

Neue Nährböden zum Nachweis von *Escherichia coli* und koagulase-positiven Staphylokokken in Milch und Milchprodukten

P. ZANGERL und M. FRIEDL

Escherichia coli und koagulase-positiv Staphylokokken (im Wesentlichen *Staphylococcus aureus*) spielen eine bedeutende Rolle zur Beurteilung der Guten Hygienepaxis im Lebensmittelbereich. Der Nachweis dieser Keimgruppen erlaubt außerdem eine Abschätzung des potentiellen Gesundheitsrisikos durch pathogene bzw. enterotoxinogene Stämme. Für Milch und Milchprodukte sind in der Milchhygieneverordnung Normen für diese Keimgruppen festgesetzt. Für die Zählung von *E. coli* und *S. aureus* stehen internationale Standardverfahren zur Verfügung. Diese sind jedoch zeit- und arbeitsaufwendig. In diesem Beitrag soll auf Alternativverfahren eingegangen werden, die es erlauben, die Zielkeime zuverlässig und mit geringerem Arbeitsaufwand nachzuweisen.

Escherichia coli und Coliforme

Im Standard des Internationalen Milchwirtschaftsverbandes – IDF Standard 170A:1999 – sind drei Methoden zum Nachweis von *E. coli* vorgesehen:

- 1)MPN-Verfahren bei 45°C
 Probe **à** Laurylsulfat (LST) Bouillon, 37°C, 24-48h **à** Gasbildung **à** EC Bouillon,45°C, 24-48h **à** Gasbildung **à** Tryptonwasser, 45°C, 48h **à** Indolbildung
- 2)MPN-Verfahren mit 4-Methylumbelliferyl-b-D-Glucuronid (MUG)
 Probe **à** mod. LST Bouillon (MUG-LSTB), 30°C, 24-48h **à** Gasbildung, Fluoreszenz bei 360-366 nm, Indolbildung
- 3)Membranfilter-Koloniezählverfahren bei 44°C
 Probe **à** Membranfilter/mod. Mineral-Glutamat Agar, 37°C, 4h **à** Membranfilter/Casein-pepton-Galle Agar, 44°C, 18-24h **à** Indolbildung

Die diagnostischen Systeme sind Gasbildung aus Lactose (Verfahren 1,2), Indolbildung aus Tryptophan (Verfahren 1,2,3) und die Spaltung von MUG durch die b-D-Glucuronidase von *E. coli* (Verfahren 2). Neben *E. coli* wird in der Milchwirtschaft häufig die Gesamtzahl der Coliformen zur Beurteilung des Hygienestatus herangezogen. Der Coliformennachweis erfolgt nach IDF Standard 73B:1998 mit Kristallviolett-Neutralrot-Galle (VRB) Agar (VRBA), 30°C, 24h. Als diagnostisches System dient die Säurebildung aus Lactose. Da Coliforme über die Gasbildung aus Lactose definiert werden, müssen zweifelhafte Kolonien abgeimpft und auf Gasbildung in Brillantgrün-Galle-Lactose Bouillon geprüft werden.

Bei Milch und Milchprodukten ist eine Methode von Vorteil, bei der *E. coli* und die Gesamtcoliformen parallel erfasst werden können. Dies ist beim Nachweis mit MUG-LST Bouillon der Fall (Verfahren 2). Für die Untersuchung größerer Probenzahlen hat dieses Verfahren allerdings den Nachteil eines hohen Arbeits- und Materialaufwandes. Ein weiterer Nachteil ist der Mangel an Präzision aufgrund der MPN Schätzung. Eine Alternative zu MUG-LSTB stellt die Verwendung von VRB Agar mit MUG Zusatz (MUG-VRBA) dar, bei dem *E. coli* als fluoreszierende Kolonien erkennbar sind. In jüngster Zeit stehen zum parallelen Nachweis von *E. coli* und der Gesamtcoliformen auch chromogene Medien zur Verfügung.

Bei diesen Medien erfolgt der Nachweis der Coliformen über die b-D-Galactosidase, der *E. coli*-Nachweis zusätzlich über die b-D-Glucuronidase. Coliforme und *E. coli* sind aufgrund dieser Enzymsysteme unterschiedlich gefärbt. Zur Überprüfung der Eignung dieser Medien wurden 468 Proben (Rohmilch: 48,

Käsebruch: 96, Käse aus Rohmilch: 324) parallel mit Coli ID Medium (bio-Mérieux) und MUG-VRBA (Merck) angesetzt. Bei Verwendung von MUG-VRBA konnte aufgrund der diffusen Fluoreszenz auf der Platte die *E. coli*-Keimzahl oft nur geschätzt werden und bei 12 Proben war eine Zahlenangabe überhaupt nicht möglich.

Mit Coli ID wurde *E. coli* in 361 Proben, mit MUG-VRBA nur in 348 Proben nachgewiesen. Bei den Proben, bei denen eine Zahlenangabe mit beiden Methoden möglich war, lagen die *E. coli*-Keimzahlen bei MUG-VRBA signifikant um durchschnittlich 0,23 log niedriger als beim Coli ID Nährboden ($p < 0,001$). Hinsichtlich der Coliformen war die Übereinstimmung zwischen den Methoden wesentlich besser als bei *E. coli*. Beim Coli ID Medium lagen die Keimzahlen an Coliformen geringfügig um durchschnittlich 0,06 log höher, die Unterschiede sind allerdings statistisch signifikant ($p < 0,001$). Um die Übereinstimmung mit der Referenzmethode zu prüfen, wurden 24 Rohmilch- und 10 Käseproben parallel mit MUG-LSTB (Merck), MUG-VRBA und Coli ID Medium untersucht. Während der Prozentsatz *E. coli*-positiver Proben mit MUG-LSTB und Coli ID ähnlich hoch war (27 bzw. 26 Proben), wurde *E. coli* bei Verwendung von MUG-VRBA in nur 21 Proben festgestellt. Ein Vergleich der *E. coli*- und Coliformenkeimzahlen in Proben, bei denen auswertbare Ergebnisse erhalten wurden, erbrachte allerdings keine signifikanten Unterschiede bei den Methoden ($p > 0,05$).

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass *E. coli* mit dem Coli ID Medium wesentlich zuverlässiger bestimmt wird als mit MUG-VRB Agar. Die Zählung der Coliformen bereitet beim Coli ID Nährboden wegen der fließenden

Autoren: Dr. Peter ZANGERL und Mag. Martina FRIEDL, Bundesanstalt für alpenländische Milchwirtschaft, Rotholz, A-6200 JENBACH



Farbübergänge von blau bis weißgrau jedoch Schwierigkeiten. Graue bis weißgraue Kolonien, die auf Gasbildung in Brillandgrün-Galle-Lactose Bouillon (30°C, 24-48h) geprüft wurden, bildeten häufig kein Gas aus Lactose. Mit dem Coli ID Medium werden daher die Coliformenzahlen eher überschätzt.

Staphylococcus aureus

Zum Nachweis von koagulase-positiven Staphylokokken hat sich wegen seiner hohen Produktivität der Baird-Parker Agar (BPA) durchgesetzt.

Als diagnostische Kriterien dienen die Telluritreduktion (Schwarzfärbung der Kolonien) und die Eigelbreaktion (Trübung und/oder Klärung um die Kolonie).

Der Baird-Parker Agar hat jedoch den Nachteil, dass weder die Telluritreduktion noch die Eigelbreaktion ausreichende diagnostische Merkmale für *S. aureus*

darstellen. Bei Proben mit einem hohen Anteil an Begleitflora wie Rohmilchkäse ist daher die Untersuchung durch das Abimpfen von Kolonien für Bestätigungsreaktionen sehr arbeitsintensiv. Weiters ist bei einem hohen Begleitfloraanteil die Erfassbarkeit von *S. aureus* stark beeinträchtigt. Aus diesem Grund ist im IDF Standard 145A: 1997 neben dem Baird-Parker Agar die Verwendung von Kaninchen-plasma-Fibrinogen (RPF) Agar (RPFA) vorgesehen. Bei diesem Nährboden wurde das Eigelb im Baird-Parker Medium durch Kaninchenplasma, bovines Fibrinogen und Trypsin-Hemmer ersetzt, so dass die Koagulasereaktion direkt im Nährboden abgelesen werden kann und weitere Bestätigungsreaktionen entfallen.

Heute stehen kommerziell erhältliche RPF-Medien mit konstanter Plasmaqualität zur Verfügung, die jedoch unterschiedliche Selektivität aufweisen. Die

unterschiedliche Selektivität konnte auf die Qualität des Baird-Parker Grundmediums (Basis vor Supplementzusatz) zurückgeführt werden. Bei einer parallelen Untersuchung von 20 Rohmilch- und 36 Käseproben aus Rohmilch konnte mit BPA (Oxoid) *S. aureus* in 34 Proben nachgewiesen werden.

Demgegenüber wurde *S. aureus* in 8 weiteren Proben nur mit RPFA (Biokar Diagnostics) nachgewiesen. Ein Vergleich der *S. aureus*-Keimzahlen, bei denen mit beiden Nährböden auswertbare Ergebnisse erhalten wurden, erbrachte keine signifikanten Unterschiede ($p > 0,05$). Die RPF-Medien von Biokar Diagnostics (Beauvais Cédex, Frankreich) und bioMérieux (Marcy-l'Étoile, Frankreich) erwiesen sich gegenüber dem Baird-Parker Nährboden von Oxoid (Basingstoke, England) hinsichtlich der Zuverlässigkeit der Ergebnisse und der Praktikabilität als überlegen.