

**Zeitschrift:** Mitteilungen aus dem Gebiete der Lebensmitteluntersuchung und Hygiene = Travaux de chimie alimentaire et d'hygiène

**Herausgeber:** Bundesamt für Gesundheit

**Band:** 81 (1990)

**Heft:** 6

**Artikel:** Hygienische Risiken durch Formaggini aus kleingewerblicher Produktion im Kanton Tessin : Enterotoxigene S. aureus- und E. coli-Stämme = The microbiology of home-made style formaggini (fresh cheese) manufactured in southern Switzerland : incidence of ent...

**Autor:** Jermini, M.F.G. / Domeniconi, F. / Bissig, Flavia

**DOI:** <https://doi.org/10.5169/seals-982631>

### **Nutzungsbedingungen**

Die ETH-Bibliothek ist die Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften auf E-Periodica. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Zeitschriften und ist nicht verantwortlich für deren Inhalte. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern beziehungsweise den externen Rechteinhabern. Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen sowie auf Social Media-Kanälen oder Webseiten ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. [Mehr erfahren](#)

### **Conditions d'utilisation**

L'ETH Library est le fournisseur des revues numérisées. Elle ne détient aucun droit d'auteur sur les revues et n'est pas responsable de leur contenu. En règle générale, les droits sont détenus par les éditeurs ou les détenteurs de droits externes. La reproduction d'images dans des publications imprimées ou en ligne ainsi que sur des canaux de médias sociaux ou des sites web n'est autorisée qu'avec l'accord préalable des détenteurs des droits. [En savoir plus](#)

### **Terms of use**

The ETH Library is the provider of the digitised journals. It does not own any copyrights to the journals and is not responsible for their content. The rights usually lie with the publishers or the external rights holders. Publishing images in print and online publications, as well as on social media channels or websites, is only permitted with the prior consent of the rights holders. [Find out more](#)

**Download PDF:** 26.01.2026

**ETH-Bibliothek Zürich, E-Periodica, <https://www.e-periodica.ch>**

*M. F. G. Jermini, F. Domeniconi, Flavia Bissig und M. Jäggli*  
Laboratorio Cantonale d'Igiene, Lugano

## **Hygienische Risiken durch Formaggini aus kleingewerblicher Produktion im Kanton Tessin: Enterotoxigene *S. aureus*- und *E. coli*-Stämme**

The Microbiology of Home-made Style Formaggini (Fresh Cheese)  
Manufactured in Southern Switzerland:  
Incidence of Enterotoxigenic Strains of *S. aureus* and *E. coli*

### **Einleitung**

Der Genuss von Milch in roher Form gehört schon seit Jahrzehnten nicht mehr zur täglichen Gewohnheit der Gesellschaft. Das damit verbundene Risiko einer Infektion oder Intoxikation gilt heute als allgemein anerkannt, was zur Durchsetzung der Milchpasteurisation praktisch in der ganzen Welt geführt hat.

Hingegen wird heute immer noch eine ganze Reihe von Produkten – darunter sind in der Schweiz vor allem verschiedene Käsesorten zu zählen – aus Rohmilch hergestellt und täglich konsumiert. Auch der Kanton Tessin stützt einen Teil seiner Käsereitradition auf die Verarbeitung von Rohmilch ab. Dabei sind einerseits die Alpkäse des nördlichen Tessingebiets «Sopraceneri» und andererseits die typischen «Formaggini ticinesi» zu erwähnen, die vor allem im Südtessin («Sottoce-neri») bekannt und von den Konsumenten sehr geschätzt sind.

Da die Rohmilch für die Herstellung von Alpkäse und der sauren Formaggini – die sogenannten «Büscion» (Zapfen) – unter Anwendung von Starterkulturen verarbeitet wird, ist das Risiko der Vermehrung von im Ausgangsmaterial allfällig vorhandenen pathogenen oder toxigenen Keimen durch die eingeleitete Milchsäuregärung sehr verringert.

Viel problematischer erscheint der Fall der «Robiola ticinese», ein typischer Frischkäse aus Kuh- oder Ziegenmilch oder einer Mischung davon, der nur im Tessin und allein mit Labgerinnung hergestellt wird und dessen Hauptbesonderheit der süsse Geschmack ist. Es ist gerade das Fehlen der Säure, welches dieses

Produkt charakterisiert und ihm die vom Konsumenten geschätzten organoleptischen Eigenschaften verleiht. Die Gefahr, dass in kleinen bis mittelgrossen Bauernbetrieben rohe Milch mit pathogenen Keimen kontaminiert wird, ist relativ gross. Tabelle 1 zeigt einige mikrobiologische Daten von Rohmilch aus acht Tessiner Landwirtschaftsbetrieben. Die wichtigsten Ursachen für diese Kontaminationen der Milch sind die schlechte Stall- und Personalhygiene, die unsauberen Melkutensilien und die nicht korrekte Melktechnik, die oft zu Entzündungen und Erkrankungen des Kuheuters, vor allem die Mastitis, führen kann.

*Tabelle 1. Schalm-Test und Vorkommen von Staphylococcus aureus in der Milch von 81 Kühen aus 8 Südtessiner Betrieben*

| Anzahl Betriebe | Anzahl untersuchter Kühe | Schalm-Test  | S. aureus  |
|-----------------|--------------------------|--|--|
| 8               | 81                       | 41<br>positiv<br>in mindestens<br>einem Viertel<br>Viertel | 4 (= 10%)<br><10 KBE/ml <sup>-1</sup><br><br>37 (= 90%)<br>>10 KBE/ml <sup>-1</sup>  |
|                 |                          | 40<br>negativ<br>in allen<br>Vierteln                      | 30 (= 75%)<br><10 KBE/ml <sup>-1</sup><br><br>10 (= 25%)<br>>10 KBE/ml <sup>-1</sup> |

Aus all diesen Gründen ist es nicht verwunderlich, dass im Jahre 1989 sogar 91,5% der vom kantonalen Laboratorium analysierten Formaggini den Anforderungen der eidgenössischen Verordnung für die mikrobiologische Qualität von Frischkäse (1) nicht entsprachen. Zudem wurden im Oktober 1989 fünf Ausbrüche von *S. aureus*-Intoxikationen mit gesamthaft 30 erkrankten Personen gemeldet.

Deshalb hat sich das kantonale Laboratorium ab Herbst 1989 intensiv mit den hygienischen Risiken bei der Produktion von Tessiner Frischkäse beschäftigt. Es wurden in Zusammenarbeit mit dem Kantonstierarzt und dem Milchwirtschaftlichen Kontroll- und Beratungsdienst (MKBD) provisorische Richtlinien für eine hygienisch einwandfreie Frischkäseproduktion veröffentlicht. Dabei steht die obligatorische Thermisierung der Rohmilch während 15 Minuten bei 65 °C im Vordergrund. Ausserdem wurde das Auftreten und Verhalten von bei der Tessiner Frischkäseproduktion problematischen Bakterien wie *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter jejuni* und Salmonellen in Laborversuchen näher untersucht.

## Material und Methoden

### *Die mikrobiologische Qualität von Rohmilch-Formaggini*

In der Periode 1988 — Herbst 1989 wurden aus 51 kleingewerblichen Produktionsbetrieben 99 Formaggini-Proben vom Lebensmittelinspektorat amtlich erhoben und in kühlgelagertem (4 °C) Zustand zum Untersuchungslabor gebracht. Die Analysen erfolgten am gleichen Tag. Bei 59 Proben wurde die Zahl der koloniebildenden Einheiten der Enterobakteriazeen, *E. coli* und *S. aureus* ermittelt, bei weiteren 22 Proben auf An-/Abwesenheit von Salmonellen und *C. jejuni* und bei 40 Proben von *L. monocytogenes* geprüft. Die jeweilige Methodik richtete sich nach dem Schweizerischen Lebensmittelbuch (2).

### *Vermehrung von Staphylococcus aureus, Escherichia coli und Enterobakteriazeen während der Herstellung und Lagerung von Rohmilch-Formaggini*

#### *Technologisches Verfahren*

Das hier angewandte technologische Verfahren zur Formaggini-Herstellung ist in Abbildung 1 dargestellt. Als Ausgangsmaterial dienten 4 l rohe Kuhmilch, die von der grössten Sammelstelle der Region Lugano frisch bezogen wurden. Die Milch wurde in einem 5-l-Becherglas mittels Bunsenbrenner unter ständigem Rühren auf 34 °C erwärmt. Zur 34 °C warmen Milch wurden 0,48 ml flüssiges Lab (Standard Labextrakt Winkler, Konolfingen) zugegeben, was der üblich angewandten Menge von 12 ml 100 l<sup>-1</sup> Milch entspricht. Die Milch wurde dann mit einem Glasstab gut gemischt und während 50 Minuten zur Gerinnung stehengelassen. Nach dieser Zeit konnte die sich inzwischen gebildete Gallerte geschnitten werden. Die Bruchgrösse war praxisbezogen diejenige einer Walnuss. Danach wurde der Bruch zur Förderung der Schrumpfung (Synärese) «setzen» gelassen. Ab und zu wurde das Ganze sorgfältig gemischt, um zu vermeiden, dass die Bruchkörner zusammenkleben, was zu einer mangelhaften, nicht idealen Molkenabgabe führen würde.

Fünzig Minuten nach dem Schneiden der Gallerte konnte das Bruch-Molke-Gemisch direkt in eine perforierte zylindrische Kunststoffform (Höhe 50 cm; Durchmesser 7 cm) überführt werden. Die Form wurde während 5 Stunden bei Zimmertemperatur stehengelassen und dabei 3- bis 4mal gewendet, um eine homogene Molkenabgabe zu begünstigen. Der Käsezyylinder in der Form wurde danach auf die Temperatur von 4 °C gekühlt und am darauffolgenden Tag, das heisst nach 16 Stunden Kühlung, in 2–3 cm dicke Formaggini geschnitten. Die Formaggini wurden in sterilen, nicht verschweissten Plastikbeuteln parallel bei 4 °C im Kühlschrank und bei Zimmertemperatur gelagert.



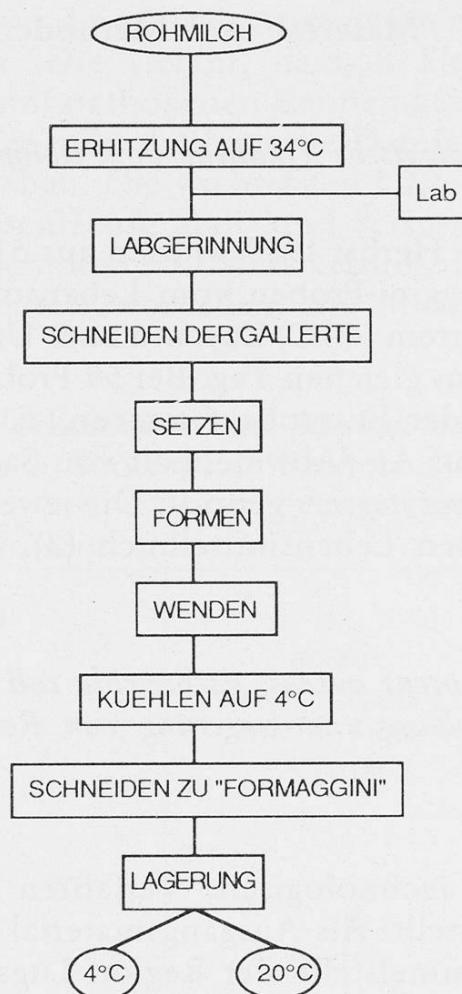


Abb. 1. Fließdiagramm der standardisierten Formaggini-Herstellung aus Rohmilch unter Laboratoriumsbedingungen

### Mikrobiologische Untersuchungen

Um das mikrobiologische Risiko bei der Verarbeitung von Rohmilch zu beurteilen, wurde die Vermehrung von *S. aureus*, *E. coli* und Enterobakteriazeen verfolgt.

Zur mikrobiologischen Untersuchung wurden Proben während dem Fabrikationsprozess bei folgenden Produktionsstufen entnommen: Rohmilch; Milch bei 34 °C, vor Labzugabe; vor dem Formen; vor der Kühlung auf 4 °C (die Probe wurde dabei am oberen Teil der Form entnommen, weil es sich in einem Vorversuch gezeigt hat, dass keine Inhomogenitäten innerhalb der Form festzustellen waren); nach dem Schneiden zu Formaggini.

Zusätzlich wurden die Formaggini während der Lagerung bei Kühlschrank- bzw. Zimmertemperatur in 24stündigem Intervall bis zum dritten Lagerungstag untersucht. Die Koloniezahlbestimmungen von *S. aureus* (CT, Oxoid CM275 +

R.P.F. Supplement SR122 + TDNA-Agar), Enterobakteriazeen (VRBG, Acumedia 7425) und *E. coli* (TSA, Biolife 2150 und ECD + MUG, Biolife 1427) erfolgten nach den Vorschriften des Schweizerischen Lebensmittelbuches (2).

Es wurde jeweils das arithmetische Mittel der Anzahl KBE ml<sup>-1</sup> berechnet (2) und halblogarithmisch gegen die Zeit aufgetragen.

Parallel zu den mikrobiologischen Untersuchungen wurde bei jeder Probenahme, sowohl während dem Herstellungsprozess als auch der Lagerung, der pH-Wert bestimmt. Der pH-Wert-Verlauf wurde als Funktion der Zeit graphisch dargestellt.

In einer separaten analogen Versuchsserie wurden Formaggini ausgehend von thermisierter Milch (65 °C und 15 Minuten) hergestellt.

### *Staphylococcus aureus*

#### 1. Isolierung und Identifizierung von *S. aureus*-Stämmen aus Formaggini

Bei sechzig Formaggini-Proben verschiedener Herkunft wurden die Koloniezahlen von *S. aureus* nach Schweiz. Lebensmittelbuch (2) bestimmt und von 42 kontaminierten Proben jeweils von einer Kolonie abgeimpft, die Isolate identifiziert und als Sammlung aufbewahrt. Kolonien, die auf modifiziertem Baird-Parker-Agar (Oxoid CM275 + Oxoid R.P.F. Supplement SR 122) eine positive Koagulasereaktion zeigten, wurden zwecks Reinigung nochmals auf demselben Agar ausgestrichen. Tryptic Soy Agar (Biolife 2150) wurde danach mit Material aus presumptiven *S. aureus*-Kolonien beimpft und 24 Stunden bei 37 °C bebrütet. Bis zur Identifizierung der so isolierten Stämme, die innerhalb der nächsten 72 Stunden erfolgte, wurden die Kulturen bei 4 °C aufbewahrt. Zur Identifizierung der isolierten Stämme wurden die Koagulasereaktion, die Thernonucleasereaktion, die Resistenz gegenüber Lysozym, die Sensitivität gegenüber Lysostaphin und die biochemischen Eigenschaften mit dem Testsystem API20 Staph in der angegebenen Reihenfolge bestimmt. Als positive Kontrolle dienten die *S. aureus*-Stämme La654 und La3214 aus dem CCTM-Centre de Collection de Types Microbiens in Lausanne. Als negative Kontrolle wurde ein Stamm von *Micrococcus varians* (TI 815N) aus der eigenen Sammlung benutzt.

Die identifizierten Stämme wurden tiefgefroren als Suspension in einer Lösung aus 70% Magermilch, 10% Kalbsblutserum und 20% Glycerin bei -18 °C aufbewahrt.

#### 2. Bildung von Enterotoxinen A-D *in vitro* durch *S. aureus*-Stämme aus Formaggini

Die Bildung der Staphylokokken-Enterotoxine SEA, SEB, SEC und SED durch 42 *S. aureus*-Stämme (Übernachtkultur bei 37 °C in BHI, Beimpfung direkt aus Aufbewahrungssuspension) wurde mittels Sandwich ELISA mit markierten Antikörpern (W. Bommeli, Bern-CH) untersucht. Vor dem eigentlichen ELISA-Test wurden die Übernachtskulturen nach den Angaben des Testherstellers vorbehandelt. Als positive Kontrolle dienten die toxinbildenden *S. aureus*-Stämme La654 und La3214. Als negative Kontrolle wurde ein Stamm von *Micrococcus varians* (TI 815.N) aus der eigenen Sammlung benutzt.

### 3. Hitze-resistenz von repräsentativen *S. aureus*-Stämmen

#### a) Stämme

Die Hitze-inaktivierungsbestimmung wurde mit den 6 in der Tabelle 2 angegebenen *S. aureus*-Stämmen aus der Sammlung des kantonalen Laboratoriums durchgeführt. Die Auswahl erfolgte einerseits aufgrund der geographischen Herkunft der Frischkäse, aus welchen die Stämme isoliert wurden, und andererseits aufgrund des Toxinbildungs-vermögens jedes Stammes. Wie aus der Tabelle 2 ersichtlich ist, sind die gewählten Stämme für das ganze Kantonsgebiet repräsentativ und vertreten ein möglichst vielfältiges Toxinbildungs-vermögen.

Tabelle 2. Herkunft und Toxinbildungs-vermögen der untersuchten *S. aureus*-Stämme

| <i>S. aureus</i> -Stamm-Nr. | Herkunft                    | Toxinbildungs-vermögen |
|-----------------------------|-----------------------------|------------------------|
| 814                         | Isonetal im Sottoceneri     | SEA, SED               |
| 909                         | Muggiotal im Sottoceneri    | SEA, SED               |
| 912                         | Malcantone im Sottoceneri   | kein                   |
| 983                         | Bedrettal im Sopraceneri    | SED                    |
| 1361                        | Capriascatal im Sottoceneri | SEA, SEB, SED          |
| 1776                        | Maggiatal im Sopraceneri    | SEA, SEB, SEC, SED     |

#### b) Regeneration der Stämme

Ca. 5 ml BHI (Oxoid CM 225) wurden mit Hilfe einer sterilen Öse mit 10 µl der *S. aureus*-Aufbewahrungssuspension (1 Jahr, -18 °C) beimpft und bei 37 °C während 20 Stunden bebrütet. Die regenerierte Bakteriensuspension wurde dann mit einer Impföse auf Baird-Parker-Agar (Oxoid CM 275 + Egg Yolk Tellurite-Zusatz Oxoid SR 54) ausgestrichen und wiederum bei 37 °C während 24 Stunden bebrütet. Vom Baird-Parker-Agar konnten Kolonien auf Tryptic Soy Agar-Schrägagar (TSA, Oxoid CM 131) überimpft werden. Nach einer Bebrütung bei 37 °C während 24 Stunden wurden die Kulturen in Schrägagarröhrchen für die unten beschriebenen Versuche bei 4 °C aufbewahrt.

#### c) Vorbereitung des Inoculums

Einige der auf TSA-Agar gewachsenen Staphylokokken-Kolonien wurden mit einer Öse in ca. 3 ml steriles Wasser überführt, und zwar bis zur Erreichung einer dem ersten Grad der Mac Farland-Skala entsprechenden Trübung (3). Von dieser Bakteriensuspension wurden 0,5 ml in 25 ml BHI überimpft und bei 37 °C während 16 bis 20 Stunden bebrütet. Diese Zeit erwies sich in einem mit den zwei Stämmen 912 und 1776 durchgeführten Vorversuch (Resultate nicht gezeigt) als optimal, damit die Bakterien die stationäre Wachstumsphase, bei welcher sie die grösste Hitze-resistenz aufweisen (4, 5), erreichen können.



de die Probe je nach vorgesehenen Verdünnungsstufen entweder direkt in ein Reagenzglas mit 9 ml Verdünnungslösung (für die Verdünnungsstufe  $10^{-1}$  und höhere) oder in ein leeres Reagenzglas pipettiert. In diesem letzten Fall konnte dann je nach Bedarf eine dezimale Verdünnungsreihe mit 4,5 ml Verdünnungslösung angesetzt werden. Von jeder Verdünnungsstufe bzw. der unverdünnten Probe wurde jeweils 0,1 ml auf zwei Platten im Oberflächenverfahren ausgestrichen. Die untere Nachweisgrenze lag damit bei 10 KBE  $\text{ml}^{-1}$ .

Als Nährboden für die Auszählung der überlebenden Zellen wurde Baird-Parker-Agar (Oxoid CM 275 mit Egg Yolk Tellurite-Zusatz, Oxoid SR 54) gewählt, weil es als bestes Medium für die Wiederbelebung von hitzegeschädigten Zellen beschrieben wird (4, 6). Die Auswertung der Platten erfolgte nach einer Bebrütungsdauer von zwei Tagen bei 37 °C, obwohl die meisten Kolonien schon nach 24 Stunden gut sichtbar waren. Somit wurde die Erholung von subletal geschädigten Zellen begünstigt.

Für jede Verdünnungsreihe wurde das gewogene arithmetische Mittel berechnet und das Resultat in  $\log_{10}$  KBE überlebender Zellen  $\text{ml}^{-1}$  ausgedrückt.

#### *b) Berechnung der Hitzeresistenz*

Für die Berechnung der Hitzeresistenz wurden alle experimentell ermittelten Daten graphisch in einer halblogarithmischen Darstellung aufgetragen. Je nach dem Verlauf der so dargestellten Wertepaare wurde die Grafik anders ausgewertet. Es konnten grundsätzlich zwei Fälle unterschieden werden; lagen die Wertepaare auf einer Geraden oder beschrieben sie einen schwach sigmoidalen Verlauf, so wurde eine einzige Regressionsgerade mit allen Punkten berechnet. War dagegen im graphischen Verlauf der Wertepaare eine deutliche Knickkurve erkennbar, wurden aus den Punkten zwei Regressionsgeraden berechnet.

#### *i) Berechnung der Hitzeresistenz-Parameter*

Die D-Werte oder dezimalen Reduktionszeiten wurden aus der Gleichung der Regressionsgeraden aus dem Verhältnis  $D = -1/a$  berechnet. Sämtliche Regressionsberechnungen wurden auf einem Macintosh SE/30 durchgeführt. Der z-Wert beschreibt die Temperaturabhängigkeit der Inaktivierung und gibt nach Definition die Temperaturerhöhung in °C an, die notwendig ist, um die Abtötungszeit (D-Wert) um 90% zu reduzieren.

Die z-Wert-Berechnung erfolgte nur bei Stämmen, die eine lineare Inaktivierung zeigten.

### *Escherichia coli*

#### *1. Isolierung und Identifizierung von E. coli-Stämmen aus Formaggini*

58 Proben von aus Rohmilch hergestellten Formaggini verschiedener Herkunft wurden auf *E. coli* untersucht. Einerseits wurde die Kontamination gemäss



#### d) Erhitzungsmedien

Die Hitzeinaktivierungen der 6 *S. aureus*-Stämme wurden sowohl in kommerzieller UHT-Kuhmilch als auch in Ziegenmilch durchgeführt. Zur Ausschaltung des grössten Teils der Rohmilchflora, und vor allem von *S. aureus*, wurde die Ziegenmilch unter ständigem Rühren auf einer Heizplatte auf Kochtemperatur erhitzt. Danach wurde sie sofort unter fliessendem Wasser auf die gewünschte Versuchstemperatur gekühlt.

#### e) Erhitzungsbedingungen

Bei allen Stämmen wurde die Hitzeresistenz in Kuhmilch bei 60 °C und 65 °C und in Ziegenmilch bei 60 °C untersucht. Die Dauer der Exposition betrug 20 Minuten bei 60 °C und 5 Minuten bei 65 °C. Bei Stamm 814 wurde die Hitzeresistenz zusätzlich in Kuhmilch bei 55 °C während 40 Minuten untersucht.

#### f) Durchführung des Inaktivierungsversuches

Für die Hitzeinaktivierungen der verschiedenen *S. aureus*-Stämme wurde ein 500-ml-Dreihalskolben mit 296 ml Erhitzungsmedium gefüllt und in ein thermisiertes Wasserbad eingetaucht. Der Kolben wurde dann aseptisch mit einem sterilen Stabrührer ausgerüstet, der bei 200 rpm für eine ständige Homogenität des Erhitzungsmediums sorgte. Die Aufgabe der Temperaturregelung der Milch im Erhitzungsgefäss selbst übernahm ein Kontaktthermometer (Messgenauigkeit  $\pm 0,5$  °C) (Abb. 2).

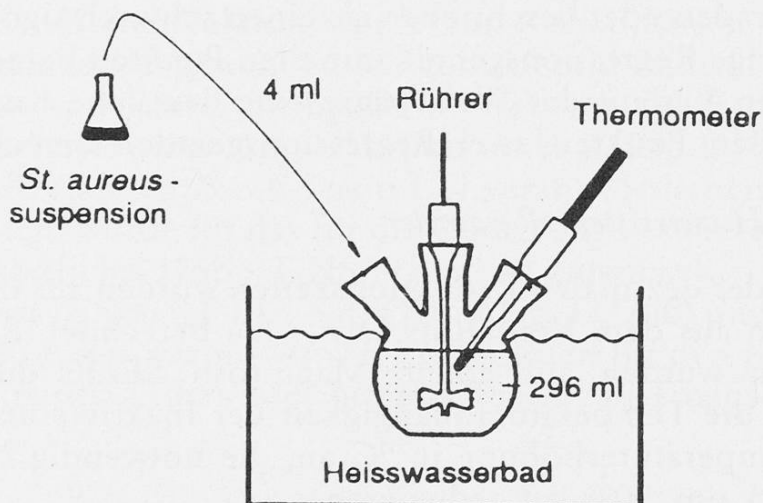


Abb. 2. Schematische Darstellung der Versuchsanordnung zur Bestimmung der Hitzeinaktivierung von 6 *S. aureus*-Stämmen

#### g) Nachweis der überlebenden Zellen

Auf die gewünschte Temperatur thermostatisierte Milch wurde mit 4 ml Inoculum, das vorher zur Auflösung allfälliger Klumpen gut homogenisiert wurde, beimpft. Nach bestimmten Zeitintervallen wurde aus der erhitzten Bakteriensuspension 1 ml Probe entnommen und sofort in einem Eisbad gekühlt. Dabei wur-

Schweiz. Lebensmittelbuch (2) quantifiziert, und andererseits wurden aus den 22 kontaminierten Proben 58 *E. coli*-Stämme isoliert, identifiziert und als Sammlung aufbewahrt. Die Isolierung und Identifizierung wurde an anderer Stelle bereits ausführlich beschrieben (7). Insgesamt wurden für die Isolierung jene Kolonien, die auf *E. coli*-Direkt(ECD)-Agar mit 4-methyl-umbelliphenyl- $\beta$ -glucuronid-(MUG)-Zusatz (ECD + MUG, Biolife Italiana No. 1427) unter einer 366-nm-Lampe fluoreszierten, als präsumptive *E. coli* zwecks Reinigung auf Tryptic Soy Agar (TSA, Biolife Italiana, No. 2150) ausgestrichen und bei 37 °C 18–20 Stunden bebrütet. Gereinigte Stämme wurden auf TSA-Schrägar überimpft, bebrütet und bei 4 °C bis zur Identifizierung, die innerhalb der nächsten 72 Stunden erfolgte, aufbewahrt. Zur Identifizierung der Stämme wurden die Vermehrung und die Vergärung von Lactose bei 44 °C, die MUG-Hydrolyse bei 44 °C und die Indolbildung aus Tryptophan bei 44 °C untersucht. Zusätzlich wurden die biochemischen Eigenschaften mit dem Testsystem API20 E bestimmt.

Die identifizierten Stämme wurden tiefgefroren als Suspension in einer Lösung aus 70% Magermilch, 10% Kalbsblutserum und 20% Glycerin bei –18 °C aufbewahrt.

## *2. Nachweis von E. coli und Identifizierung von enterotoxischen Stämmen mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) und ELISA-Test*

Die 58 *E. coli*-Stämme wurden im Institut für Biochemie, Laboratorium für Lebensmittelchemie der Universität Bern mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) und ELISA auf Enterotoxigenität geprüft (7).

Die Polymerase-Kettenreaktion wurde zur Amplifikation von *E. coli*-spezifischen DNS-Sequenzen angewendet. Oligonukleotid-Primers wurden einerseits zur Amplifikation von einem 595bp DNS-Fragment des *E. coli*-typischen malB Operon und andererseits zur Amplifikation einer 275bp DNS-Sequenz des zur Codierung des hitzelabilen *E. coli*-Toxin LT1 verantwortlichen Genes entwickelt. Ein analoges System wurde für das für die Codierung des hitzestabilen *E. coli*-Toxin ST1 verantwortliche 175bp DNS-Fragment entwickelt.

Ein ELISA-Test (*E. coli* ST EIA Kit, Oxoid Nr. TD700) und eine Latex-Agglutination (VET-RPLA Kit, Oxoid Nr. TD920) wurden für den Nachweis des hitzestabilen *E. coli*-Toxins ST1 bzw. des hitzelabilen *E. coli*-Toxins LT1 durchgeführt.

## **Resultate**

### *Die mikrobiologische Qualität von Rohmilch-Formaggini*

Die Abbildung 3 zeigt die prozentuale Verteilung der Koloniezahlen in den log<sub>10</sub>-Klassen 2 bis >6 pro Gramm für Enterobakteriaceen, *E. coli* und *S. aureus* in 59 untersuchten Formaggini-Proben, die im Frühling 1988 bis Herbst 1989 im Tessin amtlich erhoben wurden. Insgesamt waren 91,5% der Proben zu beanstanden, wobei die Enterobakteriaceen und *S. aureus* daran am meisten beteiligt wa-

ren. Etwas weniger als 60% der Proben zeigten einen *S. aureus*-Wert, der höher als der hygienisch-mikrobiologische Grenzwert (1) von  $10\,000\text{ KBE g}^{-1}$  war, und führten dementsprechend zu einer Beschlagnahme der Restware.

Salmonellen und *C. jejuni* konnten in 22 und *L. monocytogenes* in 40 Proben nicht nachgewiesen werden.

### *Vermehrung von Staphylococcus aureus, Escherichia coli und Enterobakteriazeen während der Herstellung und Lagerung von Rohmilch-Formaggini*

Die Technologie und die genauen Bedingungen für die Herstellung von Formaggini auf Labormassstab wurden aufgrund von Besuchen bei insgesamt 12 Produzenten im «Sottoceneri» festgelegt. Dabei wurden zuerst die einzelnen teilweise sehr eigenartigen Produktionstechniken miteinander verglichen und nachher auf einen Generalnenner umgewandelt. Dabei resultierte das in Abbildung 1 dargestellte standardisierte Käseherstellungsverfahren.

In der Abbildung 4 wird die Zunahme der Enterobakteriazeen-, *E. coli*- und *S. aureus*-Koloniezahlen und der pH-Verlauf während der Herstellung und Lagerung von Rohmilch-Formaggini dargestellt.

Bei einer Ausgangskontamination der Rohmilch mit  $1,2 \times 10^2$ -Enterobakteriazeen,  $1,0 \times 10^2$  *E. coli* und  $2,9 \times 10^3$  *S. aureus* pro ml erfolgt bereits im Laufe des Herstellungsprozesses eine deutliche Zunahme der Koloniezahlen um ungefähr 1,5 Potenzen während der ersten zwei Stunden mit einem weiteren Anstieg auf  $10^6\text{ KBE ml}^{-1}$  in ca. 7 Stunden. Der pH-Wert blieb in dieser Zeit konstant um den Wert 6,5. Beim Lagern bei 4 °C und 20 °C konnte eine weitere Zunahme der Koloniezahlen und eine Abnahme des pH-Wertes festgestellt werden. Der End-pH-Wert betrug nach 72 Stunden 5,0–5,2 je nach Lagerungstemperatur.

In einer separaten Versuchsserie wurden Formaggini aus thermisierter Milch hergestellt. Bei Stufenkontrollen während der Herstellung und Untersuchungen in 24stündigem Intervall während einwöchiger Lagerung bei 4 °C und 20 °C lagen die Zahlen in  $\text{KBE g}^{-1}$  für *S. aureus*, *E. coli* und Enterobakteriazeen immer unter den Nachweisgrenzen ( $10^2$ , 10 bzw.  $10\text{ KBE g}^{-1}$ ).

#### *S. aureus*

##### *1. Bildung der Enterotoxine A-D in vitro durch S. aureus-Stämme aus Formaggini*

Wie aus der Tabelle 3 ersichtlich ist, bildeten 28 (66,6%) der 42 untersuchten Stämme mindestens ein Toxin; zwei (4,7%), 3 (7,1%), 14 (33,3%) und 9 (21,4%) Stämme bildeten 4 bzw. 3, 2 und nur ein Toxin. Von den Stämmen, die nur ein Toxin bildeten, war ein Stamm SEA-Produzent, 3 Stämme SEC-Produzenten und 5 Stämme SED-Produzenten. Vierundzwanzig Stämme (57,1%) bildeten SED, 20 (47,6%) bildeten SEA und 5 je (11,9%) bildeten SEB und SEC.

Die *S. aureus*-Kontamination in den untersuchten Proben schwankte zwischen  $10^2$  und  $1,9 \times 10^7\text{ KBE g}^{-1}$ .



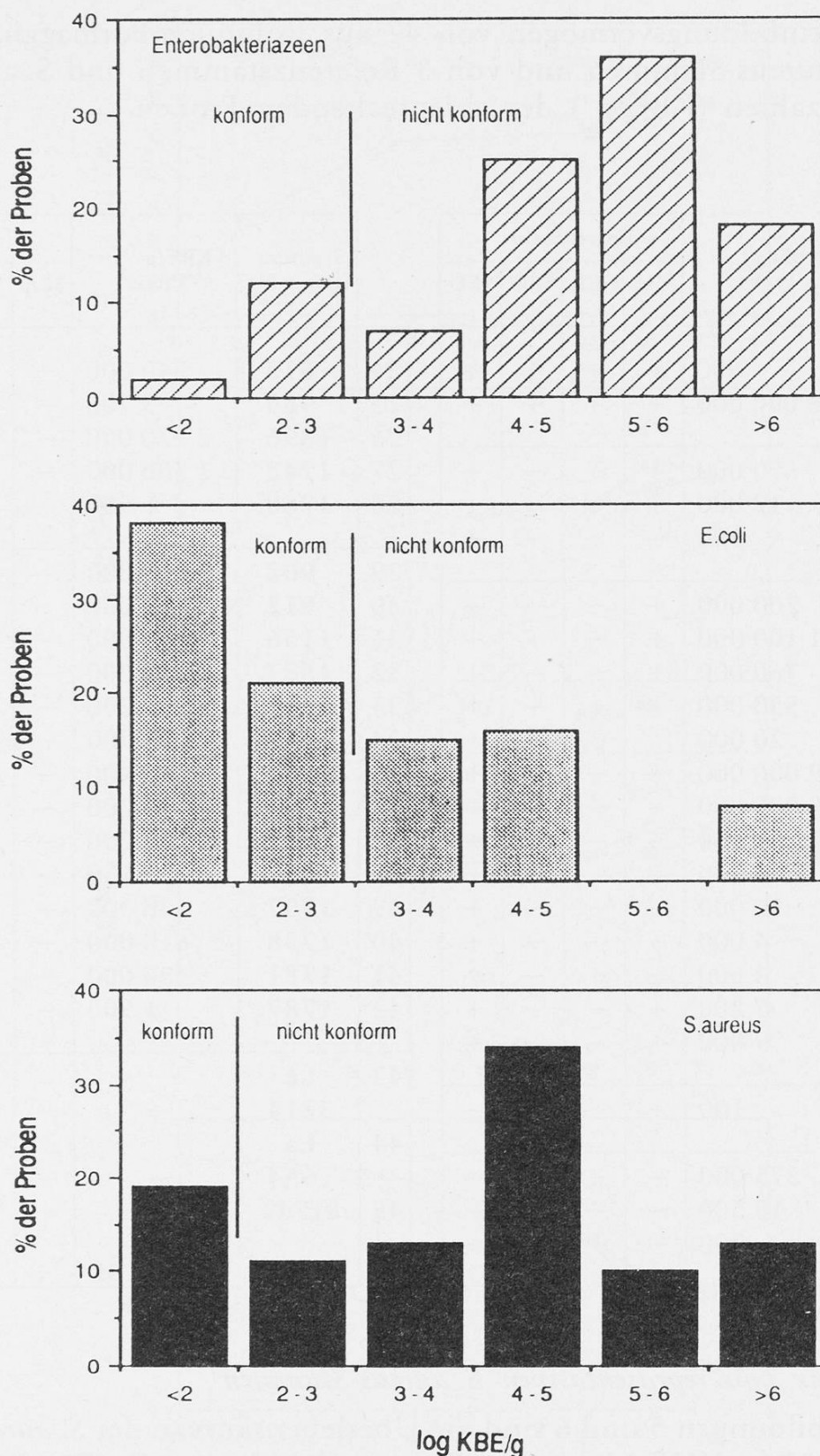


Abb. 3. Prozentuale Verteilung der Koloniezahlen in den Klassen  $\log_{10} 2$  bis  $>6$  für Enterobakteriazeen-, *E. coli* und *S. aureus* bei 59 amtlich erhobenen Formaggini-Proben. Konform und nicht konform beziehen sich auf dem Toleranzwert ( $10^3$  KBE/g<sup>-1</sup> für die Enterobakteriazeen und *E. coli*,  $10^2$  KBE/g<sup>-1</sup> für *S. aureus*) für Frischkäse in der Hygieneverordnung (1)



**Tabelle 3.** Toxinbildungsvermögen von 42 aus Rohmilch-Formaggini isolierten *S. aureus*-Stämmen und von 3 Referenzstämmen und *S. aureus*-Koloniezahlen (KBE/g<sup>-1</sup>) der entsprechenden Proben

|    | S. aureus-Stamm-Nr. | KBE/g <sup>-1</sup> in Probe | Enterotoxine |     |     |     |
|----|---------------------|------------------------------|--------------|-----|-----|-----|
|    |                     |                              | SEA          | SEB | SEC | SED |
| 1  | 1776                | 600                          | +            | +   | +   | +   |
| 2  | 1784                | 6 000 000                    | +            | +   | +   | +   |
| 3  | 1361                | 670 000                      | +            | +   | —   | +   |
| 4  | 1768                | 12 000                       | +            | +   | —   | +   |
| 5  | 1779                | 200                          | +            | +   | —   | +   |
| 6  | 814                 | 200 000                      | +            | —   | —   | +   |
| 7  | 909                 | 1 100 000                    | +            | —   | —   | +   |
| 8  | 918                 | 760 000                      | +            | —   | —   | +   |
| 9  | 1395                | 550 000                      | +            | —   | —   | +   |
| 10 | 1397                | 20 000                       | +            | —   | —   | +   |
| 11 | 1472                | 19 000 000                   | +            | —   | —   | +   |
| 12 | 1473                | 19 000 000                   | +            | —   | —   | +   |
| 13 | 1743                | 600                          | +            | —   | —   | +   |
| 14 | 1777                | 6 300                        | +            | —   | —   | +   |
| 15 | 1778                | 14 000                       | +            | —   | —   | +   |
| 16 | 1782                | 4 000                        | +            | —   | —   | +   |
| 17 | 1785                | 4 600                        | +            | —   | —   | +   |
| 18 | 1786                | 7 200                        | +            | —   | —   | +   |
| 19 | 1788                | 9 000                        | +            | —   | —   | +   |
| 20 | 1536                | 100                          | +            | —   | —   | —   |
| 21 | 1567                | 375 000                      | —            | —   | +   | —   |
| 22 | 1711                | 18 500                       | —            | —   | +   | —   |
| 23 | 1712                | 700                          | —            | —   | +   | —   |
| 24 | 815                 | 540 000                      | —            | —   | —   | +   |
| 25 | 983                 | 3 700                        | —            | —   | —   | +   |
| 26 | 1396                | 2 220 000                    | —            | —   | —   | +   |
| 27 | 1742                | 1 300 000                    | —            | —   | —   | +   |
| 28 | 1780                | 900                          | —            | —   | —   | +   |
| 29 | 902                 | 7 800 000                    | —            | —   | —   | —   |
| 30 | 912                 | 11 000                       | —            | —   | —   | —   |
| 31 | 1156                | 440 000                      | —            | —   | —   | —   |
| 32 | 1537                | 50 000                       | —            | —   | —   | —   |
| 33 | 1538                | 200                          | —            | —   | —   | —   |
| 34 | 1542                | 3 700                        | —            | —   | —   | —   |
| 35 | 1544                | 5 400                        | —            | —   | —   | —   |
| 36 | 1550                | 1 200                        | —            | —   | —   | —   |
| 37 | 1552                | 4 200                        | —            | —   | —   | —   |
| 38 | 1647                | 2 100                        | —            | —   | —   | —   |
| 39 | 1707                | 38 300                       | —            | —   | —   | —   |
| 40 | 1738                | 610 000                      | —            | —   | —   | —   |
| 41 | 1781                | 380 000                      | —            | —   | —   | —   |
| 42 | 1787                | 5 900                        | —            | —   | —   | —   |
| 43 | La 3214             | —                            | —            | +   | —   | —   |
| 44 | La 654              | —                            | —            | —   | +   | —   |
| 45 | 815.N               | —                            | —            | —   | —   | —   |

## 2. Hitzeresistenz von repräsentativen *S. aureus*-Stämmen

In den Abbildungen 5 und 6 sind die Überlebenskurven der *S. aureus*-Stämme Nr. 814 und 909 in UHT-Milch und Ziegenmilch dargestellt. Die Stämme wurden so ausgewählt, weil sie Beispiele für linear verlaufende Hitzeinaktivierungskurven (Nr. 814) bzw. Knickkurven (Nr. 909) sind. Mit Ausnahme von Stamm Nr. 909 zeigten alle anderen Stämme linear oder schwach-sigmoidal verlaufende Hitzeinaktivierungskurven.

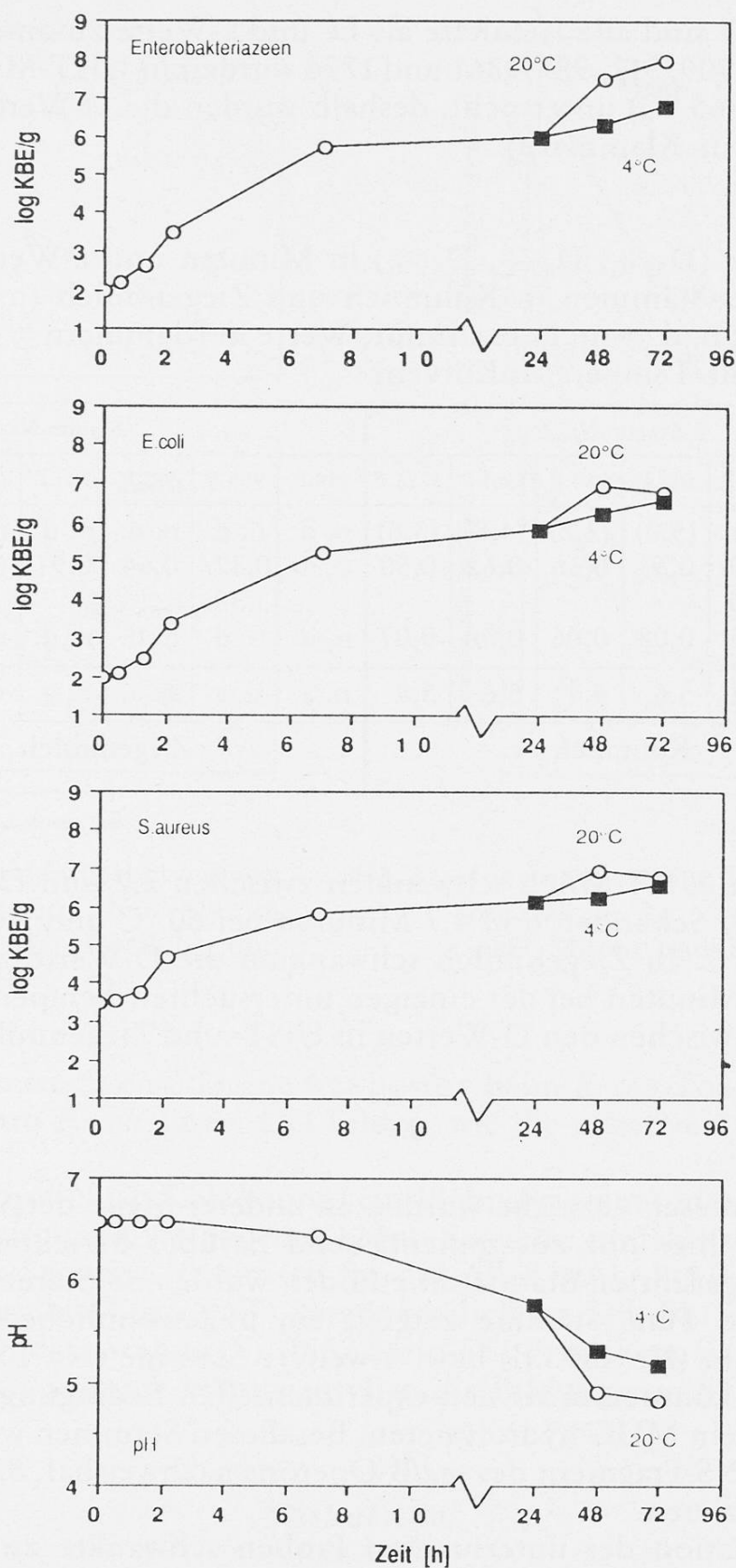


Abb. 4. Zunahme der Enterobakteriazeen-, *E. coli*- und *S. aureus*-Koloniezahl (KBE/g<sup>-1</sup>) und Verlauf des pH-Wertes während der Herstellung und Lagerung von Formagini aus Rohmilch (Anfangskontamination bei  $1,2 \times 10^2$  Enterobakteriazeen,  $1,0 \times 10^2$  *E. coli* und  $2,9 \times 10^3$  KBE/g<sup>-1</sup> *S. aureus*)

In der Tabelle 4 sind alle Resultate als D- und z-Werte zusammengefasst. Bei den Stämmen Nr. 909, 912, 983, 1361 und 1776 wurden in UHT-Milch nur 2 Temperaturen (60 und 65 °C) untersucht, deshalb wurden die D-Werte bei 55 °C extrapoliert (Werte in Klammern).

**Tabelle 4.** D-Werte ( $D_{55\text{ °C}}$ ,  $D_{60\text{ °C}}$ ,  $D_{65\text{ °C}}$ ) in Minuten und z-Werte in °C von 6 *S. aureus*-Stämmen in Kuhmilch und Ziegenmilch (n. a. = nicht berechnet; n. d. = nicht bestimmt; Werte in Klammern = extrapoliert aus Todeszeit/Temperatur-Kurven)

|          | Stamm-Nr. |               |       |       |        |        | Stamm-Nr.   |               |       |       |        |        |     |
|----------|-----------|---------------|-------|-------|--------|--------|-------------|---------------|-------|-------|--------|--------|-----|
|          | 814.P     | 909.P         | 912.P | 983.P | 1361.P | 1776.P | 814.P       | 909.P         | 912.P | 983.P | 1361.P | 1776.P |     |
| D-55 °C  | 13,5      | n. a.         | (5,0) | (2,2) | (4,8)  | (3,6)  | n. d.       | n. d.         | n. d. | n. d. | n. d.  | n. d.  | min |
| D-60 °C  | 0,94      | 0,30/<br>4,70 | 0,63  | 0,36  | 0,62   | 0,50   | 0,90        | 0,32/<br>3,38 | 0,64  | 0,91  | 0,96   | 0,48   | min |
| D-65 °C  | 0,1       | 0,05          | 0,08  | 0,06  | 0,08   | 0,07   | n. d.       | n. d.         | n. d. | n. d. | n. d.  | n. d.  | min |
| z-Wert   | 4,7       | n. a.         | 5,6   | 6,4   | 5,6    | 5,9    | n. a.       | n. a.         | n. a. | n. a. | n. a.  | n. a.  | °C  |
| Kuhmilch |           |               |       |       |        |        | Ziegenmilch |               |       |       |        |        |     |

Die D-Werte in UHT-Milch schwankten zwischen 2,2 und 13,5 Minuten bei 55 °C, zwischen 20 Sekunden und 4,7 Minuten bei 60 °C und zwischen 3 und 6 Sekunden bei 65 °C. In Ziegenmilch schwankten die D-Werte zwischen 20 Sekunden und 3,38 Minuten bei der einzigen untersuchten Temperatur von 60 °C. Der Unterschied zwischen den D-Werten in UHT- und Ziegenmilch war nicht signifikant.

### *E. coli*

Die Resultate dieser Versuche wurden an anderer Stelle detailliert veröffentlicht (7). Es wird hier nur zusammenfassend darüber berichtet.

Mit den durchgeführten Standardmethoden wurden 53 Stämme eindeutig als *E. coli* identifiziert. Fünf Stämme zeigten ein ungewöhnliches biochemisches Verhalten: 1 Stamm (Nr. 1593.fl) bzw. 4 weitere Stämme (Nr. 1095.b, 1095.ncfl, 1128.a und 1315.a) konnten unter den experimentellen Bedingungen keine Lactose vergären bzw. kein MUG hydrolysieren. Bei diesen Stämmen war das für *E. coli* typische 595bp DNS-Fragment des *malB*-Operons nachweisbar. Sie sind daher als *E. coli* zu identifizieren.

Die Kontamination der untersuchten Proben schwankte zwischen  $10^2$  und  $4,8 \times 10^6$  KBE  $g^{-1}$ .

Bei allen 58 untersuchten Stämmen war das für *E. coli* typische 595bp DNS-Fragment des *malB*-Operons nachweisbar, und sie dürfen dementsprechend als *E. coli* identifiziert werden.



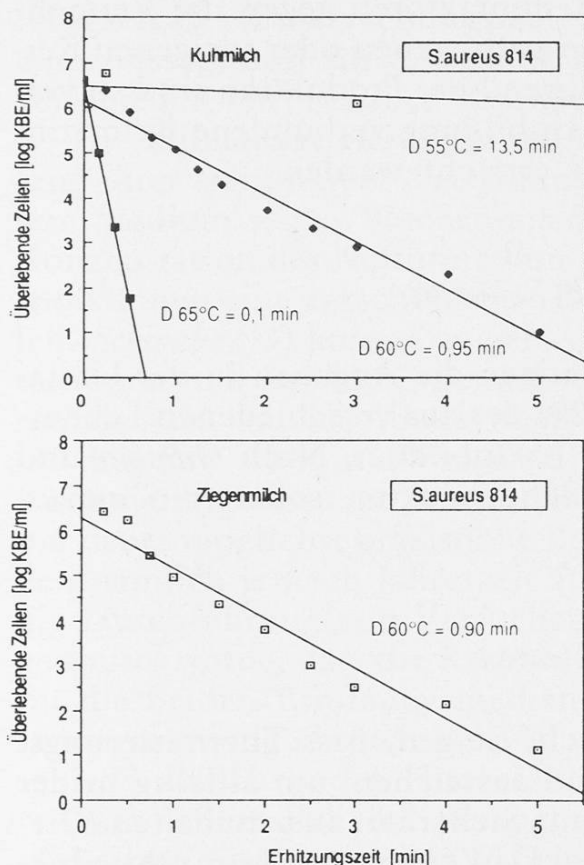


Abb. 5. Hitzeeinaktivierungskurven von *S. aureus*-Stamm Nr. 814 in Kuhmilch (UHT-Milch) und Ziegenmilch

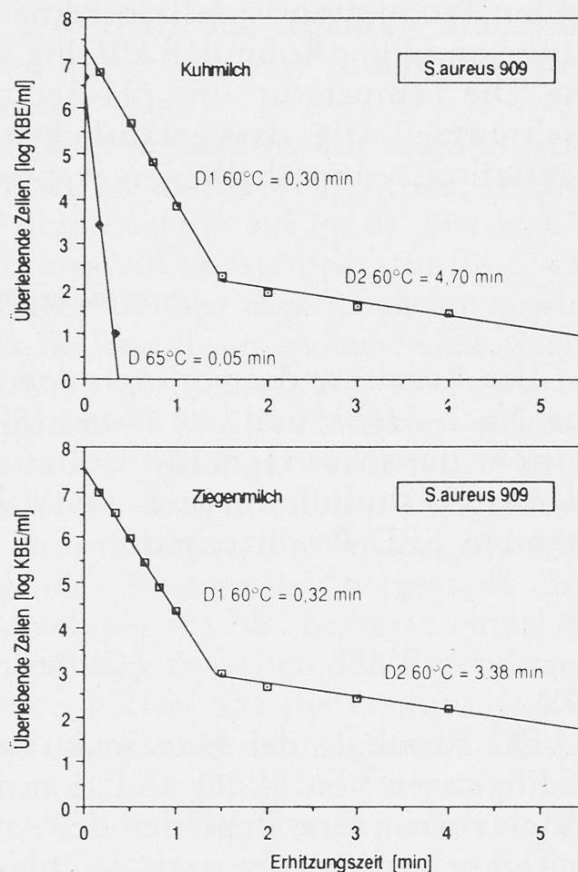


Abb. 6. Hitzeeinaktivierungskurven von *S. aureus*-Stamm Nr. 909 in Kuhmilch (UHT-Milch) und Ziegenmilch

Keiner der untersuchten Stämme war positiv beim *E. coli*-Toxin LT1-PCR-Test und konnte in vitro *E. coli*-Toxin LT1 bilden, wie die negativen Latex-Agglutinationen zeigten.

Nur beim Stamm Nr. 1652.b konnte ein 175bp-Fragment identifiziert werden, das nach Restriktionsanalyse in eine 124pb-Sequenz und kleinere aufgespalten wurde. Die 124pb-Sequenz ist typisch für das Allel *estA1*, das für die Codierung des *E. coli*-hitzestabilen Toxins ST1 verantwortlich ist. Die ELISA-Untersuchung in vitro bestätigte, dass Stamm-Nr. 1652.b ein ST1-Produzent ist. Bei keinem der ST1-PCR-negativen Stämme konnte in vitro die Bildung von ST1-Toxin nachgewiesen werden.

## Diskussion

Aus den Resultaten dieser Arbeit geht deutlich hervor, dass eine thermische Behandlung der Milch vor der Formaggini-Herstellung dringend zu empfehlen ist. Einerseits ist die Wahrscheinlichkeit, dass Rohmilch mit toxischen *S. aureus*-Zellen primär kontaminiert ist, sehr hoch, und andererseits gibt es beim traditio-



nellen Produktionsverfahren keine weiteren Hemmfaktoren gegen die Vermehrung von in der Rohmilch allfällig vorhandenen pathogenen oder toxischen Keime. Die Temperatur- und pH-Bedingungen während der Produktion sind so vermehrungsgünstig, dass gefährliche, mit der Toxinbildung verbundene Keimkonzentrationen innerhalb von wenigen Stunden erreicht werden.

### *Enterotoxinbildung durch S. aureus*

Die Resultate der vorliegenden Studie bestätigen die Angaben in der Literatur. Nach *Mossel* und *van Netten* (8) sind bis 62% der aus verschiedenen Lebensmitteln tierischer Herkunft isolierten Stämme Toxinbildner. Nach *Gilmour* und *Harvey* (9) sind die meisten aus Milch oder Milchprodukten isolierten *S. aureus*-Stämme SED-Produzenten.

### *Hitzeresistenz von S. aureus*

Die Resultate der Hitzeinaktivierungsversuche zeigen, dass Thermisierungsbedingungen von 65 °C und 15 min weitgehend ausreichen, um allfällig in der Milch vorhandene Bakterien der Art *S. aureus* mit Sicherheit auszuschalten. Diese Temperatur erlaubt nach den hier bestimmten D-Werten eine Keimzahlreduktion um 8 Zehnerpotenzen innerhalb weniger als einer Minute. Nach den erhaltenen Ergebnissen wäre auch eine Thermisierung bei 60 °C mit gleicher Heisshaltezeit möglich, vor allem wenn der während der Aufheizphase erzielte Abtötungseffekt dazugerechnet wird. Hingegen bringt eine Erhitzung der Milch auf 55 °C deutlich eine zu geringe Sicherheit. Daher wurde auf die Durchführung der Hitzeinaktivierungen bei dieser Temperatur mit allen 6 Stämmen verzichtet. In Anbetracht der sehr wahrscheinlichen Ungenauigkeit bei der Temperatur- und/oder Heisshaltezeit-Messung seitens der Bauern ist trotzdem eine Thermisierung bei 65 °C für 15 min zu empfehlen. Ausserdem ist zu berücksichtigen, dass die für die Hitzeinaktivierungen verwendeten *S. aureus*-Stämme in tiefgefrorenem Zustand aufbewahrt wurden, was vielleicht eine Erhöhung der Hitzeempfindlichkeit bedingt haben konnte.

Die in dieser Arbeit bestimmten D-Werte stimmen gut mit den in der Literatur für Vollmilch als Erhitzungsmedium angegebenen Werten überein (6, 10, 11). Die Hitzeresistenz von *S. aureus* ist von verschiedenen Faktoren abhängig, wobei die wichtigsten sind: die stammspezifischen Eigenschaften; die Wachstumsphase, in welcher die Bakterien sich befinden; die Bedingungen für ihre Vorkultivierung; die Zusammensetzung des Erhitzungsmediums und die Bedingungen für die Wiederbelebung der subletal hitzegeschädigten Zellen (11, 12). In Anbetracht der stammspezifischen Eigenschaften der Bakterien wurden die Hitzeinaktivierungsversuche mit insgesamt 6 *S. aureus*-Stämmen durchgeführt, die sich sowohl in der geographischen Herkunft als auch im Toxinbildungsvermögen unterschieden. Diese Auswahl erfolgte also nach dem Prinzip einer möglichst grossen Viel-

fältigkeit des Untersuchungsmaterials, damit die erhaltenen Resultate einerseits eine Aussagekraft für das ganze Kantonsgebiet aufweisen und andererseits den verschiedensten Tessiner Realitäten entsprechen.

Die Hitzeinaktivierungen wurden mit Zellen durchgeführt, die sich am Anfang ihrer stationären Wachstumsphase befanden. *S. aureus* weist gerade in diesem Stadium seines Wachstums die grösste Hitzeresistenz auf (4, 5). Die NaCl-Konzentration des Kulturmediums und die Vorkultivierungstemperatur für *S. aureus* können eine entscheidende Rolle in der Hitzeresistenz dieser Bakterien spielen. Schwabe (13) konnte zeigen, dass *S. aureus*-Zellen, die in hohen Salzkonzentrationen und bei 46 °C gewachsen waren, einen viel höheren D<sub>55</sub>-Wert aufwiesen als jene, die bei Abwesenheit von NaCl und bei 37 °C vorkultiviert wurden (80 min bzw. 20 min). Was das Erhitzungsmedium anbelangt, wurden die Hitzeinaktivierungsversuche sowohl in Kuh- als auch in Ziegenmilch durchgeführt, um dabei möglichst praxisnahe Bedingungen zu simulieren. Die Formaggini werden nämlich je nach Jahreszeit aus Kuh- und/oder Ziegenmilch hergestellt. Auf die Durchführung von Versuchen in einer Mischung wurde aber verzichtet, da vermutet wurde, dass die Resultate eine Mittelstellung zwischen den Ergebnissen für die beiden Erhitzungsmedien eingenommen hätten. Da die chemische Zusammensetzung ähnlich ist (14), wurden erwartungsgemäss keine grossen Unterschiede zwischen der Hitzeresistenz in Kuh- und Ziegenmilch festgestellt.

Was schliesslich die Bedingungen für die Wiederbelebung der subletal geschädigten *S. aureus*-Zellen anbelangt, wurde eine maximale Erholung der Keime durch den Einsatz von Baird-Parker-Agar als Nährmedium gesichert. Dieses Medium wurde als das geeignetste für diesen Zweck beschrieben (4, 6).

Bei den Stämmen 814 und 1776 sowohl in Kuh- als auch in Ziegenmilch und bei Stamm 1361 in Ziegenmilch lagen die experimentell bestimmten Punkte auf einer sigmoidalen Kurve, welche typisch für Mikroorganismen ist, die wie die Staphylokokken normalerweise in Zellverbänden vorliegen (6). In allen 5 Fällen wurde der D-Wert trotzdem aus der Regressionsgerade berechnet, die mit allen experimentell ermittelten Punkten bestimmt wurde. Diese Gerade stellt also nur die allgemeine Tendenz bei der Hitzeinaktivierung dieser klumpenbildenden *S. aureus*-Stämme dar.

Nur in einem Fall, und zwar für den Stamm 909, war beim gegebenen Erfassungsbereich ( $10^6$ – $10^7$  bis  $10$  KBE ml<sup>-1</sup>) eine Tailing-Erscheinung festzustellen, die auf eine erhöhte Hitzeresistenz der Bakterien gegen Ende der Inaktivierung zurückzuführen ist. Eine ähnliche Erscheinung wurde auch von Walker und Harmon (10) beobachtet. Für den Stamm 909 wurden zwei D-Werte berechnet; und zwar einer für den ersten und einer für den letzten Kurventeil.

In Anbetracht dieses Tailing-Effektes ist also eine Thermisierung bei 65 °C für 15 min zur grösseren Sicherheit durchaus gerechtfertigt.

### *E. coli*

In den letzten Jahren hat es sich gezeigt, dass nicht nur die lange bekannten enteropathogenen (EPEC) *E. coli*-Serotypen, sondern auch die enteroinvasiven



(EIEC) und die enterotoxischen (ETEC) *E. coli*-Biotypen sowie die sogenannten kolon-hämorrhagischen Stämme des Serotypes O157:H7 in Lebensmitteln vorkommen können (15–17).

Mit ETEC- oder O157:H7-*E. coli* kontaminierter Weichkäse verursachte in Nordamerika einige Kollektivausbrüche. Enterotoxigene *E. coli*-Stämme sind als Ursache von diarrhötischen Symptomen bei Menschen und Jungtieren bekannt. Die Virulenz beruht auf ihrer Fähigkeit, Enterotoxine und oberflächenspezifische Adesine zu bilden. Die letzteren begünstigen die Colonisierung des Intestinalsepithels durch die infizierten Zellen.

Enterotoxigene *E. coli*-Stämme können verschiedene Klassen und Typen von Enterotoxinen bilden. Nach Scotland (18) können diese zwischen hitzelabilen (LT; inaktiviert bei 60 °C und 30 Minuten) und hitzestabilen (ST; resistent bei 100 °C und 15 Minuten) Toxinen differenziert werden. Zwei immunologisch nicht verwandte Typen von LT, i. e. LT1 und LT2, wurden bis jetzt beschrieben. LT1 wird sowohl durch Stämme menschlicher Herkunft (LTh) als auch tierischer Herkunft (LTp aus Schweinen; LTc aus Hühnern) gebildet, während LT2 wegen der niedrigen Isolierungsrate von Produzenten bis jetzt sehr wenig untersucht wurde. ST-Toxine werden ähnlicherweise in ST1 (oder STA) und ST2 (oder STB) differenziert. Analog den LT-Toxinen wurde ST2 bis jetzt wenig studiert: in Thailand wurden ST2-Produzenten aus Wasserbüffeln aber auch aus Menschen isoliert (15). ST1-Bilder wurden öfter aus Rindern und Schweinen, seltener aus Menschen isoliert. Das für die ST1-Toxin codierende *estA1*-Allel, das aus Stamm 1652.b ebenfalls isoliert wurde (7), wurde ursprünglich in einem *E. coli*-Stamm tierischer Herkunft gefunden. Da aber die gleiche 124bp-Sequenz auch aus einem mit menschlicher Diarrhoe assoziierten *E. coli*-Stamm isoliert wurde (19), kann es nicht ausgeschlossen werden, dass es auch zu menschlichen Infektionen führen kann.

In dieser Studie wurden 5 Stämme isoliert, die bei der Identifizierung nach den Standardmethoden ein ungewöhnliches biochemisches Verhalten zeigten. Vier davon konnten kein 4-methyl-umbelliphenyl- $\beta$ -glucuronid (MUG) hydrolysieren. Das Vorkommen von glucuronidase (GUR) negativen *E. coli*-Biotypen ist in der Literatur dokumentiert (20–24). Schmidt-Lorenz und Spillmann (20) konnten einen solchen Stamm aus Camembert isolieren. In Wasserproben konnten Covert et al. (21) und Lewis and Mak (22) regelmässig GUR-negative *E. coli*-Stämme finden. Nach Chang (23) war sogar  $\frac{1}{3}$  der humanfäkalen *E. coli* aus einer internationalen Sammlung GUR-negativ. Diese enorme Zahl konnte durch Rice et al. (24) nicht bestätigt werden; eine Untersuchung von 621 Menschen-, Rinder- und Pferde-*E. coli*-Isolaten führte zur Identifizierung von einem einzigen GUR-negativen Stamm.

Die Abwesenheit des Enzymes Glucuronidase wurde bei Stämmen des Biotypes O157:H7 beobachtet, ein Biotyp, welches oft mit human-hämorrhagischen Colitis verbunden und als Verotoxinbildner bekannt ist (25). Das immer häufigere Vorkommen von MUG-negativen Isolaten konnte den *E. coli*-Nachweis mit dem offiziellen MUG-Test in Frage stellen. Bei Verdachtsfällen ist eine Typisie-

rung des Isolates oder ein direkter Nachweis auf geeigneten Nährmedien mit geeigneter Technik (26–28) ohne weiteres zu empfehlen.

Um die hygienischen Risiken durch Formaggini aus kleingewerblicher Produktion im Kanton Tessin noch besser evaluieren zu können, müssen die empfohlenen Thermisierungs-Bedingungen auch in bezug auf enterotoxigene und kolon-hämorrhagische *E. coli*-Serotypen überprüft werden.

### Zusammenfassung

In der Periode Frühling 1988 – Herbst 1989 wurden aus 51 kleingewerblichen Produktionsbetrieben 99 Formaggini-Proben aus Rohmilch erhoben und mikrobiologisch untersucht. In 40 Proben war *L. monocytogenes*, in 22 waren Salmonellen und *C. jejuni* nicht nachweisbar. 59 Proben wurden auf Enterobakteriazeen, *E. coli* und *S. aureus* untersucht. Die Zahl der Beanstandungen wegen Überschreiten der Toleranzwerte lag insgesamt bei 91,5%. Der Toleranzwert für Frischkäse von  $10^3$  KBE  $g^{-1}$  für Enterobakteriazeen und *E. coli* wurde bei 85% bzw. 42% der Proben, der Toleranzwert von  $10^2$  KBE  $g^{-1}$  für *S. aureus* bei 81% der Proben überschritten. Die schlechte Rohmilchqualität, die prekären hygienischen Betriebsbedingungen und das Fehlen jeder thermischen Behandlung der Rohmilch führten zu diesen nicht tolerierbaren Resultaten.

Die von den Kontrollbehörden im Herbst 1989 empfohlene Thermisierung der Milch auf 65 °C während 15 Minuten konnte die mikrobiologische Qualität dieses traditionsreichen Produktes deutlich verbessern.

Zur Bestätigung dieser Thermisierungsbedingungen wurden Hitzeresistenzversuche in Kuh- und Ziegenmilch mit 6 repräsentativen *S. aureus*-Stämmen durchgeführt. Zwischen den beiden Milchsorten wurde kein bedeutender Unterschied festgestellt. Die  $D_{60\text{ °C}}$ - bzw.  $D_{65\text{ °C}}$ -Werte lagen dabei im Bereich 20 s und 4,7 min bzw. 3 s und 6 s. Daraus wurden  $z$ -Werte im Bereich 4,7–6,4 °C ermittelt.

Bei 28 von 42 aus Rohmilch-Formaggini isolierten *S. aureus*-Stämmen (66%) konnte mittels ELISA-Test die Bildung von mindestens einem Enterotoxin festgestellt werden, wobei am häufigsten (57% der Stämme) SED gebildet wurde.

Bei einem von 58 aus Rohmilch-Formaggini isolierten *E. coli*-Stämmen (1,7%) konnte durch Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ein 124bp-DNS-Fragment identifiziert werden, welches für die Codierung des hitzestabilen *E. coli*-Toxins ST1 verantwortlich ist. Das Toxin ST1 konnte in vitro mittels ELISA-Untersuchung nachgewiesen werden. Bei keinem der Isolate war die Bildung von hitzelabilem LT1-Toxin nachweisbar.

### Résumé

Pendant la période printemps 1988 – automne 1989, 99 échantillons de fromages frais produits à partir de lait cru ont été prélevés dans 51 établissements de production artisanale et soumis à analyses microbiologiques. Il n'a jamais été possible de détecter dans les fromages analysés la présence de *Listeria monocytogenes* (40 échantillons), Salmonella ou Campylobacter (22 échantillons), tandis que le 91,5% des 59 échantillons analysés pour la présence de Enterobactériacées, *E. coli* et *S. aureus* était non conforme aux normes législatives



suisses. En effet, 85% des échantillons dépassait la valeur de tolérance admise pour les Enterobactériacées (1000 CFU g<sup>-1</sup>), 81% celle établie pour les *S. aureus* (100 CFU g<sup>-1</sup>) et 42% celle fixée pour les *E. coli* (1000 CFU g<sup>-1</sup>). Ces résultats s'expliquent par la mauvaise qualité du lait cru et par les mauvaises conditions hygiéniques des établissements de production. En outre, le lait cru n'a jamais été soumis à des traitements thermiques. En effet, la thermisation du lait à 65 °C pendant 15 minutes, mesure conseillée par les autorités compétentes, permet l'amélioration de la qualité microbiologique de ces produits locaux traditionnellement appréciés. L'efficacité du traitement de thermisation proposé a été vérifiée par des essais de résistance à la chaleur dans du lait de vache et de chèvre avec 6 souches représentatives de *S. aureus*. On a pu constater des variations minimales du comportement de ces souches dans les deux types de lait: les valeurs D<sub>60 °C</sub> et D<sub>65 °C</sub> se situent entre 20 secondes – 4,7 minutes et 3–6 secondes respectivement, tandis que la valeur z se place entre 4,7–6,4 °C. Vingt-huit (66%) des 42 souches de *S. aureus* isolées des fromages analysés avec un test ELISA produisaient au moins une entérotoxine; dans le 57% des cas il s'agissait de la toxine SED. Dans une deuxième série d'essais, on a pu démontrer avec la méthode PCR (Polymerase Chain Reaction) qu'une souche des 58 *E. coli* isolées (1,7%) était porteuse du fragment de 124bp codant pour la toxine ST1 (toxine du type résistant à la chaleur). En vitro il a été possible de mettre en évidence la toxine ST1 par un test ELISA uniquement dans la souche ST1-PCR-positive. Aucun des *E. coli* isolés était producteur de la toxine LT1 (type sensible à la chaleur): toutes les souches étaient en effet négatives soit avec la méthode PCR soit avec agglutination Latex des cultures.

### Summary

During the period from spring 1988 to autumn 1989, 99 samples of home-made style Swiss-italian fresh cheese (formaggini) were collected from small factories and investigated for the presence of *Listeria monocytogenes*, *Salmonella*, *Campylobacter jejuni*, Enterobacteriaceae, *E. coli* and *S. aureus*. None of the samples was found to be contaminated by *L. monocytogenes* (40 samples), *Salmonella* or *C. jejuni* (22 samples). Conversely 85%, 42% and 81% of 59 samples resulted to be contaminated by Enterobacteriaceae, *E. coli* and *S. aureus* respectively, to an extend higher than the officially tolerated Swiss standard-values. The poor raw milk quality, peculiar hygienic conditions during manufacturing and storage as well as lack of any thermal treatment are some of the causes of these intolerable findings. The poor raw milk thermal treatment suggested in Fall 1989 by the competent authority (65 °C/15 minutes) could improve the microbiological quality of this traditional product. In fact, to confirm the efficacy of the suggested treatment, the heat resistance of 6 representative *S. aureus* strains has been investigated in cow's and goat's milk. D<sub>60 °C</sub>- and D<sub>65 °C</sub>-values were calculated in the range 20 seconds – 4,7 minutes and 3–6 seconds, respectively, resulting in z-values in the range 4,7–6,4 °C. Heat treatment parameters in cow's and goat's milk were similar. In addition, 28 of 42 *S. aureus* strains isolated from Formaggini (66%) were found to produce at least one enterotoxin, SED being the most frequently found (57%). In a separate series of trials one strain of *E. coli* among 58 Formaggini isolates was found by Polymerase Chain Reaction (PCR) to host a 124bp DNA-fragment, which codes for *E. coli* – heat stable ST1 enterotoxin. The strain was able to produce ST1-toxin, as confirmed by a ST1-ELISA-test in vitro. None of the 58 *E. coli* strains was able to produce heat labile LT1 toxin.

## Literatur

1. Schweiz. Verordnung über die hygienisch-mikrobiologischen Anforderungen an Lebensmittel, Gebrauchs- und Verbrauchsgegenstände. Eidg. Drucksachen- und Materialzentrale, Bern 1987.
2. Schweiz. Lebensmittelbuch, Kapitel 56, 5. Auflage. Eidg. Drucksachen- und Materialzentrale, Bern 1988.
3. Hallmann, L.: Bakteriologie und Serologie, 3. Auflage, S. 763. Georg Thieme, Hamburg 1961.
4. Bergdoll, M. S.: *Staphylococcus aureus*. In: Doyle, M. P. (ed.), Foodborne bacterial pathogens, pp. 471–475 und 504. Marcel Dekker Inc., Basel 1989.
5. Kornaki, J. and Marth, E. A.: Thermal inactivation of *S. aureus* in retentates from ultra-filtered milk. J. Food Prot. **9**, 631–637 (1989).
6. Baird-Parker, A. C.: Classification and identification of Staphylococci and their resistance to physical agents. In: Cohen, J. O. (ed.), The staphylococci, 14. Center for Disease Control CDC, Atlanta 1972.
7. Candrian, U., Furrer, B., Höfelein, Ch., Meyer, R., Jermini, M. and Lüthy, J.: Detection of *E. coli* and identification of enterotoxigenic strains by primer-directed enzymatic amplification of specific DNA sequences. Int. J. Food Microbiol. (im Druck 1990).
8. Mossel, D.A.A. and van Netten, P.: *Staphylococcus aureus* and related staphylococci in foods: Ecology, proliferation, toxinogenesis, control and monitoring. J. Appl. Bacteriol Symp. Suppl. **19**, 123–145 (1990).
9. Gilmour, A. and Harvey, J.: Staphylococci in milk and milk products. J. Appl. Bacteriol Symp. Suppl. **19**, 147–166 (1990).
10. Walker, G. C. and Harmon, L. G.: Thermal resistance of *Staphylococcus aureus* in milk, whey and phosphate buffer. Appl. Microbiol. **4**, 584–590 (1966).
11. Baird-Parker, A. C.: The staphylococci: An introduction. J. Appl. Bacteriol Symp. Suppl. **19**, 1–8 (1990).
12. Hurst, A. and Hughes, A.: The protective effect of some food ingredients on *Staphylococcus aureus* MF31. J. Appl. Bacteriol. **55**, 81–88 (1983).
13. Schwabe, M.: Inactivation of staphylococcal enterotoxin by heat and reactivation by high pH treatment. Int. J. Food. Microbiol. **10**, 33–42 (1990).
14. Souci, S. W., Fachman, W. and Kraut, H.: Food Composition tables, 19–26. Wiss. Verlagsgesellschaft, Stuttgart 1989.
15. Kornaki, J. and Marth, E. H.: Foodborne illness caused by *Escherichia coli*: A review. J. Food Prot. **45**, 1051–1067 (1982).
16. Makukutu, C. A. and Guthrie, R. K.: Survival of *Escherichia coli* in food at hot-holding temperatures. J. Food Prot. **49**, 496–499 (1986).
17. Okrend, A., Rose, B. E. and Bennet, B.: A screening method for the isolation of *Escherichia coli* O157:H7 from ground beef. J. Food Prot. **53**, 249–252 (1990).
18. Scotland, S. M.: Toxins, J. Appl. Bacteriol Symp. Suppl. **17**, 109–129 (1988).
19. Moseley, S. L., Hardy, J. W., Hug, M. I., Echeverria, P. and Falkow, S.: Isolation and nucleotide sequence determination of a gene encoding a heat-stable enterotoxin of *Escherichia coli*. Infect. Immun. **39**, 1167–1174 (1983).
20. Schmidt-Lorenz, W. und Spillmann, H.: Kritische Überlegungen zum Aussagewert von *Escherichia coli*, Coliformen und Enterobakteriazen in Lebensmitteln. Arch. Lebensmittelhyg. **39**, 1–24 (1988).

21. Covert, T. C., Shadix, L. C., Rice, E. W., Haines, J. R. and Fryberg, R.: Evaluation of the autoanalysis Colilert test for the detection and enumeration of total coliforms. Appl. Environ. Microbiol. **55**, 2443–2447 (1989).
22. Lewis, C. and Mak J. L.: Comparison of membrane filtration and autoanalysis Colilert presence-absence techniques for analysis of total coliforms and *Escherichia coli* in drinking water samples. Appl. Environ. Microbiol. **55**, 3091–3094 (1989).
23. Chang, C.: Glucuronidase-negative human fecal *Escherichia coli* from an international collection. J. Food. Prot. (im Druck 1990).
24. Rice, E., Allen, M. J. and Edberg, S.: Efficacy of  $\beta$ -glucuronidase assay for identification of *Escherichia coli* by the defined substrate technology. Appl. Environ. Microbiol. **56**, 1203–1205 (1990).
25. Levine, M. M.: *Escherichia coli* that cause diarrhea: enterotoxigenic, enteropathogenic, enteroinvasive, enterohemorrhagic and enteroadherent. J. Inf. Dis. **155**, 377–389 (1987).
26. March, S. and Ratnam, S.: Sorbitol-MacConkey medium for detection of *Escherichia coli* O157:H7 associated with hemorrhagic colitis. J. Clin. Microbiol. **23**, 869–872 (1986).
27. Todd, E. C. D., Szabo, R. A., Peterkin, P., Sharpe, A. N., Parrington, L., Bundle, D., Gidney, M. A. and Perry M. B.: Rapid hydrophobic grid membrane filter-enzyme-labeled antibody procedure for identification and enumeration of *Escherichia coli* O157 in foods. Appl. Environ. Microbiol. **54**, 2536–2540 (1988).
28. Farmer, J. J. and Davis, B. R.: H7 antiserum-sorbitol fermentation medium: a single tube screening method for detecting *Escherichia coli* O157:H7 associated with hemorrhagic colitis. J. Clin. Microbiol. **22**, 620–625 (1985).

Dr. M. F. G. Jermini  
 Dipartimento Opere Sociali del Canton Ticino  
 Laboratorio Cantonale d'Igiene — Reparto Microbiologia  
 via Ospedale 6  
 CH-6900 Lugano