


Verbreitung von *Staphylococcus aureus* in Rohmilchkäsen der alpinen Region

Staph Almkäse

 HBLFA Tirol
Landwirtschaft und Ernährung,
Lebensmittel- und Biotechnologie

 Consiglio Nazionale delle Ricerche

 Schweizerische Eidgenossenschaft
Confédération suisse
Confederazione Svizzera
Confederaziun svizra

 Consiglio Nazionale delle Ricerche
ISPA
ISTITUTO DI SCIENZE DELLE PRODUZIONI ALIMENTARI

 Consiglio Nazionale delle Ricerche
IBBA
Istituto di Biologia e Biotechnologia Agraria

Eidgenössisches Departement für Wirtschaft,
Bildung und Forschung WBF
Agroscope

Impressum

Medieninhaber und Herausgeber:

Projektnehmer:in: HBLFA Tirol

Abteilung: Mikrobiologie und Hygiene

Adresse: Rotholz 50, 6200 Strass im Zillertal

Projektleiter:in Projektarbeiten Österreich: Margaretha Buchner, MSc

Tel.: +43 5244 622 62 702

E-Mail: margaretha.buchner@hblfa-tirol.at

Kooperationspartner:innen: Projektinitiator Thomas Berger (Agroscope, Bern, CH),

Projektpartner ISPA (Mailand, IT) und IBBA (Mailand, IT)

Finanzierungsstelle(n): BML für die Untersuchungen an der HBLFA Tirol

Projektlaufzeit: 01.04.2021 – 13.06.2023

Fotonachweis Cover: HBLFA Tirol

Rotholz, 12. Jänner 2024

Copyright und Haftung:

Auszugsweiser Abdruck ist nur mit Quellenangabe gestattet, alle sonstigen Rechte sind ohne schriftliche Zustimmung des Medieninhabers unzulässig. Es wird darauf verwiesen, dass alle Angaben in dieser Publikation trotz sorgfältiger Bearbeitung ohne Gewähr erfolgen und eine Haftung der HBLFA Tirol und der Autorin/des Autors ausgeschlossen ist. Rechtsausführungen stellen die unverbindliche Meinung der Autorin/des Autors dar und können der Rechtssprechung der unabhängigen Gerichte keinesfalls vorgreifen.

Inhalt

| | |
|--|-----------|
| Abstract..... | 4 |
| 1 Einleitung | 6 |
| 2 Projektbeteiligte und Aufgabenbereiche | 10 |
| 3 Material und Methoden | 11 |
| 3.1 Sammlung Käseproben..... | 11 |
| 3.2 Keimzahlbestimmung..... | 14 |
| 3.3 Isolation und Genotypisierung, Enterotoxinanalyse..... | 14 |
| 4 Ergebnisse und Diskussion | 15 |
| 4.1 Koagulase-positive Staphylokokken in Almkäsen aus Rohmilch | 15 |
| 4.2 Enterotoxinanalyse..... | 17 |
| 4.3 Isolatuntersuchungen..... | 17 |
| 4.4 Ursachenfindung für erhöhte Keimzahlen in Schnittkäsen von österreichischen Almen..... | 18 |
| 4.5 Notwendige Maßnahmen bei der Herstellung von Rohmilchkäsen, insbesondere auf Almen..... | 19 |
| 4.6 Nachhaltige Bekämpfungsstrategien <i>Staphylococcus aureus</i> | 23 |
| 5 Zusammenfassung..... | 24 |
| 6 Kommunikation..... | 25 |
| Literaturverzeichnis | 26 |
| Abbildungsverzeichnis | 28 |
| Tabellenverzeichnis..... | 29 |
| Abkürzungen..... | 30 |
| Anlage 1 | 31 |
| Anlage 2 | 33 |

Abstract

Staphylococcus aureus (*S. aureus*) zählt in Europa zu den häufigsten Verursachern lebensmittelbedingter Krankheitsausbrüche. Werden im Lebensmittel hohe Keimzahlen erreicht, so können hitzeresistente Enterotoxine gebildet werden, die beim Konsumenten eine Lebensmittelvergiftung bewirken können. Haupteintragswege in Käse sind subklinische, nicht diagnostizierte Mastitiden der Milchtiere, der Eintrag kann jedoch auch durch den Menschen und über das Umfeld erfolgen. Aufgrund der Vergesellschaftung von Milchtieren unterschiedlicher Talbetriebe während der Sommerzeit, der Verarbeitung von Rohmilch sowie teilweise schwieriger Herstellungsbedingungen, werden insbesondere bei Almkäsen häufiger diesbezügliche Grenzwertüberschreitungen rechtlicher Vorgaben festgestellt. Im Rahmen dieses Projektes wurden regional typische Rohmilchkäse von Almen im alpinen Raum der Schweiz, Italiens und Österreichs auf die Keimzahl Koagulase-positiver Staphylokokken untersucht. Dabei wurden insbesondere bei Frisch- und Schnittkäsen, die im Gegensatz zu Hartkäsen keinem Brennschritt unterzogen werden, zu einem erheblichen Anteil Überschreitungen der gesetzlich festgelegten Grenzwerte festgestellt. *S. aureus* Genotyp B stellt aufgrund seiner hohen Infektiosität ein häufiges Herdenproblem dar und wurde auch in Almkäsen nachgewiesen. Um die Lebensmittelsicherheit zu gewährleisten und Grenzwertüberschreitungen insbesondere bei Rohmilchkäsen vorzubeugen, müssen proaktiv Maßnahmen zu Erhalt und regelmäßige Kontrollen der Eutergesundheit konsequent umgesetzt und die im jeweiligen HACCP-Konzept festgelegten Kontrollpunkte strikt eingehalten werden. Entscheidend für die Umsetzung der laufend zu ergreifenden Maßnahmen sind die grundlegende Sensibilisierung sowie regelmäßige Schulungen des Almpersonals und der Tierhalter.

Staphylococcus aureus (*S. aureus*) is one of the most common causes of food-borne diseases in Europe. If high bacterial counts are reached in food, heat-resistant enterotoxins may be formed causing food poisoning. The main sources of contamination in cheese are subclinical, undiagnosed mastitis of dairy animals, but contamination can also occur through humans as well as the environment. Due to the socialization of dairy animals from different valley farms during the summer period, the processing of raw milk and sometimes difficult production conditions, statutory limits are frequently exceeded, especially in alpine cheeses. Within the scope of this project, regionally typical raw milk cheeses from alpine pastures in Switzerland, Italy and Austria were examined for the bacterial count of coagulase-positive staphylococci. In particular, fresh and semi-hard cheeses, which in contrast to hard cheeses are not subjected to a scalding step, were found to exceed the statutory limits to a considerable extent. Due to its high infectivity, *S. aureus* Genotype B, that represents a frequent herd problem, was also detected in alp cheese samples. In order to ensure food safety and to reduce the frequency of limit value exceedances especially in raw milk cheeses, proactive actions must be regularly taken to maintain and control udder health. Furthermore, the control points defined in the respective HACCP concept must be strictly adhered to. Fundamental sensitization and regular training of alpine pasture personnel and dairy farmers are crucial for the implementation of the measures to be taken on an ongoing basis.

1 Einleitung

Relevanz, rechtliche Grundlagen

Staphylococcus aureus (*S. aureus*) ist als wichtigster Vertreter der Gruppe Koagulase-positiver Staphylokokken durch die Auslösung von Lungenentzündungen, Endokartitiden, Mastitiden und Sepsis einer der bedeutendsten bakteriellen Infektionserreger. Im Jahr 2019 wurde *S. aureus* weltweit mit über 1 000 000 Todesfällen in Verbindung gebracht (GBD 2019, 2022). Seine Relevanz für den Lebensmittelsektor zeigt sich jedoch insbesondere durch die Bildung hitzeresistenter Staphylokokken-Enterotoxine und dadurch bedingte Lebensmittelintoxikationen (engl. staphylococcal food poisoning, SFP). *S. aureus* zählt in Europa zu den häufigsten Verursachern lebensmittelbedingter Krankheitsausbrüche (One Health Report 2021, EFSA/ECDC 2022). Die Haupteintragsquellen des Erregers in Käse sind dabei meist subklinische, nicht diagnostizierte Mastitiden bei den Milchtieren. Der Eintrag kann jedoch auch über den Menschen und über das Umfeld erfolgen. Die klinischen und epidemiologischen Eigenschaften sowie das natürliche Reservoir im Betrieb sind dabei vom jeweils vorliegenden Genotyp - es wurden mehr als 100 verschiedene bovine *S. aureus* Genotypen und Varianten identifiziert - abhängig (Graber und Bodmer, 2019; Graber, 2016). Cosandey et al. (2016) untersuchten in 12 europäischen Ländern insgesamt 456 *S. aureus*-Stämme, die jeweils direkt aus Milch von Tieren mit subklinischer Mastitis oder von Herden mit vorherrschender Mastitisproblematik isoliert wurden. Die Analyse ergab dabei fünf große genotypische Cluster (CL), CLB, CLC, CLF, CLI und CLR, auf die 76 % aller Isolate entfielen, von denen CLB, CLC und CLR bei weitem am stärksten vertreten waren. CLC (inkludiert den Genotyp C, GTC) sowie CLR (GTR) wurden in fast allen untersuchten Ländern gefunden, CLB (GTB) jedoch nur in der Schweiz, Österreich, Belgien, Frankreich, Deutschland und Italien. Wie Graber und Bodmer (2019) in einem umfassenden Review zur Thematik zusammenfassen, sticht *S. aureus* Genotyp B (GTB) durch besondere Infektiosität hervor: „Bis zu 100% der Kühe einer Milchviehherde weisen eine Infektion mit diesem Erreger auf (..), wobei normalerweise zwei oder mehr Viertel einer Kuh infiziert sind. Dagegen verursacht *S. aureus* GTC eine Einzelviertelinfektion von einzelnen Kühen (..). So sind in der Schweiz durchschnittlich 10,3% Milchviehherden GTB-infiziert, was ca. 2000 Betrieben entspricht. Die Untersuchungen zeigten aber auch, dass vor allem die Alpregionen davon betroffen sind.“ Die Alpfung stellt einen besonderen Risikofaktor zur Ansteckung mit *S. aureus* GTB dar, da dort häufig der Kontakt zwischen Milchtieren verschiedener Talbetriebe gegeben ist

und die Übertragung durch kontaminierte Melkzeuge erfolgt, sofern vor der Zusammenführung auf der Alm keine entsprechenden Maßnahmen zur Feststellung etwaiger Infektionen und nachhaltiger Behandlung getroffen werden (Graber und Bodmer, 2019; Berchtold et al., 2014). Als weitere Risikofaktoren für die Ansteckung wurde der Zukauf von Kühen, die nicht entsprechende Behandlung bei vorliegender akuter Mastitis sowie eine falsche Melktechnik (wie Blindmelken) festgestellt (Berchtold et al., 2014).

Neben durch *S. aureus* verursachte Mastitiden, die eine direkte Ausscheidung der Keime mit der Milch bedingen, sind auch Kontaminationen der Milch beim Melkvorgang durch das Milchtier selbst (Euterhaut, Haut, Wunden) sowie durch das verarbeitende Personal (asymptomatische Träger oder unbehandelte Wundinfektionen) und indirekt über unzureichend gereinigte Anlagen und Geräte möglich.

Kriterium für die Lebensmittelsicherheit: Staphylokokken-Enterotoxine

Die Verordnung (EG) Nr. 2073/2005 über mikrobiologische Kriterien für Lebensmittel legt die rechtlichen Anforderungen hinsichtlich des Gehaltes an Koagulase-positiven Staphylokokken in Käse zum Zeitpunkt während der Herstellung, zu dem der höchste Staphylokokkengehalt erwartet wird, als Prozesshygienekriterium fest. Bei > 100 000 KbE Koagulase-positiven Staphylokokken/g ist der Käse auf Staphylokokken-Enterotoxine (Lebensmittelsicherheitskriterium) zu untersuchen, um die Sicherheit des Lebensmittels für den Konsumenten zu gewährleisten. Bei > 100 000 KbE Koagulase-positiven Staphylokokken/g in verzehrfertigem Rohmilchkäse sowie bei > 10 000 KbE Koagulase-positiven Staphylokokken/g in anderen verzehrfertigen Lebensmitteln legt die Arbeitsgruppe „Nicht sicher“ (Beiblatt 004 Leitlinie „Nicht sicher“, 2019) als Grundsatzbeurteilung jedoch fest, dass auch bei nicht nachweisbaren Staphylokokken-Enterotoxinen das Lebensmittel als „nicht sicher – für den menschlichen Verzehr ungeeignet“ zu bewerten ist.

Prozesshygienekriterium: Rohstoffqualität, Herstellungs- und Verarbeitungshygiene

Bei der Herstellung von Käse wird die Vermehrung von *S. aureus* durch verschiedenste Faktoren beeinflusst. Dabei spielen neben der Ausgangskeimzahl in der Rohmilch, deren Lagerungsbedingungen vor der Verarbeitung, die Säuerungsaktivität der eingesetzten Kulturen sowie der Temperaturverlauf während der Käsung die vorrangige Rolle. Zudem reichern sich Staphylokokken, die in der Kesselmilch vorhanden sind, auch bei optimaler Säuerungsaktivität und durch physikalische Anreicherung im Bruchkorn etwa um das 100-fache an. Für die Verarbeitung von Schnittkäse aus Rohmilch ist daher auf jeden Fall eine Keimzahl

von < 100 KbE Koagulase-positive Staphylokokken/ml in der Kesselmilch erforderlich. Bei Schnittkäse ist der höchste Staphylokokkengehalt vor der Reifung zu erwarten. Der diesbezügliche Grenzwert liegt entsprechend Verordnung (EG) Nr. 2073/2005 bei m 10 000 KbE/g, M 100 000 KbE/g (Probenahmeplan n=5, c=2). Bei Hartkäse aus Rohmilch ist der höchste Staphylokokkengehalt im Bruch bei Erreichen der Brenntemperatur zu erwarten. Durch das Brennen erfolgt bereits im Käsekessel eine Abnahme der Staphylokokkenkeimzahl, auf der Presse findet eine weitere Inaktivierung statt. Die Beprobung des Käsebruchs ist jedoch aus logistischen Gründen schlecht durchführbar. Die Leitlinie über mikrobiologische Kriterien für Milch und Milchprodukte 2015 legt daher in Österreich für Hartkäse aus Rohmilch vor der Reifung den Grenzwert M 1 000 KbE Koagulase-positive Staphylokokken/g fest. Sowohl in Schnitt- als auch in Hartkäse nimmt der Gehalt an Koagulase-positiven Staphylokokken im Verlauf der Reifung ab (Friedl, 2001). Der Untersuchungszeitpunkt ist für Weichkäse entsprechend der Leitlinie über mikrobiologische Kriterien für Milch und Milchprodukte 2015 auf das Ende der Reifung im Betrieb festgelegt, da in Weichkäse auch noch eine Vermehrung während des Reifungsprozesses möglich ist. In Frischkäse ist der Untersuchungszeitpunkt auf das Ende des Herstellungsprozesses festgelegt.

Wiederkehrende Problematik

Aufgrund der angeführten Risikofaktoren - Vergesellschaftung von Milchtieren unterschiedlicher Talbetriebe auf der Alm, teilweise unzureichender Herstellungs- bzw. Hygienepaxis sowie der Verarbeitung von Rohmilch - werden bei Käsen, die auf Almen produziert werden, im Rahmen von Schwerpunktaktionen häufig Grenzwertüberschreitungen hinsichtlich dieses mikrobiologischen Kriteriums festgestellt (AGES Schwerpunktaktionen A-804-18 vom Dezember 2018, A-805-20 vom März 2021, A-804-22 vom Dezember 2022). Auch werden an der HBLFA Tirol – Abteilung Mikrobiologie und Hygiene regelmäßig während der Alpeperiode Grenzwertüberschreitungen betreffend Koagulase-positive Staphylokokken, insbesondere in Schnittkäse aus Rohmilch, beobachtet.

Im Endbericht der Schwerpunktaktion A-805-20 der AGES vom März 2021 ist festgehalten: „Da auf bäuerlichen Almbetrieben die Pasteurisierung der Rohmilch aufgrund fehlender technischer Möglichkeiten meist nicht möglich ist, wird die Rohmilch üblicherweise ohne Hitzebehandlung verarbeitet. Durch das Fehlen einer Pasteurisierung kann ein Restrisiko – ausgehend von pathogenen Keimen – auch durch hygienisch sorgfältigste Herstellung nicht ausgeschlossen werden. Eine Vermehrung von pathogenen Keimen muss jedoch unbedingt verhindert werden. Für die lebensmittelrechtliche Sicherheit ist daher die Einhaltung einer guten Herstellungspraxis (GMP) von größter Bedeutung. Die Untersuchungsergebnisse der

letzten Jahre zeigten jedoch, dass nicht alle Hersteller alle Schritte der GMP einwandfrei beherrschen. (...) Das Ergebnis der aktuellen Schwerpunktaktion zeigt, dass sich die Situation der mangelhaften Hygiene bei der Herstellung von Käse auf Almen, bei dem es sich meist um Rohmilchkäse handelt, sogar noch verschlechtert hat. (...) Die Herstellung von Rohmilchkäsen auf Almen in hygienischer Hinsicht weist daher weiterhin Verbesserungsbedarf auf.“ Im Rahmen der oben genannten Schwerpunktaktionen wurden zwischen 18,7 % und 30,6% der Produkte von Almen (insbesondere Käse, aber auch Butter) betreffend Staphylokokken-Enterotoxinen, koagulase-positiven Staphylokokken sowie *E. coli*, Verotoxinbildenden *Escherichia coli* (VTEC/STEC) sowie allgemein erhöhter mikrobiologischer Belastung beanstandet und die Beanstandungsquoten in Bezug auf pathogene Keime als hoch bzw. sehr hoch eingestuft.

Neben dem Lebensmittelsicherheitsaspekt gehen Infektionen des Euters mit *S. aureus* mit großen finanziellen Verlusten einher (Graber, 2019). Subklinische Mastitiden werden bei mangelhaftem Monitoring der Einzelgemelke erst verzögert identifiziert, dementsprechend ist unter diesen Bedingungen auch die Wahrscheinlichkeit einer Verbreitung des Infektionserregers in der Herde und ein damit verbundenes Aufschaukeln der Problematik gegeben. In der öffentlichen Wahrnehmung sind Erzeugnisse von Almen hochwertig. Qualitätsmängel von Produkten einzelner Almen schädigen den Ruf der gesamten Almwirtschaft, auch sind Auswirkungen für die österreichische Milchwirtschaft naheliegend.

Ziele des Projektes

Ein zentrales Ziel des vorliegenden Projektes ist in erster Linie die Erhebung aktueller Daten im alpinen Raum der Schweiz, Italiens und Österreichs betreffend (1) die Verbreitung koagulase-positiver Staphylokokken in regional typischen Rohmilchkäsen auf Almen, (2) die Identifikation des hoch-infektiösen *S. aureus* Genotyp B sowie (3) die daraus folgende Ableitung von Schlüsselparametern für das Vorkommen von koagulase-positiven Staphylokokken und Staphylokokken-Enterotoxinen in Rohmilchkäsen. Die Ergebnisse des Projektes werden in die Beratung sowie in die Sensibilisierung von milchverarbeitenden Betrieben für diese jährlich wiederkehrende Thematik einfließen, um fortlaufend die Herstellung der hochqualitativen Almprodukte zu unterstützen.

2 Projektbeteiligte und Aufgabenbereiche

Die Abwicklung des Projektes erfolgte in Zusammenarbeit mit dem Projektinitiator und übergeordneten Projektleiter Thomas Berger bei Agroscope (Bern, CH) sowie den Instituten ISPA (Istituto di Scienze delle Produzioni Alimentari, Unitá territoriale di Milano) und IBBA (Istituto di Biologia e Biotecnologia Agraria, Milano) (siehe Tabelle 1).

Tabelle 1 Projektbeteiligte und Aufgabenbereiche

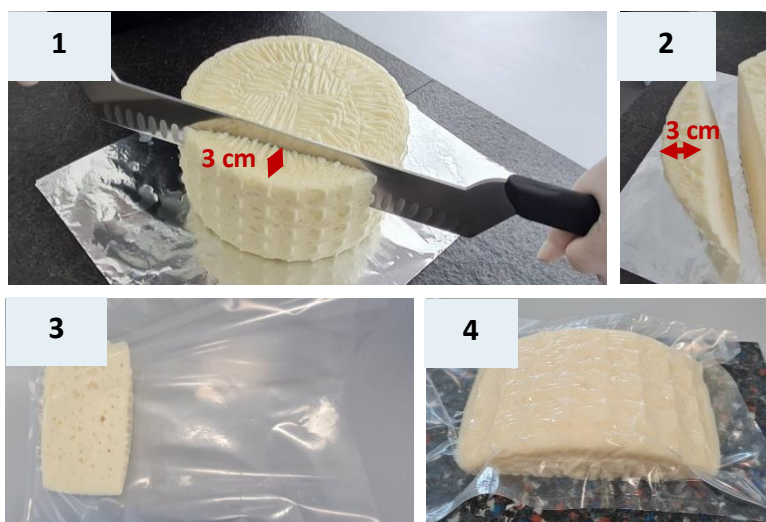
| Institute | Aufgabenbereiche |
|---|--|
| Agroscope Schwarzenburgstraße 161, 3003 Bern, Schweiz Projektinitiator | <ul style="list-style-type: none"> • Sammlung Käseproben und Datenerhebung (Schweiz) • Keimzahlbestimmung (Schweiz) • Isolation Reinkulturen (Schweiz) • Enterotoxinanalyse • Datenauswertung gesamt |
| HBLFA Tirol Rotholz 50, 6200 Strass i. Z., Österreich | <ul style="list-style-type: none"> • Sammlung Käseproben und Datenerhebung (Österreich) • Keimzahlbestimmung (Österreich) • Isolation Reinkulturen (Österreich) • Mitwirkung Datenauswertung |
| ISPA – Consiglio Nazionale delle Ricerche, Istituto di Scienze delle Produzioni Alimentari Hauptstandort: Via Amendola, 122/O, 70126 Bari BA Puglia, Italien Unitá territoriale di Milano: Via Alfonso Corti 12, 20133 Milano, Italien | <ul style="list-style-type: none"> • Sammlung Käseproben und Datenerhebung (Italien) • Keimzahlbestimmung (Italien) • Isolation Reinkulturen (Italien) • Genotypisierung • Mitwirkung Datenauswertung |
| IBBA – Consiglio Nazionale delle Ricerche, Istituto di Biologia e Biotecnologia Agraria Via Edoardo Bassini 15, 20133 Milano, Italien | |

3 Material und Methoden

3.1 Sammlung Käseproben

Die Basis der vorliegenden Untersuchungen bilden 114 auf Almen zu Beginn der Almsaison, Juni bis Juli 2021, hergestellte Rohmilchkäse (Hart-, Schnitt- und Frischkäse), die für die jeweiligen Regionen typisch sind. Da die Teilnahme am Projekt auf freiwilliger Basis erfolgte und die Beweggründe zur Teilnahme oder Nicht-Teilnahme nicht erfasst werden können, handelt es sich bei den Untersuchungsgegenständen um den Typ einer zufälligen Stichprobe im jeweiligen Untersuchungsgebiet. Um die korrekte Probenahme zu gewährleisten und um allgemeine Informationen zu den Käsen sowie Details zu ausgewählten Parametern während der Käseherstellung zu erheben, wurde den Almen eine Anleitung zur Probenahme (siehe Abbildung 1) sowie ein entsprechender Erhebungsbogen (exemplarisch siehe Anlage 1) zugestellt. Diese dienten der Erfassung verschiedener Herstellungsparameter wie Behandlung/Lagerung der Rohmilch, Temperatur- und Zeitparameter bei den Herstellungsschritten, pH-Wert nach Herstellung. In Österreich wurde zudem die Auskunft über gesetzte Eutergesundheitsmaßnahmen erbeten (siehe Anlage 1).

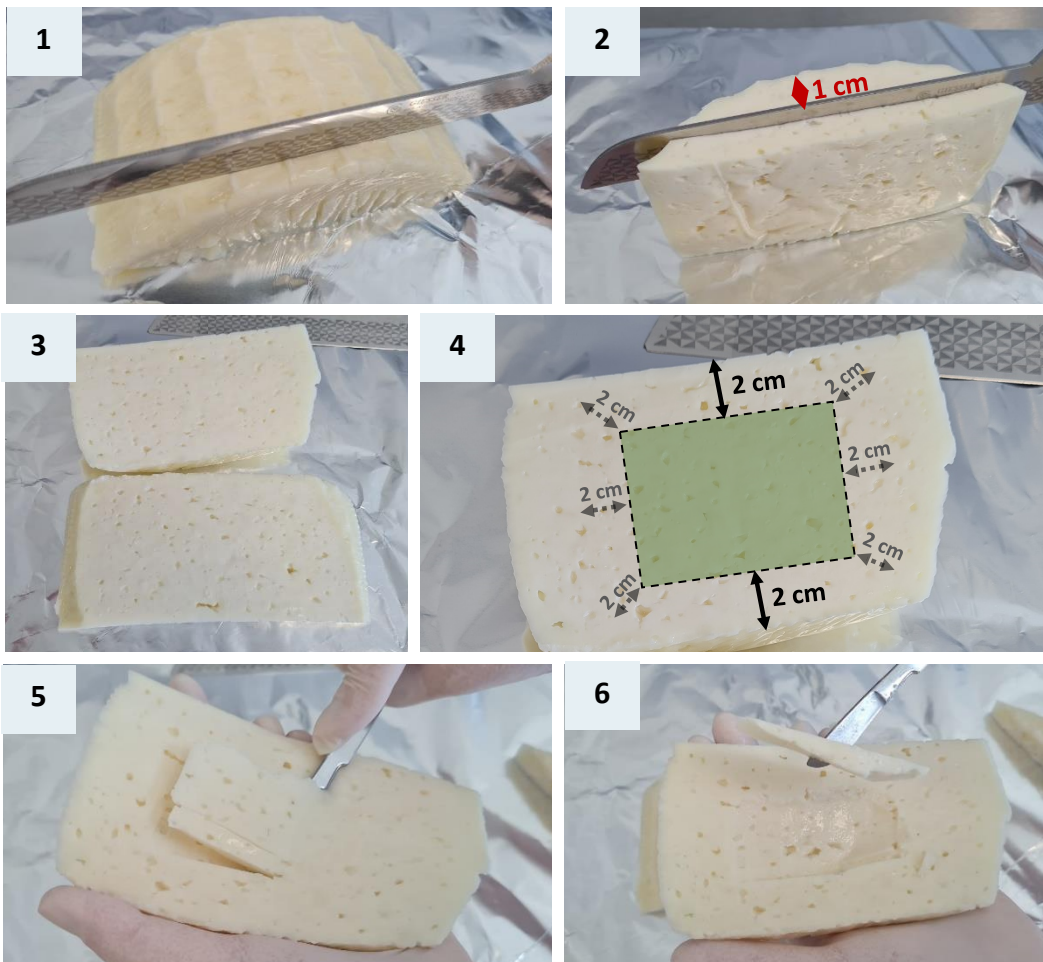
Abbildung 1 Probenahme im Anschluss an die Formgebung (mit oder ohne Pressen), vor oder nach dem Salzbad



(1) Schnitt 3 cm vom Rand, dafür Handschuhe, sauberes Messer und saubere Unterlage verwenden, (2) Probe, (3) Probe sauber und bevorzugt vakuumverpacken und (4) sofort auf 4°C abkühlen und gekühlt ins Labor transportieren/versenden; © HBLFA Tirol

Um die Untersuchung der Käse innerhalb von 24 Stunden nach der Probenahme sicherzustellen, erfolgte die Entnahme der Prüfmenge (Abbildung 2) sowie die anschließende Keimzahlbestimmung direkt in den jeweiligen Laboratorien der für die Probensammlung zuständigen Institute. Das übrige Teilstück der Probe wurde vakuumverpackt und für die Enterotoxinanalyse vorübergehend bei $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefroren und gelagert.

Abbildung 2 Entnahme der Prüfmenge



(1) aseptischer Schnitt zur Entfernung der plattseitigen Oberfläche, (2) aseptischer Schnitt im 1 cm-Abstand von der Innenseite, (3) Außen- und Innenstück der Probe, (4) Außenstück der Probe mit Markierung der Entnahmestelle, (5) - (6) aseptische Entnahme der Prüfmenge (10 g) im Abstand von 2 cm zur Außenseite; © HBLFA Tirol

Österreich (AT)

Nach ausführlicher Information über das Projekt seitens der Landwirtschaftskammern Vorarlberg, Kärnten, Salzburg und der Steiermark sowie der Agrarmarketing Tirol GmbH erklärten sich in den jeweiligen Zuständigkeitsgebieten insgesamt 32 Almen zur Teilnahme bereit. Dabei erfolgte die Sammlung von 19 Hartkäsen aus Vorarlberg, 12 Schnittkäsen aus Tirol und einem Schnittkäse aus Kärnten. Eine gezielte Auswahl von Almen aufgrund vorhergehender Untersuchungsergebnisse erfolgte nicht.

Schweiz (CH)

Die Sammlung der Käseproben (Schnittkäse: 23 Alpkäse halbhart, 8 Formaggio d'alpe ticinese AOP, 5 Mutschli/Tomme du Valais, 4 Formagella, 4 Raclette d'alpage, 3 Vacherin Fribourgeois alpage AOP; Frischkäse: 5 Büscion/Büscion di Capra/Tomino di Capra) erfolgte durch den Projektinitiator und übergeordneten Projektleiter Agroscope in den Kantonen Bern, Freiburg, Glarus, Graubünden, Nidwalden, Obwalden, Schwyz, Tessin, Uri, Wallis.

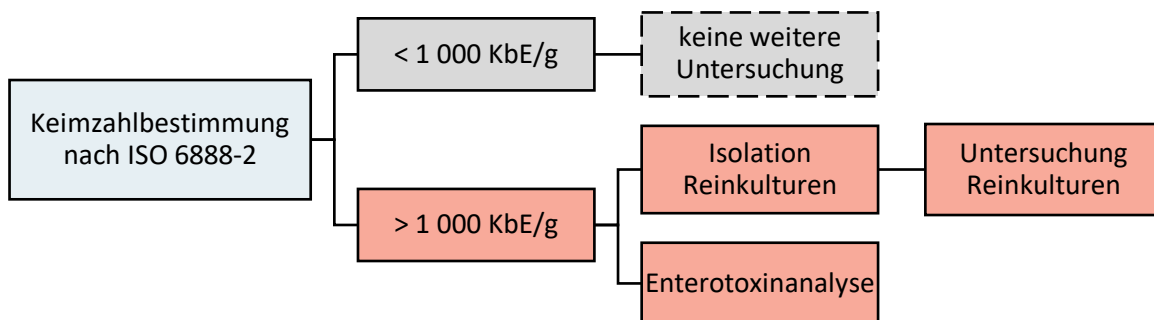
Italien (I)

Die Sammlung der Käseproben (Schnittkäse: 13 Formagella, 10 Toma, 7 Minadur) erfolgte in den Tälern Val Brembana (Provinz Bergamo), Valcamonica (Provinz Brescia) sowie in der Provinz Verbano-Cusio-Ossola durch die italienischen Kooperationspartner.

3.2 Keimzahlbestimmung

Die Bestimmung der Keimzahl Koagulase-positiver Staphylokokken erfolgte nach ISO 6888-2 auf Baird Parker Rabbit-Plasma-Fibrinogen (RPF-)Agar (bioMérieux, Frankreich) im Plattenguss- oder alternativ im validierten Oberflächenausstrichverfahren. Ab einer Keimzahl von über 1 000 KbE Koagulase-positive Staphylokokken/g wurden Reinkulturen isoliert und genotypisiert sowie der Käse auf Enterotoxine untersucht (Abbildung 3).

Abbildung 3 Schematische Darstellung zur Vorgehensweise im Rahmen des Projektes



3.3 Isolation und Genotypisierung, Enterotoxinanalyse

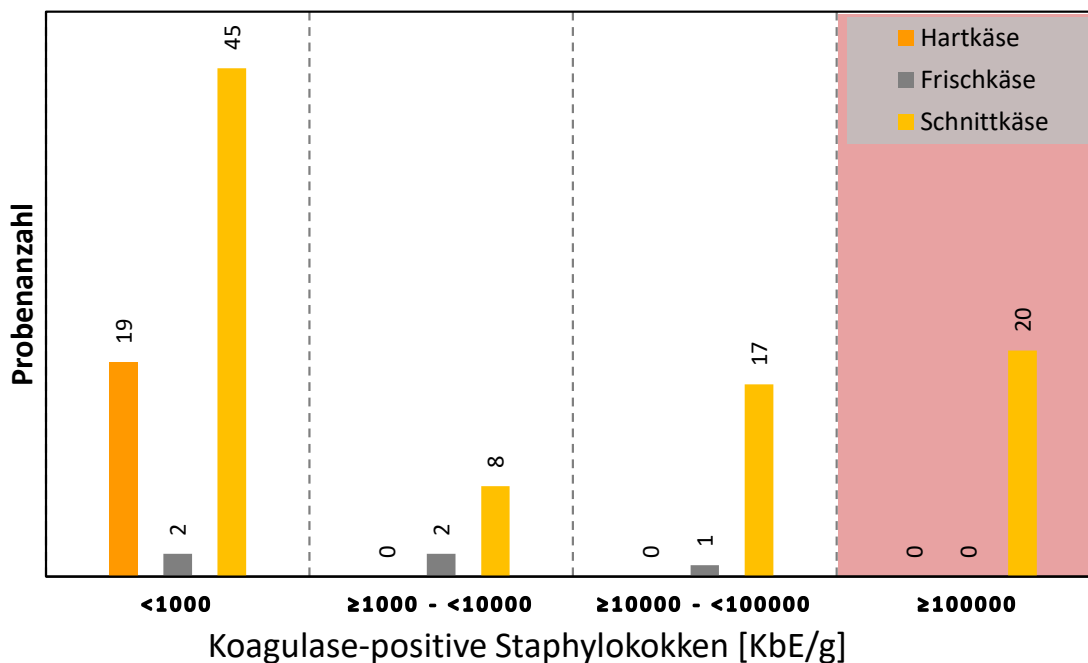
Pro Probe mit Keimzahlen > 1 000 KbE Koagulase-positive Staphylokokken/g wurden 5 Kolonien mit möglichst unterschiedlicher Morphologie in Reinkultur isoliert und diese in Microbank-Röhrchen (Pro-Lab Diagnostics, Kanada) nach Herstellerangaben bei - 40°C eingefroren und bis zur weiteren Untersuchung gelagert. Zur Sicherstellung der Isolation von *S. aureus* und dem Ausschluss etwaiger anderer Staphylokokken, wurden die Reinkulturen mittels MALDI-TOF-Analyse bestätigt. Die Genotypisierung erfolgte nach Fournier et al. (2008) durch Ribosomal Spacer PCR der 16S-23S rRNA Spacer-DNA (Graber, 2016). Die Enterotoxinanalyse wurde unter Anwendung des VIDAS® SET2 (bioMérieux, Frankreich) nach ISO 19020:2017 durchgeführt.

4 Ergebnisse und Diskussion

4.1 Koagulase-positive Staphylokokken in Almkäsen aus Rohmilch

In Abbildung 4 sind die Keimzahlen Koagulase-positiver Staphylokokken aller untersuchten Käse dargestellt. Insgesamt lagen 48 Käse über 1000 KbE Koagulase-positiver Staphylokokken/g, die somit der weiteren Untersuchung (Isolatuntersuchung, Enterotoxinnachweis) unterzogen wurden. Im Folgenden sind Details zu den Ergebnissen nach unterschiedlichen Käsetypen und der jeweiligen Herkunft dargestellt.

Abbildung 4 Übersicht untersuchter Rohmilchkäse (Frisch-, Schnitt-, Hartkäse) und Bereiche der Keimzahlen Koagulase-positiver Staphylokokken



Untersuchungszeitraum Juni bis Juli 2021, Hartkäse (n = 19), Frischkäse (n = 5), Schnittkäse (n = 90) aus Rohmilch aus Österreich, Italien und der Schweiz.

Hartkäse

In den untersuchten Hartkäsen aus Rohmilch (n = 19; ausschließlich Käse aus Österreich/Vorarlberg) lag die Keimzahl Koagulase-positiver Staphylokokken stets < 1 000 KbE/g

(siehe Abbildung 4). Durch das Brennen, ein Erhitzen des Käsebruches auf 50 bis 52 °C (Angabe in den Erhebungsbögen) zum Molkeentzug für die Herstellung von Hartkäse, wird auch das hygienische Risiko dieses Käsetypes drastisch reduziert. Dieser Schritt fehlt bei der Herstellung von Frischkäse und Schnittkäse, weshalb der Vermehrung in der Rohmilch vorhandener Koagulase-positiver Staphylokokken bis zum Ende des Herstellungsprozesses nur die Säuerung maßgeblich entgegenwirkt.

Frischkäse

Von den untersuchten Frischkäsen (n = 5; ausschließlich Käse aus der Schweiz/Tessin) überschritt eine Probe den Grenzwert m.

Schnittkäse

Von den untersuchten Schnittkäsen (n = 90) überschritten 50 % den Wert von 1 000 KbE/g und wurden im Rahmen des Projektes weiteruntersucht. Die Untersuchungsergebnisse sowie die Herkunft der jeweiligen Schnittkäseproben sind Tabelle 2 zu entnehmen. 17 Schnittkäse überschritten den Grenzwert m, 20 Schnittkäse den Grenzwert M der Verordnung (EG) Nr. 2073/2005 über mikrobiologische Kriterien für Lebensmittel.

Tabelle 2 Koagulase-positiver Staphylokokken in den untersuchten Schnittkäsen nach Ländern

| Koagulase-positiv Staphylokokken KbE/g | Anteil an untersuchten Schnittkäsen (%) | Anzahl AT | Anzahl CH | Anzahl I |
|---|--|-----------|-----------|----------|
| < 10 ³ | 45 (50) | 8 | 27 | 10 |
| 10 ³ -10 ⁴ | 8 (9) | 2 | 4 | 2 |
| > m | 17 (19) | 1 | 12 | 4 |
| > M | 20 (22) | 2 | 4 | 14 |

m = 10 000 KbE/g, M = 100 000 KbE/g lt. VO (EG) Nr. 2073/2005 über mikrobiologische Kriterien für Lebensmittel

Somit wurden in 40 % der untersuchten Frischkäse und Schnittkäse Überschreitungen der gesetzlich festgelegten Grenzwerte (m, M) hinsichtlich Koagulase-positiver Staphylokokken festgestellt. Da es sich jedoch um Einzelwerte handelt, ist eine Beurteilung, ob die Proben zwischen m und M der Verordnung (EG) 2073/2005 entsprechen, nicht möglich. Das Ergebnis gilt als akzeptabel, wenn von 5 gezogenen Proben maximal 2 Proben den Wert von m = 10.000 KBE/g überschreiten und bei keiner der 5 Proben der Wert von M = 100.000 KBE/g überschritten wird.

4.2 Enterotoxinanalyse

Insgesamt wurden 48 Käse (siehe Kapitel 4.1.) auf Staphylokokken-Enterotoxine untersucht. In je einem Schnittkäse aus Österreich und Italien waren Staphylokokken-Enterotoxine nachweisbar (Tabelle 3). Diese wiesen eine Keimzahl über 100 000 KbE Koagulase-positive Staphylokokken/g auf. Aus beiden Proben wurde *S. aureus* GTB isoliert. Die gesetzlich vorgeschriebene Vorgehensweise bei positivem Staphylokokken-Enterotoxinnachweis wurde eingehalten. In den untersuchten Schweizer Käsen konnten keine Staphylokokken-Enterotoxine nachgewiesen werden.

4.3 Isolatuntersuchungen

Zu den 48 untersuchten Käsen mit Keimzahlen von jeweils > 1 000 KbE Koagulase-positive Staphylokokken/g (siehe Kapitel 4.1.) liegen Isolatuntersuchungen vor. In 3 von 5 Schnittkäsen aus Österreich sowie 10 von 20 Schnittkäsen aus Italien wurde *S. aureus* GTB festgestellt (Tabelle 3). Im Vergleich dazu wurde *S. aureus* GTB nur in 5 von 23 der Schweizer Käseproben nachgewiesen. Dieser deutliche niedrigere Anteil des *S. aureus* GTB in der Schweiz ist sehr wahrscheinlich auf ein Sanierungsprojekt im Kanton Tessin in den Jahren 2017-2020 (Graber, 2019) zurückzuführen, welches zielgerichtet in allen am Sanierungsprojekt teilnehmenden Betrieben eine vollständige Entfernung dieses Genotyps anstrebte und darüber hinaus eine generelle Sensibilisierung der Mitwirkenden bezüglich dieser Thematik bewirkte. Die fünf *S. aureus* GTB-positiven Schweizer Käseproben wurden auf Almen hergestellt, die nicht am Sanierungsprojekt teilnahmen.

Tabelle 3 Nachweis von Staphylokokken-Enterotoxinen in *S. aureus* GTB-positiven Schnittkäseproben nach Ländern (AT, CH, I)

| Land | Koagulase-positive Staphylokokken [KbE/g] | Staphylokokken-Enterotoxine (SEA-SEE) |
|------|---|---------------------------------------|
| AT | 1700 | - |
| | 2600 | - |
| | 270000 | + |
| CH | 19000 | - |
| | 29000 | - |
| | 39000 | - |
| | 120000 | - |
| | 260000 | - |
| I | 7100 | - |
| | 17000 | - |
| | 26000 | - |
| | 47000 | - |
| | 148000 | - |
| | 167000 | - |
| | 210000 | - |
| | 230000 | - |
| | >300000 | - |
| | >300000 | + |

4.4 Ursachenfindung für erhöhte Keimzahlen in Schnittkäsen von österreichischen Almen

Aus den Erhebungsbögen zu den Käsen aus Österreich können insbesondere zwei bereits bekannte Faktoren abgeleitet werden, die in den Schnittkäsen aus Rohmilch erhöhte Keimzahlen von Koagulase-positiven Staphylokokken direkt begünstigten:

- Unzureichende Kontrollen der Eutergesundheit:** Nicht regelmäßige Durchführung von Schalmtests und/oder Zellzahlbestimmungen der Einzeltiere oder Untersuchungen nur bei vorliegendem Verdacht einer Erkrankung. Dieses unzureichende Vorgehen birgt das Risiko, subklinische Mastitiden nicht zu erfassen. Somit können sehr hohe Keimzahlen an Koagulase-positiven Staphylokokken in der Rohmilch entstehen, die erst bei Untersuchung des Käses - und somit zu spät - festgestellt werden.

- **Säuerungsverzögerungen:**

Bei der Verarbeitung von Rohmilch ist beim Auftreten von Säuerungsverzögerungen mit einer sehr starken Vermehrung Koagulase-positiver Staphylokokken und auch mit Toxinbildung im Käse zu rechnen. Der pH-Wert 2 Stunden nach Abfüllung ist ein kritischer Kontrollpunkt, um auf die Säuerungsgeschwindigkeit der Kultur rückschließen zu können.

Bei der Herstellung der Schnittkäse aus Rohmilch mit Keimzahlen über dem Wert von 1 000 KbE Koagulase-positive Staphylokokken/g wurden übliche Nachwärmtemperaturen des Käsebruchs von maximal $37 \pm 0,9$ °C erreicht. Der pH-Wert 2 Stunden nach Abfüllung des Käsebruchs lag bei 4 der insgesamt 5 Proben mit Keimzahlen von $> 1\ 000$ KbE Koagulase-positive Staphylokokken/g (siehe Tabelle 2) bei $\text{pH } 5,67 \pm 0,27$ und entspricht somit der Vorgabe der Leitlinie für eine gute Hygienepraxis und die Anwendung der Grundsätze des HACCP für bäuerliche Milchverarbeitungsbetriebe 2005 von unter pH 6,0 für Schnittkäse aus Rohmilch. Da bei der Käsung optimale Bedingungen für die Vermehrung der meisten Mikroorganismen, auch von Schadkeimen und Krankheitserregern, vorliegen und bei Rohmilchkäsen keine Keimreduktion durch thermische Einwirkung erfolgt, ist eine schnelle Säuerung maßgeblich für die hygienische Sicherheit von Schnittkäsen aus Rohmilch. Ein Käse wies einen sehr hohen pH-Wert von 6,52 auf (Soll: pH 6,0 siehe oben). Dies lässt nach Rücksprache mit dem Hersteller auf Säuerungsstörungen bedingt durch den Einsatz einer nicht ausreichend aktiven Betriebskultur schließen und erwies sich in Kombination mit einem zu diesem Zeitpunkt ebenso nicht beherrschtem Mastitis-Auftreten als maßgeblich für besonders hohe Keimzahlen von $> 100\ 000$ KbE Koagulase-positive Staphylokokken/g sowie der nachgewiesenen Toxinproduktion in diesem Rohmilchschnittkäse (siehe 4.2 Enterotoxinanalyse, Tabelle 3). Die betroffene Alm nahm zu diesem Zeitpunkt an einem Projekt zur fachlichen Begleitung bei der Milchverarbeitung auf Almen teil, im Rahmen dessen unverzüglich und vor Ort mit Hilfe eines Almberaters diesbezügliche Lösungsansätze erarbeitet und umgesetzt wurden. Die gesetzlich vorgeschriebene Vorgehensweise bei dem entsprechenden Befund wurde eingehalten. Der Käse ist nicht in Verkehr gelangt.

4.5 Notwendige Maßnahmen bei der Herstellung von Rohmilchkäsen, insbesondere auf Almen

Auf Basis der Projektdaten sowie in der Literatur angeführter Maßnahmen ergeht zur Beherrschung von Risikofaktoren für erhöhte Gehalte an Koagulase-positiven Staphylokokken in Rohmilchkäsen folgende Empfehlung:

Für die Herstellung von Schnittkäse, Weichkäse und Frischkäse aus Rohmilch kann nur ausgewählte Rohmilch eingesetzt werden. Kuhmilch mit Zellzahlen von > 200 000/ml soll nicht zu Rohmilchkäse, insbesondere Frisch-, Weich- und Schnittkäse verarbeitet werden. Die Verarbeitung von Mastitismilch (bei einer Infektion mit Koagulase-positiven Staphylokokken werden diese, häufig schwankend, zu ca. 10 000 Keime/ml direkt mit der Milch ausgeschieden) stellt die Hauptursache von Grenzwertüberschreitungen in Käse aus Rohmilch dar. Deshalb ist es unerlässlich, konsequent und zielgerichtet geeignete Maßnahmen zur Mastitisbekämpfung zu ergreifen, die auch dann angewendet werden, wenn kein konkreter Verdacht besteht (Fehlings und Baumgartner, 2016; Matschweiger, 2022; Empfehlungen HBLFA Tirol – Abteilung Mikrobiologie und Hygiene):

- **Melktechnik und Melkhygiene**
 - **erfahrenes Melkpersonal und Verwendung einer ordnungsgemäß gewarteten, regelmäßig kontrollierten Melkanlage** (insbesondere Kontrolle und Wechsel von Sitzgummis und Dichtungen)
 - **Melkreihenfolge:** gesunde vor verdächtigen vor erkrankten/in Behandlung stehenden Tieren (euterkrankte Tiere kennzeichnen)
 - **gegebenenfalls Melkzeugzwischenreinigung und -desinfektion**
 - **Euter reinigen, Zitzen vorreinigen und pflegen** (desinfizierendes/pflegendes Zitzentauchen nach dem Melken)
 - **Vormelken** in den Vormelkbecher, um als einfachen und effektiven täglichen Kontrollschritt Farbveränderungen oder ein Ausflocken rasch erkennen zu können und der Übertragung von Tier zu Tier bei der Melkung vorzubeugen

- **Striktes Eutergesundheitsmanagement**
 - **mindestens 14-tägige Durchführung des Schalmtests** (auch bei unauffälligen Tieren) und/oder
 - **regelmäßige Zellzahlbestimmungen bei den einzelnen Tieren (Einzelgemelksprobe auch unauffälliger Tiere):** Die Zellzahlbestimmung der Tank-/Kesselmilch hat aufgrund des Verdünnungseffektes nur bedingte Aussagekraft.

- Die **lückenlose Dokumentation aller erhobenen Gesundheitsdaten** (inkl. Schalmtests, Zellzahlbestimmungen) und der ergriffenen Maßnahmen ist unverzichtbar für die Chargenbildung, die im Fall maßgeblicher Grenzwertüberschreitungen erforderlich sein kann um das Problem entsprechend eingrenzen zu können.

- **Erhebung des Gesundheitsstatus der Milchtiere vor Auftrieb auf die Alm:** Kranke/verdächtige Tiere sollten nicht aufgetrieben werden.

- **Personal- und Herstellungshygiene:**

Auch alle üblicherweise angewandten Maßnahmen zur Personal- und Herstellungshygiene sind unverzichtbar, da das Personal als asymptomatischer Träger (auf Haut, im Nasen-Rachen-Raum) oder durch schlecht versorgte Wunden bei Kontakt mit Rohstoff/Zwischenprodukt/Endprodukt oder Gerätschaften einen Eintrag von *S. aureus* bewirken kann. Bei nicht ausreichender Reinigung sowie Reinigbarkeit der Flächen, Geräte und Hilfsmittel können diese Keime auch indirekt über das Käseumfeld eingetragen werden. Die **regelmäßige Teilnahme an einschlägigen Hygieneschulungen**, wie in der Leitlinie für eine gute Hygienepraxis und die Anwendung der Grundsätze des HACCP bei der Milchverarbeitung auf Almen 2005 gefordert, ist unabdingbar.

- **Verwendung aktiver Säuerungskulturen:**

Betriebskulturen sollen maximal 2 Tage alt sein und Direktstarter sollen nach Herstellervorgaben voraktiviert werden. Maßnahmen zur Vorbeugung eines Phagenbefalls sind zu ergreifen.

- **Überprüfung und Dokumentation der Säuerungsgeschwindigkeit jeder hergestellten Charge!**

Der **pH-Wert 2 Stunden nach der Abfüllung** stellt als Maß für die Säuerungsgeschwindigkeit/-aktivität **insbesondere bei der Herstellung von Käsen aus Rohmilch** einen **kritischen Kontrollpunkt** (laut HACCP) dar. Viele unerwünschte Mikroorganismen, die in der Milch enthalten sein können, werden in ihrem Wachstum durch niedrige pH-Werte gehemmt, deshalb stellt die rasche Säuerung einen maßgeblichen Einflussfaktor auf die hygienische Sicherheit dieser Produkte dar. Nur die Kontrolle des pH-Wertes 2 Stunden nach der Abfüllung und entsprechende Dokumentation im Produktionsbericht von jeder hergestellten Charge gibt Auskunft über die tatsächlichen Säuerungsverhältnisse der jeweiligen Produktion. Die Kontrolle des pH-Wertes ist lt. der Leitlinie für eine gute Hygienepraxis und die Anwendung der Grundsätze des HACCP bei der Milchverarbeitung auf Almen 2005 vorgesehen.

Bei Nichtentsprechung sind Maßnahmen laut HACCP-Plan umzusetzen.

Gegebenenfalls müssen die entsprechenden Käse entsorgt werden.

- **Untersuchung der Käse nach VO (EG) Nr. 2073/2005 über mikrobiologische Kriterien für Lebensmittel zum Zeitpunkt während der Herstellung, zu dem der höchste Staphylokokkengehalt erwartet wird**

Viele Almen (aber auch Talbetriebe) reichen im Rahmen der betrieblichen Eigenkontrolle erst den gereiften Käse zur Untersuchung ein. Dies entspricht in Bezug

auf das Prozesshygienekriterium Koagulase-positive Staphylokokken nicht dem laut VO (EG) Nr. 2073/2005 vorgegebenen „Zeitpunkt während der Herstellung, zu dem der höchste Staphylokokkengehalt erwartet wird“. In der Leitlinie über mikrobiologische Kriterien für Milch und Milchprodukte 2015 wird der Untersuchungszeitpunkt für Schnittkäse und Hartkäse vor Reifung präzisiert: „üblicherweise vor Reifung“ (Darlegung siehe auch Kapitel 1 „Prozesshygienekriterium“). Zwar sind zur Beurteilung der Untersuchung gereifter Käse in der Leitlinie angepasste (aufgrund der Abnahme der Keime während der Reifung geringere) Grenzwerte angegeben. Die Untersuchung der „grünen“ Käse (Käse vor Reifung, Käse vor/nach Salzbad) zu Beginn der Alpperiode auf die Prozesshygienekriterien Koagulase-positive Staphylokokken und *E. coli* wird aber dringend empfohlen. Da eine Untersuchung der Rohmilch auf Koagulase-positive Staphylokokken nicht vorgesehen ist, wird üblicherweise ausschließlich durch die Untersuchung der „grünen“ Käse zeitnah festgestellt, wenn Handlungsbedarf besteht. Untersuchungen der gereiften Käse gegen Ende der Alpperiode (kurz bevor diese ausgegeben werden), bergen nach dem auf der Alm über Wochen bis Monate geleisteten hohen Arbeitseinsatz Frustrationspotential, wenn die mikrobiologischen Werte schließlich nicht entsprechen. Auch hohe finanzielle Verluste sind möglich. Durch frühzeitige Untersuchungen kann diesen Umständen zeitnah entgegengewirkt werden.

4.6 Nachhaltige Bekämpfungsstrategien *Staphylococcus aureus*

Für nachhaltige Behandlungen und ein angepasstes Herdenmanagement bei Vorliegen einer *S. aureus*-Problematik ist die Genotypisierung erforderlich (Nemati et al., 2023), da die klinischen und epidemiologischen Eigenschaften sowie das natürliche Reservoir im Betrieb vom jeweils vorliegenden Genotyp abhängig sind (Graber und Bodmer, 2019; Darlegung auch siehe Kapitel 1). Wenn bei wiederkehrender Mastitisproblematik *S. aureus* GTB als Auslöser identifiziert wird, wird eine zielgerichtete Sanierung der entsprechenden Betriebe nach dem Vorbild des im Kanton Tessin erfolgreich durchgeführten und nachhaltigen Bekämpfungsprojekt in den Jahren 2017-2020 empfohlen. Die entsprechende Vorgehensweise ist im online freizugänglichen Bericht „Sanierung von *Staphylococcus aureus*-Genotyp-B-infizierten Milchviehherden“ (Graber, 2019) detailliert dargelegt.

5 Zusammenfassung

In der Alpperiode 2021 lagen die Gehalte an Koagulase-positiven Staphylokokken bei einem erheblichen Anteil (40 %) der untersuchten Frischkäse und Schnittkäse aus den Untersuchungsgebieten (AT, CH, I) über den gesetzlich festgelegten Grenzwerten. Im Gegensatz zu Hartkäse, welcher ein diesbezüglich sicheres Produkt darstellt, wird bei der Frisch- und Schnittkäseherstellung kein Brennen des Käsebruches durchgeführt, weshalb außer der Säuerungsaktivität der Vermehrung Koagulase-positiver Staphylokokken nichts maßgeblich entgegenwirkt. Trotz teilweise sehr hoher Keimzahlen von über 100 000 KbE Koagulase-positiver Staphylokokken/g, wurde nur in zwei Käsen Staphylokokken-Enterotoxine nachgewiesen. Sowohl in Österreich als auch Italien ist *S. aureus* Genotyp B stark vertreten. Da es sich dabei um eine höchst ansteckende Variante von *S. aureus* handelt, sind Maßnahmen zur Mastitisvorbeugung bzw. -behandlung dringend zu ergreifen. Eine erhöhte Sensibilisierung insbesondere von milchverarbeitendem Personal auf Almen ist essentiell um Ansteckungen während der Alpperiode von Tieren unterschiedlicher Talbetriebe effektiv vorzubeugen.

Die Ergebnisse der multifaktoriellen statistischen Auswertung unter Miteinbeziehung aller erhobenen Daten (inklusive der Daten über den Herstellungsprozess) werden nach Veröffentlichung der in Vorbereitung befindlichen wissenschaftlichen Publikation vollständig verfügbar sein.

6 Kommunikation

Nach Abschluss der Untersuchungen an der HBLFA Tirol wurde den teilnehmenden Almen ein entsprechender Prüfbericht mit Lebensmittelgutachten zugestellt.

Im Rahmen des Almsennertreffens (Organisation durch Agrarmarketing Tirol) am 28.04.2022 an der HBLFA Tirol, wurden die auf österreichische Proben bezogenen Ergebnisse des Projektes vor dem Hintergrund der Staphylokokken-Thematik vorgestellt und eingehend besprochen.

Eine Vorstellung der in diesem Bericht dargelegten Ergebnisse erfolgte bei der Österreichischen Milchwirtschaftlichen Tagung am 15.09.2023 an der HBLFA Tirol.

Nach erfolgter wissenschaftlicher Publikation werden die Projektteilnehmer schriftlich über die Gesamtergebnisse des Projektes informiert.

Für Kunden der HBLFA Tirol, deren Käse erhöhte Keimzahlen an Koagulase-positiven Staphylokokken aufweisen, wird dem Prüfbericht das „Merkblatt Staphylokokken in Käse“ (siehe Anlage 2) beigelegt.

Literaturverzeichnis

Beiblatt 004 Leitlinie „Nicht Sicher“ der AG „Nicht Sicher“ vom 2. Juli 2019

Berchtold B., Bodmer M., van den Borne B.H.P., Reist M., Graber H.U., Steiner A., Boss R., Wohlfender F.: Genotype-specific risk factors for *Staphylococcus aureus* in Swiss dairy herds with an elevated yield-corrected herd somatic cell count. *Journal of Dairy Science* 2014; 97: 4886-4896

Cosandey A., Boss R., Luini M., Artursson K., Bardiau M., Breitenwieser F., Hehenberger E., Lam Th., Mansfeld M., Michel A., Mösslacher G., Naskova J., Nelson S., Podpečan O., Raemy A., Ryan E., Salat O., Zangerl P., Steiner A., Graber H.U.: *Staphylococcus aureus* genotyp B and other genotypes isolated from cow milk in European countries. *Journal of Dairy Science* 2016; 99 (1): 529-540

EFSA and ECDC (European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control): The European Union One Health 2021 Zoonoses Report. *EFSA Journal* 2022; 20(12):7666, 273 pp.

Fehlings K., Baumgartner C.: Eutergesundheit – Maßnahmen zur Bekämpfung der Mastitis. In: Märtlbauer E., Becker H.: *Milchkunde und Milchhygiene*. Stuttgart: Eugen Ulmer KG 2016, 1. Auflage, S. 109-111

Fournier C., Kuhnert P., Frey J., Miserez R., Kirchhofer M., Kaufmann T., Steiner A., Graber H.U.: Bovine *Staphylococcus aureus*: Association of virulence genes, genotypes and clinical outcome. *Research in Veterinary Science* 2008; 85: 439-448

Friedl M.: Hygienische Sicherheit von Hart- und Halbhartkäsen aus Rohmilch oder thermisierter Milch. Inaugural-Dissertation an der Veterinärmedizinischen Universität Wien, 2001

Graber H.U.: Sanierung von *Staphylococcus-aureus*-Genotyp-B-infizierten Milchviehherden. *Agrarforschung Schweiz* 2019; 10(6): 220-227

Graber H.U.: Genotyping of *Staphylococcus aureus* by Ribosomal Spacer PCR (RS-PCR). *Journal of Visualized Experiments* 2016; 117, e54623

Graber H.U., Bodmer M.: Staphylococcus aureus und seine Genotypen als Mastitiserreger der Milchkuh – eine Übersicht. Schweizer Archiv für Tierheilkunde 2019; 161(10): 611-617

GBD 2019 Antimicrobial Resistance Collaborators: Global mortality associated with 33 bacterial pathogens in 2019: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019. The Lancet 2022; 400 (10369), 2221-2248

BMG: Leitlinie für eine gute Hygienepraxis und die Anwendung der Grundsätze des HACCP bei der Milchverarbeitung auf Almen, BMG-75220/0054-IV/B/10/2005 vom 19.12.2005 mit Änderungen/Ergänzungen: BMGFJ-75220/0010-IV/B/7/2007 vom 16.4.2007

BMG: Leitlinie für eine gute Hygienepraxis und die Anwendung der Grundsätze des HACCP für bäuerliche Milchverarbeitungsbetriebe, BMGF-75220/0054-IV/B/10/2005 vom 9.12.2005 mit Änderungen/Ergänzungen: BMGFJ-75220/0010-IV/B/7/2007 vom 16.4.2007, BMG-75220/0035-II/B/7/2009 vom 23.10.2009, BMG-75210/0003-II/B/13/2014 vom 25.2.2014

BMG: Leitlinie über mikrobiologische Kriterien für Milch und Milchprodukte, BMG-75210/0029-II/B/13/2015 vom 7.9.2015

Matschweiger C.: Hygiene in der Milchverarbeitung auf der Alm. Broschüre aus der Reihe „Fachunterlagen Almwirtschaft“. Almwirtschaft Österreich, Innsbruck, Ländliches Fortbildungsinstitut Österreich, Wien 2022

Nemati G., Romanó A., Wahl F., Berger T., Rojo L. V., Graber H. U.: Bovine *Staphylococcus aureus*: a European study of contagiousness and antimicrobial resistance. Frontiers in Veterinary Science 2023; 10:1154550.

Verordnung (EG) Nr. 2073/2005 DER KOMMISSION vom 15. November 2005 über mikrobiologische Kriterien für Lebensmittel i.d.g.F.

Abbildungsverzeichnis

| | |
|--|----|
| Abbildung 1 Probenahme im Anschluss an die Formgebung (mit oder ohne Pressen), vor oder nach dem Salzbad..... | 11 |
| Abbildung 2 Entnahme der Prüfmenge | 12 |
| Abbildung 3 Schematische Darstellung zur Vorgehensweise im Rahmen des Projektes | 14 |
| Abbildung 4 Übersicht untersuchter Rohmilchkäse (Frisch-, Schnitt-, Hartkäse) und Bereiche der Keimzahlen Koagulase-positiver Staphylokokken | 15 |

Tabellenverzeichnis

| | |
|---|----|
| Tabelle 1 Projektbeteiligte und Aufgabenbereiche..... | 10 |
| Tabelle 2 Koagulase-positiver Staphylokokken in den untersuchten Schnittkäsen nach Ländern | 16 |
| Tabelle 3 Nachweis von Staphylokokken-Enterotoxinen in <i>S. aureus</i> GTB-positiven Schnittkäseproben nach Ländern (AT, CH, I) | 18 |

Abkürzungen

| | |
|------------------|---|
| GTB, GTC, ... | Genotyp B, Genotyp C, ... |
| HACCP | Gefahrenanalyse und kritische Kontrollpunkte (engl. Hazard Analysis and Critical Control Points): systematischer Ansatz zur Sicherstellung der Lebensmittelsicherheit |
| KbE/g, KbE/ml | Einheit zur Angabe der Keimzahl: Kolonie-bildende Einheiten pro Gramm oder Milliliter Probe |
| <i>S. aureus</i> | <i>Staphylococcus aureus</i> |

Anlage 1

Erhebungsbogen zum Forschungsprojekt

„Verbreitung von *Staphylococcus aureus* in Rohmilchkäsen der alpinen Region“
Untersuchung von Hartkäsen aus Rohmilch vor Reifung von Almkäseereien

Datenschutz: Ihre Kontaktdaten sowie die angegebenen allgemeinen Produktinformationen werden für die Abwicklung der Untersuchung an der HBLFA Tirol – Forschung und Service benötigt und unterliegen wie alle Untersuchungsdaten der Vertraulichkeit. Alle sonstigen Angaben werden im Rahmen des Projekts anonymisiert verarbeitet.

| | |
|-------------------------------|--|
| Betrieb/Alm (Produktionsort) | |
| Name, Vorname: | |
| Anschrift (Straße, PLZ, Ort): | |
| (Mobil-)Telefonnummer: | |
| E-Mail Adresse: | |
| Produktbezeichnung: | |
| Produktionsdatum/Charge: | |

Wichtig: Für die Auswertung der Untersuchungen des Projekts sind Ihre Angaben von größter Bedeutung. Wir bitten Sie daher, diese möglichst präzise zu gestalten und gegebenenfalls um Anmerkungen zu ergänzen.

| | |
|---|---|
| Anzahl der Melktiere und Höfe (Herkunft): _____ Tiere von _____ Höfen | |
| Melktechnik | <input type="checkbox"/> händisch <input type="checkbox"/> maschinell |
| Wie erfolgt das Eutergesundheitsmanagement (bitte geben Sie den Zeitpunkt sowie die Häufigkeit der Maßnahmen an)? | <input type="checkbox"/> Schalmtest - _____ |
| | <input type="checkbox"/> Zellzahl Einzeltier - _____ |
| | <input type="checkbox"/> Zellzahl Verarbeitungsmilch - _____ |
| | Sonstiges: _____ |

| | |
|---|---|
| Angaben zur Rohmilch | |
| Milchtyp | <input type="checkbox"/> Kuhmilch <input type="checkbox"/> Schafmilch <input type="checkbox"/> Ziegenmilch |
| Behandlung der Rohmilch | <input type="checkbox"/> keine Behandlung <input type="checkbox"/> Wärmebehandlung: Temperatur _____ °C, Dauer _____ <input type="checkbox"/> Zentrifugation/Entrahmung <input type="checkbox"/> Sonstige (bitte ausführen): _____ |
| Abendmilch Lagerungstemperatur _____ °C Lagerungsdauer _____ Stunden Vorreifung (Kulturrezugabe) <input type="checkbox"/> ja <input type="checkbox"/> nein wenn ja, welche Kultur? (bitte ausführen): _____ | |
| Morgenmilch Lagerungstemperatur _____ °C Lagerungsdauer _____ Stunden | <input type="checkbox"/> unmittelbare Verarbeitung ohne Kühlung |
| Sonstige Anmerkungen: | _____ |

| Angabe zum Herstellungsprozess - Hartkäse | |
|---|---|
| Dauer des Anwärmens der Milch | _____ °C |
| Temperatur bei Kulturenzugabe | _____ °C |
| Welche Kultur(en) wird/werden zugegeben? | |
| Kultur 1 (Bezeichnung): _____ | Kultur 2 (Bezeichnung): _____ |
| <input type="checkbox"/> mesophil <input type="checkbox"/> thermophil | <input type="checkbox"/> mesophil <input type="checkbox"/> thermophil |
| <input type="checkbox"/> Betriebskultur | <input type="checkbox"/> Betriebskultur |
| <input type="checkbox"/> Direktstarter: Aktivierung <input type="checkbox"/> ja <input type="checkbox"/> nein wenn ja: Zeit _____, Temp. _____ °C | <input type="checkbox"/> Direktstarter: Aktivierung <input type="checkbox"/> ja <input type="checkbox"/> nein wenn ja: Zeit _____, Temp. _____ °C |
| <input type="checkbox"/> Sonstige: | <input type="checkbox"/> Sonstige: |
| Weitere Informationen zu den verwendeten Kulturen: _____ | |
| Vorreifung | |
| Vorreifungsdauer | _____ Minuten |
| Vorreifungstemperatur | _____ °C |
| Dicklegen der Milch | |
| Zeit | _____ Minuten |
| Temperatur | _____ °C |
| Bruchschneiden | |
| Temperatur | _____ °C |
| Vorkäsen | |
| Dauer | _____ Minuten |
| Temperatur | _____ °C |
| Zeit bis zum Erreichen der Brenntemperatur | _____ Minuten |
| Bruchwaschen | <input type="checkbox"/> ja <input type="checkbox"/> nein wenn ja, Menge: _____ %, Temp.: _____ °C |
| Brennen | |
| Brenndauer | _____ Minuten |
| Brenntemperatur | _____ °C |
| Nachkäsen | |
| Dauer | _____ Minuten |
| Temperatur | _____ °C |
| Pressen | |
| Dauer | _____ Stunden |
| Temperatur | _____ °C |
| pH-Wert 2 Stunden nach Abfüllung | pH _____ |
| Probenahme vor dem Einbringen in das Salzbad | |
| Datum und Uhrzeit der Probenahme: | am _____ um _____ |
| geplante Reifezeit und Reifetemperatur dieser Produktion | _____ °C bzw. von _____ bis _____ °C |

Datum/Ort

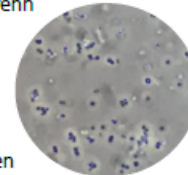
Unterschrift

Anlage 2

Merkblatt Staphylokokken in Käse

Was sind Staphylokokken und welche Bedeutung haben sie?

Staphylokokken sind kugelförmige Bakterien. Von großer Bedeutung sind die sogenannten Koagulase-positiven Staphylokokken, deren bedeutendster Vertreter *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) ist. *S. aureus* ist einer der häufigsten Erreger von Euterentzündungen bei Kühen, Ziegen und Schafen. Lebensmittelhygienisch bedeutsam ist die Eigenschaft bestimmter *S. aureus*-Stämme in Lebensmitteln Gifte (Toxine) zu bilden, wenn Keimzahlen von mehr als ca. 100 000 pro Gramm erreicht werden. Diese Staphylokokken-Enterotoxine können nach kurzer Zeit Übelkeit, heftiges Erbrechen, Bauchschmerzen und Durchfall verursachen. Staphylokokken-Lebensmittelvergiftungen gehören zu den häufigsten lebensmittelbedingten Erkrankungen. Während diese Bakterien selbst hitzeempfindlich sind, werden bereits gebildete Gifte auch durch eine Erhitzung auf über 100°C nicht zerstört. Manche *S. aureus* (Genotyp B, GTB) sind hochansteckend und bewirken meist Euterinfektionen von zwei oder mehr Eutervierteln. Dadurch sind oft alle Tiere einer Herde betroffen, so dass strikte vorbeugende Maßnahmen seitens des Melkpersonals und des milchverarbeitenden Personals zwingend erforderlich sind.



S. aureus

Wie kommen Staphylokokken in den Käse?

Quelle Tier: *S. aureus* kommt auf der Euterhaut und im Kot vor. Die Rohmilch enthält diesen Keim daher üblicherweise in sehr geringen Zahlen (unter 10 Keime pro Milliliter). Beim Vorliegen einer Euterentzündung jedoch werden die Keime über das Euter in stark schwankenden Zahlen in die Milch ausgeschieden. Die rohe Kesselmilch kann in diesem Fall mehrere Hundert bis mehrere Tausend Staphylokokken pro Milliliter enthalten.

Quelle Mensch: *S. aureus* wird häufig über eiternde Wunden auf Lebensmittel übertragen. Aber auch gesunde Menschen können Überträger sein, da sich *S. aureus* im Nasen-Rachen-Raum, im Darm, auf den Haaren usw. befinden kann. Daher sind richtiges Händewaschen, die Vermeidung von Produktkontakt, richtiges Niesverhalten, Tragen einer Kopfbedeckung, sichere Abdeckung von Wunden und gegebenenfalls Beschäftigungsverbote notwendig.

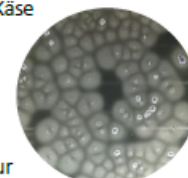
Quelle Umgebung: Ausgehend von menschlichen oder tierischen Quellen findet sich der Keim auch auf Hand- und Geschirrtüchern, Kleidern sowie auf ungenügend gereinigten Geräten und Anlagen. Eine Übertragung wird durch ordnungsgemäße Reinigung und Desinfektion verhindert.

Welche rechtlichen Anforderungen an Käse gibt es?

Laut Verordnung (EG) Nr. 2073/2005 über mikrobiologische Kriterien für Lebensmittel muss Käse aus Rohmilch unter 10.000 Koagulase-positiven Staphylokokken pro Gramm aufweisen und darf 100.000 pro Gramm keinesfalls überschreiten. Die Grenzwerte gelten zu einem Zeitpunkt während der Herstellung, zu dem der höchste Staphylokokkengehalt erwartet wird (bei Schnitt- und Hartkäse üblicherweise vor der Reifung, bei Weichkäse am Ende der Reifung).

Bei einem Staphylokokkengehalt von mehr als 10.000 pro Gramm müssen Maßnahmen zur Verbesserung der Herstellungshygiene und bei der Auswahl der Rohstoffe (Überprüfung der Maßnahmen zu Eutergesundheit und zu Personalhygiene, Säuerungskontrolle) gesetzt werden.

Bei einem Staphylokokkengehalt von mehr als 100.000 pro Gramm ist gemäß Verordnung (EG) Nr. 2073/2005 das Lebensmittelsicherheitskriterium „Staphylokokken-Enterotoxine nicht nachweisbar in 25 g“ einzuhalten.



Koagulase-positiv
Staphylokokken

Wie verhalten sich Staphylokokken während Käsung und Reifung?

Durch Pasteurisierung werden Staphylokokken abgetötet. Die Thermisierung (Wärmebehandlung unterhalb der Pasteurisierungsbedingungen) der Milch führt nicht zu einer vollständigen Abtötung. Thermisierungsbedingungen von 60 °C für 5 Minuten bzw. 65 °C für 15 Sekunden bewirken jedoch eine starke Verminderung der Keimzahlen. Während des Käseprozesses bis zum Salzbad können sich die in der Milch vorhandenen Staphylokokkenzahlen zumindest um das 100-fache erhöhen. Die Vermehrung ist unter anderem abhängig von den Säureverhältnissen (pH-Wert) im Käse.

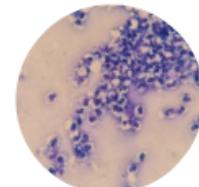
Während der Reifung nimmt bei Schnitt- und Hartkäse der Keimgehalt ab. Bei oberflächengereiftem Weichkäse kann es auch während der Reifung zu einer weiteren Vermehrung kommen, da der pH-Wert ansteigt.

Wann ist mit Giftbildung im Käse zu rechnen?

- **Vorhandensein von giftbildenden Staphylokokken in der Kesselmilch** bei Verarbeitung von Milch euterkranker Tiere. Prinzipiell ist aber auch ein Eintrag der Keime über das Personal oder aus der Umgebung möglich.
- Eine **starke Vermehrung der Keime** bei der Käsung durch eine zu schwache bzw. schleppende Anfangssäuerung (Säuerungsverzögerung).

Wie kann bei der Rohmilchverkäsung die Gefahr zu hoher Staphylokokken-Keimzahlen beherrscht werden?

- **Melktechnik und Melkhygiene:** Verwendung ordnungsgemäß gewarteter, regelmäßig kontrollierter Melkanlagen, erfahrenes Melkpersonal, Melkreihenfolge (gesunde vor verdächtigen/erkrankten Tieren), gegebenenfalls Melkzeugzwischenreinigung und –desinfektion, Euterreinigung und –pflege, Vormelken
- **Kontrollen der Eutergesundheit** auch bei unauffälligen Tieren, **da die Infektion mit *S. aureus* sehr häufig keine Symptome zeigt**
 - Erhebung des Gesundheitsstatus von Milchtieren **vor der Zusammenführung** (z.B. bei Zukauf von Tieren oder vor Auftrieb auf die Alm bei unterschiedlichen Talbetrieben)
 - Mindestens 14-tägige Durchführung des Schalmtests
 - Alternativ ist auch eine Zellzahlbestimmung der Einzelmelke im Labor möglich. Eine gesunde Kuh weist einen Zellgehalt von unter 100.000 Zellen/ml Milch auf. Bei einer Zellzahl von über 200.000/ml im Einzelmelk kann davon ausgegangen werden, dass eine Euterentzündung vorliegt. **Milch von Tieren mit einem Zellgehalt von über 200.000 pro Milliliter soll daher nicht verarbeitet werden.** Die Ergebnisse der Zellgehalte in der Sammelmilch sind für die Herstellung von Rohmilchkäse nicht aussagekräftig.
 - **Ausmerzungen von Tieren** mit chronischen Euterentzündungen
- **Lückenlose Dokumentation** aller erhobenen Gesundheitsdaten und der ergriffenen Maßnahmen
- **Verwendung aktiver Kulturen** (Alter von Betriebskulturen maximal 2 Tage). Bei Direktstartern Voraktivierung nach Herstellerangaben (z.B. 1 Stunde in abgekochter und auf 30 °C abgekühlter Milch).
- **Überprüfung und Dokumentation der Säuerung** von jeder Produktion durch **pH-Messung der Molke mittels pH-Teststreifen 2 Stunden nach dem Abfüllen**
- **Produktuntersuchungen zum richtigen Zeitpunkt: Schnitt- und Hartkäse vor Reifung!** Die Untersuchungen auf die Prozesshygienekriterien Koagulase-positive Staphylokokken und *E. coli* sind bei Schnitt- und Hartkäse vor Reifung durchzuführen. Dieser Untersuchungszeitpunkt ermöglicht zeitnahe Maßnahmen.
- **Regelmäßige Hygieneschulungen für Melkpersonal und milchverarbeitendes Personal**



Zellen in Mastitismilch



Randprobe vor Reifung

Sind Fragen offengeblieben? Bitte setzen Sie sich mit uns in Verbindung:

Dr. Frieda Eliskases-Lechner
HBLFA Tirol - Forschung und Service
Abteilung Mikrobiologie und Hygiene
Tel.: 0043 (0) 5244 622 62 701
E-Mail: frieda.eliskases-lechner@hblfa-tirol.at

Margaretha Buchner, MSc
HBLFA Tirol - Forschung und Service
Abteilung Mikrobiologie und Hygiene
Tel.: 0043 (0) 5244 622 62 702
E-Mail: margaretha.buchner@hblfa-tirol.at

Margaretha Buchner, MSc

**Höhere Bundeslehr- und Forschungsanstalt für Landwirtschaft und Ernährung sowie
Lebensmittel- und Biotechnologie**

Abteilung Mikrobiologie und Hygiene

Rotholz 50, 6200 Strass im Zillertal

hblfa-tirol.at