personer døde. Kilden var mykost produsert ved et norsk gårdsmeieri (Nygård et al. 2010).

2.5. *Staphylococcus aureus*

Bakterieslekten *Staphylococcus* tilhører familien *Micrococcaceae*, og omfatter mange arter, hvor flere kan gi sykdom hos mennesker. Den viktigste humanpatogene arten er *Staphylococcus aureus*. Ved infeksjonstilstander som sårinfeksjoner og toksisk sjokk-sykdom er *S. aureus* kjent som agens (Rørvik & Granum 2007). En av de viktigste årsakene til *Staphylococcus* matforgiftning er lagring under for høy temperatur over lang tid, for eksempel ved at kjøttpålegget blir stående for lenge på bordet under et koldtbord (Rode et al. 2007).

2.5.1. Egenskaper

S. aureus er en Gram positiv, katalase- og koagulase- positiv, ubevegelig og fakultativt anaerob kokk (1 µm i diameter) (Bhunja 2008). Koagulaseproduksjonen skiller mellom patogene og apatogene varianter. Evnen til å koagulere kaninplasma kan være forbundet med bakterienes virulens. Koagulase-positive stammer av *S. aureus* produserer varmemestabile

enzymet (TNase), som tåler koking over lang tid. Påvisning av TNase i et næringsmiddel indikerer at bakterien har vært tilstede i minst 10^5 per gram matvare. (Rørvik & Granum 2007). *S. aureus* produserer ulike toksiner, hvorav enterotoksiner kan gi sykdom hos mennesker. Enterotoksinene er vannløslige globulære proteiner. De er varmemestabile, og overlever koking i 30 minutter. Enterotoksin B er det mest varmemestabile, og er aktivt ved 60 °C i 16 timer (Bhunia 2008).

2.5.2. Påvisningsmetoder

Påvisning av *S. aureus* i næringsmidler gjøres ved NMKL metode nr. 66 for koagulase-positive stafylokokker. Metoden fungerer for alle typer næringsmidler. Overflateutsæd av fortyngninger av næringsmidlet på selektivt medium (Baird- Parker (BP)), ofte både med og uten kaninplasma tilsatt agaren. Koloniene telles, typiske kolonier undersøkes nærmere med koagulasetest, gramfarging og hemolyse (Nordisk Metodikkomité for Næringsmidler 2009; Rørvik & Granum 2007). Produksjon av β -galaktosidase benyttes for å skille mellom *S. aureus* og den humanpatogene varianten *Staphylococcus intermedius*, fordi begge disse som oftest er koagulase-positive. Næringsmidler mistenkt for å ha forårsaket matforgiftning med *S. aureus* undersøkes også ved mikroskopi. Varmebehandlede næringsmidler kan inneholde toksiner produsert før varmebehandlingen, selv om bakteriene er drept. Pulsfelt gelelektroforese (PFGE) er mye benyttet til typebestemmelse ved sporing av smittekilder til en stafylokokkintoksikasjon (Rørvik & Granum 2007).

S. aureus' evne til å produsere enterotoksin undersøkes ved enten immunologisk test for å påvise produsert toksin (ELISA) eller ved PCR for å påvise toksingener. Enterotoksiner må påvises for at næringsmidlet skal være årsak til stafylokokkintoksikasjon. Fram til 1990-tallet var toksinene A, B, C1, C2, C3, D og E beskrevet (Balaban & Rasooly 2000; Rørvik & Granum 2007). G, H og I har kommet til senere, J til og med U er vist ikke å inneha emetisk aktivitet, disse kalles dermed stafylokokkliknende toksiner. Toksinene A og D er ansett for å være de kraftigste, disse er, alene eller sammen, de vanligste årsakene til intoksikasjon. Genet for enterotoksin A bæres av en bakteriofag som integreres i kromosomet, B- og C-genene bæres av kromosomet, mens D-genene sannsynligvis reguleres av plasmider (Rørvik & Granum 2007).

2.5.3. Betingelser for vekst og toksindannelse

Mange stammer av *S. aureus* produserer enterotoksiner (SE), som er ansvarlige for symptomene ved sykdom. Enterotoksinproduksjon foregår mellom 10 og 46 °C, og for at det skal kunne oppstå forgiftning, trenger bakteriene 15 – 18 °C i minimum tre til fire timer. *S. aureus* vokser mellom 7 og 47 °C, med optimumstemperatur på 30 – 37 °C (Medvedova et al. 2009a; Medvedova et al. 2009b; Tatini 1973). *S. aureus* er relativt salttolerant, og vokser ved saltkonsentrasjoner opptil 15 %. Samtidig er den forholdsvis resistent mot varme og tørking (Bhunia 2008). Toksinproduksjon foregår ved saltkonsentrasjoner over 10 % ved ellers optimale forhold (Rørvik & Granum 2007). Selv om *S. aureus* er mesofil, og ikke vokser under 7 °C, er den en av de mest utbredte, blant patogene bakterier i kjøleskapet (Jackson et al. 2007; Kennedy et al. 2005). Dette kan være et resultat av at omtrent 50 % av populasjonen er bærere av denne bakterien (Arbuthnott et al. 1990).

Enterotoksinene uttrykkes forskjellig, produksjonen avhenger av bakterienes vekstfase, tetthet, pH og innhold av CO₂. Toksinene A og J dannes i den eksponensielle fasen, mens B, C og D syntetiseres i overgangen mellom den eksponensielle fasen og stasjonærfase (Bhunia 2008).

2.5.4. *S. aureus* relatert til mat

S. aureus finnes først og fremst i nese og svelg, men også i hår og hud, særlig ved sårddannelser sett hos mennesker og varmblodige dyr. *S. aureus* er en vanlig årsak til jurbetennelse hos ku og geit, noe som fører til at den ofte forekommer i upasteurisert melk. Smitte til matvarer skjer som regel ved håndtering av matvaren, hvor *S. aureus* kan formere seg. Den kan også kontaminere matvarer ved dårlig hygiene i produksjonsanlegget, eller ved kontaminerte råvarer (Rørvik & Granum 2007). *S. aureus* er funnet i kjøttprodukter, sjømat, grønnsaker, ris, poteter, tunfisksalat, bakevarer, fløte og nudler (Kerouanton et al. 2007; Medvedova et al. 2009a; Normanno et al. 2005; Valik & Gorner 1993).

2.5.5. Symptomer og sykdomsforløp

Symptomer på stafylokokkintoksikasjon er kvalme, oppkast, magesmerter, diaré, hodepine, sterk utmattelse og kaldsvette (Bhunia 2008; Rørvik & Granum 2007). Sykdommen er som

regel kortvarig og dødsfall er sjelden. Inkubasjonstiden for sykdommen er én til seks timer. Komplikasjoner kan være dehydrering og sjokktilstander, etterfulgt av kramper i alvorlige tilfeller (Rørvik & Granum 2007).

SEA (Stafylokokkenterotoksin A) er toksinet som forårsaker mest sykdom hos mennesker (Bhunia 2008). Mengde enterotoksin avgjør sykdomsutviklingen. For produksjon av enterotoksiner over deteksjonsgrensen, må *S. aureus* være i matvaren i minimum 10^6 kde per ml (Charlier et al. 2008; Fujikawa & Morozumi 2006; Lindqvist et al. 2002; Medvedova et al. 2009a). Den akutte fasen av intoksikasjonen varer som regel mellom én og åtte timer, vanligvis med full restitusjon etter en til to dager (Rørvik & Granum 2007).

2.5.6. Utbrudd

S. aureus- intoksikasjon er ikke meldepliktig i Norge, forekomsten er derfor ukjent. Det ble ikke varslet noen tilfeller av gastroenteritt hvor *S. aureus* var mistenkt smittestoff i 2009 (Nygård et al. 2010).

S. aureus var årsak til utbrudd etter inntak av hvit geitost i Luster i Sogn i 2001. Osten var kjøpt på et lokalt marked. I analyserte prøver ble enterotoksin C påvist. Toksinet kan produseres av *S. aureus*- stammer som er hyppig årsak til jurbetennelse. I motsetning til brun geitost, kokes eller pasteuriseres ikke melka ved produksjon av hvit geitost, noe som gir økt fare for *S. aureus* (Folkehelseinstituttet 2003).

2.6. *Yersinia spp*

Yersinia spp tilhører familien *Enterobacteriaceae*. Bakterieslekten omfatter *Y. enterocolitica*, *Y. pseudotuberculosis*, *Y. pestis*, *Y. ruckeri*, *Y. kristensenii*, *Y. fredriksenii*, *Y. intermedia*, *Y. aldovae*, *Y. rohdei*, *Y. mollaretii* og *Y. bercovieri*. De syv siste artene er apatogene kommensaler, og finnes i stor grad i omgivelsene (Kapperud 2007). *Yersinia* ble i 1894 beskrevet som mikroorganismen ansvarlig for byllepesten, av den franske mikrobiologen Alexandre Yersin. Bakterieslekten fikk dermed navnet etter ham. *Yersinia* ble dannet for å omfatte bakterier tidligere omtalt som bakterieslekten *Pasteurella*, som tilhørte *Enterobacteriaceae* (Adams & Moss 2000a).

2.6.1. Egenskaper

Y. enterocolitica er en Gram negativ stavbakterie, den kan vokse både aerobt og anaerobt, er oksidase negativ, katalase positiv, nitratreduktase positiv, urease positiv og H₂S negativ. Den danner syre og forgjærer mannitol (Kapperud 2007).

Humanpatogene stammer av *Y. enterocolitica* omfatter serotypene O:3, O:9, O:8 og O:5.27 (Bottone 1999). Mange bakteriestammer av serogruppe O:3 er ubevegelige ved alle temperaturer, i motsetning til andre serogrupper, som er bevegelige med flageller ved 22 – 25 °C (Bottone 1977; Kapperud 2007). Serotype O:3 dominerer i Skandinavia, og er årsaken til yersiniose i store deler av verden, mens O:9 er vanlig i blant annet Finland, Belgia og Nederland (Ahvonen 1972; Tauxe et al. 1987).

2.6.2. Påvisningsmetoder

Y. enterocolitica påvises i næringsmidler ved bruk av NMKL metode 117. Dette er en referansemethode for påvisning av *Y. enterocolitica* i alle typer næringsmidler. Metoden er spesielt utviklet for påvisning av serotypene O:3 og O:9. NMKL metode 117 påviser *Y. enterocolitica* ved anrikning i to selektive flytende medier, irlgasanticarcillinkaliumkloratbuljong (ITC) og fosfatbufretsaltvann (PBS)buljong, deretter subkultivering fra buljongene på to selektive agarer, cefsulodinirgasannovobiosin (CIN) og Salmonella- Shigellaagar med natriumdeoxycholot og kalsiumklorid (SSDC). Typiske kolonier undersøkes deretter nærmere ved biokjemiske tester (Kapperud 2007; Nordisk Metodikkomité for Næringsmidler 1996).

Serotyping av *Y. enterocolitica* foregår som oftest ved hjelp av O-antigener. Seks biotyper og over 70 serovarianter er foreløpig beskrevet, inkludert både patogene og apatogene bakterier (Kapperud 2007).

2.6.3. Betingelser for vekst

Y. enterocolitica trives godt i kjølige omgivelser, forekomsten av bakterien er størst i land med kjølig klima, som for eksempel Norge. *Y. enterocolitica* kan formere seg helt ned mot 1 °C, men vokser best ved 28 – 29 °C (Andersen et al. 1991). Bakterien kan vokse i rått og kokt

kjøtt, og i melk under lagring. Ved lave temperaturer kan *Y. enterocolitica* også vokse i vakuumpakket kjøtt, og overlever fryselagring. Den overlever imidlertid ikke pasteurisering eller vanlig steking eller koking (Kapperud 2007).

2.6.4. *Y. enterocolitica* relatert til mat

De viktigste smittekilene for *Y. enterocolitica* er svinekjøtt og svinekjøttprodukter, og i mindre grad inntak av udesinfisert drikkevann (Andersen et al. 1991; Bucher et al. 2008; Fredriksson-Ahomaa et al. 2001; Fredriksson-Ahomaa et al. 2006). Gris er en regelmessig bærer av humanpatogene varianter av *Y. enterocolitica*, men bakterien er også funnet hos blant annet hund, katt og rotter (Kapperud 2007). Bakterien er funnet i høyt antall i tarmen, på tunge og tonsiller hos slaktegris, og kan enkelt kontaminere overflaten av slaktekroppen og miljøet på slakteriet. I 1994 – 1995 ble det innført en ”plastposeteknikk” ved slakteriene i Norge, hvor anus omsluttet med en plastpose rett etter tarmen er løsnet. På denne måten hindres avrenning fra tarmen, og det er mindre sjanse for kontaminering (Kapperud 2007).

2.6.5. Symptomer og sykdomsforløp

Y. enterocolitica gir sykdommen yersiniose, som i de fleste tilfeller er en selvbegrensende diarésykdom. Kliniske symptomer ved sykdommen er diaré med magesmerter og moderat feber. Kvalme og oppkast kan forekomme, men er som regel ikke dominerende (Kapperud 2007). Gastroenteritt med *Y. enterocolitica* varer oftest én til to uker, men sykdommen kan vedvare i måneder med kroniske magesmerter og gjentatte omganger med diaré.

Inkubasjonstiden kan variere, alt fra én til 11 dager er rapportert. (Cover & Aber 1989).

Infeksjon med *Y. enterocolitica* kan gi symptomer som likner på blindtarmbetennelse (Kapperud 2007).

Diagnosen yersiniose stilles ved isolasjon av *Y. enterocolitica* fra avføring. Spesifikke antistoffer i blodserum kan også påvises, og kan være et hjelpemiddel ved følgetilstander som for eksempel leddbetennelse (artritt). Særlig infeksjon med serogrupperne O:3 eller O:9 etterfølges av leddplager hos voksne. Pasientene har ofte, men ikke i alle tilfeller, hatt gastrointestinale symptomer i forkant (Kapperud 2007).

En annen komplikasjon ved yersiniose er erythema nodosum (knuterosen), en type betennelse i underhuds fett (Schwartz 2007). Denne sykdommen rammer særlig middelaldrene og eldre kvinner (Kapperud 2007). *Y. enterocolitica* kan formere seg i blod og blodprodukter ved kjølelagring, noe som kan føre til endotoksisk sjokk ved blodoverføring. Personer med yersiniose kan skille bakterien ut med avføringen i lang tid etter sykdommen, og smitte andre både gjennom avføring og via blod ved blodgiving (Kapperud 2007).

2.6.6. Utbrudd

Hvert år får folkehelseinstituttet melding om 50 – 150 tilfeller av yersiniose. Vanligvis er 20 – 40 % smittet utenlands. *Y. enterocolitica* ligger på fjerdeplass blant årsakene til bakterielt betinget diaré sykdom i Norge (Nygård et al. 2010). Antall meldte tilfeller til MSIS har gått litt ned de siste årene, fra 133 tilfeller i år 2000, til 60 tilfeller i 2009 (Folkehelseinstituttet 2010).

I januar 2006 ble det meldt et høyt antall tilfeller av yersiniose i Norge. Undersøkelser viste at det omhandlet *Y. enterocolitica* O:9, en relativt sjelden serogruppe i Norge. I tillegg var de meldte tilfellene over et lite geografisk område, og i en liten tidsperiode, som indikerte et utbrudd. Seks isolater ble påvist i avføring, og to i blodkulturer fra personer i Tønsberg og Stokke i Vestfold. I tillegg ble tre isolater isolert fra pasienter i Østfold (Stenstad et al. 2007). Utbruddet var det første rapporterte i Norge forårsaket av *Y. enterocolitica* O:9. Smittekilden ble antatt å være sylte, selv om humanpatogene stammer ikke ble funnet i næringsmiddelet (Stenstad et al. 2007).

I Oppland i julen 2006 var *Y. enterocolitica* O:3 årsak til utbrudd i et juleselskap. Fire av ti personer i selskapet ble syke, hvorav noen med langvarige bivirkninger. Smittekilden ble funnet å være hjemmelaget sylte. Ved sylteproduksjon er en av hovedingrediensene hodekjøtt fra svin, hvor smitten sannsynligvis kom fra (Folkehelseinstituttet 2009).

3. MATERIALER OG METODER

Forsøkene ble utført på mikrobiologisk laboratorium og klasse III patogent laboratorium ved Nofima Mat AS, Ås.

3.1. Bakteriestammer

I dette forsøket ble det benyttet fem ulike bakteriearter (*Bacillus cereus*, *B. weihenstephanensis*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* og *Yersinia enterocolitica*). I første forsøk ble to stammer av hver bakterieart benyttet, unntatt for *Bacillus*, der det ble undersøkt en *B. cereus* og en *B. weihenstephanensis*. I gjentaket ble det valgt ut en stamme av hver bakterieart, og *B. cereus* ble ikke inkludert. En oversikt over de ulike stammene som ble benyttet vises i tabellen under. Tabell 3.1 viser også hvilke av bakteriestammene som er tidligere utbruddsstammer. Disse bakterieartene ble valgt fordi de kan forekomme på varmebehandlede kjøttprodukter, og kan vokse ved relativt lave temperaturer

Tabell 3.1. Oversikt over bakteriestammene benyttet i forsøket.

Bakterie	Stamme	Utbrudd	Toksin	Referanse
<i>Bacillus cereus</i>	F3605/73	Stekt ris 1971 (Mortimer 1974)	Cerulide	a)
<i>Bacillus weihenstephanensis</i>	MC67	Isolert fra leirjord i Danmark (Hendriksen et al. 2006)	Cerulide	a)
<i>Listeria monocytogenes</i>	ILSI #36	Pølser 1998- 1999 (Report 1999)		e)
<i>Listeria monocytogenes</i>	MF2184	Kjøttpålegg Trøndelag 1992 (Folkehelseinstituttet 1992)		d)
<i>Staphylococcus</i>	50089	Geitost 2001	Enterotoksin	b)

<i>aureus</i>		(Folkehelseinstituttet 2003)	A	
<i>Staphylococcus aureus</i>	50583	Pizza	Enterotoksin B	b)
<i>Yersinia enterocolitica</i>	1106-0094-1 O:9	Sylte (Øst- og Vestfold, 2006)		c)
<i>Yersinia enterocolitica</i>	1106-0129-1 O:3	Hjemmelaget sylte (Oppland, 2006)		c)

a): Senter for mattrygghet ved Norges Veterinærhøgskole i Oslo

b): Veterinærinstituttet, Oslo, Norge

c): Folkehelseinstituttet

d): Fagsenteret for kjøtt

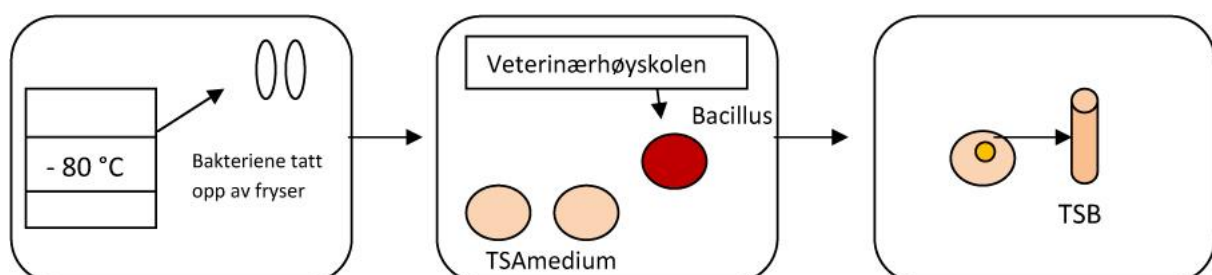
e): International Life Sciences Institute North America, (Fugett et al. 2006)

3.1.1. Oppbevaring og oppdyrking av bakterier

L. monocytogenes, *Y. enterocolitica* og *S. aureus* ble oppbevart i 20% glycerol i BHI (Brain Heart Infusion, Oxoid, England) ved -80°C (Thermo Fisher Scientific Inc, Danmark). En pødeøse ble sådd ut på TSA (Tryptone Soya Agar) og inkubert natten over ved 30°C .

Kulturer for dyrkingsforsøk ble laget ved å plukke 3 – 5 store kolonier, inokulere i 5 ml TSB (Tryptone Soya Broth) og inkubere med risting (rørene med *L. monocytogenes* ble inkubert uten risting) ved 30°C natten over, eller til det ble observert god vekst i rørene. Videre i oppgaven betegnes denne kulturen som overnattkultur.

Bacillus -stammene ble hentet på Senter for Mattrygghet ved Norges Veterinærhøgskole i Oslo. Disse var sådd ut på blodagar, og ble inokulert i 5 ml TSB, deretter inkubert med risting ved 30°C natten over eller til god vekst i rørene.



3.2. Medier

Oppskriftene til de ulike mediene benyttet i forsøket er beskrevet i vedlegg 1. Alle mediene ble sterilisert ved autoklaving, ved 121 °C i 15 minutter. Autoklavingen foregikk ved bruk av autoklav (Getinge, Sverige) eller certoklav (CertoClav GmbH, Østerrike). Ferdige agarskåler (Plastics Gosseling, Frankrike) ble lagret på kjølerom ved 4 °C. Ferdig buljong ble lagret ved romtemperatur. Vannet benyttet til mediene var destillert (ELGA Labwater, Bucks, Storbritannia).

Mediene benyttet i forsøket var

- Brain Heart Infusion (BHI, Oxoid, England)
- Standard Plate Count Agar (PCA, Oxoid, England)
- Tryptone Soya Agar (TSA, Oxoid, England)
- Tryptone Soya Broth (TSB, Oxoid, England)

3.3. Løsninger

Ingredienser og fremgangsmåte for løsningene benyttet i forsøket er beskrevet i vedlegg 1. Løsningene ble oppbevart i kjøleskap ved 4 °C dersom ikke annet er nevnt.

Benyttede løsninger under forsøket:

- Peptonvann
- Tween 80, 0,2 % (Sigma- Aldrich, USA)

Det ble benyttet sterilisert destillert vann til Tween 80. Peptonvann ble sterilisert ved autoklaving ved 121 °C i 15 minutter.

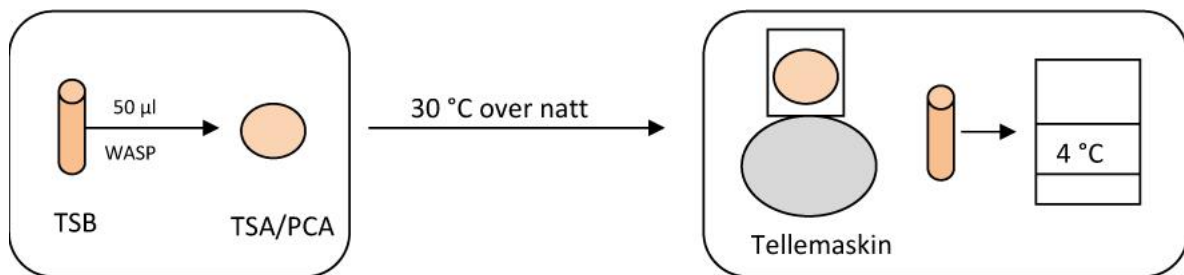
3.4. Vekstforløp i suspensjon ved konstant temperatur

Det ble utført forsøk med vekst i buljong ved kontinuerlig temperatur. Forsøket ble utført for å sammenlikne resultatene med kontrollskålene (0 timer) i vekstforsøket. I forsøket ble de samme bakteriestammene som i vekstforsøket på agaroverflate benyttet. *B.cereus*, *B. weihenstephanensis*, *L. monocytogenes* og *Y. enterocolitica* ble inkubert ved 4 °C, mens *S. aureus* ble inkubert ved 8 °C, da disse vokser dårlig ved lavere temperatur, basert på

forforsøk. Forsøket foregikk over 11 dager. *L. monocytogenes* ble behandlet på klasse III patogenlaboratorie ved Nofima Mat AS, Ås. Den ble behandlet på samme måte som de andre bakteriene, men ble telt på en annen automatisk teller (aCOLyte, Synbiosis, Storbritannia).

3.4.1. Opparbeidelse av bakteriekultur og bestemmelse av celletall

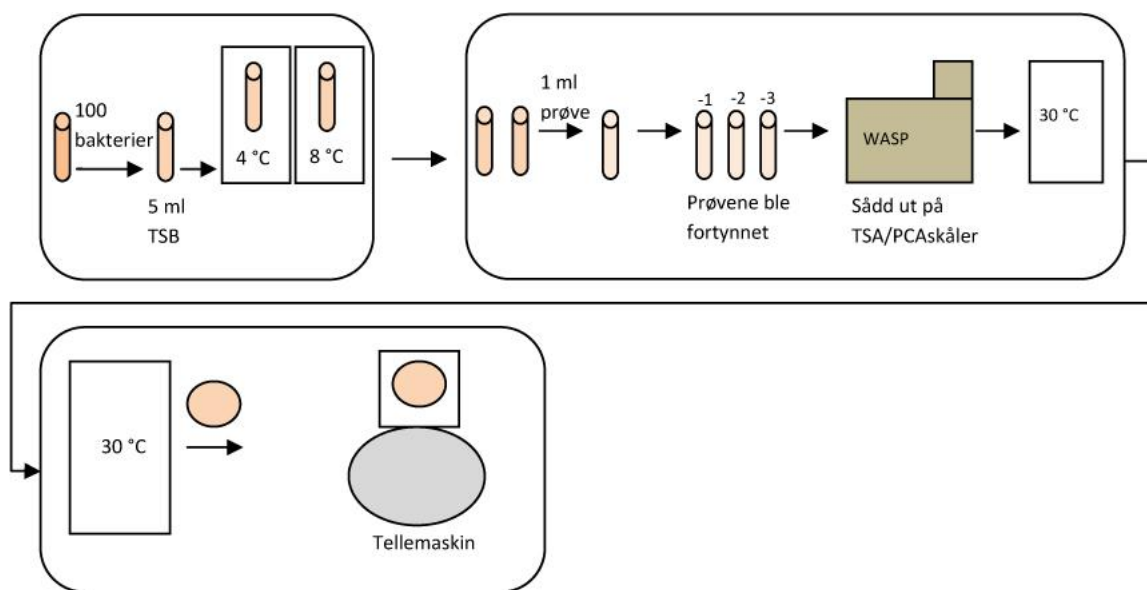
Bakteriekulturene ble opparbeidet i henhold til kapittel 3.1.1. Oppbevaring og opptak av bakterier. Overnattkulturene ble sådd ut på skåler med TSA for å bestemme celletallet. *Bacillus spp.* ble sådd ut på PCA fordi utsæd på TSA gav store, utflytende kolonier som var vanskelige å telle. PCA ble benyttet for *Bacillus spp.* under hele forsøket. Skålene ble inkubert ved 30 °C, og bakterietall (kde per ml) bestemt ved å bruke en automatisk plateteller (Protocol 2, Synbiosis, Storbritannia). Celletallet ble kontrollert ved gjentak av utsæd på henholdsvis TSA og PCA.



Etter bestemmelse av celletall ble bakteriekulturen fortynnet med peptonvann til 10^3 bakterier. 100 µl suspensjon ble inokulert i 5 ml TSB. Disse ble inkubert ved henholdsvis 4 og 8 °C.

3.4.2. Bestemmelse av celletall i suspensjon

Hver dag ble prøver tatt ut fra alle bakteriekulturene. Disse ble fortynnet og sådd ut på henholdsvis TSA- og PCA-skåler ved bruk av automatisk spiralutplater (Whitley Automatic Spiral Plater WASP, Don Whitley Scientific Limited, Storbritannia). Videre i oppgaven omtales denne som WASP. WASPen sår 50 µl bakteriesuspensjon automatisk ut i en spiral, koloniene telles dermed enkelt ved hjelp av tellemaskin. Skålene ble inkubert ved 30 °C til neste dag, hvor de ble telt. Tellingene foregikk ved bruk av automatisk tellemaskin, som oppgir kolonidannende enheter (kde) per ml.



3.5. Etablering av metode for bestemmelse av celletall på agaroverflate

Innledende forsøk med mikroskopering ble utført for å se om bakteriene dannet aggregater ved vekst på agaskåler, og om disse løste seg opp ved skylling med peptonvann.

Mikroskoperingen viste at særlig *Bacillus spp* dannet aggregater. I og med ett aggregat vil gi en koloni, vil aggregering føre til for lavt estimat for bakterieantall ved overflateutsæd.

Sonikering ble derfor utprøvd som et supplement til skylling av agarskålene.

Aggregater kan løses opp fysisk, for eksempel med ultralyd (sonikering) eller en detergent. Tween 80 er tidligere benyttet som detergent, og ble foreslått som et alternativ til sonikering. Et lite forsøk ble utført for å sammenlikne effekten av Tween 80, sonikering og peptonvann med hensyn på bakterieantall. Tween 80 (0,2 %) ble benyttet på samme måte som peptonvann, med skylling av bakterier fra agarskål. Ved sonikering ble skålene skylt med peptonvann, deretter behandlet i ultralydbad (Branson, VWR International, USA) i ti minutter ved 4 °C. Resultatene påviste ingen forskjell mellom sonikering og skylling med Tween 80 (0,2 %) for *Bacillus spp*. Skylling med Tween 80 ble dermed valgt i stedet for sonikering fordi det er enklere, og krever mindre utstyr (som for eksempel sonikeringsbad).

3.6. Vekstforløp på agaroverflate ved varierende temperatur

I dette forsøket ble vekst på agarskåler undersøkt. Skålene ble inkubert ved 4 og 8 °C, *S. aureus* ble inkubert ved 8 og 12 °C. Skålene ble tatt ut fra kjøleinkubator daglig (fra ett opptil 10 døgn) og inkubert ved 25 °C i henholdsvis 30 minutter, en time og to timer.

Kontrollskålene stod ved den aktuelle temperaturen gjennom hele forsøksperioden. Forsøket ble utført to ganger.

3.6.1. Bestemmelse av celletall

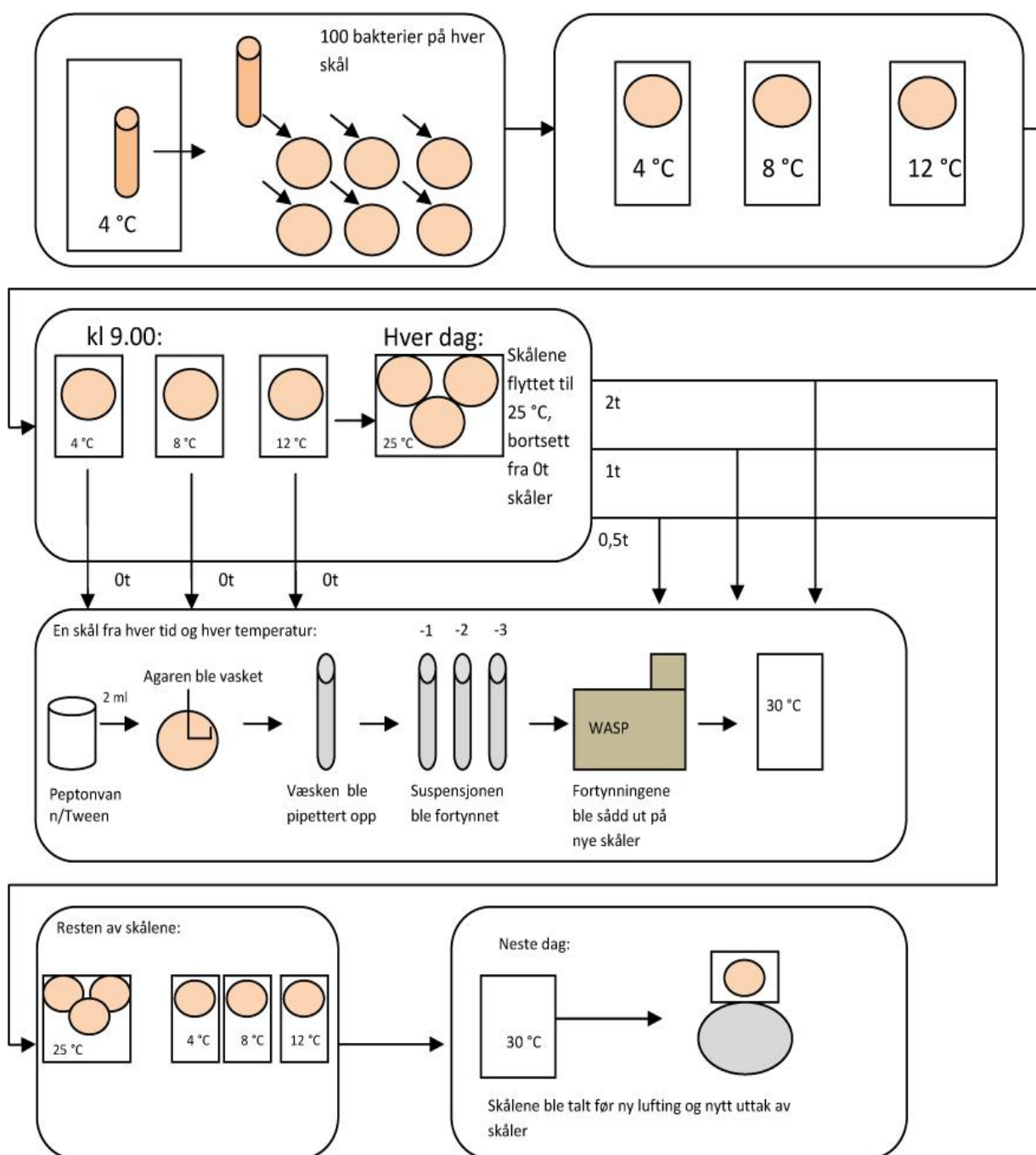
Overnattkulturene etter oppdyrking av bakteriene (kapittel 3.1.1.) ble sådd ut på skåler med TSA/PCA for å bestemme celletallet. PCA ble benyttet for *Bacillus spp.* under hele forsøket. Skålene ble inkubert ved 30 °C og talt på tellemaskinen.

Kulturene stod en natt ved 4 ° i påvente av bestemmelse av celletall, og for kuldetilvenning. Celletallet ble kontrollert ved gjentak av utsæd på henholdsvis TSA og PCA.

Cellekulturene ble fortynnet til 10^3 celler per ml, hvorav 100 µl ble sådd ut fra denne. Bakteriene ble sådd ut ved manuell overflatespredning, og inkubert ved 4, 8 og 12 °C.

3.6.2. Bestemmelse av celletall på agarskåler

Daglig ble prøveskåler tatt ut for bestemmelse av celletall. Bakterier på skålene ble skylt av med 2 ml kaldt peptonvann, ved bruk av hockeystav (VWR International, USA) og deretter pipetert over i et reagensrør. Kaldt peptonvann ble benyttet for at veksten skulle stoppe, og at *Bacillus spp* ikke skulle lysere. ”Vaskevannet” ble deretter fortynnet med peptonvann, basert på celletall fra dagen før, og sådd ut for telling ved bruk av WASP. Skålene ble inkubert ved 30 °C til neste dag, hvor de ble talt på tellemaskin.



3.6.3. Bestemmelse av toksindannelse

Samtidig med utsæd av skåler til vekstforsøket, ble skåler til toksinprøvene sådd ut. Disse fikk samme behandling, med uttak av kjøleinkubator til 25 °C daglig, som i vekstforsøket.

B. cereus og *B. weihenstephanensis* emetisk toksin

Metoden benyttet er modifisert fra Thorsen et al. 2009. Prøvene ble preparert fortløpende etter uttak. 1g autoklaverte glasskuler (2 mm) ble tilsatt 15 ml sentrifugerør (VWR International,

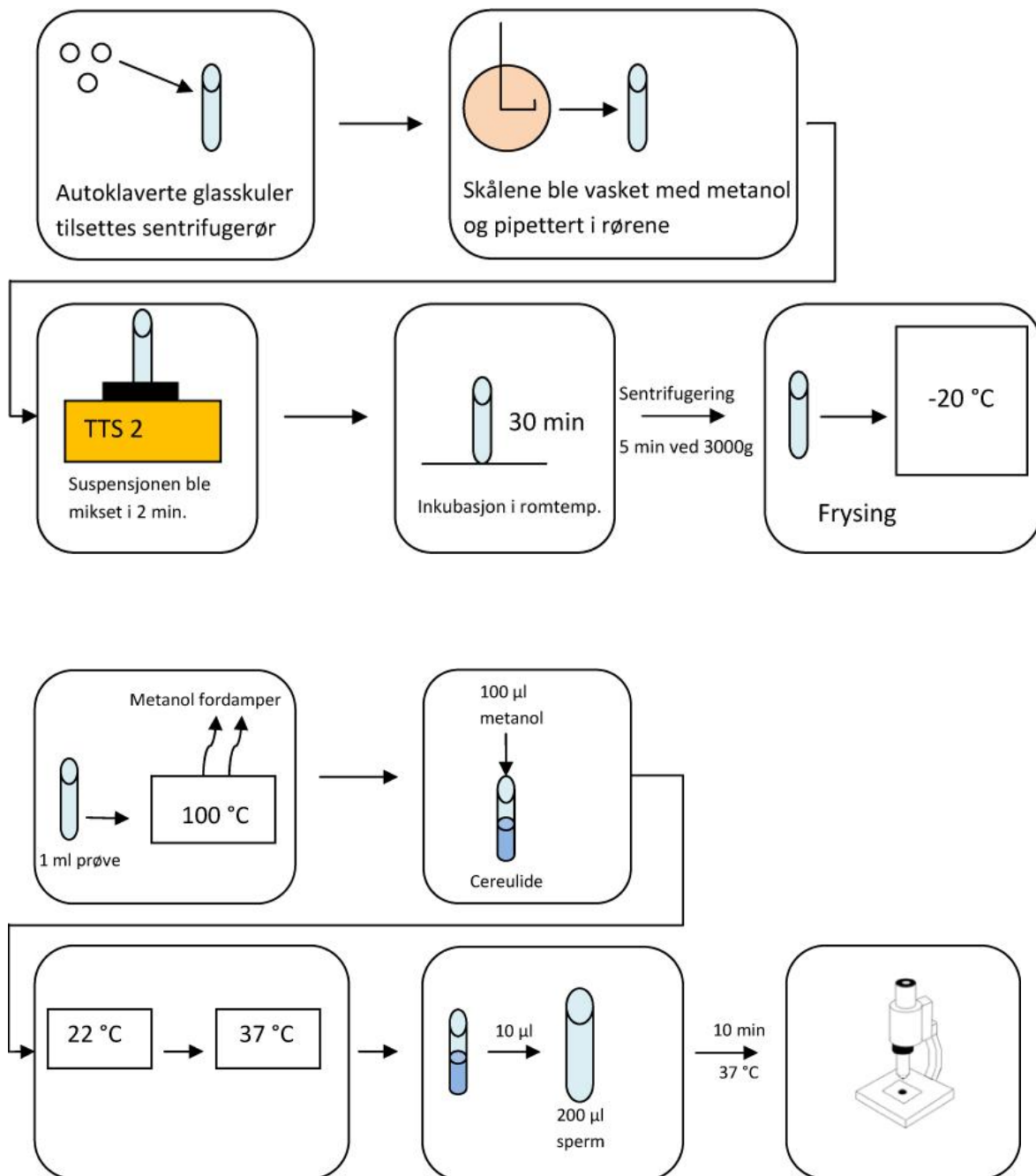
USA). Uttaksskålene ble vasket med 2 ml metanol (99,9 %, Merck KGaA, Tyskland), og væsken ble pipettert opp i røret. Deretter ble suspensjonen mikset i to minutter ved bruk av Wortexmikser (TTS2, IKA Works, Inc, USA). Glasskulene ble benyttet for å knuse cellene under miksing, fordi toksinene finnes i biomassen (Thorsen et al. 2009). Rørene ble inkubert i 30 minutter ved romtemperatur for at toksinene skulle diffundere fra cellene ut i væskefasen. Etter inkubering ble suspensjonen sentrifugert (Sorvall RC 5C+, Sorvall) i fem minutter ved 3000g. Supernatanten ble pipettert over i nye rør, og frosset ned ved -20 °C til analysedagen.

Analysen av emetisk toksin fra *B. cereus* og *B. weihenstephanensis* foregikk ved Senter for Mattrygghet, Norges Veterinærhøgskole i Oslo. Prøvene ble undersøkt for positivt/negativt resultat ved bruk av svinesperm (Metode 137, Norges veterinærhøgskole).

Prøvene ble kokt ned for å oppkonsentrere eventuelt produsert cereulide. 1 ml av prøven ble satt i kokende vannbad (100 °C) i avtrekkskap, hvor metanolen fordampet. Preformert cereulide fordamper ikke, og ble deretter løst i 100 µl metanol.

Til analysen ble rånesæd fra Norsvin benyttet. Den skal benyttes innen fem dager etter mottak, og ble oppbevart ved 22 °C før bruk. Svinespermen, pipettespisser og objektglass ble forvarmet til 37 °C for at ikke spermene skulle dø. 10 µl bakterieekstrakt ble tilsatt 200 µl sperm. Blandingen ble inkubert i 10 minutter ved 37 °C. Fasekontrastmikroskop (Olympus BX51, Tyskland, med varmeplate Thermo plate Tokai Hit, Olympus, Japan) ble benyttet for å se etter bevegelse. 20 µl av den inkuberte suspensjonen ble pipettert på objektglass, og dekkglass ble lagt over.

Ved ubevegelige sædceller ansees prøven som mulig positiv.



S. aureus enterotoksiner

Prøvene ble preparert fortløpende etter prøveuttak. Agarskålen og en tom petriskål ble veid for å finne vekten av agaren. Agaren ble sluppet ned i en stomacherpose (BagFilter[®], Interscience, Frankrike) ved hjelp av en podenål (nunc[™], Thermo Fischer Scientific, Danmark), og tilsatt oppvarmet destillert vann, hvor mengden tilsvarte agarens vekt. Blandingen ble homogenisert i stomacher (Colworth Stomacher 400, modell nummer BA6021, Storbritannia) i 60 sekunder. Stomacherposen ble deretter inkubert i vannbad ved 50

°C (GFL, type 1004, Tyskland) i 30 minutter for at toksinene skulle diffundere fra agaren ut i væskefasen. Vannbad ved 50 °C ble benyttet for at agaren ikke skulle stivne under prosessen. Etter 30 minutter ble suspensjonen overført til store sentrifugerør, og sentrifugert i 15 minutter ved 5000g. Etter sentrifugering ble supernatanten pipettert av og frosset ved -20 °C til analysedagen.

For påvisning av enterotoksiner til *Staphylococcus aureus* ble ”TRANSIA[®] PLATE Staphylococcal Enterotoxins, ST 0796” fra Biocontrol benyttet. Dette er et ELISA-basert sett som detekterer enterotoksin A, B, C, D og E (Biocontrol ; Hennekinne et al. 2007). Settet er validert for benyttelse som kontroll i EU. Det dannes et immunkompleks mellom i) antistoffene, ii) toksinene i den konsentrerte prøven og iii) toksinenes antistoffer konjugert med peroxidase (Hennekinne et al. 2007).

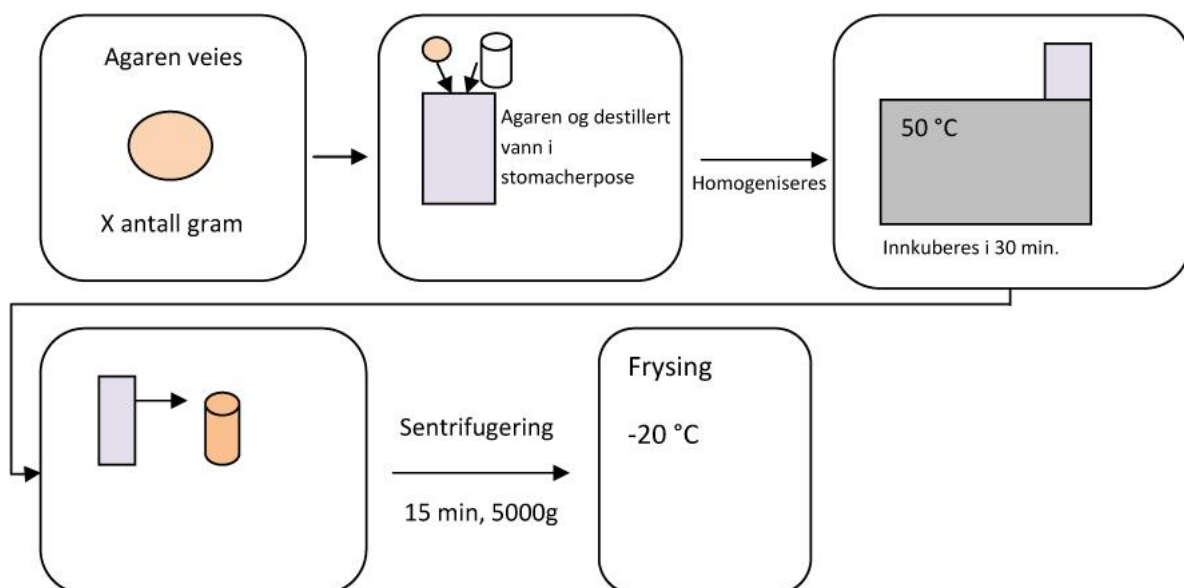
Supernatanten ble tint i romtemperatur før analysen, og sterilfiltrert med porestørrelse 0,45 µm (VWR International, USA). 900 µl ble deretter overført til mikrosentrifugerør (VWR International, USA), og tilsatt 100 µl kaninserum. Kaninserumet hemmer protein A, som i noen tilfeller kan gi falske positive resultater (Biocontrol ; Hennekinne et al. 2007). Negativ kontroll ble laget ved å blande 900 µl TSB og 100 µl kaninserum. Den negative kontrollen benyttes til å kalkulere positiv grenseverdi (Biocontrol). Prøvene ble deretter homogenisert ved bruk av Wortexmikser, og inkubert i 30 minutter ved romtemperatur. Vaskebuffer ble laget under inkuberingen, slik at alle reagenser var ferdige til analysens start. Reagens 3 ”vaskebuffer” ble blandet med destillert vann i forhold 1:20, totalt 1,2 liter ferdigblandet vaskebuffer. Etter inkubering ble prøvene justert med pH-papir (Merck KGaA, Tyskland) til pH 7,0-7,5.

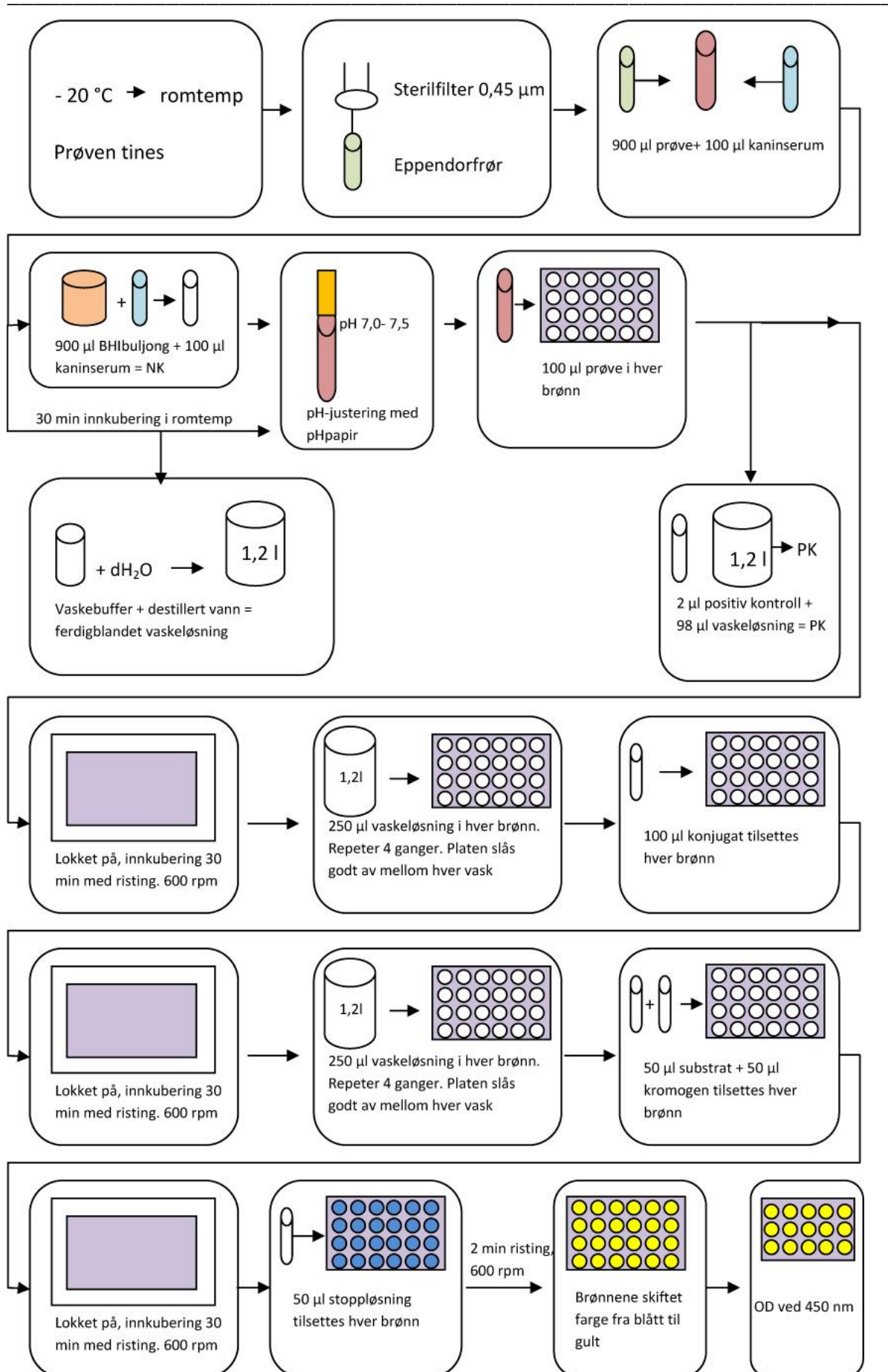
Alle reagensene benyttet i analysen ble temperert i romtemperatur, og ristet godt på forhånd. Ønsket antall striper med brønner ble festet til platen, og merket med prøvenummer. 100 µl av hver prøve, inkludert negativ kontroll, ble tilsatt de ulike brønnene. Positiv kontroll ble laget rett i brønnen ved blanding av reagens 2 ”positiv kontroll” og ferdigblandet vaskeløsning i forhold 1:20, det vil si 98 µl vaskeløsning og 2 µl ”positiv kontroll”. Positiv kontroll ble blandet ved pipettering opp og ned i brønnen. Hansker ble benyttet ved håndtering av positiv kontroll. Lokket ble satt på prøveplaten og inkubert i romtemperatur med risting (TTS 3, IKA Works Inc, USA), på 600 rpm i 30 minutter. Etter inkubering ble innholdet ristet ut i en

autoklavpose, og brønnene ble vasket med 250 μl vaskebuffer i hver brønn. Vaskingen foregikk med multipipette (Biohit[®] proline, BIOHIT, Finland) og hard stråle mot bunnen av brønnen. Platen ble satt til risting i 10 sekunder for å sikre tilstrekkelig vasking. Deretter ble vaskeløsningen slått av platen. Vaskingen ble gjentatt 4 ganger.

Etter vask ble hver brønn tilsatt 100 μl reagens 4 ”konjugat”, som ble blandet forsiktig med en sirkulær bevegelse. Lokket ble satt på platen, og inkubert i 30 minutter ved romtemperatur med risting (600 rpm). Etter inkubering ble innholdet i brønnene ristet ut i en autoklavpose. Deretter ble brønnene vasket på samme måte som tidligere, totalt fem ganger. 50 μl reagens 5 ”substrat” og 50 μl reagens 6 ”kromogen” ble tilsatt hver brønn ved bruk av multipipette. Prøveplaten ble deretter inkubert ved romtemperatur i 30 minutter med risting (600 rpm). Etter inkubering ble 50 μl reagens 7 ”stoppløsning” tilsatt hver brønn, i samme rekkefølge som substratet, og blandet ved to minutters risting (600 rpm). Tilsetting av ”stoppløsning” gjorde brønnene blå, etter risting skiftet de farge til gult. Absorbansen ble målt ved hjelp av spektrofotometer (Titertek Multiskan Plus MK II, Titertek Instruments Inc. Huntsville, USA) med bølgelengde 450 nm.

For at analysen skal være gyldig, må den optiske tettheten til den positive kontrollen være større enn eller lik 0,50. Den optiske tettheten til den negative kontrollen må være lavere eller lik 0,30. Terskelen for positivt resultat ble regnet som den optiske tettheten til den negative kontrollen + 0,10. Prøven ble regnet som positiv for enterotoksin dersom den optiske tettheten til den aktuelle prøven var større enn eller lik terskelen for positivt resultat.





3.7. Statistisk analyse

Resultatene ble satt inn i excel og det ble laget vekstkurver. Resultatene ble beregnet ytterligere i Minitab. Bakterienes veksthastigheter ble beregnet ved hjelp av regresjonsanalyse, hvor veksthastigheten er kurvens stigningstall. Regresjonslinja ble beregnet fra et utvalg målinger i den eksponensielle vekstfasen. Regresjonsanalysen gav likningen $Y=ax+b$, hvor a er stigningstallet til regresjonslinja, x er antall dager, b er konstant og Y er log antall bakterier. P- verdien til stigningstallet viste om bakterien vokste, det vil si om veksten var forskjellig fra 0. For at veksten skulle være signifikant forskjellig fra 0 var $p<0,05$.

Likningen ble videre benyttet til utregning av bakterienes tilvenningsfase. Tilvenningsfasen er tiden til $Y=2$, fordi det ble inokulert 10^2 bakterier. $2= ax+b$, $x=(2-b)/a$. Negativt resultat ble ansett som at bakteriene ikke hadde noen tilvenningsfase.

Bakteriestammene benyttet i gjentakforsøket ble undersøkt om de vokste raskere ved henholdsvis 30 minutter, én time og to timer daglig i romtemperatur enn ved konstant kjøletemperatur. Paret t-test ble benyttet, hvor stigningstallene fra forsøk 1 og 2 ble sammenliknet med stigningstallene til en av de andre inkubasjonstidene. Det var hensiktmessig å sammenlikne to timer daglig ved 25 °C med konstant temperatur til å begynne med. Dersom sammenlikningen ikke var signifikant, var det ikke behov å kontrollere de andre. Veksten var signifikant forskjellig dersom $p<0,05$.

Tilvenningsfasene ble undersøkt på samme måte som stigningstallene, for å kontrollere om det var signifikant forskjell mellom de ulike inkubasjonstidene ved 25 °C og ved konstant temperatur.

4. RESULTATER

4.1. Vekstforløp i suspensjon ved konstant temperatur

Utgangspunktet for denne modellen var startnivå på totalt 100 bakterier. Antall dager er dermed relatert til dette. Vekstforløpet i suspensjonene ble kontrollert ved daglige uttak. Figurene 4.1.1 – 4.1.8 viser vekstforløpet i suspensjon til de ulike bakteriene ved 4 °C. *S. aureus* ble inkubert ved 8 °C. Det ble ikke tatt ut prøve dag fem, og seks, heller ikke dag én i forsøk 1. Forsøk 1 pågikk i 11 dager, mens forsøk 2 pågikk i åtte dager.

4.1.1. *Bacillus cereus* og *B. weihenstephanensis*

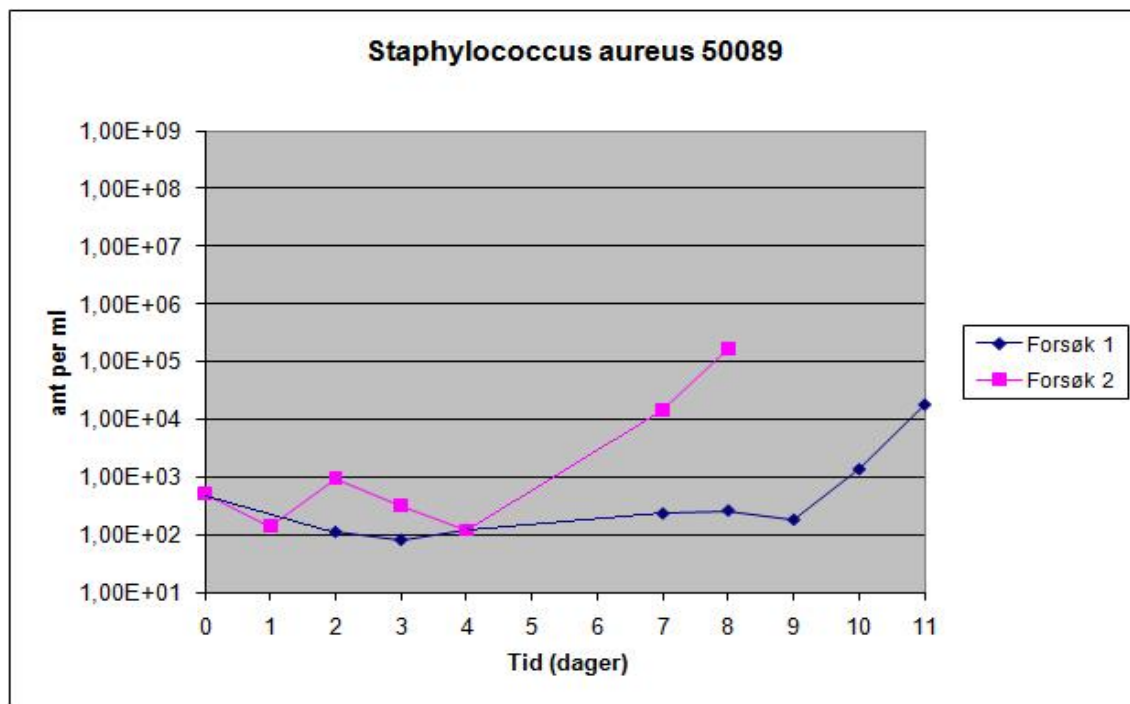
Det ble ikke påvist vekst av *B. cereus* eller *B. weihenstephanensis* i suspensjon ved 4 °C.

4.1.2. *Listeria monocytogenes*

L. monocytogenes- stammene viste svært liten vekst i suspensjon ved 4 °C. Frem til dag åtte ble det ikke påvist vekst, deretter svak vekst gjennom resten av forsøksperioden.

4.1.3. *Staphylococcus aureus*

Figurene 4.1.1 og 4.1.2 viser vekstkurvene til henholdsvis *S. aureus* 50089 og *S. aureus* 50583. Diagrammene viser vekstkurvene ved 8 °C for både forsøk 1 og 2.

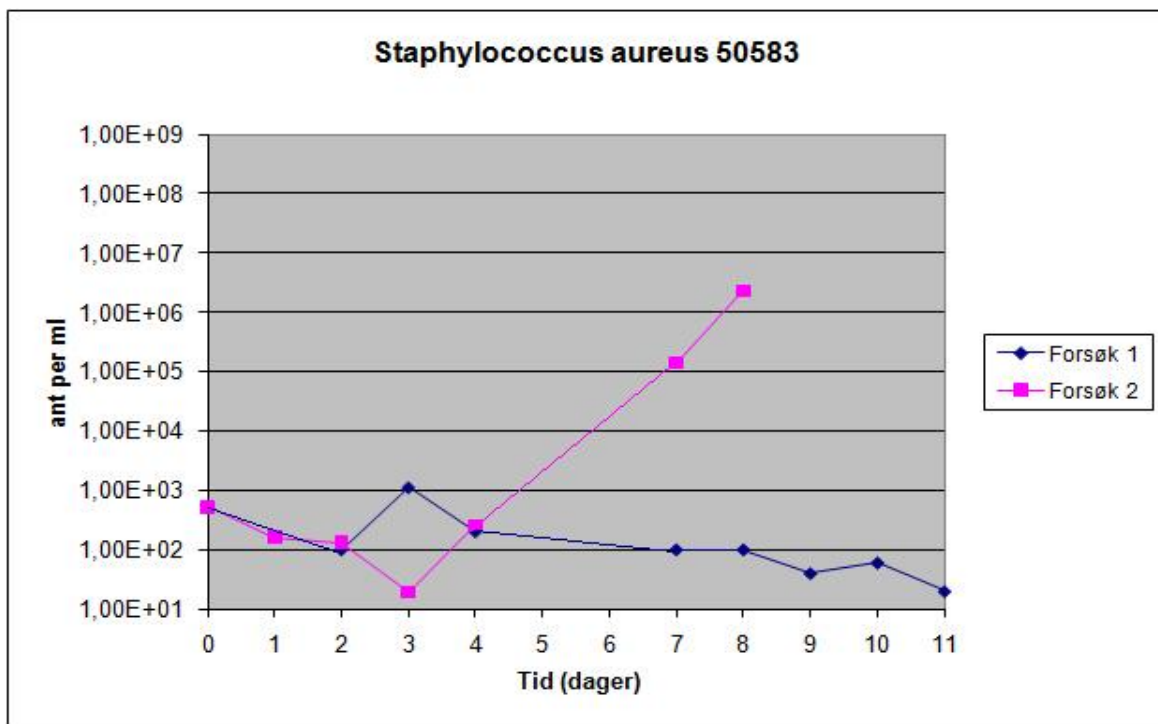


Figur 4.1.1. Vekstkurven til *S. aureus* 50089 ved 8 °C i logaritmisk skala. Blå linje indikerer forsøk 1, og rosa linje indikerer forsøk 2.

Vekstkurven til *S. aureus* 50089 viser at veksten startet etter dag ni i forsøk 1 og etter dag fire i forsøk 2.

Totalt celledtall var 10^4 bakterier etter 11 dager. Veksthastigheten var 1,0 log kde per døgn, med tilvenningsfase på 8,8 dager. Det ser ut til at bakteriene i forsøk 2 vokste like raskt, men at tilvenningsfasen var kortere. Fordi det mangler punkter for dag fem, og seks, er det vanskelig å si hvor lang denne fasen var.

For at det skal dannes toksin i mengder som kan gi intoksikasjon, må $10^5 - 10^8$ *S. aureus* finnes i matvaren (Bhunja 2008). Denne grensen ble ikke nådd i forsøk 1, og etter åtte dager i forsøk 2.



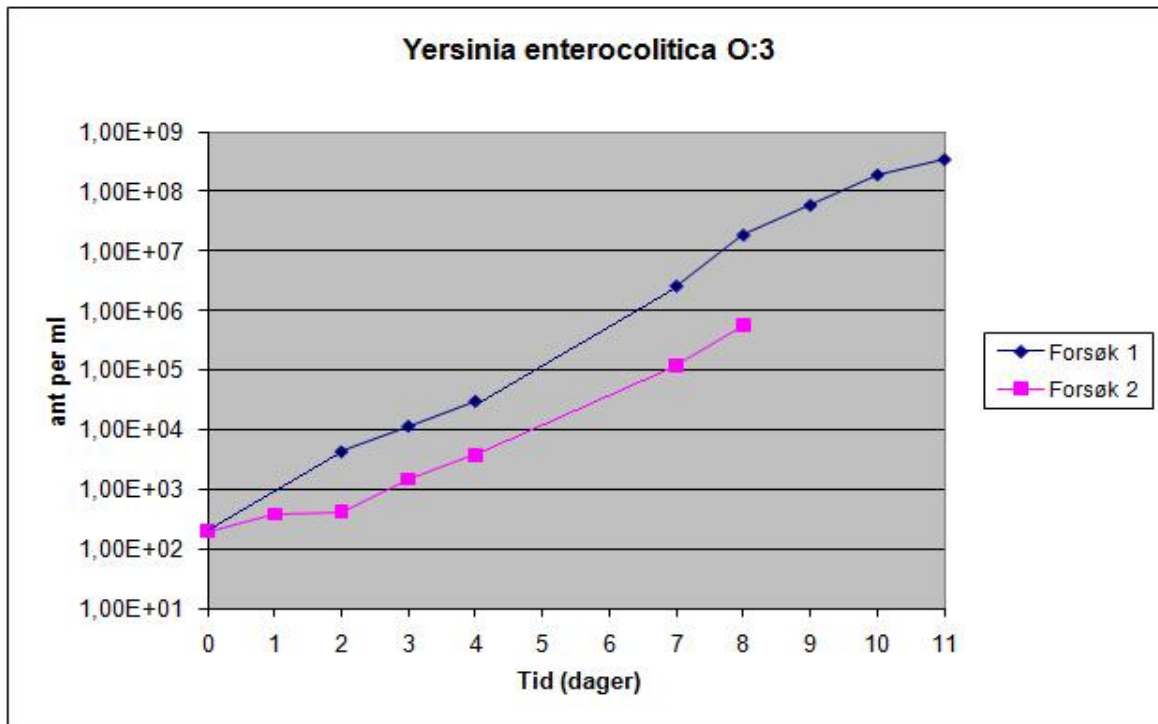
Figur 4.1.2. Vekstkurven til *S. aureus* 50583 ved 8 °C i logaritmisk skala. Blå linje indikerer forsøk 1, og rosa linje indikerer forsøk 2.

Figur 4.1.2. viser vekstkurven til *S. aureus* 50583. Det ble påvist svært liten vekst ved 8 °C i forsøk 1, mens bakteriene vokste med veksthastighet på 0,9 log kde per døgn i forsøk 2.

Tilvenningsfasen var 3,6 dager. Bakteriene nådde den infeksjose dosen etter sju dager i forsøk 2.

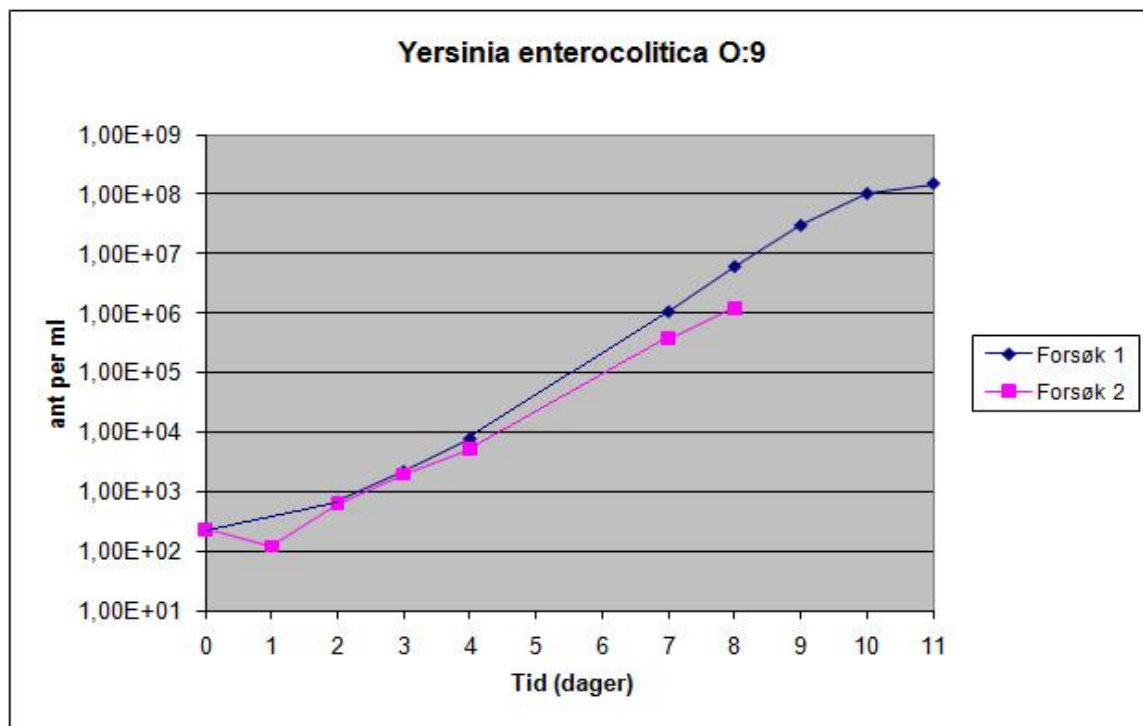
4.1.4. *Yersinia enterocolitica* O:3

Figurene 4.1.3 og 4.1.4 viser vekstkurvene til henholdsvis *Y. enterocolitica* O:3 og O:9.



Figur 4.1.3. Vekstkurven til *Y. enterocolitica* O:3 ved 4 °C i logaritmisk skala. Blå linje indikerer forsøk 1, og rosa linje indikerer forsøk 2.

Figur 4.1.3. viser god vekst for *Y. enterocolitica* O:3. Veksten (veksthastighet 0,6 log kde per døgn) avtok etter dag åtte. Celletallet var da i overkant 10⁷ bakterier. Den infektive dosen til *Y. enterocolitica* ansees å være 10⁷ – 10⁹ bakterier (Bhunia 2008). Totalt celletall var 10⁸ bakterier, noe som er over den infeksjose dosen. Det ble ikke påvist tilvenningsfase i forsøk 1. Forsøk 2 viser den samme tendensen, men hadde tilvenningsfase på 0,8 dager.



Figur 4.1.4. Vekstkurven til *Y. enterocolitica* O:9 ved 4 °C i logaritmisk skala. Blå linje indikerer forsøk 1, og rosa linje indikerer forsøk 2.

I figuren for *Y. enterocolitica* O:9 vises god vekst ved 4 °C, med veksthastighet på 0,7 log kde per døgn. Veksten avtok etter ti dager, med totalt celletall på 10^8 bakterier. Det er over den infektive dosen til *Y. enterocolitica* ($10^7 - 10^9$ bakterier). Tilvenningsfasen var 1,0 dager. Den samme tendensen vises for forsøk 2.

4.2. Vekstforløp på agaroverflate ved varierende temperatur

I dette forsøket ble bakterievekst på agaroverflater undersøkt. 10^2 bakterier ble sådd ut på hver skål, og ble inkubert ved 4, 8 og 12 °C. Skålene (bortsett fra kontrollskålene) ble daglig oppbevart ved 25 °C i henholdsvis 30 minutter, én time og to timer. Prøveskåler ble daglig tatt ut for kontroll av vekst.

4.2.1. Bestemmelse av celletall

Før utsæd til agarskåler ble konsentrasjonen til suspensjonen bestemt ved telling.

Suspensjonen stod én natt ved 4 °C for kuldeadapting, og celletallet ble kontrollert.

Celletallet med kontroll vises i tabell 4.2.1.

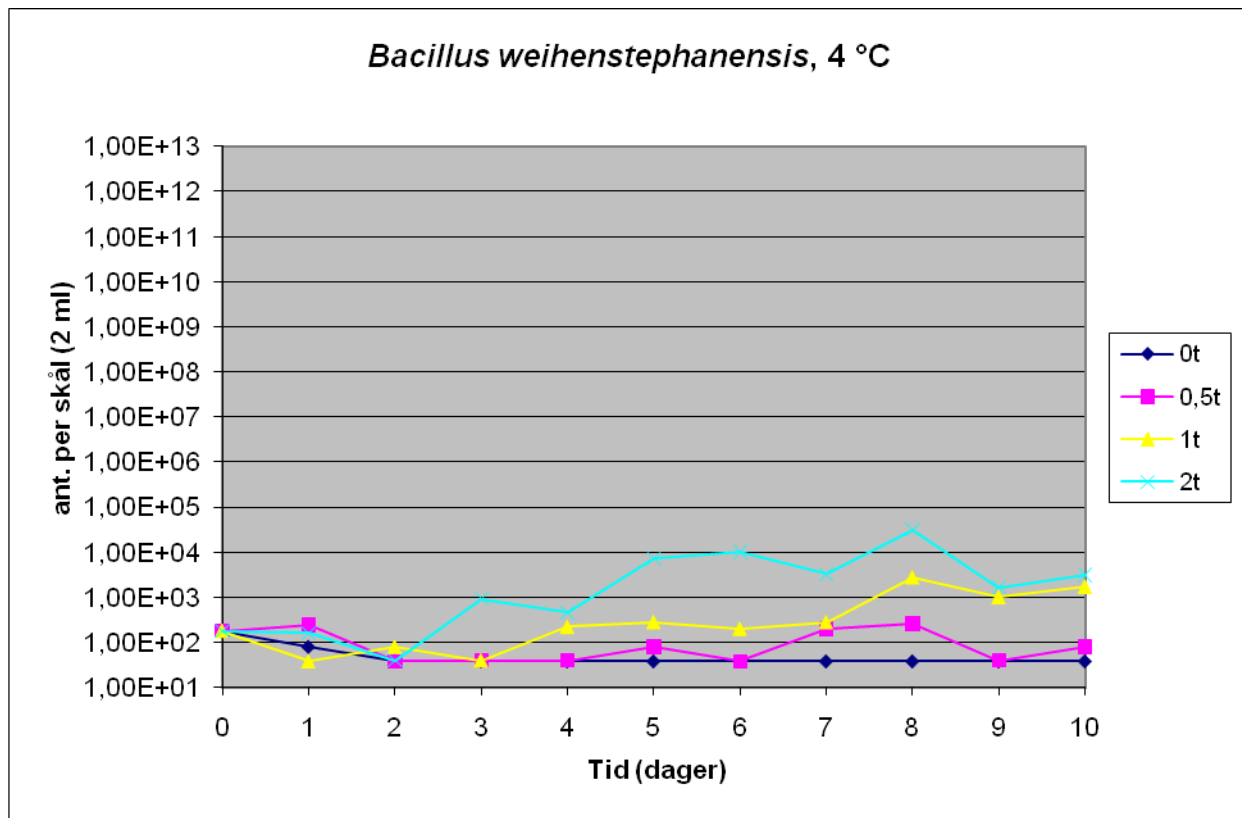
Tabell 4.2. 1. Celletallet til bakteriesuspensjonen sådd ut på skålene til vekstforsøket på agaroverflate ved varierende temperatur. Celletallet ble kontrollert neste dag, for å være forsikret om at konsentrasjonen ikke hadde endret seg i løpet av én natt ved 4 °C.

Bakterie	Celletall (per ml)	Kontroll celletall (per ml)
<i>Bacillus cereus</i>	4,4*10 ⁷	2,6*10 ⁷
<i>Bacillus weihenstephanensis</i> MC67	1,8 *10 ⁷	1,4*10 ⁷
<i>Listeria monocytogenes</i> ILSI #36	1,5*10 ⁹	1,2*10 ⁹
<i>Listeria monocytogenes</i> MF2184	1,4*10 ⁹	1,6*10 ⁹
<i>Staphylococcus aureus</i> 50089	5,0*10 ⁸	1,6*10 ⁹
<i>Staphylococcus aureus</i> 50583	5,2*10 ⁸	1,4*10 ⁹
<i>Yersinia enterocolitica</i> O:9	2,3*10 ⁹	2,5*10 ⁹
<i>Yersinia enterocolitica</i> O:3	2,0*10 ⁹	2,5*10 ⁹

Tabell 4.2.1 viser at celletallet ikke forandret seg vesentlig etter én natt ved 4 °C. *Y. enterocolitica* hadde det høyeste celletallet ved begge prøvetakinger, mens *B. weihenstephanensis* hadde det laveste.

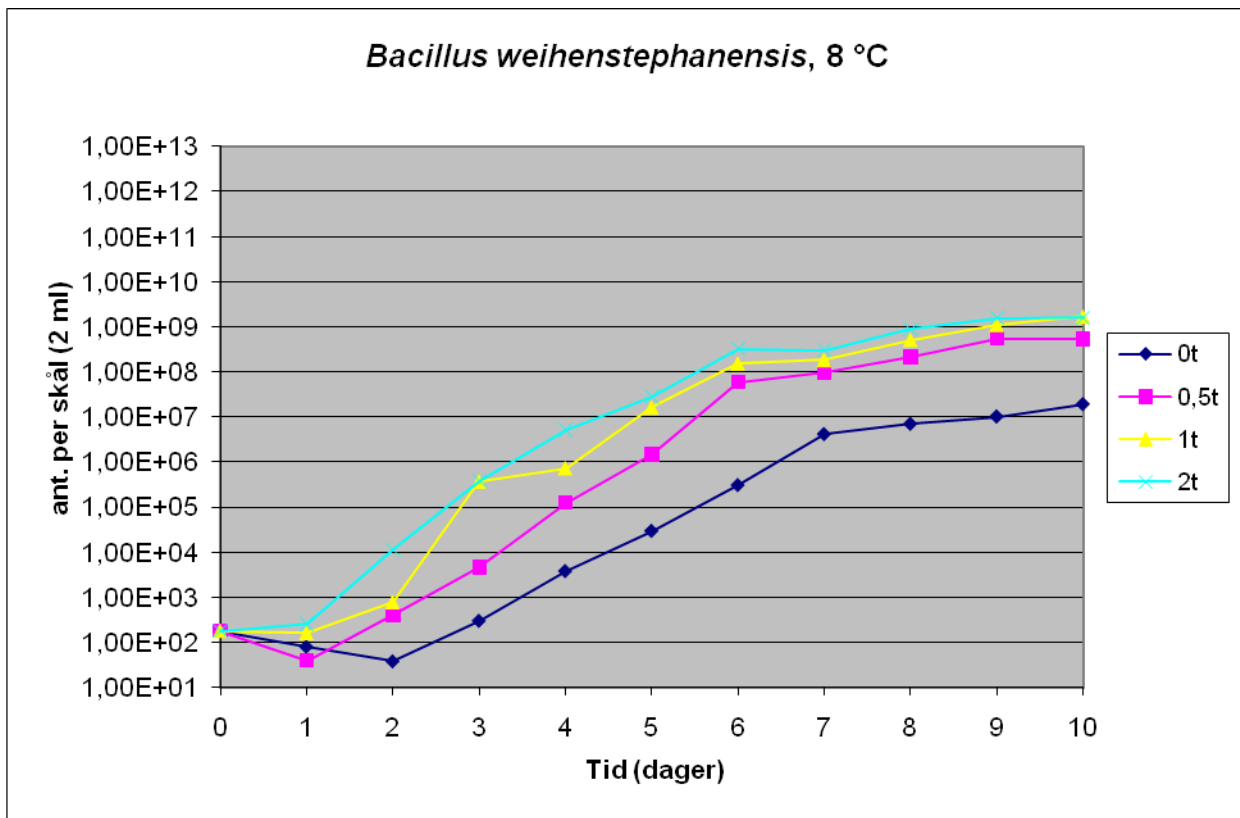
4.2.2. *Bacillus cereus* og *B. weihenstephanensis*

Vekstkurvene til *B. weihenstephanensis* vises i figur 4.2.1 og 4.2.2. Tween 80 ble benyttet som detergent. *B. cereus* viste ingen vekst ved verken 4 eller 8 °C. Resultatene til forsøk 2 vises i vedlegg 2.



Figur 4.2.1. Vekstkurven for *B. weihenstephanensis* ved 4 °C på logaritmisk skala. Blå linje indikerer 0t, dvs. konstant ved 4 °C, rosa linje indikerer 30 minutter daglig ved 25 °C, gul linje indikerer én time daglig ved 25 °C og turkis linje indikerer to timer daglig ved 25 °C.

Figur 4.2.1 viser at *B. weihenstephanensis* hadde liten vekst ved 4 °C. Bakteriene med to timer ved 25 °C vokste noe mellom dag tre og dag åtte, men ingen logaritmisk vekst. Ingen av kurvene nådde celletall opp mot den infeksjøs dose for *B. weihenstephanensis* (10^5 bakterier). *B. weihenstephanensis* viste også liten vekst i forsøk 2 ved 4 °C.



Figur 4.2.2. Vekstkurven for *B. weihenstephanensis* ved 8 °C på logaritmisk skala. Blå linje indikerer 0t, dvs. konstant ved 8 °C, rosa linje indikerer 30 minutter daglig ved 25 °C, gul linje indikerer én time daglig ved 25 °C og turkis linje indikerer to timer daglig ved 25 °C.

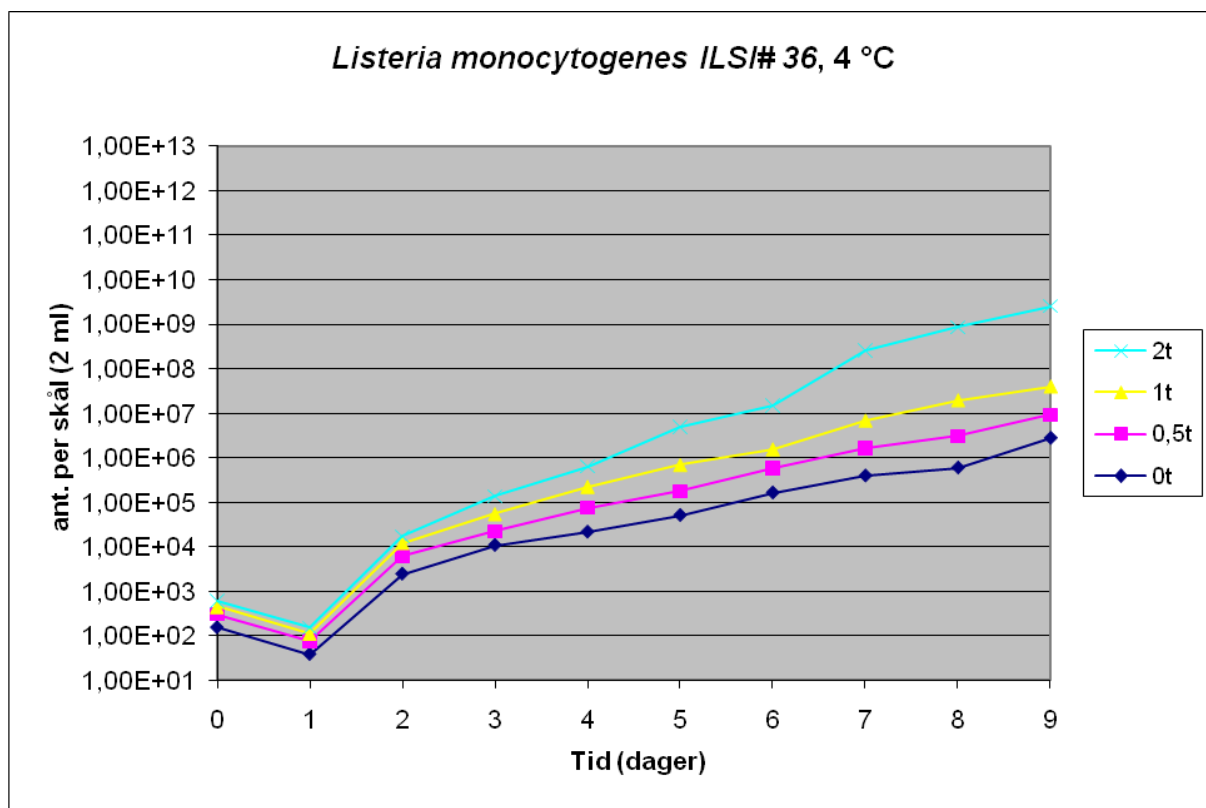
Ved 8 °C viser vekstkurven at bakteriene vokste godt. Figur 4.2.2 viser at bakteriene vokste litt raskere (veksthastighet 1,3, 1,2 og 1,1 log kde per døgn for 30 minutter, én og to timer) med inkubasjon ved 25 °C, med kortere tilvenningsfase enn ved konstant temperatur (veksthastighet 1,0 log kde per døgn). Tilvenningsfasen var 1,6 dager ved 30 minutter i romtemperatur, og to dager ved konstant temperatur. Bakteriene ved én og to timer i romtemperatur (25 °C) viste ingen tilvenningsfase. Totalt celletall var 10^7 bakterier ved konstant temperatur, og omtrent 10^9 for de andre bakteriene.

Alle bakteriene nådde 10^5 , som regnes som infektiv dose. Konstant lagring ved 8 °C gav 10^5 bakterier etter omtrent 5,5 dager, ved 30 minutter ved 25 °C, brukte bakteriene fire dager, omtrent 2,8 dager ved en time i romtemperatur, og 2,5 dager ved to timer ved 25 °C.

Vekstkurvene for forsøk 2 viste samme tendens (vedlegg 2).

4.2.3. *Listeria monocytogenes*

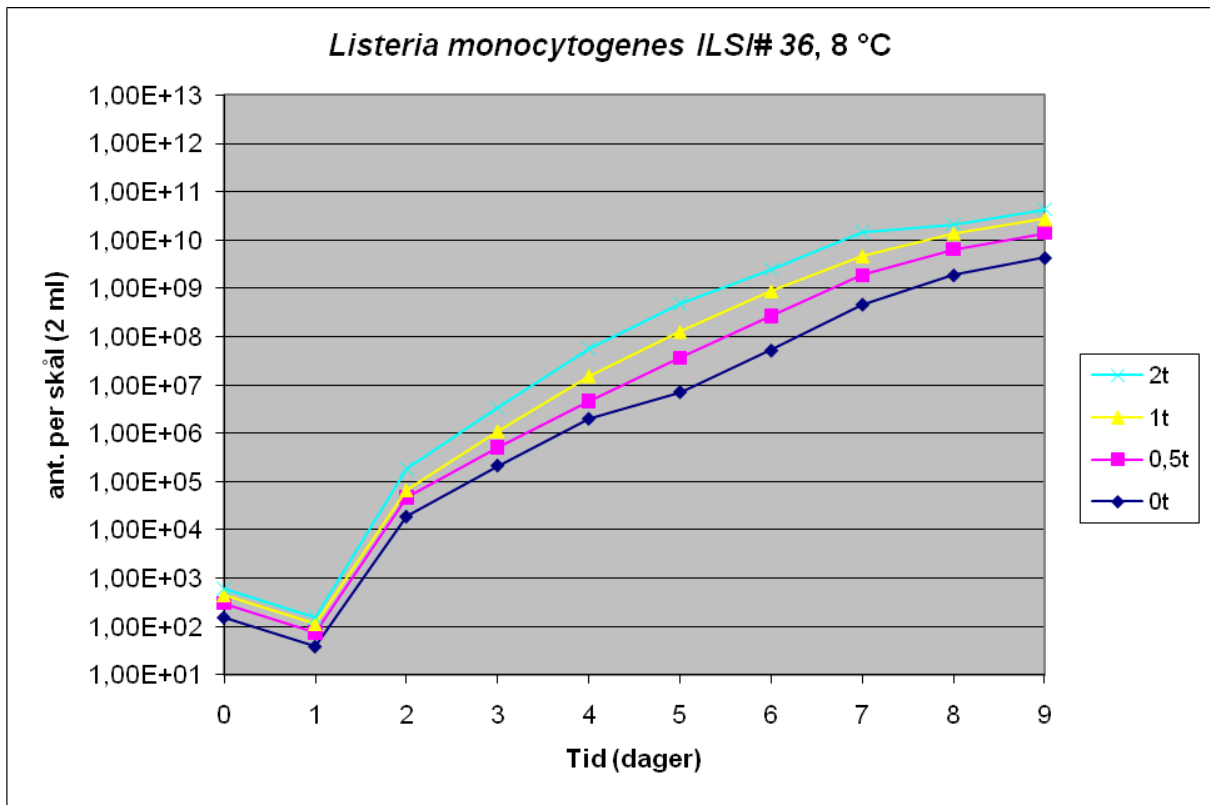
Figurene 4.2.3 – 4.2.6 viser vekstkurvene for *L. monocytogenes*- stammene benyttet i forsøket. Vekstkurvene til gjentakforsøket vises i vedlegg 2.



Figur 4.2.3. Vekstkurven for *L. monocytogenes* ILSI #36 ved 4 °C på logaritmisk skala. Blå linje indikerer 0t, dvs. konstant ved 4 °C, rosa linje indikerer 30 minutter daglig ved 25 °C, gul linje indikerer én time daglig ved 25 °C og turkis linje indikerer to timer daglig ved 25 °C.

Figur 4.2.3 viser god vekst for alle av *L. monocytogenes* ILSI #36 ved 4 °C ved alle betingelser undersøkt. Kurven for to timer ved 25 °C viste det høyeste celletallet (10^9 bakterier), mens én time, 30 minutter og ved konstant temperatur oppnådde bakteriene relativt likt celletall, omtrent 10^7 bakterier. Veksthastigheten for konstant temperatur, 30 minutter og én time ved 25 °C var relativt lik, henholdsvis 0,4, 0,5, 0,6 log kde per døgn. To timer daglig ved 25 °C gav veksthastighet på 0,9 log kde per døgn. Det ble ikke påvist adapteringsfase for bakteriene.

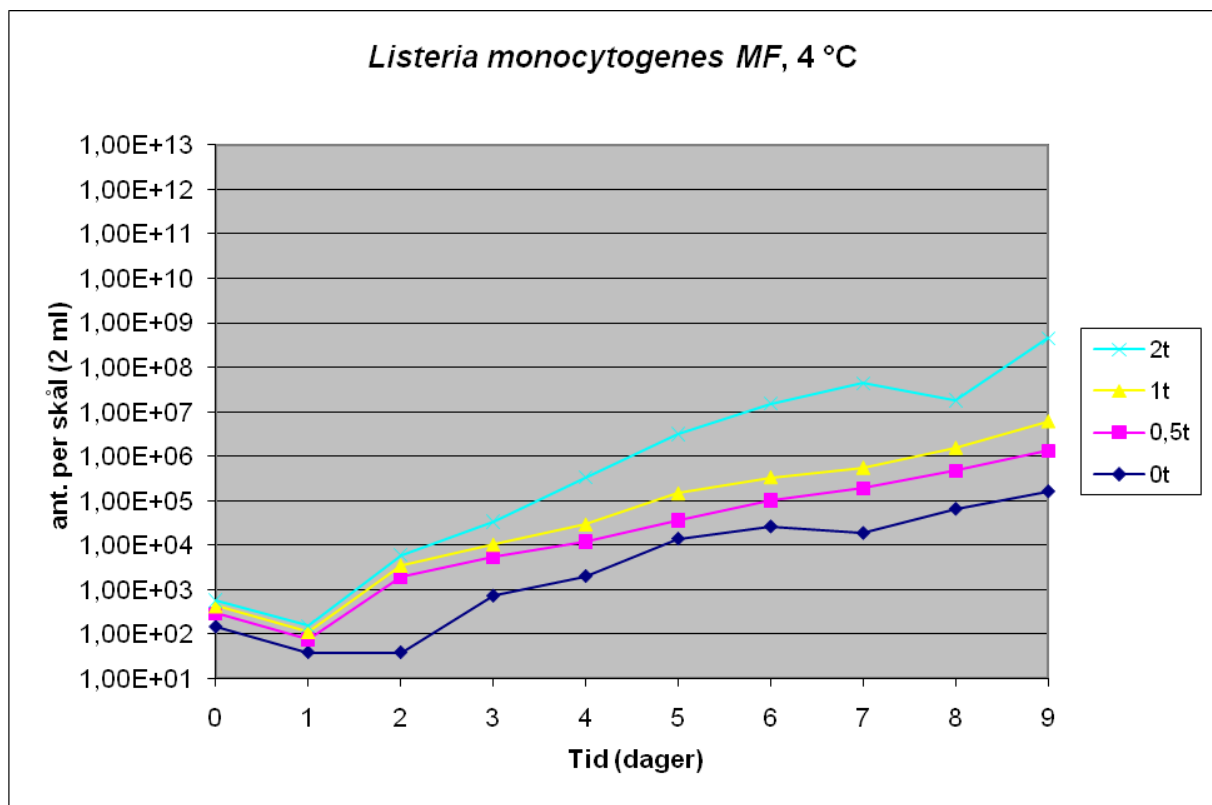
Alle bakteriene oppnådde celletall over 10^6 bakterier, som regnes som den infektive dosen til *L. monocytogenes*. Bakteriene ved konstant temperatur brukte omtrent 8,2 dager på å nå denne grensen, 30 minutter daglig i romtemperatur førte til at bakteriene brukte 6,5 dager på å oppnå det samme celletallet. Én time ved 25 °C førte til at bakteriene vokste til 10^6 på 5,5 dager, bakteriene med to timer ved 25 °C brukte i overkant fire dager på å nå denne grensen.



Figur 4.2.4. Vekstkurven for *L. monocytogenes* ILSI #36 ved 8 °C på logaritmisk skala. Blå linje indikerer 0t, dvs. konstant ved 8 °C, rosa linje indikerer 30 minutter daglig ved 25 °C, gul linje indikerer én time daglig ved 25 °C og turkis linje indikerer to timer daglig ved 25 °C.

Figur 4.2.4 viser at bakteriene vokste godt ved 8 °C. Bakteriene vokste med relativt lik veksthastighet, uavhengig av inkubasjon ved romtemperatur (25 °C). Veksthastigheten var 0,8 log kde per døgn ved konstant temperatur, 1,0, 1,1 og 1,2 log kde per døgn for henholdsvis 30 minutter, én time og to timer ved 25 °C. Det ble ikke påvist tilvenningsfase for bakteriene.

Totalt celletall av *L. monocytogenes* ILSI #36 ved siste uttaksdag var omtrent 10^{10} bakterier. Ved konstant temperatur brukte denne stammen omtrent 3,5 dager på å nå 10^6 bakterier, mens ved 30 minutter ved 25 °C tok det 3,2 dager å nå det samme celletallet. Én time daglig ved 25 °C gav 10^6 bakterier etter 3 dager, mens to timer ved romtemperatur (25 °C) gav 10^6 bakterier etter 2,5 dager.



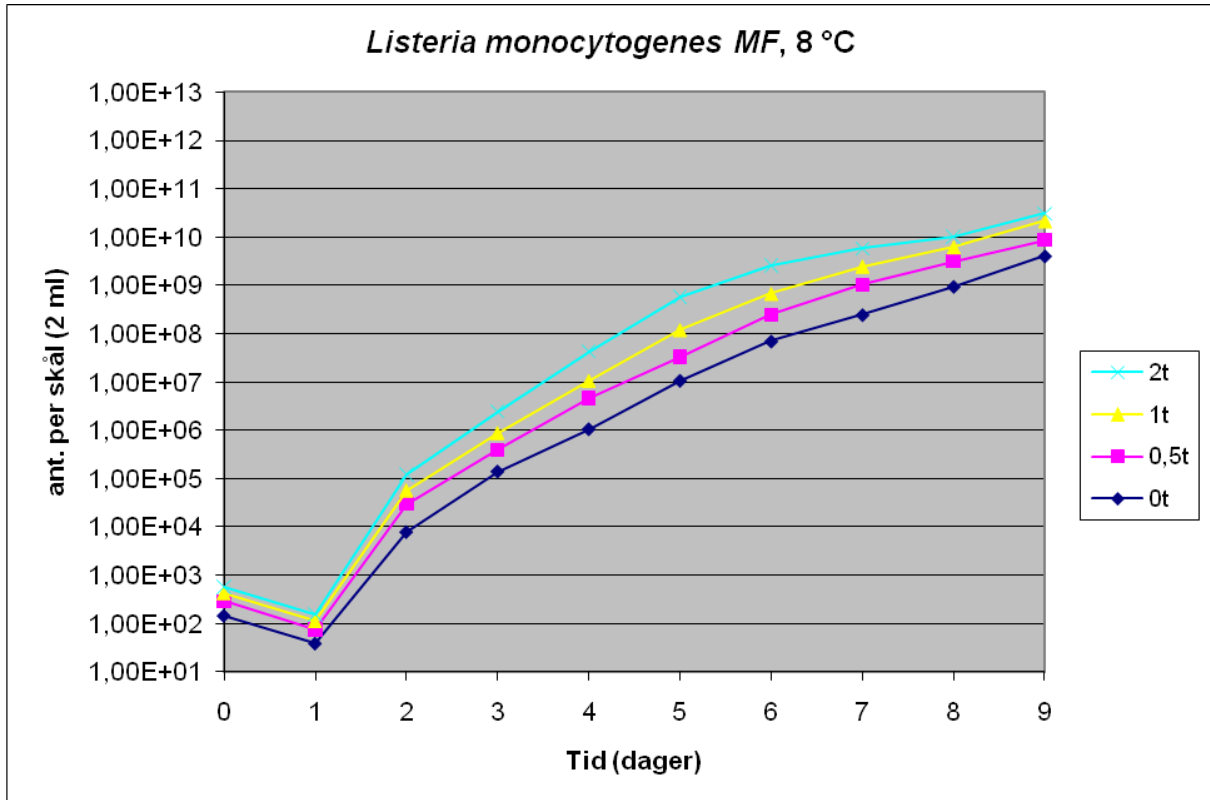
Figur 4.2.5. Vekstkurven for *L. monocytogenes* MF 2184 ved 4 °C på logaritmisk skala. Blå linje indikerer 0t, dvs. konstant ved 4 °C, rosa linje indikerer 30 minutter daglig ved 25 °C, gul linje indikerer én time daglig ved 25 °C og turkis linje indikerer to timer daglig ved 25 °C.

Figur 4.2.5 viser at *L. monocytogenes* MF 2184 vokste ved 4 °C ved både konstant temperatur og med inkubering ved 25 °C.

Ved konstant temperatur på 4 °C vokste bakteriene til 10^5 celler etter ni dager, med veksthastighet på 0,5 log kde per døgn. Veksthastigheten var relativt lik ved konstant temperatur, 30 minutter i romtemperatur (25 °C) og ved én time i romtemperatur. (hhv. 0,4,0,6 log kde per døgn). Ved to timer ved 25 °C vokste bakteriene raskere (0,9 log kde per døgn). Bakteriene med to timer ved 25 °C vokste til 10^8 celler. I forsøk 2 vokste bakteriene litt raskere, med økende veksthastighet med økende inkubasjon ved 25 °C (vedlegg 2).

Bakteriene nådde den infektive dosen (10^6 celler) etter 8,8 dager ved 30 minutter i romtemperatur (25 °C), 7,5 dager ved én time i romtemperatur og etter 4,5 dager ved to timer i romtemperatur.

Tilvenningsfasen var 1,4 dager ved konstant temperatur, og 0,2 dager ved to timer i romtemperatur. Adapteringsfasen var kortere for forsøk 2, uten tilvenningsfase ved konstant temperatur (vedlegg 2).



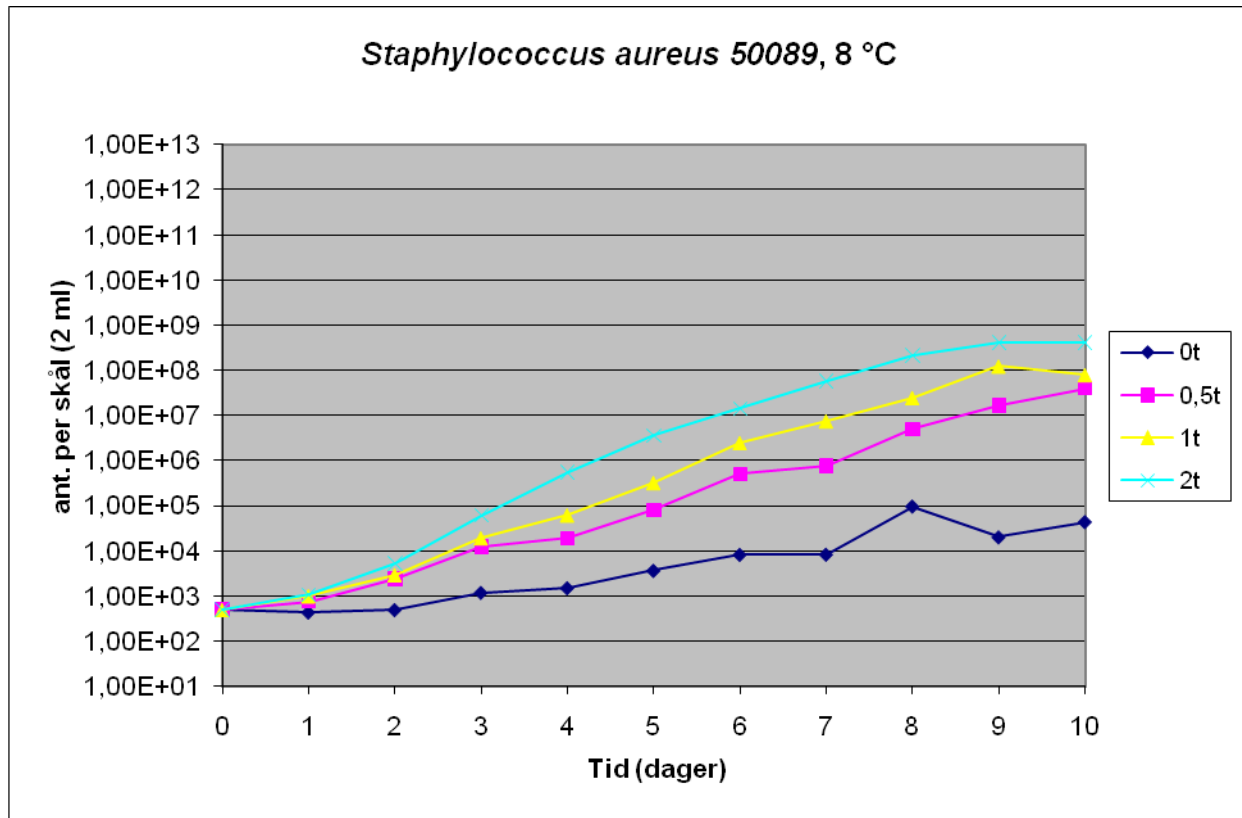
Figur 4.2.6. Vekstkurven for *L. monocytogenes* MF2184 ved 8 °C på logaritmisk skala. Blå linje indikerer 0t, dvs. konstant ved 8 °C, rosa linje indikerer 30 minutter daglig ved 25 °C, gul linje indikerer én time daglig ved 25 °C og turkis linje indikerer to timer daglig ved 25 °C.

Figur 4.2.6 viser viser god vekst ved 8 °C for alle av *L. monocytogenes* MF2184 ved alle betingelsene undersøkt. Kurvene fulgte hverandre gjennom hele forsøksperioden, uavhengig av inkubasjon i romtemperatur. Det totale celledtallet var omtrent 10^{10} bakterier for alle kurvene etter ni dager. Bakteriene nådde grensen for infeksjons dose (10^6) etter fire dager ved konstant temperatur på 8 °C, 3,3 dager med 30 minutter daglig ved 25 °C, etter omtrent 3 dager med én time ved 25 °C, og 2,8 dager ved to timer i romtemperatur (25 °C).

Veksthastigheten økte med økende inkubasjon ved 25 °C (0,9 – 1,3 log kde per døgn). I forsøk 2 var veksthastigheten høyere (1,7 log kde per døgn), men veksten avtok etter fem dager. Bakteriene hadde ingen tilvenningsfase før de begynte å vokse.

4.2.4. *Staphylococcus aureus*

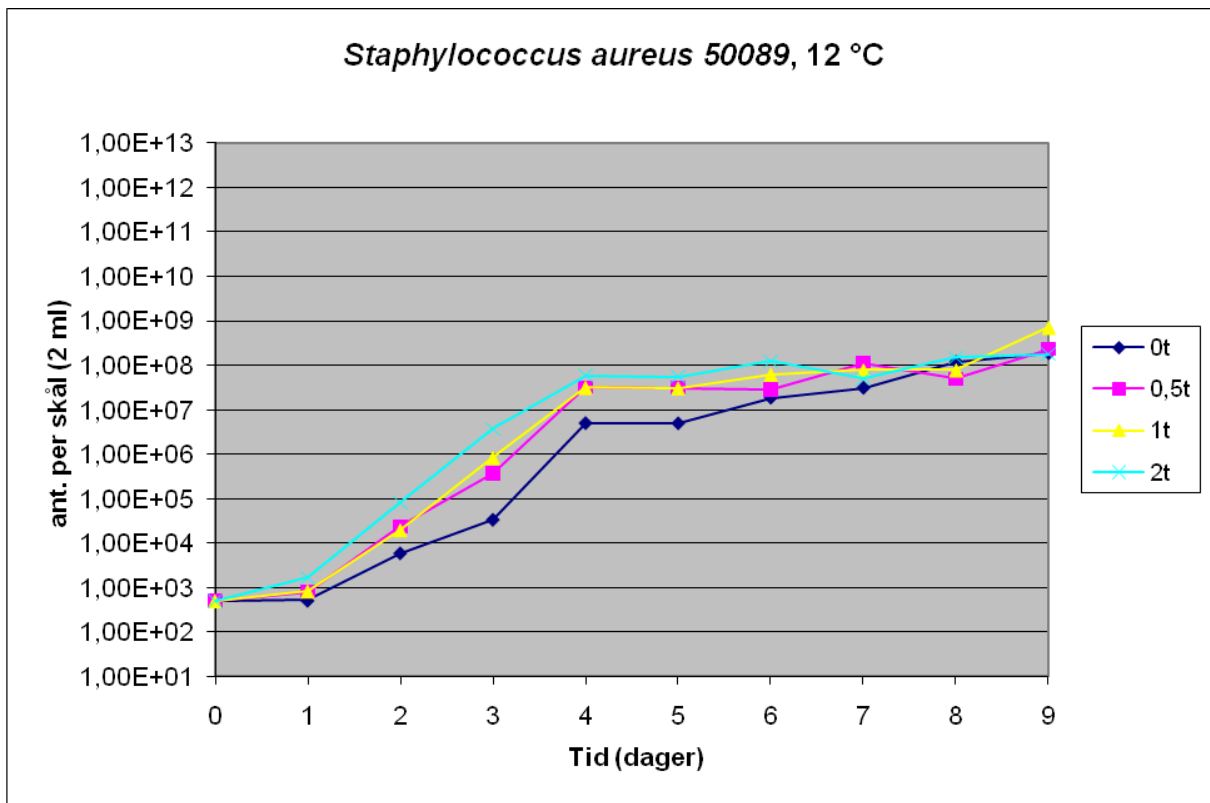
Figurene under (4.2.7 – 4.2.10) viser vekstkurvene til *S. aureus*- stammene benyttet i forsøket. Vekstkurvene for forsøk 2 vises i vedlegg 2.



Figur 4.2.7. Vekstkurven for *S. aureus* 50089 ved 8 °C på logaritmisk skala. Blå linje indikerer 0t, dvs. konstant ved 8 °C, rosa linje indikerer 30 minutter daglig ved 25 °C, gul linje indikerer én time daglig ved 25 °C og turkis linje indikerer to timer daglig ved 25 °C.

Figur 4.2.7 viser god vekst for *S. aureus* 50089 ved 8 °C. Bakteriene med inkubasjon på 25 °C vokste raskere (veksthastighet 0,5, 0,6, 0,7 log kde per døgn) enn bakteriene ved konstant temperatur (veksthastighet 0,3 log kde per døgn), uavhengig av hvor lenge inkubasjonstiden ved 25 °C var. Den samme tendensen vises i forsøk 2.

Bakteriene med to timer daglig ved 25 °C nådde den infeksjose dosen (10^5 bakterier) etter i overkant av tre dager. Ved 30 minutter i romtemperatur vokste celletallet til 10^5 i løpet av fem dager, med én time ved 25 °C, brukte bakteriene 4,2 dager. Ved konstant temperatur på 8 °C var celletallet 10^5 bakterier etter åtte dager. Bakteriene hadde ingen tilvenningsfase i forsøk 1, mens ved 30 minutter i romtemperatur (25 °C) var adapteringsfasen 0,2 dager.

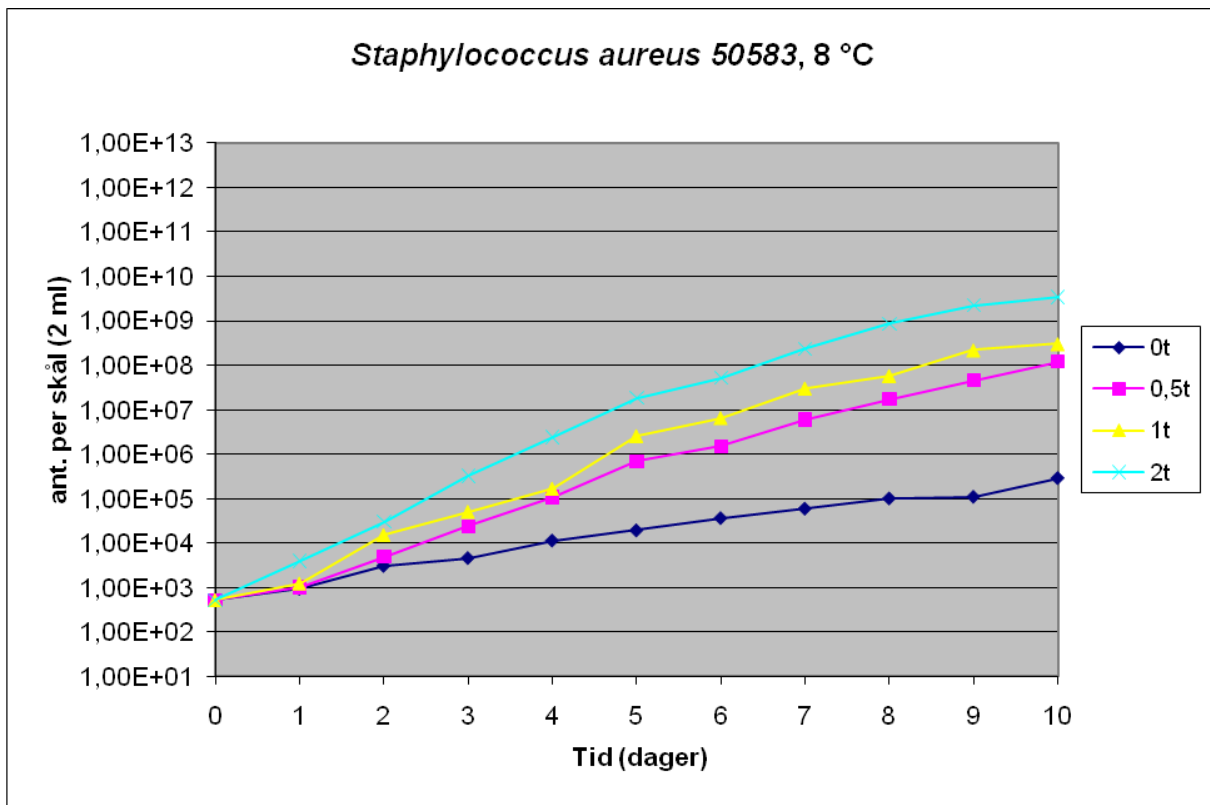


Figur 4.2.8. Vekstkurven for *S. aureus* 50089 ved 12 °C på logaritmisk skala. Blå linje indikerer 0t, dvs. konstant ved 12 °C, rosa linje indikerer 30 minutter daglig ved 25 °C, gul linje indikerer én time daglig ved 25 °C og turkis linje indikerer to timer daglig ved 25 °C.

Figur 4.2.8 viser god vekst av *S. aureus* 50089 ved 12 °C. For alle av *S. aureus* 50089 ved alle betingelsene undersøkt avtok veksten etter dag fire, den samme tendensen vises også i forsøk 2. Veksthastigheten er lik ved inkubasjon i romtemperatur (1,5 log kde per døgn), mens den er litt lavere (1,3 log kde per døgn) for konstant lagring ved 12 °C.

Bakteriene vokste til den infeksiøse dosen (10^5 bakterier) i løpet av 3,2 dager ved lagring med konstant temperatur. Celletallet for bakteriene med 30 minutter og én time ved 25 °C var 10^5 bakterier etter 2,5 dager, mens med to timer ved 25 °C brukte bakteriene to dager på å nå det samme celletallet.

Bakteriecellene brukte opptil en halv dag på adaptasjon til nytt miljø (0,5, 0,4, 0,4, 0,1 dager), hvorav bakteriene ved konstant temperatur hadde den lengste tilvenningsfasen. I forsøk 2 hadde bakteriene ingen tilvenningsfase.

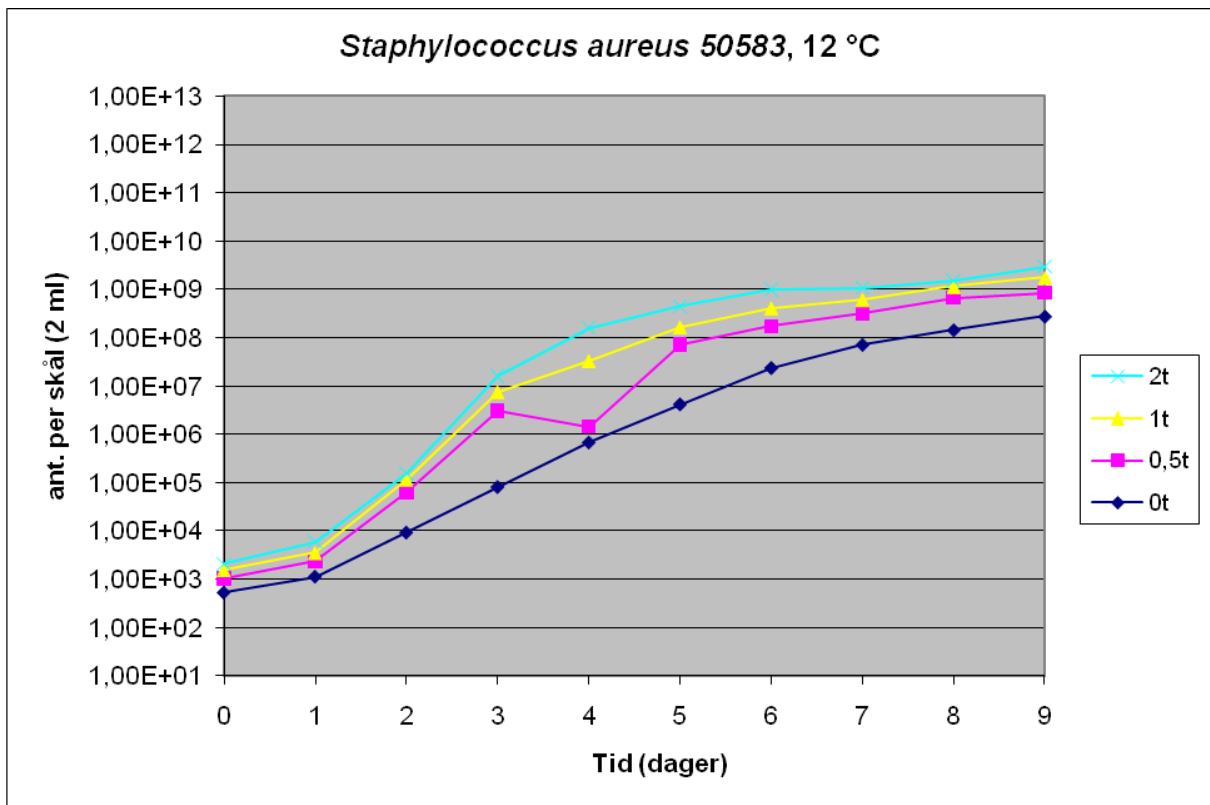


Figur 4.2.9. Vekstkurven for *S. aureus* 50583 ved 8 °C på logaritmisk skala. Blå linje indikerer 0t, dvs. konstant ved 8 °C, rosa linje indikerer 30 minutter daglig ved 25 °C, gul linje indikerer én time daglig ved 25 °C og turkis linje indikerer to timer daglig ved 25 °C.

Figur 4.2.9 viser vekst for alle *S. aureus*-bakteriene ved 8 °C. Kurvene viser at bakteriene vokste raskere med inkubasjon ved 25 °C (veksthastighet 0,6, 0,7 og 0,8 log kde per døgn), enn ved konstant lagring ved 8 °C (0,3 log kde per døgn). Det totale celletallet ved konstant temperatur nådde 10^5 bakterier gjennom forsøksperioden, mens med to timer daglig ved 25 °C endte celletallet på bortimot 10^{10} bakterier ved forsøkets slutt.

Bakteriene med konstant temperatur nådde den infeksjose dosen (10^5 bakterier) etter dag åtte, og økte lite i celletall etter dette. 30 minutter og én time daglig ved 25 °C gav celletall på 10^5 bakterier etter 3,5 dager, mens bakteriene med to timer i romtemperatur (25 °C) nådde den infeksjose dosen etter 2,5 dager.

Ved 8 °C brukte ikke bakteriene tid på adaptasjon til nytt miljø.



Figur 4.2.10. Vekstkurven for *S. aureus* 50583 ved 12 °C på logaritmisk skala. Blå linje indikerer 0t, dvs. konstant ved 12 °C, rosa linje indikerer 30 minutter daglig ved 25 °C, gul linje indikerer én time daglig ved 25 °C og turkis linje indikerer to timer daglig ved 25 °C.

Figur 4.2.10 viser god vekst for alle av *S. aureus* 50583 ved 12 °C for alle betingelsene underøkt. Bakteriene med inkubasjon ved 25 °C vokste relativt likt, med veksthastighet 1,7, 1,8 og 1,8 log kde per døgn for henholdsvis en halvtime, én time og to timer daglig ved 25 °C. Veksthastigheten til bakteriene ved konstant temperatur var lavere, 0,9 log kde per døgn. Veksten til bakteriene med inkubasjon ved 25 °C avtok mot slutten av forsøksperioden. Totalt celletall for alle bakteriene var dermed forholdsvis likt, omtrent 10^9 bakterier etter ni dager.

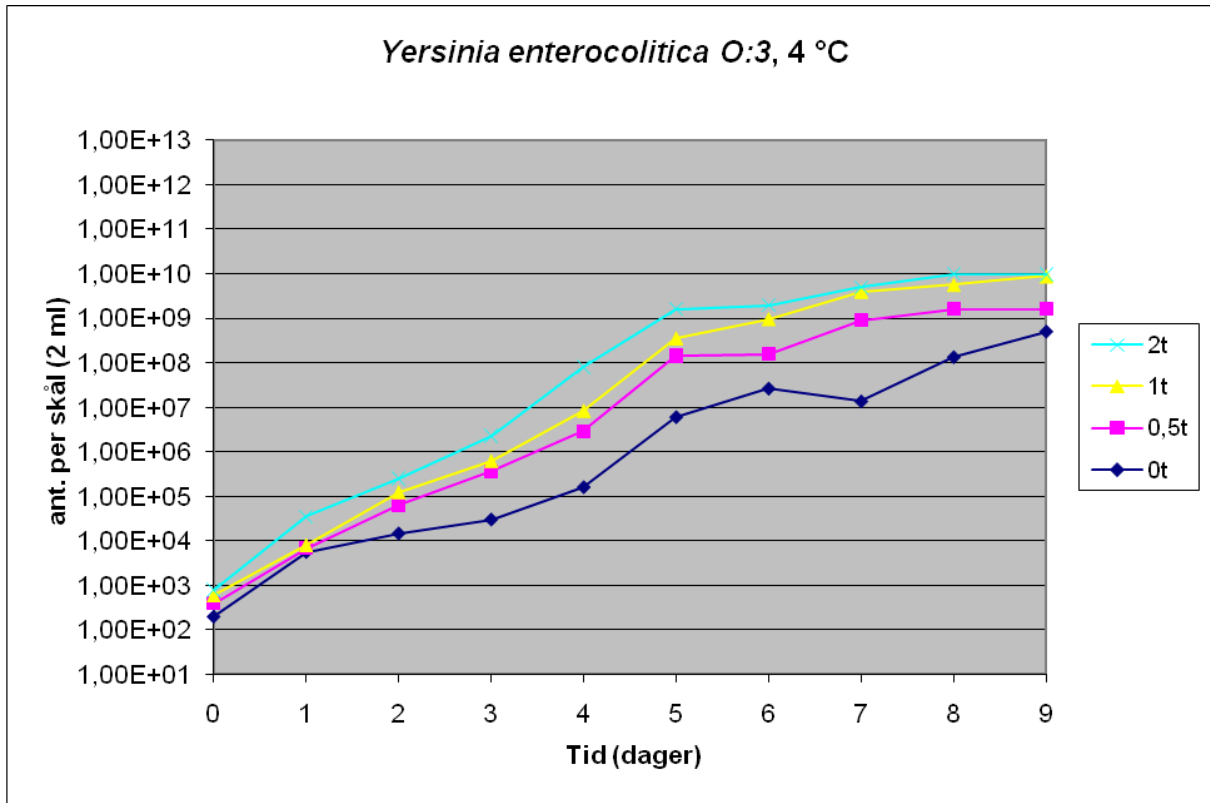
Bakteriene ved konstant temperatur nådde den infeksjose dosen (10^5 bakterier) etter tre dager. 30 minutter, én time og to timer daglig inkubasjon ved 25 °C gjorde at bakteriene nådde infektiv dose etter to dager.

Ved konstant temperatur hadde bakteriene ingen tilvenningsfase før de begynte å vokse. Cellene med inkubasjon ved 25 °C brukte 0,4, 0,4 og 0,3 dager på å adaptere til nytt miljø, henholdsvis 30 minutter, én time og to timer ved 25 °C.

4.2.5. *Yersinia enterocolitica*

Figurene 4.2.11 – 4.2.14 viser vekstkurvene til *Y. enterocolitica* O:3 og O:9 ved 4 og 8 °C.

Resultatene fra forsøk 2 ligger i vedlegg 2.



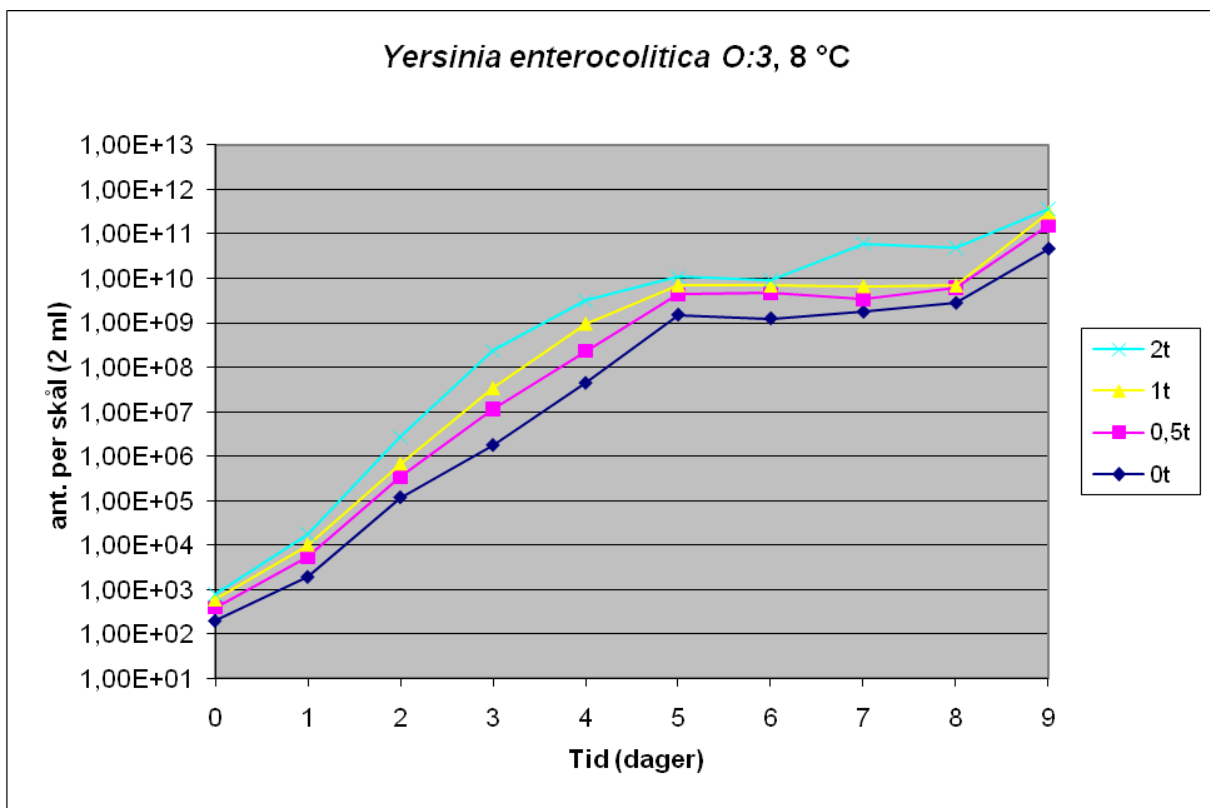
Figur 4.2.11. Vekstkurven for *Y. enterocolitica* O:3 ved 4 °C på logaritmisk skala. Blå linje indikerer 0t, dvs. konstant ved 4 °C, rosa linje indikerer 30 minutter daglig ved 25 °C, gul linje indikerer én time daglig ved 25 °C og turkis linje indikerer to timer daglig ved 25 °C.

Figur 4.4.11 viser god vekst for alle *Y. enterocolitica* O:3 ved 4 °C. Veksthastigheten var lavere for bakteriene ved konstant lagring (1,0 log kde per døgn), og økte med økende inkubering ved 25 °C. Veksthastigheten til bakteriene med 30 minutter daglig inkubering ved 25 °C var 1,1 log kde per døgn, 1,2 log kde per døgn for bakteriene med én time ved 25 °C, og 1,4 log kde per døgn ved to timers inkubering ved 25 °C. Den samme tendensen vises for forsøk 2, med tilsvarende veksthastigheter.

Det totale celledetallet var 10^9 bakterier ved konstant temperatur og 30 minutter ved 25 °C etter ni dager. Bakteriene med én og to timer ved 25 °C vokste til totalt celledetall på 10^{10} bakterier gjennom forsøksperioden. Det var større forskjeller mellom konstant temperatur og inkubasjon ved 25 °C i to timer i forsøk 2, der det totale celledetallet ved konstant temperatur var opp mot 10^9 bakterier, mens celledetallet var 10^{11} for de andre bakteriene etter ti dager.

Den infektive dosen til *Y. enterocolitica* ansees å være $10^7 - 10^9$ bakterieceller (Bhunia 2008). Ved konstant temperatur på 4 °C brukte bakteriene fem dager på å nå 10^7 bakterier. Inkubasjon ved 25 °C i 30 minutter og én time førte til 10^7 bakterier etter omtrent fire dager, mens to timer ved 25 °C gav den infeksjøs dose etter 3,5 dager.

Bakteriene med inkubasjon ved 25 °C hadde ingen tilvenningsfase i forsøk 1. Konstant temperatur førte til adapteringsfase på 0,7 dager. I forsøk 2 brukte bakteriene med inkubasjon ved 25 °C 0,1 – 0,2 dager på akklimatisering.



Figur 4.2.12. Vekstkurven for *Y. enterocolitica* O:3 ved 8 °C på logaritmisk skala. Blå linje indikerer 0t, dvs. konstant ved 8 °C, rosa linje indikerer 30 minutter daglig ved 25 °C, gul linje indikerer én time daglig ved 25 °C og turkis linje indikerer to timer daglig ved 25 °C.

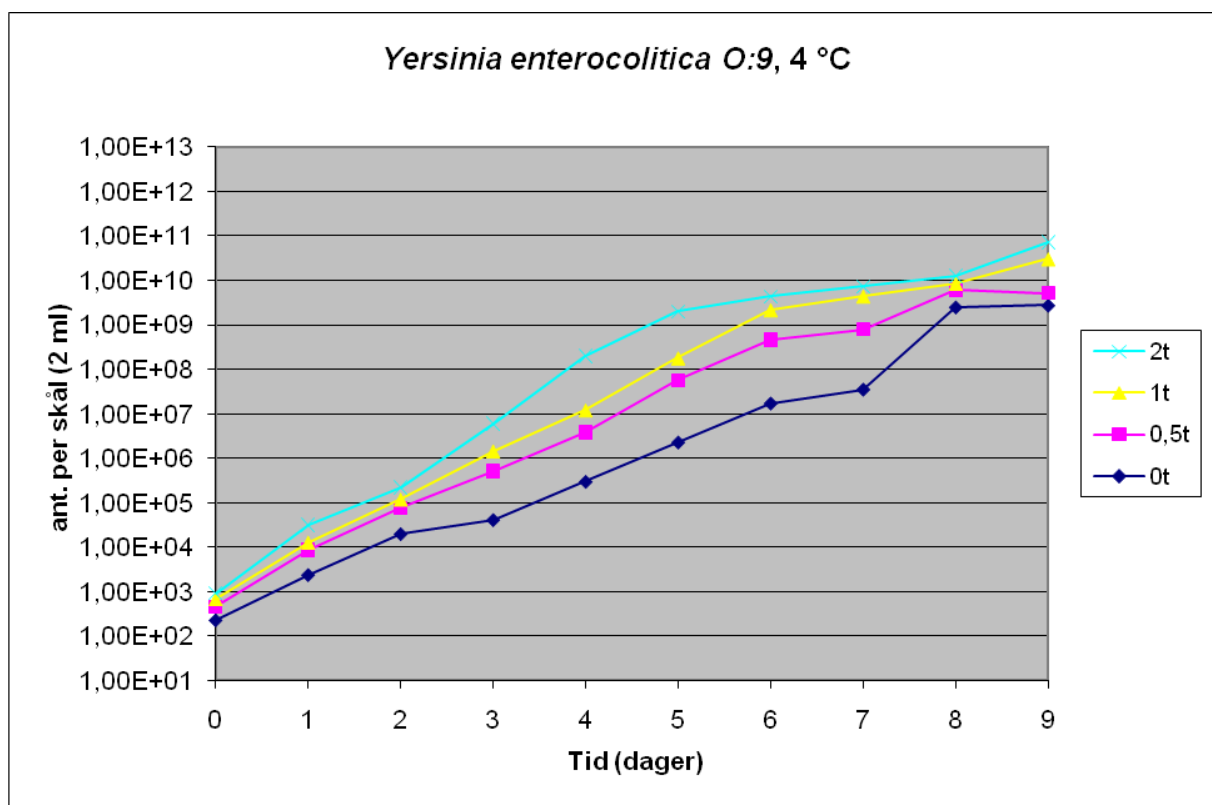
Figur 4.2.12 viser at *Y. enterocolitica* O:3 vokste raskt ved 8 °C. Det var små forskjeller i vekst mellom bakteriene inkubert ved konstant temperatur, og med inkubasjon ved 25 °C, men bakteriene med to timer ved 25 °C vokste raskere enn de andre. Veksthastigheten var 2,2 for bakteriene med to timer ved 25 °C, og 1,4 log kde per døgn for bakteriene ved konstant temperatur. Veksthastighetene til bakteriene med 30 minutter og én time ved 25 °C var

henholdsvis 1,6 og 1,7 log kde per døgn. I forsøk 2 var veksthastighetene omtrent 1,4 log kde per døgn for alle bakteriene.

Det totale celletallet var omtrent 10^{11} bakterieceller etter ni dager, både ved konstant temperatur og med inkubasjon ved 25 °C. Veksten avtok etter dag fem, men tiltok etter dag åtte. Bakteriene viste den samme tendensen i forsøk 2.

Ved konstant temperatur brukte bakteriene 3,5 dager på å nå den infeksjose dosen (10^7 bakterier). Den samme grensen ble nådd etter tre dager med 30 minutter ved 25 °C, og etter omtrent 2,5 dager ved én time i romtemperatur (25 °C). To timer daglig ved 25 °C gav den infektive dosen etter 2,2 dager.

Kun med to timer ved 25 °C brukte bakteriene tilvenningstid, 0,1 dager. I forsøk 2 hadde ingen av bakteriene adapteringsfase.

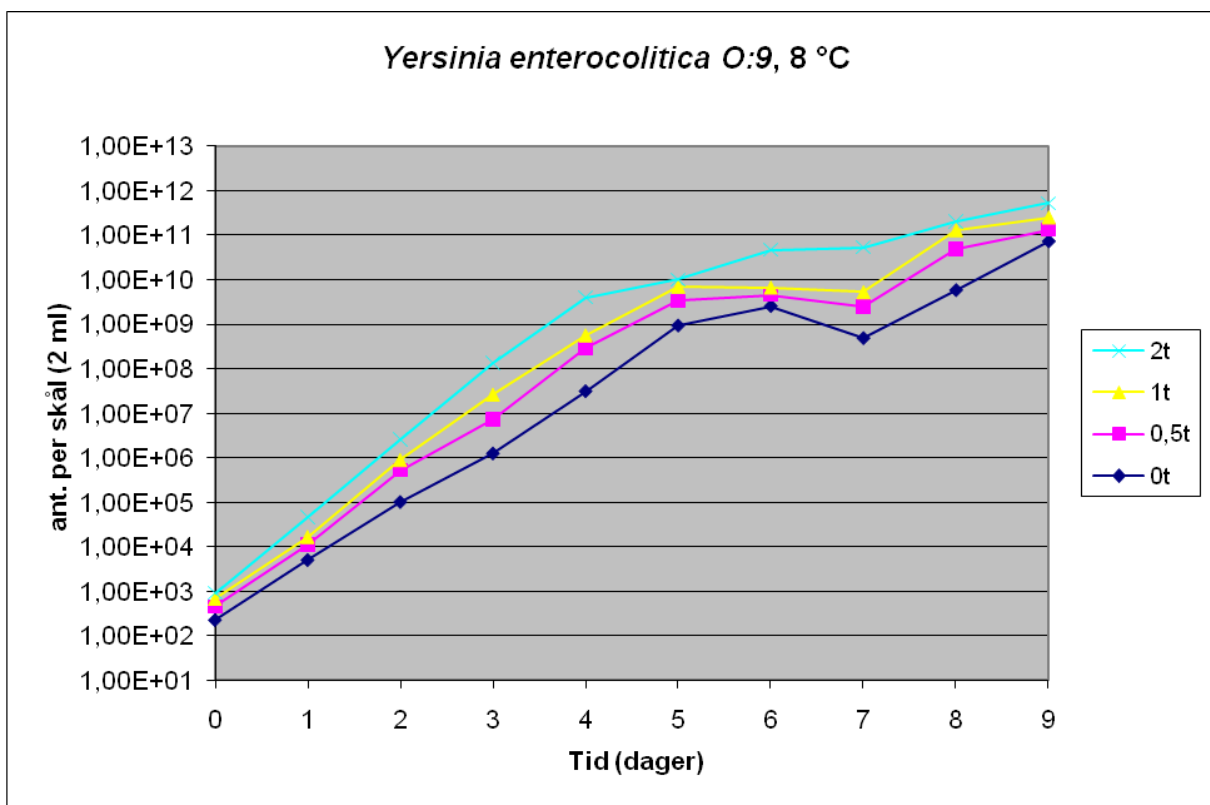


Figur 4.2.13. Vekstkurven for *Y. enterocolitica* O:9 ved 4 °C på logaritmisk skala. Blå linje indikerer 0t, dvs. konstant ved 4 °C, rosa linje indikerer 30 minutter daglig ved 25 °C, gul linje indikerer én time daglig ved 25 °C og turkis linje indikerer to timer daglig ved 25 °C.

Figur 4.2.13 viser rask vekst for *Y. enterocolitica* O:9 ved 4 °C. Veksthastigheten var lavest for bakteriene ved konstant temperatur (0,9 log kde per døgn), og økte med økende inkubasjon ved 25 °C, henholdsvis 1,0, 1,1 og 1,4 log kde per døgn. Totalt celletall var opp mot 10^{10} bakterier ved konstant temperatur og 30 minutter ved 25 °C, mens det for én og to timer ved romtemperatur (25 °C) var opp mot 10^{11} bakterier etter ni dager. Veksten til bakteriene med to timer ved 25 °C avtok etter dag fem, og etter dag seks for de andre bakteriene.

Ved konstant temperatur brukte bakteriene omtrent seks dager på vekst til den infeksjose dosen (10^7 bakterier). 30 minutter og en time ved 25 °C gav den infektive dosen etter henholdsvis 4,2 og fire dager, mens bakteriene med to timer ved 25 °C nådde 10^7 bakterier etter omtrent tre dager.

Kun bakteriene ved konstant temperatur viste en liten tilvenningsfase på 0,01 dager (14,4 minutter).



Figur 4.2.14. Vekstkurven for *Y. enterocolitica* O:9 ved 8 °C på logaritmisk skala. Blå linje indikerer 0t, dvs. konstant ved 8 °C, rosa linje indikerer 30 minutter daglig ved 25 °C, gul linje indikerer én time daglig ved 25 °C og turkis linje indikerer to timer daglig ved 25 °C.

Figur 4.2.14 viser god vekst ved 8 °C. Det var liten forskjell i celletall med eller uten inkubasjon ved 25 °C. Det totale celletallet var 10¹¹ bakterier etter ni dager.

Veksthastighetene varierte mellom 1,3 og 1,5 log kde per døgn, med den høyeste veksthastigheten ved en time i romtemperatur (25 °C).

Bakteriene ved konstant temperatur nådde infektiv dose (10⁷ bakterier) etter omtrent fire dager. Ved 30 minutter og én time i romtemperatur (25 °C) brukte bakteriene omtrent tre dager på å vokse til 10⁷ bakterier. To timer daglig ved 25 °C gav det samme celletallet etter omtrent 2,5 dager. Bakteriene hadde ingen tilvenningsfase ved 8 °C.

4.3. Bestemmelse av toksindannelse

Dannelse av toksin av henholdsvis *B. cereus* og *B. weihenstephanensis*, og *S. aureus* ble bestemt ved bruk av to ulike metoder. Emetisk toksindannelse fra *B. cereus* og *B. weihenstephanensis* ble forsøkt påvist ved bruk av svinesperm, mens enterotoksinproduksjon av *S. aureus* ble påvist ved optisk tetthet i et prøvesett. Det ble tatt ut prøver hver 2. dag for både *Bacillus* og *Staphylococcus*.

4.3.1. *Bacillus cereus* og *B. weihenstephanensis* emetisk toksin

Tabell 4.3.1 viser resultatene fra forsøkene med svinesperm. Forsøk 1 varte i ni dager, mens forsøk 2 og 3 varte i ti dager.

Tabell 4.3.1. Viser resultatene fra forsøk med svinesperm. + betyr ubevegelige spermier, positiv prøve, - betyr bevegelige spermier, negativ prøve, og +/- betyr flest ubevegelige og noen ubevegelige spermier.

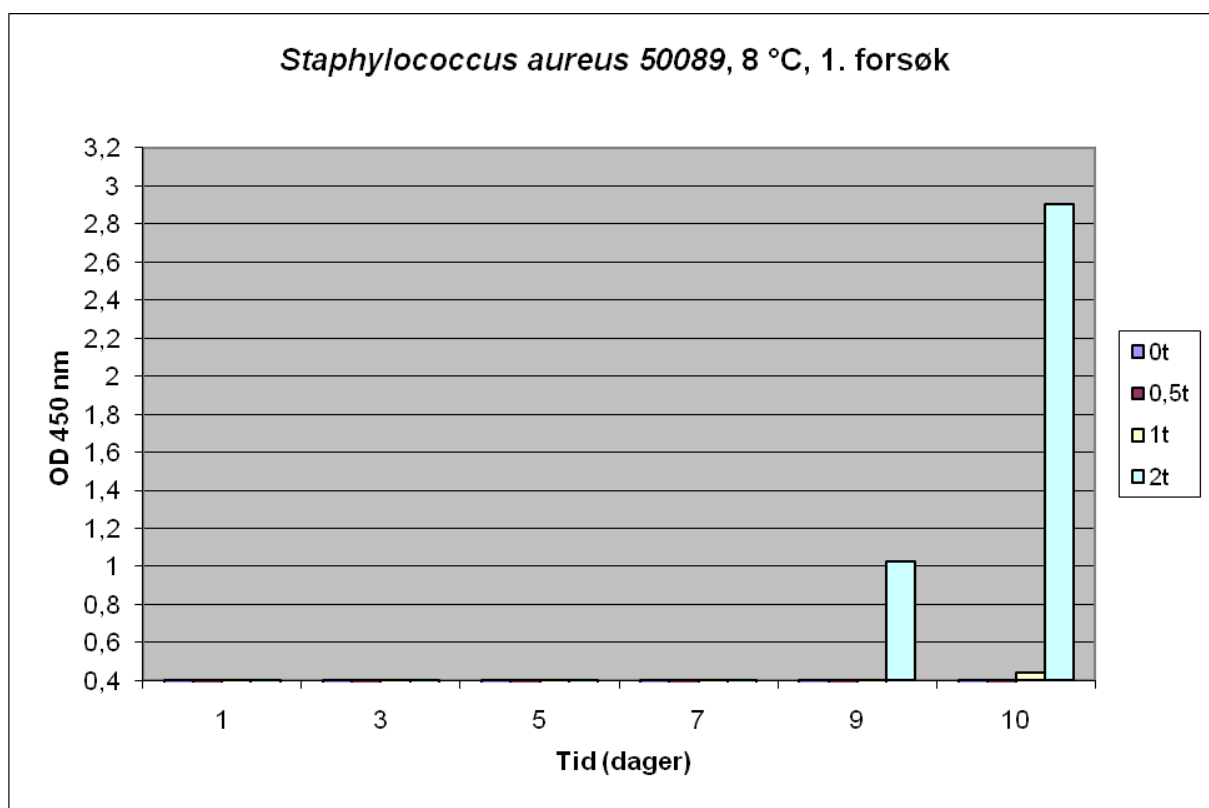
Prøvenr.	Prøve:	Forsøk 1	Forsøk 2	Forsøk 3
40	B.w 8°C 2t Dag 10	Dag 9 +	-	+
39	B.w 8°C 1t Dag 10	Dag 9 +/-	-	+
38	B.w 8°C 0,5t Dag 10	Dag 9 +/-	-	Dag 10 +/-
37	B.w 8°C 0t Dag 10	Dag 9 -	-	-
36	B.w 4°C 2t Dag 10	Dag 9 -	-	-
35	B.w 4°C 1t Dag 10	Dag 9 -	-	-
34	B.w 4°C 0,5t Dag 10	Dag 9 -	-	-
33	B.w 4°C 0t Dag 10	Dag 9 -	-	-
32	B.w 8°C 2t Dag 8	Dag 7 -	-	+
31	B.w 8°C 1t Dag 8	Dag 7 -	-	+
30	B.w 8°C 0,5t Dag 8		-	-
29	B.w 8°C 0t Dag 8			-
28	B.w 4°C 2t Dag 8		-	+
27	B.w 4°C 1t Dag 8		-	+

26	B.w 4°C 0,5t Dag 8		-	-
25	B.w 4°C 0t Dag 8		-	-
24	B.w 8°C 2t Dag 6		-	-
23	B.w 8°C 1t Dag 6		-	-
22	B.w 8°C 0.5t Dag 6		-	-
21	B.w 8°C 0t Dag 6		-	-
20	B.w 4°C 2t Dag 6		-	-
19	B.w 4°C 1t Dag 6			
18	B.w 4°C 0.5t Dag 6			
17	B.w 4°C 0t Dag 6			
16	B.w 8°C 2t Dag 4			
15	B.w 8°C 1t Dag 4			
14	B.w 8°C 0.5t Dag 4			
13	B.w 8°C 0t Dag 4			
12	B.w 4°C 2t Dag 4			
11	B.w 4°C 1t Dag 4			
10	B.w 4°C 0.5t Dag 4			
9	B.w 4°C 0t Dag 4			
8	B.w 8°C 2t Dag 2			
7	B.w 8°C 1t Dag 2			
6	B.w 8°C 0.5t Dag 2			
5	B.w 8°C 0t Dag 2			
4	B.w 4°C 2t Dag 2	Dag 1 -		
3	B.w 4°C 1t Dag 2	Dag 1 -		
2	B.w 4°C 0.5t Dag 2	Dag 1 -		
1	B.w 4°C 0t Dag 2	Dag 1 -		

Tabell 4.3.1 viser liten produksjon av emetisk toksin av *B. weihenstephanensis*. *B. cereus* hadde veldig liten vekst både i suspensjon og på agaroverflate, denne er dermed ikke kontrollert for toksinproduksjon. Prøver fra den siste forsøksdagen viste positivt utslag på spermiene.

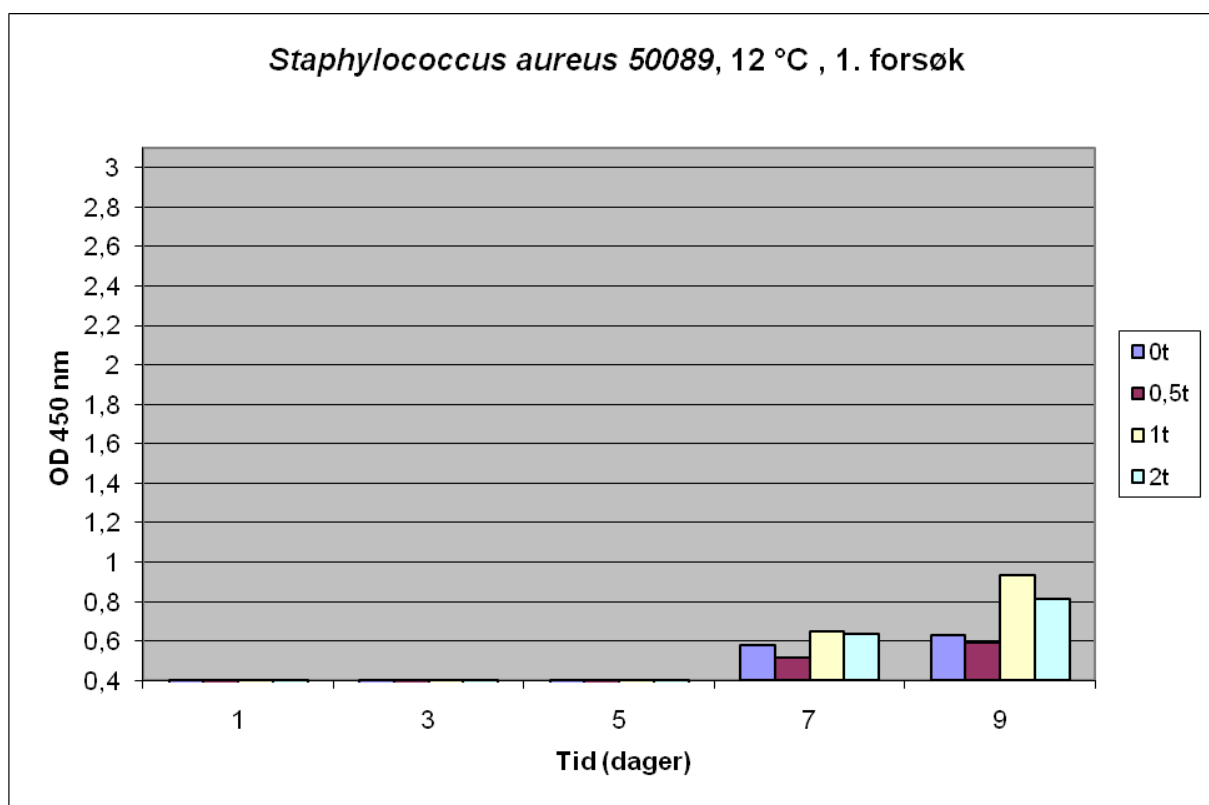
4.3.2. *Staphylococcus aureus*- enterotoksiner

Figurene 4.3.1 – 4.3.3 viser produksjon av *S. aureus*- enterotoksiner. Til *S. aureus* 50089 vises både 8 g 12 °C, mens det for *S. aureus* 50583 bare vises 12 °C. Forsøket ved 8 °C pågikk i ti dager, og i ni dager ved 12 °C. Resultatene fra forsøk 2 ligger i vedlegg 3. Metoden benyttet til påvisning av *S. aureus*- enterotoksiner er kvalitativ/semikvantitativ, og viser tilstedeværelse av toksiner. Prøvene ble preparert fortløpende gjennom forsøksperioden, frosset ned og analysert etter forsøkets slutt. 0,3 er grenseverdien til den negative kontrollen. Terskelen for positiv prøve er 0,4, prøver under denne regnes som negative.



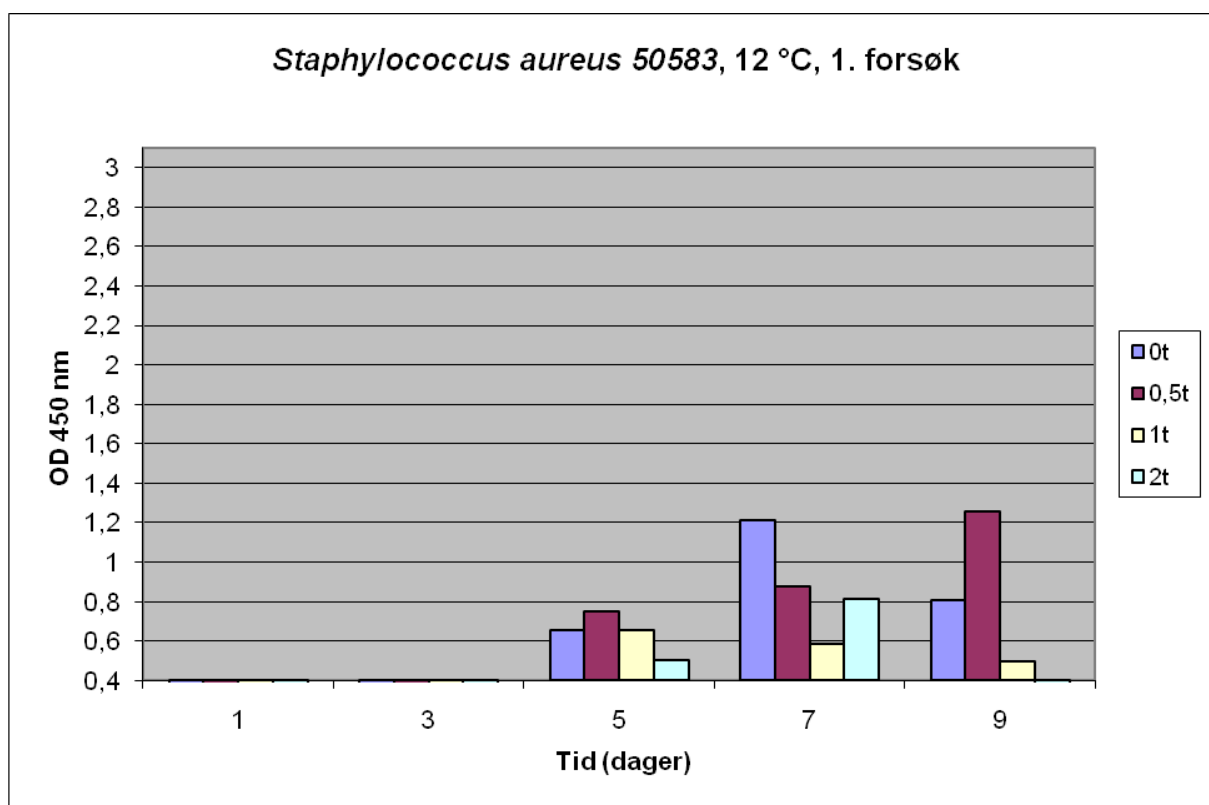
Figur 4.3.1. Optisk tetthet som funksjon av tid. Figuren illustrerer dannelsen av enterotoksiner til *S. aureus* 50089 ved 8 °C. Gul søyle indikerer én time daglig ved 25 °C og turkis søyle indikerer to timer daglig ved 25 °C.

Figur 4.3.1 viser toksindannelse på dag ni og dag ti, for bakteriene med én og to timer daglig inkubasjon ved 25 °C.



Figur 4.3.2. Optisk tetthet som funksjon av tid. Figuren illustrerer dannelsen av enterotoksiner til *S. aureus* 50089 ved 12 °C. Blå søyle indikerer konstant lagring ved 12 °C, rød søyle indikerer 30 minutter daglig ved 25 °C, gul søyle indikerer én time daglig ved 25 °C og turkis søyle indikerer to timer daglig ved 25 °C.

Figur 4.3.2 viser at det ble dannet toksin fra dag sju ved 12 °C. *S. aureus* 50089 produserte enterotoksiner ved både konstant temperatur, og ved inkubasjon ved 25 °C.



Figur 4.3.3. Ooptisk tetthet som funksjon av tid. Figuren illustrerer dannelsen av enterotoksiner til *S. aureus* 50583 ved 12 °C. Blå søyle indikerer konstant lagring ved 12 °C, rød søyle indikerer 30 minutter daglig ved 25 °C, gul søyle indikerer én time daglig ved 25 °C og turkis søyle indikerer to timer daglig ved 25 °C.

Figur 4.3.3 viser *S. aureus*bakterienes enterotoksinproduksjon ved 12 °C. Fra dag fem produserte bakteriene enterotoksiner ved både konstant temperatur og inkubering ved 25 °C. Ved dag ni ble det ikke påvist enterotoksinproduksjon av bakteriene med to timer daglig ved 25 °C.

5. DISKUSJON

Kortere opphold ved høyere temperaturer, som for eksempel i forbindelse med måltider, kan være tilstrekkelig for økt vekst av patogene mikroorganismer. Dette er ikke studert tidligere. Resultatene viste lavest vekst ved kontinuerlig temperatur. 30 minutter daglig i romtemperatur førte til høyere vekst enn ved kontinuerlig temperatur. Én time daglig i romtemperatur førte til høyere vekst enn ved 30 minutter i romtemperatur. Veksten var høyest for bakteriene med to timer daglig ved 25 °C. Funnene viser at korte daglige opphold i romtemperatur spiller en vesentlig rolle med tanke på matvarenes holdbarhet, og fare for matforgiftning.

I denne modellen tas det utgangspunkt i startnivå på 100 bakterier på overflaten av et næringsmiddel, for eksempel skivet kokt skinke. Antall dager er hele tiden relatert til startnivået. Høyere startnivå ville gitt færre antall dager for bakteriene å nå samme celledetall.

Resultatene viser at bakterieveksten varierte mellom de ulike bakteriene benyttet i forsøket, men at alle bakteriene viste samme tendens til økt vekst med lenger tid ved romtemperatur. *S. aureus* vokste bedre med daglige korte opphold i romtemperatur, enn ved kontinuerlig kjølelagring. Det ser ut til at tiden ved 25 °C (henholdsvis 30 minutter, én time eller to timer) spiller en mindre rolle enn om bakteriene oppholdes i romtemperatur eller ikke. Vekst av *L. monocytogenes* påvirkes i større grad av tiden i romtemperatur enn *S. aureus*. Særlig ved 4 °C gjør dette seg gjeldene. To timer daglig i romtemperatur førte til stor økning i bakterieveksten i forhold til en time og 30 minutter daglig i romtemperatur. Dette er særlig av betydning for personer i risikogrupperne, som gravide. Av de 45 forbrukerne med i casestudien utført ved Nofima Mat, var 17 personer gravide. Resultatene viser ingen forskjell i forbrukeradferd mellom de gravide og andre forbrukere (Røssvoll 2010).

Grensen for bakterienes evne til å forårsake matbåren infeksjon og intoksikasjon varierer for de ulike bakteriene. Gjennomsnittstiden bakteriene bruker på å nå den respektive infektive dosen, var 6,4 dager ved konstant lagring i kjøleskap ved 4 °C. Resultatene forutsetter at 100 bakterier finnes ved starten. Dersom pålegget tas ut i romtemperatur to timer daglig, reduseres gjennomsnittstiden til 3,8 dager.

ved 8 °C var gjennomsnittstiden 5,2 dager ved konstant lagring i kjøleskap, mens to timer daglig i romtemperatur førte til at den infektive dosen ble nådd etter 2,5 dager. *Y. enterocolitica* nådde den infeksjose dosen for infeksjon raskest ved både 4 og 8 °C. *B. weihenstephanensis* vokste ikke over den infeksjose grensen ved 4 °C, og brukte lengst tid på å nå den ved 8 °C.

Gildes holdbarhetsanbefaling på tre til fem dager for åpnet kjøttpålegg er dermed å anse som usikker. Bakteriene undersøkt i dette forsøket kan vokse i kjøleskapet ved 4 °C (med unntak av *S. aureus*), som resultatene viser vil uttak av pålegget ved frokosten føre til oppformering av bakteriene. Dette vil redusere holdbarheten betraktelig.

Resultatene viser at 30 minutter daglig i romtemperatur spiller en liten rolle for de fleste bakteriene i forsøket. Årsaken til dette kan være at 30 minutter er for kort tid til at bakteriene begynner å vokse, før de kjøles ned igjen. Tilvenningsfasen til bakteriene kommer ikke tydelig fram av vekstkurvene, fordi det bare er tatt prøver en gang per dag. Flere målinger per dag ville gitt en trappeformliknende kurve, som viser at bakteriene vokser lite ved opphold i romtemperatur, før de settes tilbake til 4 og 8 °C.

Selv om antall *B. weihenstephanensis* og *S. aureus* nådde grensen for tilstrekkelig toksinproduksjon til å forårsake intoksikasjoner, viser resultatene liten effekt av korte opphold i romtemperatur med hensyn på toksinproduksjon. Dette er trolig på grunn av korte, avbrutte opphold i romtemperatur. Sannsynligvis ville lagring ved konstant temperatur på 25 °C resultere i mer toksinproduksjon. Resultatene viser liten produksjon av emetisk toksin for *B. weihenstephanensis*. Preparert toksinekstrakt fra *B. cereus* ble ikke analysert for tilstedeværelse av cereulide, fordi *B. cereus* ikke vokste i løpet av forsøksperioden. Det er dermed usannsynlig at de produserer emetisk toksin, i og med at toksinene finnes i biomassen (Thorsen et al. 2009).

Kun den siste dagen ved 8 °C med en og to timer daglig i romtemperatur viser tilstedeværelse av cereulide. Det kan dermed se ut til at bakteriene trenger høyere temperaturer over tid for toksinproduksjon. Dette samsvarer med Thorsen et al, som viser lav cereulideproduksjon ved 8 °C. Med preinkubering ved 8 °C i en uke, blir cereulide påvist etter 10 timer ved 25 °C

(Thorsen et al. 2009). Resultatene kan relateres til resultatene av vekstforsøket på agaroverflater.

Enterotoksinproduksjon ble påvist for begge *S. aureus*- stammene ved 12 °C, og ved 8 °C for *S. aureus* 50089. Den negative kontrollen viste i alle tilfeller for høy optisk tetthet, resultatene er dermed ikke gyldige ifølge produsenten (Biocontrol). Ved å subtrahere fra verdien av de negative kontrollene, ble det ikke påvist enterotoksinproduksjon for *S. aureus* 50089 ved 12 °C. Ved 8 °C var den optiske tettheten over terskelverdien, selv om den negative kontrollen er trukket fra. For *S. aureus* 50583 ved 12 °C faller enterotoksinproduksjon ved dag fem bort, det samme gjør produksjonen ved en time daglig ved 25 °C for dag sju og ni.

Metoden benyttet er kvalitativ og kan være semikvantitativ, dersom alle volumer benyttet i prosessen er kjent. TRANSIA[®] platen er sensitiv, og kan detektere enterotoksiner ned til 0,25 ng toksin per g prøve (Biocontrol). Kvantifisering av påvist toksin ble det ikke tid til i denne omgang, noe som vil være interessant å gjøre. I tillegg vil det være hensiktsmessig å analysere toksinekstraktene på nytt, med tanke på de høye negative kontrollene. Det sensitive punktet med TRANSIA[®] settet er vasking av brønnene. Vaskingen utgjør en stor feilkilde fordi det kan være vanskelig å vaske brønnene ordentlig, og det er få muligheter til å kontrollere vaskingen underveis i analysen.

Det ble ikke tid til å analysere alle prøvene på grunn av ventetid på produksjon av kaninplasma. Det er dermed ikke analysert toksinprøver ved 8 °C for *S. aureus* 50583, eller ved 8 °C for *S. aureus* 50089, forsøk 2.

Vekstforsøket på agaroverflater ble utført med to stammer av hver bakterie i forsøk 1. På grunn av blant annet arbeidsmengde og tid, ble det i forsøk 2 benyttet en stamme av hver bakterie. Resultatene fra vekstforsøket på agaroverflater viser at *B. cereus* ikke vokste ved 4 °C, og svært lite ved 8 °C. Dette er årsaken til at *B. weihenstephanensis* ble valgt til gjentakforsøket. *L. monocytogenes*- stammene vokste omtrent like fort i vekstforsøket på agaroverflater. *L. monocytogenes* MF2184 ble valgt til gjentakforsøket på grunn av at den vokser relativt raskt ved lave temperaturer. *S. aureus* 50089 ble valgt som gjentakstamme fordi bakterien produserer enterotoksin A, det vanligste toksinet som forårsaker matbåren sykdom (Rørvik & Granum 2007). Av *Y. enterocolitica*-stammene benyttet i det første

forsøket er O:3 den vanligste serotypen i Norge (Kapperud 2007). *Y. enterocolitica* O:3 ble derfor benyttet i gjentakforsøket.

B. weihenstephanensis vokste lite ved 4 °C i vekstforsøket på agaroverflater, og vokste ikke ved 4 °C i vekstforsøket i suspensjon. Det ser ut til at opphold i romtemperatur to timer daglig har påvirket bakterieveksten, fordi bakteriene vokste veldig lite ved de andre betingelsene. En studie av overflatevekst på *B. weihenstephanensis* MC67 utført av Thorsen et al. i 2009 viste reduksjon i antall celler ved lagring en uke ved 5 °C. Det ble foreslått at bakteriene ble stresset av kulden etter oppformering ved 30 °C, selv om genet som koder for kuldesjokkproteinet ble påvist tidligere (Thorsen et al. 2006). Bakteriene vokste godt i en uke ved 8 °C (Thorsen et al. 2009). Dette gjenspeiles i resultatene i vekstforsøket på agaroverflater, hvor *B. weihenstephanensis* viser god vekst ved 8 °C.

I Thorsens studie fra 2009, sank celletallet imidlertid ved videre inkubasjon ved 8 °C (tre uker). Resultatene til vekstforsøket på agaroverflater ved 8 °C viser at veksten avtok mot slutten av forsøket (dag 6 – 7). Bakteriene gikk sannsynligvis inn i den stasjonære fasen før dødsfasen inntreffer, noe den tydelig gjorde i Thorsens studie. Sannsynligvis ville videreføring av vekstforsøket gitt de samme resultatene som Thorsen fant i 2009. Ved 8 °C ser det ut til at korte opphold ved 25 °C har stor effekt på bakterieveksten. *B. weihenstephanensis* vokste bedre med daglige korte opphold i romtemperatur enn ved kontinuerlig kjølelagring. Det ser ut til at tiden ved 25 °C (henholdsvis 30 minutter, en time eller to timer) spiller en mindre rolle enn om bakteriene oppholdes i romtemperatur eller ikke.

Vekst av *L. monocytogenes* påvirkes i stor grad av tiden i romtemperatur. Særlig ved 4 °C gjør dette seg gjeldene. To timer daglig i romtemperatur førte til stor økning i bakterieveksten i forhold til én time og 30 minutter daglig i romtemperatur. Ved 8 °C er det liten forskjell på bakterievekst med og uten inkubasjon ved 25 °C. Det ser ut til at inkubering i romtemperatur har liten innvirkning på bakterieveksten fordi *L. monocytogenes* vokser godt ved 8 °C (Bhunia 2008).

Veksten til *S. aureus* ved 8 °C var relativt liten sammenliknet med de andre bakteriene. Årsaken til dette er at *S. aureus* har nedre vekstgrense ved 7 °C (Medvedova et al. 2009a; Medvedova et al. 2009b; Tatini 1973). Det var dermed forventet liten vekst av *S. aureus* ved 8

°C.. Vekstkurvene ved 12 °C viser liten effekt av inkubasjon ved 25 °C. Dette er som forventet i og med at *S. aureus* vokser relativt godt ved 12 °C (Medvedova et al. 2009b). For *S. aureus* 50583 ser det ut til at opphold i romtemperatur har en liten effekt på bakterieveksten, uavhengig av om bakteriene oppholdes i romtemperatur i 30 minutter, én time eller to timer daglig. Celletallet er gjennomgående høyere for bakteriene med inkubasjon ved romtemperatur, i forhold til ved konstant lagring ved 12 °C.

Bakterieveksten ved 4 °C viser små forskjeller ved de ulike inkubasjonsbetingelsene, fordi *Y. enterocolitica* vokser godt ved 4 °C (Andersen et al. 1991). Bakteriene vokste likevel litt raskere med opphold ved 25 °C. Veksthastigheten økte med lenger opphold i romtemperatur, det vil si at bakteriene med 30 minutter daglig opphold i romtemperatur vokste raskere enn bakteriene ved konstant temperatur. Én time daglig i romtemperatur gav raskere vekst enn bakteriene med 30 minutter daglig i romtemperatur. Bakteriene vokste raskest med to timer daglig ved 25 °C. Årsaken til dette er sannsynligvis at *Y. enterocoliticas* optimale veksttemperatur finnes rundt 28 – 29 °C (Andersen et al. 1991). Bakteriene vil dermed vokse raskere når de oppholder seg ved optimale vekstforhold, i forhold til kjølelagring.

Ved 8 °C viste bakterieveksten små forskjeller mellom inkubasjonsbetingelsene. Årsaken til dette er dels fordi *Y. enterocolitica* generelt vokser godt ved 8 °C (Bhunja 2008). Forskjellene mellom de ulike inkubasjonsbetingelsene var forventet større, i og med *Y. enterocolitica* vokser optimalt ved 28 – 29 °C (Andersen et al. 1991). Det var dermed forventet større effekt av daglig inkubasjon ved 25 °C.

Vekstkurvene til alle bakteriene viser samme tendens, med lavest vekst ved kontinuerlig temperatur, og økende vekst med økende opphold i romtemperatur. Vekstkurvene viser tydelig forskjell mellom lagring ved konstant temperatur og inkubering i romtemperatur to timer daglig for noen av bakteriene. Paret t-test ble utført for å se signifikante forskjeller mellom de ulike inkubasjonsbetingelsene. Resultatene viste ingen signifikante forskjeller mellom lagring ved konstant temperatur og inkubasjon i to timer daglig ved 25 °C. Ved å se på én og én vekstkurve, vises ikke statistiske forhold optimalt. Det kunne vært hensiktsmessig å benytte større analyser, for å se på forskjellene. Årsaken til resultatet er sannsynligvis mangel på data fordi det kan være vanskelig å oppnå signifikante forskjeller med kun ett gjentaksforsøk. Det vil derfor være hensiktsmessig å utføre forsøket ytterligere en gang, og beregne dataene på nytt.

Vekstforsøket i suspensjon viste varierende resultater for de ulike bakteriene. *B. cereus*, *B. weihenstephanensis*, *L. monocytogenes* ILSI #36 og *L. monocytogenes* MF2184 vokste ikke, eller svært lite i suspensjon, mens *S. aureus* og *Y. enterocolitica* viste god vekst. *Y. enterocolitica* vokste godt ved 4 °C, noe som var forventet i og med *Y. enterocolitica* er en psykrotrof bakterie som trives godt i kaldt miljø (Andersen et al. 1991). En av årsakene til liten vekst i suspensjon kan være feil med inkubasjonstemperaturene, eller andre menneskelige feil som ikke ble oppdaget.

Resultatene indikerer at *L. monocytogenes* og *Y. enterocolitica* vokste bedre på overflater enn i suspensjon. Generelt vokser bakterier raskere i suspensjon enn på overflater fordi på agaroverflater immobiliseres cellene, mens de i suspensjon ikke fester seg til noe, og finnes dermed i vannfasen (Brocklehurst et al. 1997; Wilson et al. 2002). I tillegg fører lokale endringer, som for eksempel senket pH på koloniene, til redusert metabolsk aktivitet (Walker et al. 1997; Wimpenny et al. 1995). Resultatene fra vekstforsøkene i denne oppgaven korrelerer dermed ikke med litteraturen. *S. aureus* vokste raskere i suspensjon enn på agaroverflater for begge bakteriestammene. Dette samsvarer med litteraturen.

Resultatene fra vekstforsøket i suspensjon samsvarer med vekstforsøket på agaroverflater for *B. cereus*. Det ble ikke observert vekst ved 4 °C i noen av forsøkene. Det ville kanskje vært hensiktsmessig å utføre forsøkene med litt høyere temperaturer, som for eksempel 6 og 10 °C. *B. cereus* viste også imidlertid svært lite tegn til vekst ved 8 °C, slik at 6 °C sannsynligvis ville gitt det samme resultatet som 4 °C. Det kan være at *B. cereus* har sporulert ved 8 °C, for å beskytte seg mot den lave temperaturen (Bhunia 2008). Dette bør undersøkes nærmere.

Studier av bakterievekst gjøres ofte i suspensjon, som for eksempel i forsøk som ligger til grunn for ulike vekstmodeller som benyttes i risikoanalyse. I dette forsøket er vekst på agaroverflater undersøkt. Agaroverflatene likner mer på for eksempel kjøttpålegg enn suspensjon, samtidig som en overflate lettere varmes opp. Det var derfor hensiktsmessig å utføre forsøket ved bruk av overflatevekst.

For å bekrefte vekstforløpet på agaroverflater, bør forsøket utføres med pålegg. Da vil faktorer som organiske syrer tilsatt pålegget for å begrense bakterievekst spille en stor rolle

for veksten. Slike faktorer er ikke tatt i betraktning i dette forsøket, i og med det er utført på agarskåler.

Feilkilde ved metoden benyttet til vekstforløp på agaroverflater er skylling av bakteriene med peptonvann. Det er usikkert om alle bakteriene løses og pipetteres opp. Tween 80 ble derfor benyttet som detergent for å hindre sammenklumping av *B. cereus* og *B. weihenstephanensis*. Resultatene fra utarbeidelse av metode for skylling av bakterie, viste at Tween 80 i større grad hindret sammenklumping i forhold til peptonvann. Et alternativ til Tween 80 er sonikering ved bruk av ultralyd, men dette kan i verste fall skade cellene.

Resultatene viser at lagring ved 4 og 8 °C kan føre til vekst av patogene bakterier over grensen for matforgiftning. Veksten er imidlertid høyere ved 8 enn ved 4 °C, som er anbefalt kjøleskapstemperatur. Mange forbrukere vet ikke temperaturen i kjøleskapet, flere vet ikke hvor kaldt kjøleskapet burde være. Kjøleskapstemperaturen er ofte høyere enn anbefalt øvre grense på 4,4 °C, noe som øker faren for bakterievekst og matforgiftning. En forbrukerundersøkelse fra Uppsala i Sverige viser at gjennomsnittstemperaturen i matvarene oppbevart i forbrukernes kjøleskap varierer fra 6,2 °C i kjøttdeig til 7,4 °C i ferdigsalat. 25 – 33 % av prøvene av kjøttdeig, sild, ost og melk var lagret ved temperaturer over 8 °C. 5 – 11 % av matvarene ble lagret ved temperaturer høyere enn 10 °C (Marklinder et al. 2004). En forbrukerundersøkelse med temperaturloggere utført av Nofima Mat AS viste at gjennomsnittstemperaturen i kjøleskapet var 6,2 °C. Matvarene ble utsatt for romtemperaturer i gjennomsnittlig 47 minutter per dag med det lengste måltidet på 113 minutter (Røssvoll 2010). Dersom dette er representativt for forbrukerne, viser forsøkene i denne oppgaven at det er fare for matbåren infeksjon, dersom bakteriene kommer over i maten.

6. KONKLUSJON

- Gjentatte korte opphold i romtemperatur har stor betydning for bakterieveksten i forhold til lagring ved kontinuerlig kjøletemperatur. Resultatene indikerer at måltider med varighet opp mot to timer daglig, øker risikoen for matbårne infeksjoner.
- Det ble påvist liten toksindannelse for *B. weihenstephanensis* og *S. aureus*, selv om bakteriene var tilstede i tilfredsstillende høyt antall for toksinproduksjon. Korte, avbrutte opphold i romtemperatur fremmer trolig ikke toksinproduksjon.
- Veksten av *L. monocytogenes* påvirkes i stor grad av tiden bakteriene oppholdes i romtemperatur. Gravide og andre immunosuppressive personer er særlig utsatt for listeriose. Måltider på opptil to timer daglig øker betraktelig faren for listeriose for personer i risikogruppene.

7. VIDERE ARBEID

Forsøket bør utføres en gang til, for å bekrefte resultatene funnet i denne oppgaven. Det vil være interessant med flere målinger, for å få bedre oversikt over bakterieveksten, særlig ved bakterienes tilvenningsfase.

Det vil være hensiktsmessig å beregne resultatene statistisk på nytt med flere data, eventuelt benytte en større statistisk analyse, for å se signifikante forskjeller på bakterievekstens effekt av gjentatte korte opphold i romtemperatur.

For å bekrefte hypotesene bør forsøket utføres på kjøttpålegg, som for eksempel skivet kokt skinke. Det vil gi et klarere bilde på hvordan pålegget påvirkes ved gjentatte korte opphold i romtemperatur.

Dannelse av toksiner bør analyseres på nytt, forhåpentligvis uten for høy negativ kontroll. Prøvene bør analyseres ytterligere, for å kvantifisere toksinene.

8. REFERANSER

- Adams, M. R. & Moss, M. O. (2000a). Bacterial Agents of Foodborne Illness I: *Food Microbiology*, s. 184 - 271: The Royal Society of Chemistry.
- Adams, M. R. & Moss, M. O. (2000b). Factors Affecting the Growth and Survival of Microorganisms in Foods. I: *Food Microbiology*, s. 21 - 64: The Royal Society of Chemistry.
- Agata, N., Ohta, M. & Yokoyama, K. (2002). Production of Bacillus cereus emetic toxin (cereulide) in various foods. *International Journal of Food Microbiology*, 73 (1): 23-27.
- Agriculture, U. S. D. o. (2005). *Get the Lowdown on Chill for Food Safety: "Keep it Cool" - That's the Rule: USDA*
- U.S. Department of Agriculture: Food Safety and Inspection Service. Tilgjengelig fra: http://www.fsis.usda.gov/News_&_Events/NR_051905_01/index.asp (lest 10.05.2010).
- Ahvonen, P. (1972). Human yersiniosis in Finland. I. Bacteriology and serology. *Ann Clin Res*, 4 (1): 30 - 38.
- Andersen, J. K., Sorensen, R. & Glensbjerg, M. (1991). ASPECTS OF THE EPIDEMIOLOGY OF YERSINIA-ENTEROCOLITICA - A REVIEW. *International Journal of Food Microbiology*, 13 (3): 231-238.
- Arbuthnott, J. P., Coleman, D. C. & de Azavedo, J. S. (1990). Staphylococcal toxins in human disease. *Society for Applied Bacteriology symposium series*, 19: 101 - 107.
- Baird-Parker, A. C., Bryan, F. L., Buchanan, R. L., Busta, F. F., Christian, J. H. B., Doyle, M. P., Farkas, J., Grau, F. H., Hobbs, B. C., Jouve, J. L., et al. (1996). *Microorganisms in Foods 5: Microbiological Specifications of Food Pathogens* 1st utg., b. 5. London: International Commission on Microbiological Specifications for Foods of the International Union of Biological Societies. 513 s.
- Balaban, N. & Rasooly, A. (2000). Staphylococcal enterotoxins. *International Journal of Food Microbiology*, 61 (1): 1 - 10.
- Bhunja, A. K. (2008). *Foodborne Microbial Pathogens: Mechanisms and Pathogenesis*. Food Science Text Series: Springer Science+ Business Media, LLC. 276 s.
- Biocontrol. *Staphylococcal Enterotoxins ST0796*. Inc, B. S. (red.).
- Bottone, E. J. (1977). YERSINIA-ENTEROCOLITICA - PANORAMIC VIEW OF A CHARISMATIC MICROORGANISM. *Crc Critical Reviews in Microbiology*, 5 (2): 211-241.

- Bottone, E. J. (1999). *Yersinia enterocolitica*: overview and epidemiologic correlates. *Microbes and Infection*, 1 (4): 323-333.
- Brocklehurst, T. F., Mitchell, G. A. & Smith, A. C. (1997). A model experimental gel surface for the growth of bacteria on foods. *Food Microbiology*, 14 (4): 303-311.
- Bucher, M., Meyer, C., Grotzbach, B., Wacheck, S., Stolle, A. & Fredriksson-Ahomaa, M. (2008). Epidemiological data on pathogenic *Yersinia enterocolitica* in Southern Germany during 2000-2006. *Foodborne Pathogens and Disease*, 5 (3): 273-280.
- Charlier, C., Even, S., Gautier, M. & Le Loir, Y. (2008). Acidification is not involved in the early inhibition of *Staphylococcus aureus* growth by *Lactococcus lactis* in milk. *International Dairy Journal*, 18 (2): 197-203.
- Christiansson, A., Naidu, A. S., Nilsson, I., Wadstrom, T. & Pettersson, H. (1989). Toxin production by *Bacillus cereus* dairy isolates in milk at low temperatures. *Applied and Environmental Microbiology*, 55: 2595 - 2600.
- COMMISSION REGULATION (EC) No 2073/2005: of 15 November 2005 on microbiological criteria for foodstuffs. (2005). THE COMMISSION OF THE EUROPEAN COMMUNITIES. Tilgjengelig fra: <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=CONSLEG:2005R2073:20060101:EN:PDF> (lest 08.05.2010).
- Cover, T. L. & Aber, R. C. (1989). *Yersinia enterocolitica*. *The New England Journal of Medicine*, 321 (1): 16 - 24.
- Dierick, K., Van Coillie, E., Swiecicka, I., Meyfroidt, G., Devlieger, H., Meulemans, A., Hoedemaekers, G., Fourie, L., Heyndrickx, M. & Mahillon, J. (2005). Fatal family outbreak of *Bacillus cereus*-associated food poisoning. *Journal of Clinical Microbiology*, 43 (8): 4277-4279.
- Drobniewski, F. A. (1993). *Bacillus cereus* and Related Species. *Clinical Microbiology Reviews*, 6 (4): 324 - 338.
- Dufrenne, J., Soentoro, P., Tatini, S., Day, T. & Notermans, S. (1994). CHARACTERISTICS OF BACILLUS-CEREUS RELATED TO SAFE FOOD-PRODUCTION. *International Journal of Food Microbiology*, 23 (1): 99 - 109.
- Farber, J. M., Coates, E. D. F., Beausoleil, N. & Fournier, J. (1991). FEEDING TRIALS OF LISTERIA-MONOCYTOGENES WITH A NONHUMAN PRIMATE MODEL. *Journal of Clinical Microbiology*, 29 (11): 2606-2608.
- Finlay, W. J. J., Logan, N. A. & Sutherland, A. D. (2000). *Bacillus cereus* produces most emetic toxin at lower temperatures. *Letters of Applied Microbiology*, 31 (5): 385 - 389.
- Finlay, W. J. J., Logan, N. A. & Sutherland, A. D. (2002). *Bacillus cereus* emetic toxin production in relation to dissolved oxygen tension and sporulation. *Food Microbiology*, 19 (5): 423-430.

Folkehelseinstituttet. (1992). *Listeriose: Trøndelag i 1992*: Folkehelseinstituttet. Tilgjengelig fra:

http://www.fhi.no/eway/default.aspx?pid=233&trg=MainLeft_5799&MainArea_5661=5799:0:15,4641:1:0:0::0:0&MainLeft_5799=5544:73274::1:5800:13::0:0 (lest 26.04.2010).

Folkehelseinstituttet. (2003). *Stafylokokkmatforgifning etter inntak av kvit geitost*:

Folkehelseinstituttet. Tilgjengelig fra: www.fhi.no/artikler?id=27051 (lest 26.04.2010).

Folkehelseinstituttet. (2009). *Yersiniose; Oppland i 2006*. Tilgjengelig fra:

http://www.fhi.no/eway/default.aspx?pid=233&trg=MainLeft_5799&MainArea_5661=5799:0:15,4641:1:0:0::0:0&MainLeft_5799=5544:73289::1:5800:24::0:0.

Folkehelseinstituttet. (2010). *MSIS Statistikk*. Tilgjengelig fra: <http://www.msis.no/> (lest 24.04.2010).

Fredriksson-Ahomaa, M., Hallanvuo, S., Korte, T., Siitonen, A. & Korkeala, H. (2001).

Correspondence of genotypes of sporadic *Yersinia enterocolitica* bioserotype 4/O : 3 strains from human and porcine sources. *Epidemiology and Infection*, 127 (1): 37-47.

Fredriksson-Ahomaa, M., Stolle, A., Siitonen, A. & Korkeala, H. (2006). Sporadic human *Yersinia enterocolitica* infections caused by bioserotype 4/O : 3 originate mainly from pigs. *Journal of Medical Microbiology*, 55 (6): 747-749.

Fugett, E., Fortes, E., Nnoka, C. & Wiedmann, M. (2006). International life sciences institute north America *Listeria monocytogenes* strain collection: Development of standard *Listeria monocytogenes* strain sets for research and validation studies. *Journal of Food Protection*, 69 (12): 2929-2938.

Fujikawa, H. & Morozumi, S. (2006). Modeling *Staphylococcus aureus* growth and enterotoxin production in milk. *Food Microbiology*, 23 (3): 260-267.

Gilde. *Holdbarhet på kjøttprodukter*: Gilde. Tilgjengelig fra:

<http://www.gilde.no/holdbarhet/category13257.html> (lest 30.04.2010).

Granum, P. E. (2007). *Bacillus cereus* og andre *Bacillus*-arter. I: Granum, P. E. (red.) *Matforgifning*, s. 185- 195. Kristiansand: Høyskoleforlaget AS.

Granum, P. E. (2007). Vekst, kontroll og drap. I: Granum, P. E. (red.) *Matforgifning*, s. 59 - 71: Høyskoleforlaget.

Hendriksen, N. B., Hansen, B. M. & Johansen, J. E. (2006). Occurrence and pathogenic potential of *Bacillus cereus* group bacteria in a sandy loam. *Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology*, 89 (2): 239-249.

- Hennekinne, J. A., Guillier, F., Perelle, S., De Buyser, M. L., Dragacci, S., Krys, S. & Lombard, B. (2007). Intralaboratory validation according to the EN ISO 16 140 standard of the Vidas SET2 detection kit for use in official controls of staphylococcal enterotoxins in milk products. *Journal of Applied Microbiology*, 102 (5): 1261-1272.
- Jaaskelainen, E. L., Teplova, V., Andersson, M. A., Andersson, L. C., Tammela, P., Andersson, M. C., Pirhonen, T. I., Saris, N. E. L., Vuorela, P. & Salkinoja-Salonen, M. S. (2003). In vitro assay for human toxicity of cereulide, the emetic mitochondrial toxin produced by food poisoning *Bacillus cereus*. *Toxicology in Vitro*, 17 (5-6): 737-744.
- Jackson, V., Blair, I. S., McDowell, D. A., Kennedy, J. & Bolton, D. J. (2007). The incidence of significant foodborne pathogens in domestic refrigerators. *Food Control*, 18 (4): 346-351.
- Kapperud, G. (2007). *Yersinia enterocolitica*. I: Granum, P. E. (red.) *Matforgiftning*, s. 165-177. Kristiansand: Høyskoleforlaget AS.
- Kennedy, J., Jackson, V., Blair, I. S., McDowell, D. A., Cowan, C. & Bolton, D. J. (2005). Food safety knowledge of consumers and the microbiological and temperature status of their refrigerators. *Journal of Food Protection*, 68 (7): 1421-1430.
- Kerouanton, A., Hennekinne, J. A., Letertre, C., Petit, L., Chesneau, O., Brisabois, A. & De Buyser, M. L. (2007). Characterization of *Staphylococcus aureus* strains associated with food poisoning outbreaks in France. *International Journal of Food Microbiology*, 115 (3): 369-375.
- Larsen, H. D. & Jørgensen, K. (1999). Growth of *Bacillus cereus* in pasteurized milk products. *International Journal of Food Microbiology*, 46 (2): 173 - 176.
- Lechner, S., Mayr, R., Francis, K. P., Pruss, B. M., Kaplan, T., Wiessner-Gunkel, E., Stewart, G. & Scherer, S. (1998). *Bacillus weihenstephanensis* sp. nov. is a new psychrotolerant species of the *Bacillus cereus* group. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 48: 1373-1382.
- Lindqvist, R., Sylven, S. & Vagsholm, I. (2002). Quantitative microbial risk assessment exemplified by *Staphylococcus aureus* in unripened cheese made from raw milk. *International Journal of Food Microbiology*, 78 (1-2): 155-170.
- Mahler, H., Pasi, A., Kramer, J. M., Schulte, P., Scoging, A. C., Bar, W. & Krahenbuhl, S. (1997). Fulminant liver failure in association with the emetic toxin of *Bacillus cereus*. *New England Journal of Medicine*, 336 (16): 1142-1148.
- Marklinder, I. M., Lindblad, M., Eriksson, L. M., Finnson, A. M. & Lindqvist, R. (2004). Home storage temperatures and consumer handling of refrigerated foods in Sweden. *Journal of Food Protection*, 67 (11): 2570-2577.
- Martinez, S., Borrajo, R., Franco, I. & Carballo, J. (2007). Effect of environmental parameters on growth kinetics of *Bacillus cereus* (ATCC 7004) after mild heat treatment. *International Journal of Food Microbiology*, 117 (2): 223-227.

- McLauchlin, J., Mitchell, R. T., Smerdon, W. J. & Jewell, K. (2004). *Listeria monocytogenes* and listeriosis: a review of hazard characterisation for use in microbiological risk assessment of foods. *International Journal of Food Microbiology*, 92 (1): 15-33.
- Medvedova, A., Valik, L., Sirotna, Z. & Liptakova, D. (2009a). Growth Characterisation of *Staphylococcus aureus* in Milk: a Quantitative Approach. *Czech Journal of Food Sciences*, 27 (6): 443-453.
- Medvedova, A., Valik, L. & Studenicova, A. (2009b). The Effect of Temperature and Water Activity on the Growth of *Staphylococcus aureus*. *Czech Journal of Food Sciences*, 27: 28-35.
- Mortimer, P. R., McCann, G. (1974). Food-poisoning episodes associated with *Bacillus cereus* in fried rice. *The Lancet*, 303 (7865): 1043-1045.
- Normanno, G., Firinu, A., Virgilio, S., Mula, G., Dambrosio, A., Poggiu, A., Decastelli, L., Mioni, R., Scuota, S., Bolzoni, G., et al. (2005). Coagulase-positive *Staphylococci* and *Staphylococcus aureus* in food products marketed in Italy. *International Journal of Food Microbiology*, 98 (1): 73-79.
- Nygård, K., Vold, L., Tafjord Heier, B., Bruun, T. & Kapperud, G. (2010). Årsrapport: Matbårne infeksjoner og utbrudd i 2009. Meldingssystem for smittsomme sykdommer (MSIS) og
- Vevbasert system for utbruddsvarsling (Vesuv): Folkehelseinstituttet.
- Næringsmidler, N. M. f. (1996). *Yersinia enterocolitica* (NMKL 117). 3. utg.: NMKL. Tilgjengelig fra: <http://shop.nmkl.org/> (lest 24.04.2010).
- Næringsmidler, N. M. f. (2007). *Listeria monocytogenes* (NMKL 136). 4. utg.: NMKL. Tilgjengelig fra: <http://shop.nmkl.org/> (lest 07.05.10).
- Næringsmidler, N. M. f. (2009). *Coagulase positive staphylococci* (NMKL 66): NMKL. Tilgjengelig fra: <http://shop.nmkl.org/> (lest 25.04.2010).
- Paananen, A., Mikkola, R., Sareneva, T., Matikainen, S., Hess, M., Andersson, M., Julkunen, I., Salkinoja-Salonen, M. S. & Timonen, T. (2002). Inhibition of human natural killer cell activity by cereulide, an emetic toxin from *Bacillus cereus*. *Clinical and Experimental Immunology*, 129 (3): 420-428.
- Report, M. a. M. W. (1999). *Update: Multistate Outbreak of Listeriosis, United States, 1998-1999*: Centers for Disease, Control and Prevention.
- Rode, T. M., Langsrud, S., Holck, A. & Moretro, T. (2007). Different patterns of biofilm formation in *Staphylococcus aureus* under food-related stress conditions. *International Journal of Food Microbiology*, 116 (3): 372-383.
- Rørvik, L. M. (2007). *Listeria monocytogenes*. I: Granum, P. E. (red.) *Matforgiftning*, s. 223-234. Kristiansand: Høyskoleforlaget AS.

- Rørvik, L. M. & Granum, P. E. (2007). *Staphylococcus aureus*. I: Granum, P. E. (red.) *Matforgiftning*, s. 235- 245. Kristiansand: Høyskoleforlaget AS.
- Røssvoll, E. (2010). *Case studie: Temperaturer i kjøleskap og ved frokostbordet*: Nofima Mat AS. Upublisert manuskript.
- Schoeni, J. L. & Wong, A. C. L. (2005). *Bacillus cereus* food poisoning and its toxins. *Journal of Food Protection*, 68 (3): 636-648.
- Schuchat, A., Swaminathan, B. & Broome, C. V. (1991). EPIDEMIOLOGY OF HUMAN LISTERIOSIS. *Clinical Microbiology Reviews*, 4 (2): 169-183.
- Schwartz, R. A., Nervi S.J. (2007). Erythema nodosum: A sign of systemic disease. *American Family Physician*, 75 (5): 695 - 700.
- Stenstad, T., Grahek-Ogden, D., Nilsen, M., Skaare, D., Martinsen, T.-A., Lassen, J. & Bruu, A.-L. (2007). Et utbrudd av *Yersinia enterocolitica* O:9-infeksjon. *Tidsskrift for Den norske legeforening*, 127 (5): 586 - 589.
- Sutherland, A. D. & Murdoch, R. (1994). SEASONAL OCCURRENCE OF PSYCHROTROPHIC BACILLUS SPECIES IN RAW-MILK, AND STUDIES ON THE INTERACTIONS WITH MESOPHILIC BACILLUS SP. *International Journal of Food Microbiology*, 21 (4): 279 - 292.
- Tatini, S. R. (1973). INFLUENCE OF FOOD ENVIRONMENTS ON GROWTH OF STAPHYLOCOCCUS-AUREUS AND PRODUCTION OF VARIOUS ENTEROTOXINS. *Journal of Milk and Food Technology*, 36 (11): 559-563.
- Tauxe, R. V., Wauters, G., Goossens, V., Van Noyen, R., Vandepitte, J., Martin, S. M., Mol, P. D. & Thiers, G. (1987). *Yersinia enterocolitica* Infections and Pork: The Missing Link. *The Lancet*, 329 (8542): 1129 - 1132.
- Thorsen, L., Hansen, B. M., Nielsen, K. F., Hendriksen, N. B., Phipps, R. K. & Budde, B. B. (2006). Characterization of emetic *Bacillus weihenstephanensis*, a new cereulide-producing bacterium. *Applied and Environmental Microbiology*, 72 (7): 5118-5121.
- Thorsen, L., Budde, B. B., Henrichsen, L., Martinussen, T. & Jakobsen, M. (2009). Cereulide formation by *Bacillus weihenstephanensis* and mesophilic emetic *Bacillus cereus* at temperature abuse depends on pre-incubation conditions. *International Journal of Food Microbiology*, 134 (1-2): 133-139.
- Turnbull, P. C. B. (1981). BACILLUS-CEREUS TOXINS. *Pharmacology & Therapeutics*, 13 (3): 453-505.
- Valik, L. & Gerner, F. (1993). GROWTH OF STAPHYLOCOCCUS-AUREUS IN PASTA IN RELATION TO ITS WATER ACTIVITY. *International Journal of Food Microbiology*, 20 (1): 45-48.
- Walker, S. L., Brocklehurst, T. F. & Wimpenny, J. W. T. (1997). The effects of growth dynamics upon pH gradient formation within and around subsurface colonies of *Salmonella typhimurium*. *Journal of Applied Microbiology*, 82 (5): 610-614.

- Wilson, P. D. G., Brocklehurst, T. F., Arino, S., Thuault, D., Jakobsen, M., Lange, M., Farkas, J., Wimpenny, J. W. T. & Van Impe, J. F. (2002). Modelling microbial growth in structured foods: towards a unified approach. *International Journal of Food Microbiology*, 73 (2-3): 275-289.
- Wimpenny, J. W. T., Leistner, L., Thomas, L. V., Mitchell, A. J., Katsaras, K. & Peetz, P. (1995). Submerged bacterial colonies within food and model systems: Their growth, distribution and interactions. *International Journal of Food Microbiology*, 28 (2): 299-315.

9. VEDLEGGSLISTE

Vedlegg 1. Medier og løsninger.....	ii
Vedlegg 2. Vekstforløp på agaroverflate ved varierende temperatur, forsøk 2.....	iii
Vedlegg 3. Bestemmelse av toksindannelse, <i>S. aureus</i> - enterotoksiner, forsøk 2.....	viii
Vedlegg 4. Rådata vekstforløp i suspensjon ved konstant temperatur.....	ix
Vedlegg 5. Rådata vekstforløp på agaroverflate ved varierende temperatur, forsøk 1.....	xii
Vedlegg 6. Rådata vekstforløp på agaroverflate ved varierende temperatur, forsøk 2.....	xvii
Vedlegg 7. Rådata bestemmelse av toksindannelse. <i>S. aureus</i> - enterotoksiner.....	xx

Vedlegg 1. Medier og løsninger

Medier:

- Tryptone Soya Agar (TSA):
40 gram TSApulver (Oxoid, Hampshire, Storbritannia) blandes med 1 liter destillert vann (ELGA Purelab option-R 7/15, ELGA Labwater, Bucks, Storbritannia).
Blandingen ristes godt, og steriliseres i autoklav (Getinge GEL 2606 EC-1, Getinge AB, Sverige) eller certoklav (Certoclav sterilizer CV-EL 12L/18 L, Certoclav Sterilizer GmbH, Østerrike) i 15 minutter ved 121 °C.
- Tryptone Soya Broth (TSB):
30 gram TBSpulver (Oxoid, Hampshire, Storbritannia) blandes med 1 liter destillert vann. Blandingen ristes godt, og steriliseres i autoklav eller certoklav i 15 minutter ved 121 °C
- Standard Plate Count Agar (PCA):
23,5 gram PCApulver (Oxoid, Hampshire, Storbritannia) blandes med 1 liter destillert vann. Blandingen ristes godt, og steriliseres i autoklav eller certoklav i 15 minutter ved 121 °C.

Løsninger:

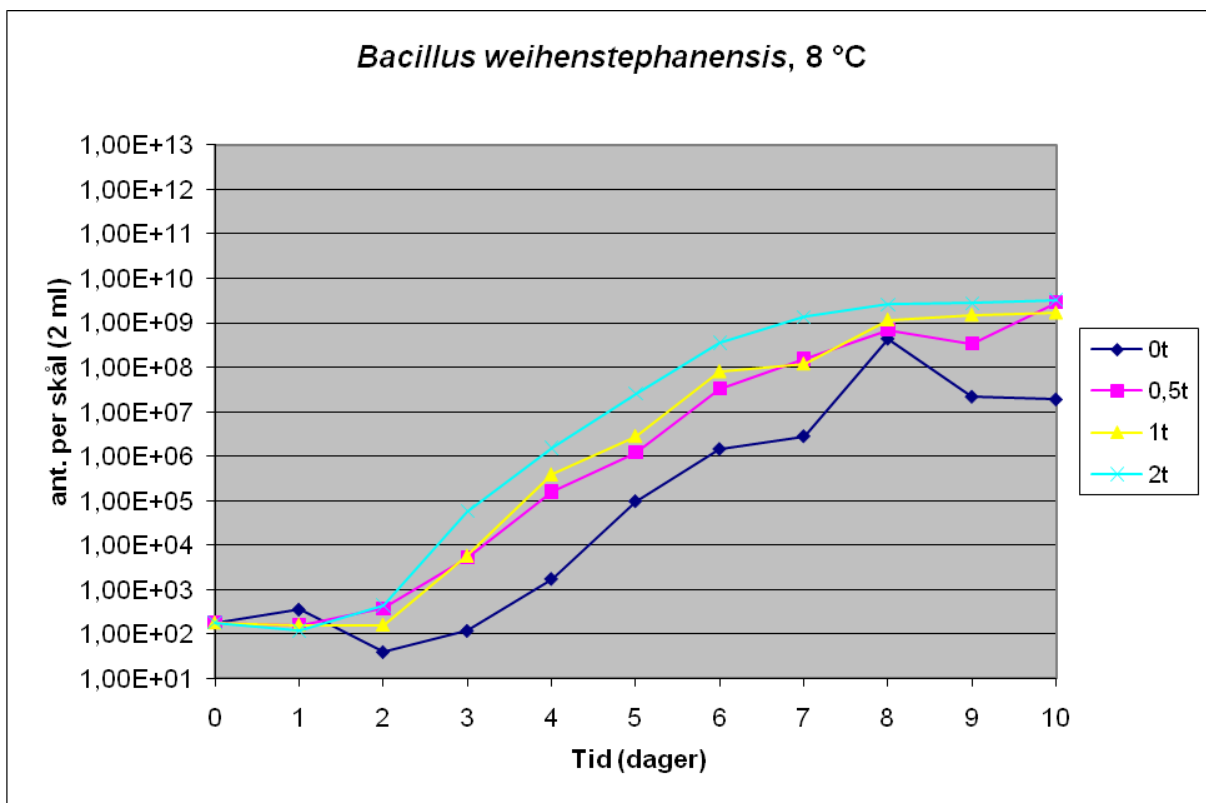
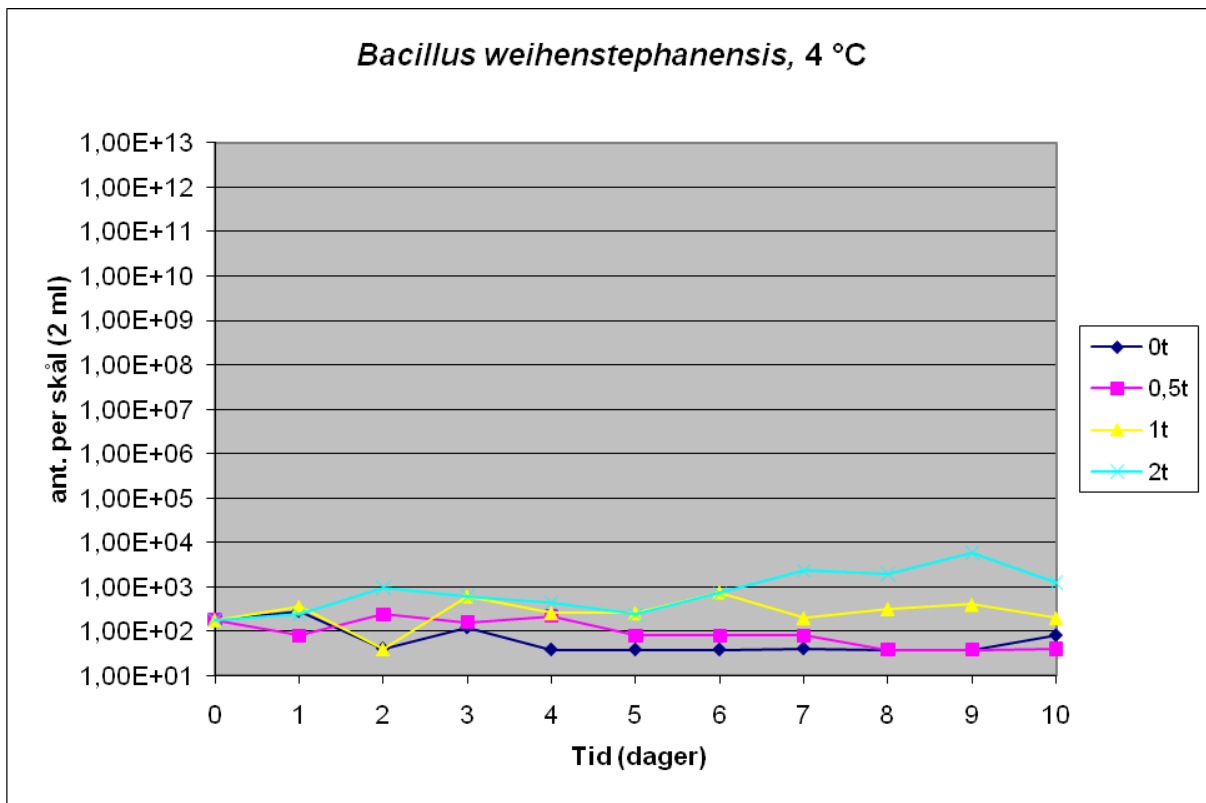
- Peptonvann:
1 gram pepton (Bacto Peptone, nr 0118-01-8, Difco, USA) og 8,5 gram natriumklorid ((NaCl) nr. 106404, Merck KGaA, Damstadt, Tyskland) tilsettes 1 liter destillert vann. PH justeres til 7,2, og steriliseres i autoklav i 15 minutter ved 121 °C.
- Sterilisert destillert vann:
Destillert vann steriliseres i autoklav eller ceroklav i 15 minutter ved 121 °C.
- Tween 80 (0,2 %):
200 µl Tween 80 (Sigma- Aldrich, Oslo) blandes i 100 ml sterilisert destillert vann.
Blandningen ristes godt.

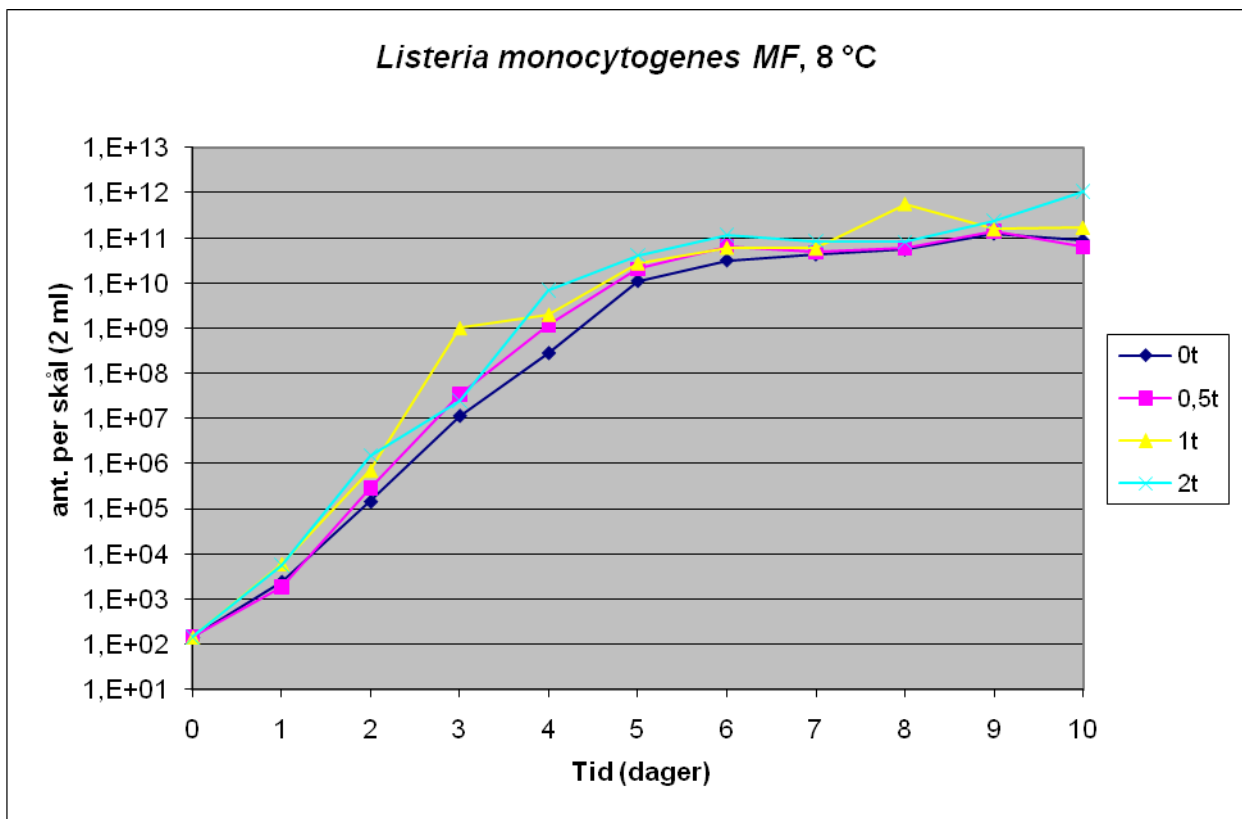
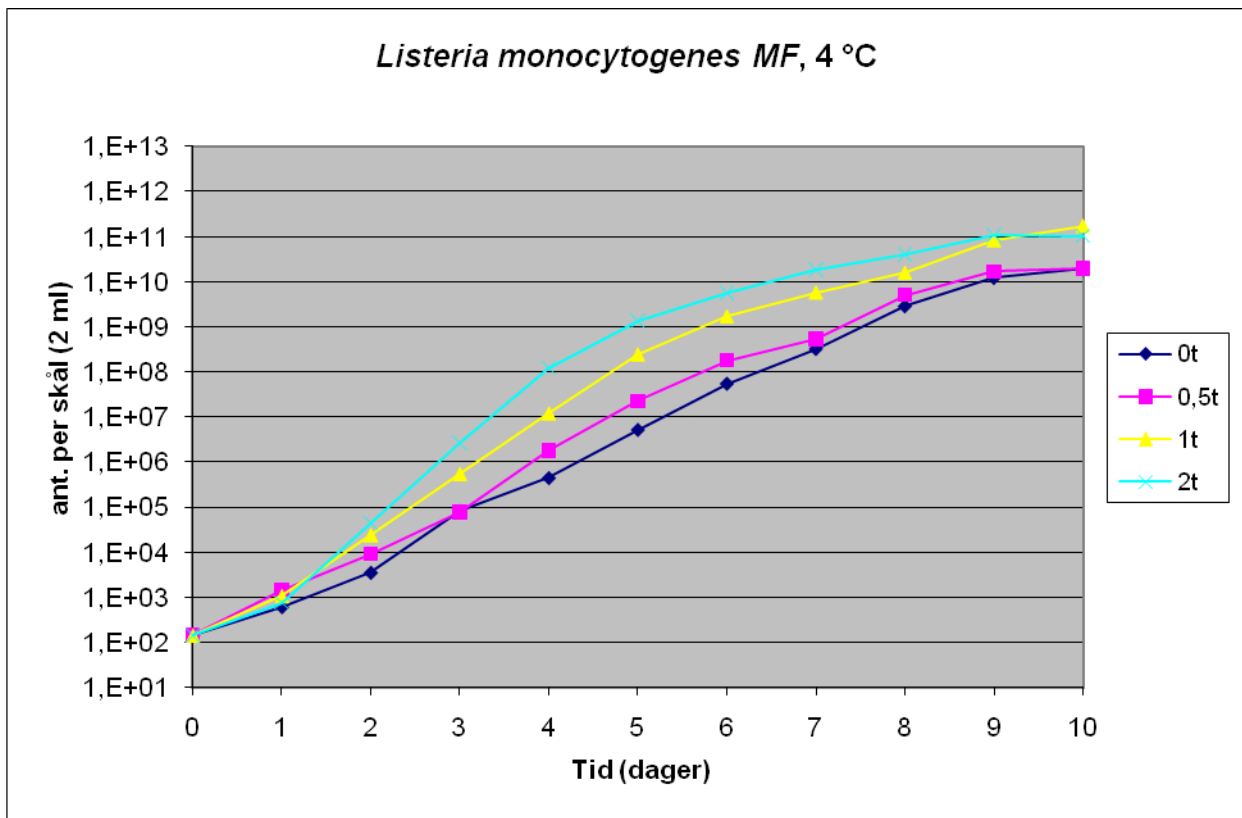
Vedlegg 2. Vekstforløp på agaroverflate ved varierende temperatur, forsøk 2.

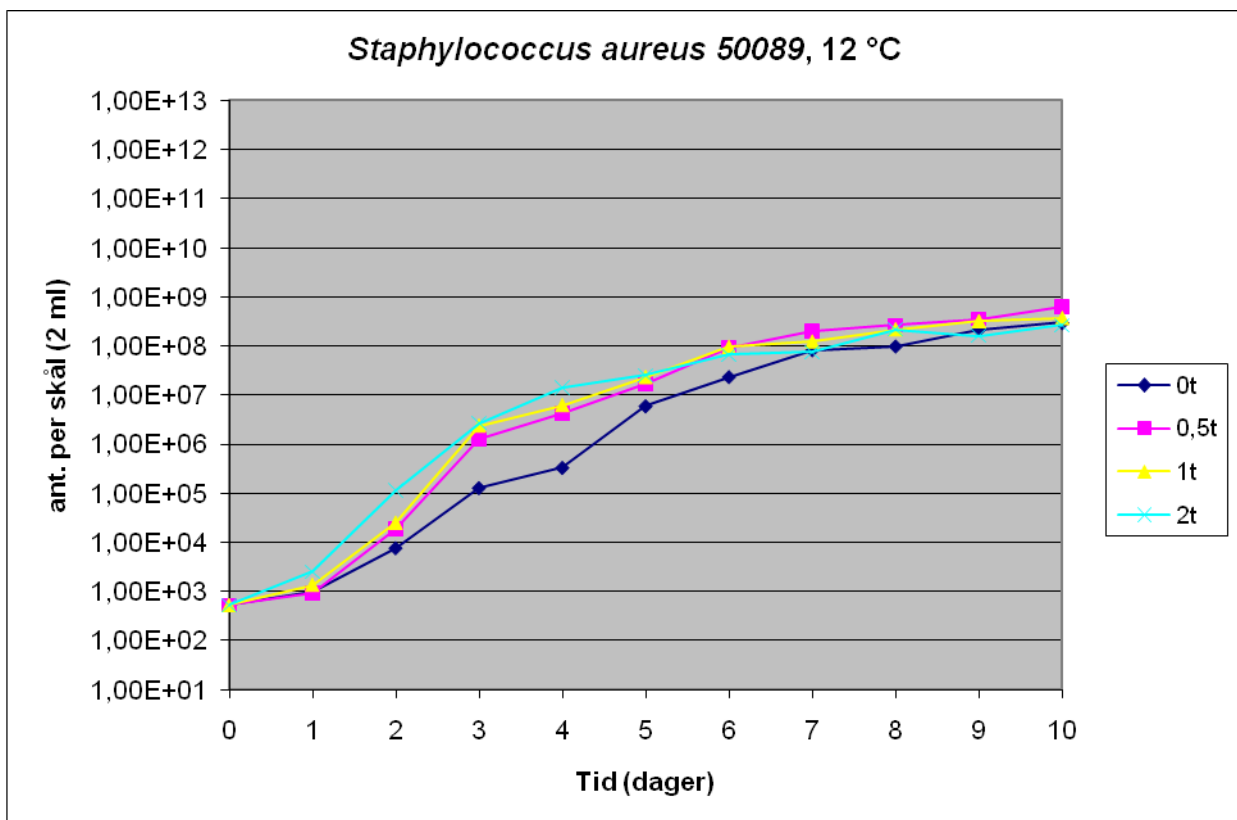
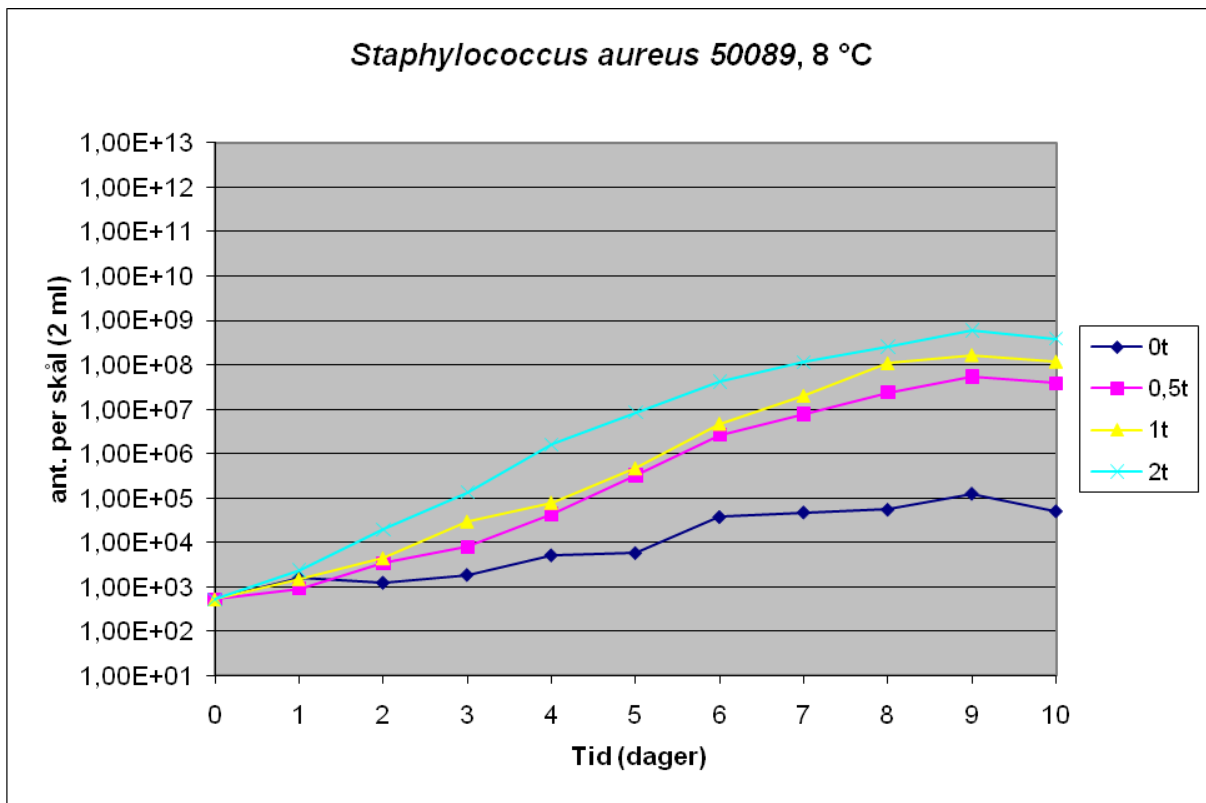
En stamme av hver bakterie ble benyttet i gjentaktforsøket. En oversikt over stammene vises i tabell V.2.1.

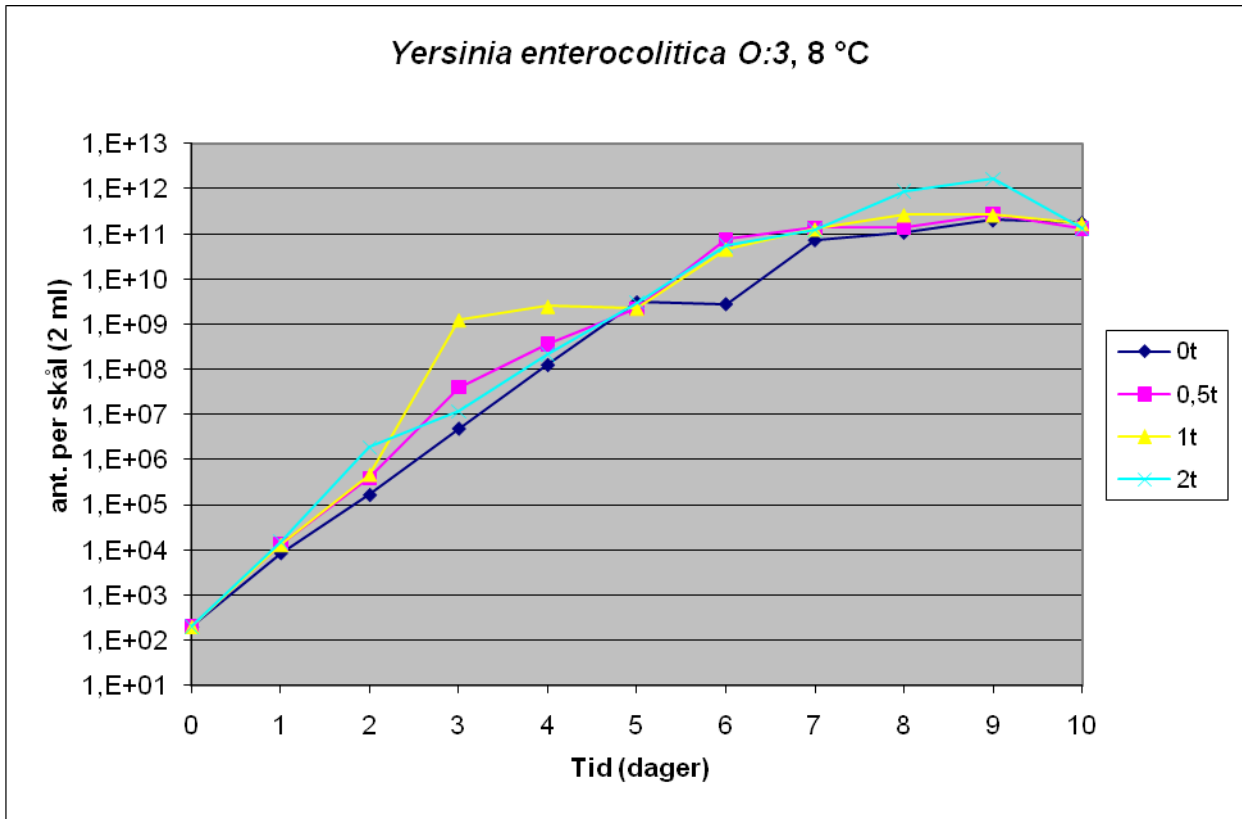
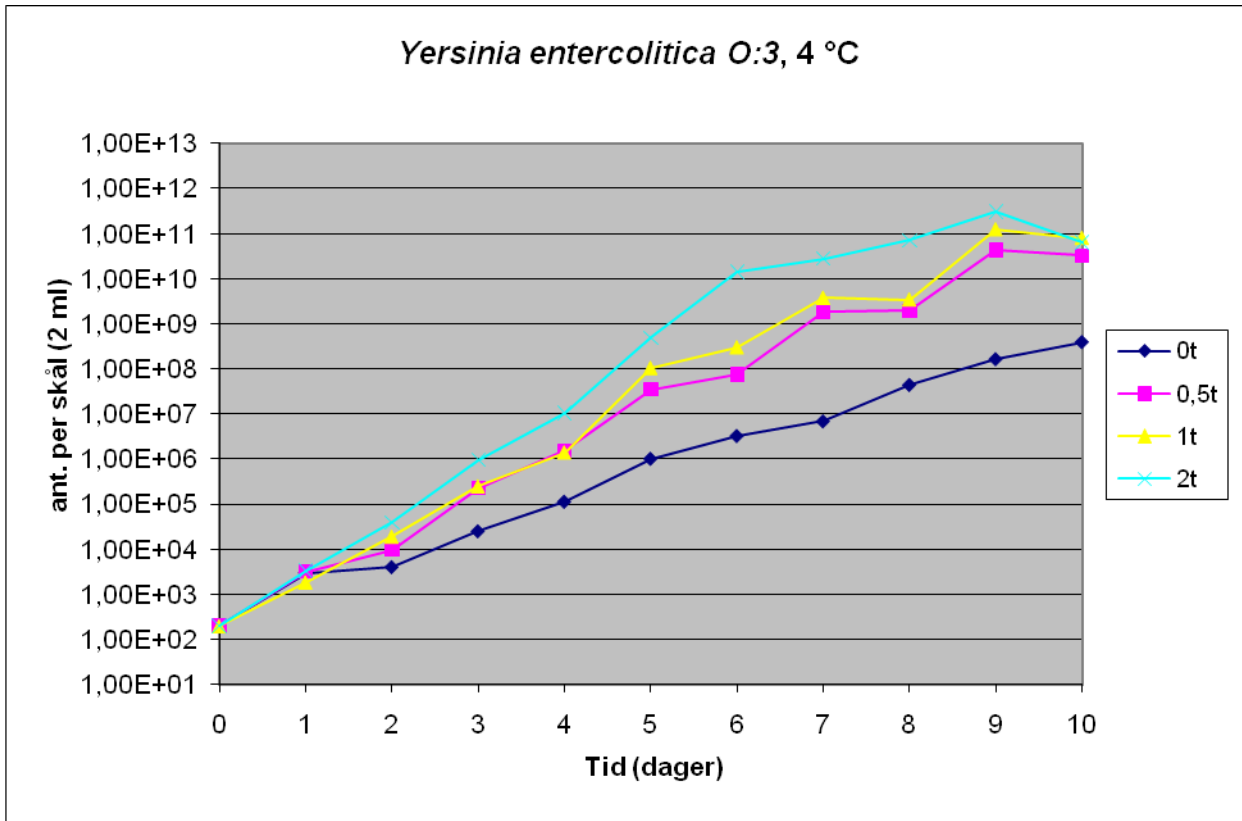
Tabell V.2.1: Tabellen viser bakteriestammene benyttet i vekstforsøk to.

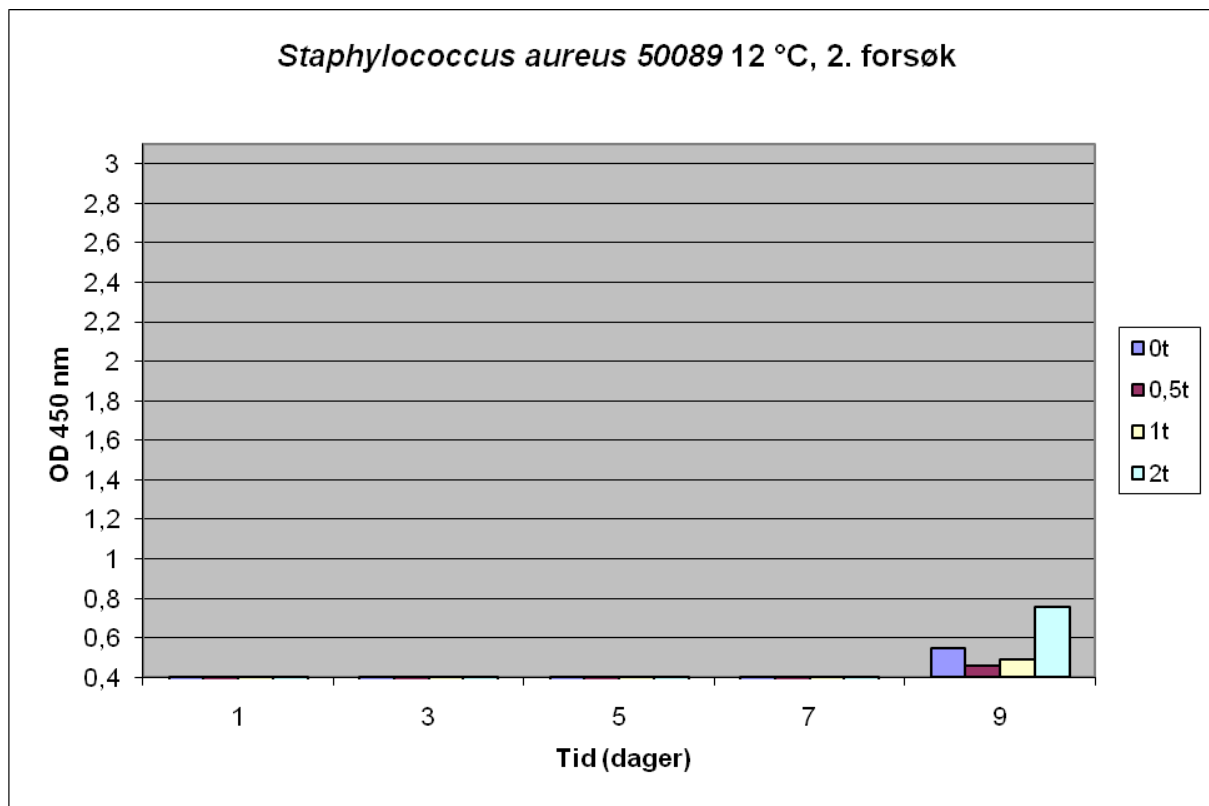
Bakterie	Stamme	Utbrudd	Toksin
<i>Bacillus weihenstephanensis</i>	MC67	Isolert fra leirjord i Danmark (Hendriksen et al. 2006)	Cerulide
<i>Listeria monocytogenes</i>	MF2184	Kjøttpålegg, Trøndelag 1992 (Folkehelseinstituttet 1992)	
<i>Staphylococcus aureus</i>	50089	Geitost 2001 (Folkehelseinstituttet 2003)	Enterotoksin A
<i>Yersinia enterocolitica</i>	1106-0129-1 O:3	Hjemmelaget sylte, Oppland 2006 (Folkehelseinstituttet 2009)	









Vedlegg 3. Bestemmelse av toksindannelse, *S. aureus*- enterotoksiner, forsøk 2.

Vedlegg 4. Rådata vekstforløp i suspensjon ved konstant temperatur

Bakterie	Dag	Forsøk 1 ant per ml	Forsøk 2 ant per ml
<i>B. cereus</i>	1		<20
	2	20	<20
	3	<20	<20
	4	<20	200
	5	Helg	Helg
	6	Helg	Helg
	7	<20	<20
	8	<20	<20
	9	<20	
	10	<20	
	11	<20	
<i>B. weihenstephanensis MC67</i>	1		<20
	2	<20	<20
	3	<20	<20
	4	<20	200
	5	Helg	Helg
	6	Helg	Helg
	7	<20	<20
	8	<20	<20
	9	<20	
	10	60	
	11	<20	
<i>L. monocytogenes ILSI #36</i>	1		140
	2	20	80
	3	<20	20
	4	<20	620
	5	Helg	Helg
	6	Helg	Helg
	7	<20	110
	8	20	
	9	240	
	10	260	
	11	380	

<i>L. monocytogenes</i> MF 2184	1		60
	2	20	140
	3	80	20
	4	<20	20
	5	Helg	Helg
	6	Helg	Helg
	7	40	40
	8	80	
	9	270	
	10	680	
	11	260	
<i>S. aureus</i> 50089	1		140
	2	110	950
	3	80	320
	4	120	120
	5	Helg	Helg
	6	Helg	Helg
	7	230	14500
	8	260	163500
	9	180	
	10	1360	
	11	18150	
<i>S.aureus</i> 50583	1		160
	2	100	130
	3	1090	<20
	4	200	250
	5	Helg	Helg
	6	Helg	Helg
	7	100	140000
	8	100	2280000
	9	40	
	10	60	
	11	20	
<i>Y. enterocolitica</i> O:3	1		380
	2	4250	420
	3	11400	1480

	4	30000	3710
	5	Helg	Helg
	6	Helg	Helg
	7	2575000	120000
	8	18450000	562000
	9	58450000	
	10	189000000	
	11	341500000	
<i>Y. enterocolitica</i> O:9	1		120
	2	680	620
	3	2200	1940
	4	7800	5110
	5	Helg	Helg
	6	Helg	Helg
	7	1050000	375000
	8	6025000	1207000
	9	29400000	
	10	100450000	
	11	148000000	

Vedlegg 5. Rådata vekstforløp på agaroverflate ved varierende temperatur, forsøk 1.

Bakterie	Temperat ur	Da g	Tid			
			0t	0,5t	1t	2t
			Antall per skål (2 ml)			
<i>B. cereus</i>	4 °C	1	<40	<40	<40	<40
		2	160	200	240	<40
		3	280	360	<40	<40
		4	<40	<40	<40	<40
		5	160	80	<40	<40
		6	<40	<40	<40	40
		7	<40	<40	<40	<40
		8	<40	<40	<40	<40
		9	<40	<40	<40	<40
	8 °C	1	<40	<40	<40	1840
		2	<40	<40	<40	800
		3	<40	<40	<40	2000
		4	<40	<40	<40	6200
		5	<40	<40	40	1800
		6	40	<40	<40	4200
		7	<40	<40	<40	3200
		8	<40	<40	<40	5600
		9	<40	<40	<40	6200
<i>B. weihenstephanensis</i> MC67	4 °C	1	80	240	<40	160
		2	40	<40	80	40
		3	<40	40	40	920
		4	<40	40	220	460
		5	<40	80	280	7220
		6	<40	<40	200	10130
		7	<40	200	280	3260
		8	<40	260	2740	31600
		9	<40	40	1000	1660
		10	<40	80	1700	3080
	8 °C	1	80	40	160	260
		2	<40	400	780	11200
		3	300	4580	367390	383000
		4	3800	125500	734000	5100000

		5	29500	1474000	16270000	28300000
		6	304000	59100000	153800000	327000000
		7	4100000	98100000	185300000	303000000
		8	6910000	212000000	514000000	889000000
		9	10026667	546000000	1116000000	1563000000
		10	18840000	532000000	1682000000	1600000000
<i>L. monocytogenes</i> ILSI #36	4 °C	1	<40	<40	<40	<40
		2	2440	3640	6240	5040
		3	10800	11640	32600	81000
		4	21400	53000	148700	409000
		5	50800	126400	510000	4310000
		6	163300	420000	968000	13230000
		7	393000	1260000	5140000	253000000
		8	595000	2490000	16400000	832000000
		9	2760000	6530000	30200000	2500000000
	8 °C	1	<40	<40	<40	<40
		2	18820	28000	20600	116200
		3	215200	290000	616000	2250000
		4	2013000	2590000	11020000	41000000
		5	7190000	29400000	90600000	358000000
		6	52000000	214200000	628000000	1583000000
		7	466000000	1418000000	2877000000	9650000000
		8	1881000000	4540000000	7620000000	73400000000
		9	4290000000	9690000000	13410000000	159700000000
<i>L. monocytogenes</i> MF 2184	4 °C	1	<40	<40	<40	<40
		2	38	1880	1600	2480
		3	720	4600	5040	23300
		4	2000	10000	17200	302000
		5	14000	21600	110000	2970000
		6	26400	75600	231000	14790000
		7	18800	170800	356000	42900000
		8	66000	400000	1058000	16500000
		9	164000	1155000	4620000	445000000
	8 °C	1	<40	<40	<40	<40

		2	7840	22000	28000	65600
		3	141300	256000	495000	1583000
		4	1068000	3560000	6090000	32500000
		5	10750000	22500000	87600000	463000000
		6	70200000	177100000	432000000	1922000000
		7	248000000	785000000	1467000000	3330000000
		8	958000000	2218000000	3070000000	4010000000
			410000000		1287000000	
		9	0	4540000000	0	9370000000
<i>S. aureus</i> 50089	8 °C	1	440	760	1020	1060
		2	500	2380	3000	5200
		3	1200	12440	19530	61300
		4	1520	19190	62800	547000
		5	3680	81100	328000	3573333
		6	8300	508000	2500000	14280000
		7	8400	757000	7540000	57500000
		8	97100	5010000	24800000	211200000
		9	20200	16590000	123000000	408000000
		10	44000	39700000	79700000	408000000
	12 °C	1	520	800	840	1680
		2	6000	24000	20000	81000
		3	33800	372000	840000	3700000
		4	4933800	31372000	31840000	58700000
		5	4900000	31000000	31000000	55000000
		6	18400000	28500000	62700000	124000000
		7	30600000	111000000	78400000	49600000
		8	115800000	49700000	79000000	150600000
		9	183300000	232200000	709000000	177000000
<i>S. aureus</i> 50583	8 °C	1	940	1020	1240	3920
		2	3100	4960	15270	30000
		3	4640	24000	51000	328000
		4	11500	108000	169000	2390000
		5	19500	689000	2590000	18370000
		6	36800	1501000	6560000	51600000
		7	60100	6010000	30500000	233100000
		8	102400	17140000	58200000	863000000
		9	111200	45800000	220000000	2222000000
		10	294000	119600000	303000000	3400000000

	12 °C	1	1120	1200	1200	2400
		2	9200	54000	54000	39000
		3	81000	3000000	4600000	8600000
		4	680000	760000	32000000	126000000
		5	4200000	68000000	97000000	280000000
		6	23900000	150100000	244000000	575000000
		7	72000000	250000000	300000000	460000000
		8	145000000	529000000	488000000	364000000
		9	277000000	567000000	937000000	1174000000
<i>Y. enterocolitica</i> O:3	4 °C	1	5600	1240	1200	27000
		2	14600	50000	58000	131000
		3	30000	330000	262000	1670000
		4	160000	2700000	5500000	72000000
		5	6000000	137000000	214000000	1240000000
		6	26200000	130000000	806000000	998000000
		7	13500000	880000000	3100000000	920000000
		8	133300000	1482000000	4050000000	4260000000
		9	500000000	1118000000	7150000000	888000000
	8 °C	1	1920	3600	4600	7600
		2	118000	220000	340000	2000000
		3	1770000	9800000	22000000	200000000
		4	44000000	188000000	720000000	2200000000
		5	150000000	2800000000	2600000000	3800000000
		6	124000000	3540000000	2024000000	2150000000
		7	174000000	1680000000	3180000000	5400000000
		8	276000000	3320000000	780000000	4209000000
		9	455300000	1062100000	1492100000	5776000000
			00	00	00	0
<i>Y. enterocolitica</i> O:9	4 °C	1	2400	6200	4300	18600
		2	20000	56000	44000	102000
		3	41400	470000	950000	4600000
		4	300000	3500000	8300000	188000000
		5	2300000	54000000	124000000	1820000000
		6	17300000	446000000	1722000000	2180000000

		7	35500000 250000000	748600000	3660000000	2780000000
		8	0 274000000	3620000000	2540000000 2535000000	3760000000 4045000000
		9	0	2420000000	0	0
	8 °C	1	5100	6000	5900	30000
		2	102000	420000	380000	1660000
		3	1250000	6000000	19200000	108000000
		4	31000000	260000000	280000000	3400000000
		5	920000000 251000000	2400000000	3800000000	3000000000 4000000000
		6	0	2000000000	2200000000	0 4837000000
		7	480000000 570000000	1970000000 4308000000	2846000000 8183900000	0 7127000000
		8	0 710400000	0 6046900000	0 1208600000	0 2703800000
		9	00	0	00	00

Vedlegg 6. Rådata vekstforløp på agaroverflate ved varierende temperatur, forsøk 2.

Bakterie	Temperatur	Dag	Tid			
			0t	0,5t	1t	2t
			Antall per skål (2 ml)			
<i>B. weihenstephanensis</i> MC67	4 °C	1	280	80	360	240
		2	40	240	40	960
		3	120	160	620	600
		4	<40	220	260	440
		5	<40	80	260	240
		6	<40	80	760	720
		7	40	80	200	2300
		8	<40	<40	320	1940
		9	<40	<40	400	5860
		10	80	40	200	1240
	8 °C	1	360	160	160	120
		2	40	380	160	440
		3	120	5220	5720	57600
		4	1760	160000	386000	1526000
		5	98000	1212000	2820000	25340000
		6	1455000	32800000	80400000	356000000
		7	2820000	152400000	120200000	1349000000
		8	434200000	689000000	1174000000	2600000000
		9	21700000	342000000	1500000000	2760000000
		10	18840000	2872000000	1682000000	3280000000
<i>L. monocytogenes</i> MF 2184	4 °C	1	620	1460	1080	760
		2	3560	9160	24200	44200
		3	82600	78100	551000	2640000
		4	450000	1811000	12020000	122200000
		5	5260000	22500000	244000000	1344000000
		6	55400000	179200000	1695000000	5590000000
		7	327000000	533000000	5710000000	18300000000
		8	2900000000	5050000000	15810000000	40500000000

		9	1233000000 0	1683000000 0	8210000000 0	10800000000 0
		10	1900000000 0	1939000000 0	1706000000 00	10270000000 0
	8 °C	1	2440	1840	6020	5620
		2	145800	285300	700000	1518000
		3	11480000	34400000	1000350000	24400000
		4	282000000	1148000000	2000000000	6860000000
		5	1112000000 0	2040000000 0	2720000000 0	41600000000
		6	3180000000 0	6290000000 0	6050000000 0	11380000000 0
		7	4310000000 0	4750000000 0	5790000000 0	84700000000
		8	5570000000 0	6030000000 0	5620000000 00	81600000000
		9	1248000000 00	1416000000 00	1550000000 00	23800000000 0
		10	8790000000 0	6240000000 0	1670000000 00	10540000000 00
<i>S. aureus</i> 50089	8 °C	1	1600	920	1500	2340
		2	1240	3380	4400	19700
		3	1860	7930	29700	135300
		4	5160	43600	79300	1605000
		5	5800	323000	469000	8500000
		6	37600	2620000	4760000	41400000
		7	47800	7720000	20340000	115500000
		8	55000	23800000	109300000	258000000
		9	126600	53800000	167500000	599000000
		10	50800	38400000	119300000	385000000
	12 °C	1	980	920	1360	2500
		2	7560	18600	24900	115500
		3	127600	1275000	2385000	2670000
		4	330000	4270000	6230000	14200000
		5	5980000	16920000	23300000	25200000
		6	23600000	92900000	95800000	66400000
		7	83600000	198300000	122700000	75400000
		8	99800000	264000000	218000000	218000000
		9	219300000	353000000	319000000	160000000

		10	300000000	628000000	370000000	265000000
<i>Y. enterocolitica</i> O:3	4 °C	1	3000	3200	1840	3300
		2	4040	9680	19000	39400
		3	25200	225200	250000	955000
		4	113900	1548000	1400000	10500000
		5	1020000	34900000	105000000	487000000
		6	3270000	74000000	301000000	1414350000
		7	6890000	1814000000	3760000000	27800000000
		8	44300000	1920000000	3450000000	71546000000
		9	165300000	4300000000	1240000000	30560000000
		10	395000000	3230000000	7960000000	0
	8 °C	1	8560	13460	12930	15130
		2	166900	385000	467000	1868000
		3	4930000	40000000	1250233500	11600000
		4	127000000	362000000	2500000000	214000000
		5	3100000000	2200000000	2247000000	2980000000
		6	2840000000	7650000000	4630000000	55500000000
		7	7440000000	0	0	12420000000
		8	0	1377000000	1284000000	0
		9	1095460000	00	00	88510000000
		10	00	1361100000	2650000000	0
		2030000000	2720000000	2640000000	16460000000	
		00	00	00	00	
		1781000000	1306000000	1707000000	13000000000	
		00	00	00	0	

Vedlegg 7. Rådata bestemmelse av toksindannelse. *S. aureus*- enterotoksiner.

Sa 50089	Dag	Temperatur	Tid	Vekt	OD 450 nm
Forsøk 1	1	8 °C	0t	23	0,217
	1	8 °C	0,5t	23	0,164
	1	8 °C	1t	23	0,187
	1	8 °C	2t	23	0,178
	1	12 °C	0t	23	0,194
	1	12 °C	0,5t	23	0,215
	1	12 °C	1t	23	0,175
	1	12 °C	2t	23	0,266
	3	8 °C	0t	22	0,176
	3	8 °C	0,5t	18,4	0,162
	3	8 °C	1t	27,2	0,158
	3	8 °C	2t	24	0,164
	3	12 °C	0t	23,12	0,306
	3	12 °C	0,5t	22	0,188
	3	12 °C	1t	20	0,205
	3	12 °C	2t	19	0,293
	5	8 °C	0t	25,1	0,162
	5	8 °C	0,5t	22,3	0,154
	5	8 °C	1t	18,6	0,179
	5	8 °C	2t	18,9	0,161
	5	12 °C	0t	18	0,287
	5	12 °C	0,5t	20,4	0,349
	5	12 °C	1t	18	0,367
	5	12 °C	2t	19	0,241
	7	8 °C	0t	20,8	0,176
	7	8 °C	0,5t	18,2	0,192
	7	8 °C	1t	24,5	0,173
	7	8 °C	2t	18,6	0,197
	7	12 °C	0t	21	0,578
	7	12 °C	0,5t	20	0,514
	7	12 °C	1t	21,4	0,649
	7	12 °C	2t	19	0,639

	9	8 °C	0t	21,2	0,166
	9	8 °C	0,5t	18,5	0,184
	9	8 °C	1t	19,7	0,229
	9	8 °C	2t	17,1	1,025
	9	12 °C	0t	17	0,632
	9	12 °C	0,5t	21,5	0,592
	9	12 °C	1t	22	0,935
	9	12 °C	2t	20	0,813
	10	8 °C	0t	20,3	0,188
	10	8 °C	0,5t	21,5	0,249
	10	8 °C	1t	18,7	0,439
	10	8 °C	2t	20,6	2,905

Sa 50583	Dag	Temperatur	Tid	Vekt	OD 450 nm
Forsøk 1					
	1	12 °C	0t	19,3	0,196
	1	12 °C	0,5t	21,4	0,268
	1	12 °C	1t	15,8	0,158
	1	12 °C	2t	17,6	0,17
	3	12 °C	0t	17,2	0,173
	3	12 °C	0,5t	18,6	0,211
	3	12 °C	1t	18,4	0,185
	3	12 °C	2t	17,9	0,2
	5	12 °C	0t	19,5	0,656
	5	12 °C	0,5t	17,4	0,749
	5	12 °C	1t	21,6	0,658
	5	12 °C	2t	15	0,503
	7	12 °C	0t	20	1,214
	7	12 °C	0,5t	21,5	0,879
	7	12 °C	1t	20	0,589
	7	12 °C	2t	14,6	0,811

	9	12 °C	0t	25	0,807
	9	12 °C	0,5t	17,7	1,257
	9	12 °C	1t	14,3	0,495
	9	12 °C	2t	15	0,365

Sa 50089	Dag	Temperatur	Tid	Vekt	OD 450 nm
Forsøk 2	1	12 °C	0t	23	0,163
	1	12 °C	0,5t	23	0,162
	1	12 °C	1t	23	0,167
	1	12 °C	2t	23	0,166
	3	12 °C	0t	20,5	0,175
	3	12 °C	0,5t	22	0,167
	3	12 °C	1t	22,6	0,144
	3	12 °C	2t	26	0,163
	5	12 °C	0t	23,4	0,184
	5	12 °C	0,5t	21,5	0,188
	5	12 °C	1t	17,2	0,243
	5	12 °C	2t	24,1	0,192
	7	12 °C	0t	22	0,224
	7	12 °C	0,5t	19,7	0,27
	7	12 °C	1t	18,4	0,272
	7	12 °C	2t	21	0,24
	9	12 °C	0t	23,7	0,549
	9	12 °C	0,5t	17,3	0,461
	9	12 °C	1t	25	0,49
	9	12 °C	2t	20,7	0,758

