

Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society

Vol 54, No 3 (2003)



Conditions of staphylococcal enterotoxin production in milk and milk products

A. J. MANTIS (Α.Ι. ΜΑΝΤΗΣ), D. K. PAPAGEORGIOU (Δ.Κ. ΠΑΠΑΓΕΩΡΓΙΟΥ)

doi: [10.12681/jhvms.15267](https://doi.org/10.12681/jhvms.15267)

To cite this article:

MANTIS (Α.Ι. ΜΑΝΤΗΣ) Α. J., & PAPAGEORGIOU (Δ.Κ. ΠΑΠΑΓΕΩΡΓΙΟΥ) D. K. (2017). Conditions of staphylococcal enterotoxin production in milk and milk products. *Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society*, 54(3), 242–252. <https://doi.org/10.12681/jhvms.15267>

Συνθήκες παραγωγής σταφυλοκοκκικών εντεροτοξινών στο γάλα και τα γαλακτοκομικά προϊόντα

A. I. Μάντης¹, Δ. Κ. Παπαγεωργίου¹

ΠΕΡΙΛΗΨΗ. Οι συγγραφείς εκθέτουν τα βιβλιογραφικά δεδομένα τα σχετικά με τη δυνατότητα που έχει ο *Staphylococcus aureus* να αναπτύσσεται και να παράγει εντεροτοξίνες στο γάλα και τα γαλακτοκομικά προϊόντα και ιδιαίτερα στα τυριά. Στο νωπό ή παστεριωμένο γάλα ο *S. aureus* αναπτύσσεται εύκολα και μπορεί να παράγει εντεροτοξίνες εάν το προϊόν συντηρείται σε ευνοϊκή για το βακτήριο θερμοκρασία. Η κρέμα γάλακτος είναι επίσης ευνοϊκό τρώφιμο για την ανάπτυξη του *S. aureus* και της παραγωγής εντεροτοξινών, αλλά το βούτυρο καθώς και τα προϊόντα που παράγονται με ζύμωση (γιαούρτη, ξυνόγαλα) δεν είναι ευνοϊκά υποστρώματα για την ανάπτυξη του *S. aureus* και την παραγωγή εντεροτοξινών. Τα τυριά είναι ένα πολύπλοκο περιβάλλον κυρίως λόγω της διαφορετικής τεχνολογίας παραγωγής στα διάφορα είδη, γεγονός που δημιουργεί ένα ιδιαίτερο περιβάλλον για κάθε είδος τυριού. Τα νωπά, τα μαλακά, τα ημίσκληρα αλλά και τα σκληρά τυριά μπορεί να επιτρέπουν την ανάπτυξη του *S. aureus* κατά τα πρώτα στάδια παραγωγής μέχρι τις 48 πρώτες ώρες. Το παθογόνο, εάν υπάρχει στο γάλα πριν από την πήξη, θα πολλαπλασιαστεί για 3-4 λογαριθμικούς κύκλους και στη συνέχεια, εξαιτίας της οξύτητας που αναπτύσσεται και του ανταγωνισμού της οξυγαλακτικής χλωρίδας, ο πληθυσμός του *S. aureus* αρχίζει να μειώνεται και συνήθως το βακτήριο δεν ανιχνεύεται όταν το τυρί συμπληρώσει την ωρίμασή του. Πάντως εάν κατά το στάδιο του πολλαπλασιασμού παραχθούν εντεροτοξίνες, αυτές ανιχνεύονται καθ' όλη τη διάρκεια συντήρησης του τυριού. Ορισμένα τυριά, όπως τα ημίσκληρα που ωριμάζουν με *penicillium* spp. (π.χ. ροκφόρ, blue cheese κ.ά.), τα τυριά τύπου pasta filata (π.χ. mozzarella) ή τα μετουσιωμένα τυριά δεν είναι ευνοϊκό υπόστρωμα για τον πολλαπλασιασμό του *S. aureus* και την παραγωγή εντεροτοξινών. Αντίθετα, τα τυριά τυρογάλακτος (Μυζήθρα νωπή, Ανθότυρος κ.ά.) είναι πολύ ευνοϊκό υπόστρωμα για τον πολλαπλασιασμό του *S. aureus* και την παραγωγή εντεροτοξινών εξαιτίας του υψηλού pH και της απουσίας ανταγωνιστικής οξυγαλακτικής χλωρίδας.

Λέξεις ευρετηρίασης: Γαλακτοκομικά προϊόντα, *S. aureus*, εντεροτοξίνες

Conditions of staphylococcal enterotoxin production in milk and milk products

Mantis¹ A.J., Papageorgiou¹ D.K.

ABSTRACT. The authors reviewed the existing scientific data, concerning the ability of *Staphylococcus aureus* to grow and produce enterotoxins in milk and in dairy products particularly in cheeses. *S. aureus* can grow well in liquid raw or pasteurized milks and produce enterotoxins if the product is stored in favorable for the pathogen temperature. Cream also supports growth of *S. aureus* and enterotoxin production, but butter as well as fermented products like yogurt and buttermilk are not favorable substrates for the production of enterotoxins. Cheeses represent a complex environment, due to their great variety in processing technology and environment. Fresh cheeses, soft cheeses and semi-hard and hard cheeses can support growth of *S. aureus* during the first stages of production up to 48 hours. Normally, the pathogen, if it is present in the milk, will multiply for 3-4 logs and after that, when acidity develops, the populations of *S. aureus* decrease and usually disappear by the end of the ripening period. However, if enterotoxins are produced during the multiplication phase of the pathogen, it will remain active in the cheese for a long time. Internal mould ripened cheeses (e.g. blue cheese), pasta filata cheeses or the processed cheeses do not represent favorable substrates for the multiplication of *S. aureus* and enterotoxin production. On the contrary, whey cheeses form a very favorable environment for the enterotoxins' production, because of their high pH and the absence of antagonistic bacterial flora.

Key words: Dairy products, *S. aureus*, enterotoxins.

¹ Εργαστήριο Γαλακτοκομίας, Τμήμα Κτηνιατρικής Α.Π.Θ.

¹ Faculty of Veterinary Medicine, Aristotle University, Thessaloniki.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Μεταξύ των μικροβιακής αιτιολογίας τροφικών διαταραχών της υγείας του ανθρώπου, η σταφυλοκοκκική τροφική τοξίνωση κατέχει σημαντική θέση. Εκδηλώνεται με κύρια συμπτώματα ναυτία, έμετο, κοιλιακό άλγος και διάρροια. Οφείλεται στην κατανάλωση με τα τρόφιμα προσηματισμένων εντεροτοξινών που παράγονται από ορισμένα στελέχη σταφυλοκόκκων και κυρίως του *Staphylococcus aureus*. Τα τελευταία χρόνια έχει διαπιστωθεί παραγωγή εντεροτοξινών και από άλλα είδη σταφυλοκόκκων όπως ο *Staphylococcus intermedius* (Backer et al., 2001) και ο *Staphylococcus hyicus* (Adesiyun et al., 1984).

Οι σταφυλοκοκκικές εντεροτοξίνες (SE) είναι θερμοάντοχες πρωτεΐνες και παράγονται από ορισμένα στελέχη που χαρακτηρίζονται ως εντεροτοξινογόνα. Για να παραχθεί ποσότητα εντεροτοξίνης ικανής να προκαλέσει τροφική τοξίνωση, πρέπει οι σταφυλόκοκκοι να πολλαπλασιαστούν στο τρόφιμο και ο πληθυσμός τους να υπερβεί το 1×10^6 CFU/g ή ml (Tatini et al., 1975).

Μέχρι σήμερα έχουν ταυτοποιηθεί 16 αντιγονικοί τύποι εντεροτοξινών, οι οποίοι χαρακτηρίζονται με τα κεφαλαία γράμματα του λατινικού αλφαβήτου από το Α έως το Ο. Έχουν μελετηθεί όμως επαρκώς μόνο οι εντεροτοξίνες Α, Β, C₁, C₂, C₃, D και Ε για τις οποίες υπάρχουν σχετικά αντιδραστήρια στο εμπόριο.

Η δυνατότητα παραγωγής από τα εντεροτοξινογόνα στελέχη σταφυλοκόκκων εντεροτοξινών σ' ένα υπόστρωμα και κυρίως σ' ένα τρόφιμο, εξαρτάται από ορισμένες παραμέτρους τόσο του τροφίμου, όσο και του γενικότερου περιβάλλοντος ανάπτυξης.

Σημαντικές παράμετροι του τροφίμου είναι:

- Το είδος του τροφίμου και η επάρκειά του σε θρεπτικά συστατικά ικανά να υποστηρίξουν πολλαπλασιασμό του βακτηρίου.
- Το pH και το δυναμικό οξειδοαναγωγής.
- Ο συντελεστής ενεργού νερού (a_w).
- Η περιεκτικότητα σε χλωριούχο νάτριο.

Από τις παραμέτρους του περιβάλλοντος η θερμοκρασία συντήρησης του τροφίμου και το είδος της ατμόσφαιρας παίζουν πρωταρχικό ρόλο. Ο *S. aureus* μπορεί να αναπτυχθεί και να παράγει εντεροτοξίνες σε θερμοκρασία 10-45 °C, pH=4,9-9,6, συντελεστή ενεργού ύδατος (a_w)=0,83-0,99 και δυναμικό οξειδοαναγωγής από +200 mV έως -200 mV (ICMSF, 1996). Επίσης αναπτύσσεται και παράγει εντεροτοξίνες σε συγκεντρώσεις χλωριούχου νατρίου (NaCl) έως 10% (υδάτινη φάση), αλλά δεν αναπτύσσεται καλά όταν υπάρχει ανταγωνιστική και ιδιαίτερα οξυγαλακτική χλωρίδα στο τρόφιμο (Genigeorgis, 1989).

Σύμφωνα με δεδομένα του προγράμματος επιτήρησης τροφικών δηλητηριάσεων του WHO για την Ευρώπη, διαπιστώνεται ότι στο διάστημα των ετών 1993-1998, σε 16 Ευρωπαϊκές χώρες το ποσοστό των τροφικών δηλητηριάσεων από *S. aureus*, με υπεύθυνο τρόφιμο το γάλα και τα γαλακτοκομικά προϊόντα, κυμάνθηκε από 1-9% (μέσος ό-

ρος 4,8%) του συνόλου των τροφικών τοξινώσεων που προκλήθηκαν από *S. aureus*. Σχετικά μικρό είναι το ποσοστό συμμετοχής των γαλακτοκομικών, ως αιτίων σταφυλοκοκκικής τοξίνωσης και στις άλλες χώρες. Όμως, ενίοτε συμβαίνουν πολυπληθή κρούσματα, όπως αυτό που οφειλόταν σε κατανάλωση γάλακτος με κακάο στις ΗΠΑ με 8.510 περιστατικά (Evenson et al., 1988) και εκείνο στην Ιαπωνία από κατανάλωση σκόνης γάλακτος με 13.420 περιστατικά (Asao et al., 2003). Στην ανασκόπηση αυτή παρατίθενται τα δεδομένα της διεθνούς βιβλιογραφίας που αναφέρονται στις συνθήκες κάτω από τις οποίες εντεροτοξινογόνα στελέχη του *S. aureus* μπορούν να παράγουν εντεροτοξίνες στο γάλα και τα διάφορα γαλακτοκομικά προϊόντα και ιδιαίτερα στα τυριά.

2. ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΕΝΤΕΡΟΤΟΞΙΝΩΝ ΣΤΟ ΓΑΛΑ

2.1 Γάλα

Το γάλα, νωπό ή παστεριωμένο, είναι ένα άριστο υπόστρωμα για την ανάπτυξη του *S. aureus* και την παραγωγή εντεροτοξινών, εάν διατηρηθεί σε θερμοκρασία μεγαλύτερη από 10 °C και η φυσική μικροχλωρίδα του δεν είναι υψηλή (Clark and Nelson, 1961). Ο πληθυσμός του *S. aureus* στο γάλα σχετίζεται κυρίως με τη μόλυνση του μαστού του ζώου (σταφυλοκοκκική μαστίτιδα) και μπορεί να κυμαίνεται από <10 CFU/ml έως αρκετές χιλιάδες ανά ml. Σε εξαιρετικές περιπτώσεις έχουν διαπιστωθεί πληθυσμοί έως και 10⁵ CFU/ml (Asperger and Zangrel, 2002).

Το νωπό γάλα παστεριώνεται προτού να καταναλωθεί ή θερμαίνεται σε συνδυασμούς χρόνου και θερμοκρασίας τουλάχιστον ισοδύναμους της HTST παστερίωσης, όταν πρόκειται να παραχθούν γαλακτοκομικά προϊόντα. Το παστεριωμένο γάλα είναι καλύτερο θρεπτικό υπόστρωμα για την ανάπτυξη του *S. aureus* και την παραγωγή εντεροτοξινών απ' ό,τι το νωπό γάλα, διότι το τελευταίο φέρει σημαντικό πληθυσμό φυσικής χλωρίδας, η οποία ασκεί ανταγωνιστική δράση (Tatini et al., 1971b). Εάν απουσιάζει η ανταγωνιστική χλωρίδα, τότε η ανάπτυξη του *S. aureus* ευνοείται και αυτό καταλήγει πιο εύκολα σε παραγωγή εντεροτοξίνης (Ikram and Leudecke, 1977).

Η θερμοκρασία συντήρησης επηρεάζει τη δυνατότητα παραγωγής εντεροτοξίνης στο νωπό ή το παστεριωμένο γάλα. Αρχικό ενοφθάλμισμα εντεροτοξινογόνου *S. aureus* της τάξεως του 10⁴ CFU/ml έδωσε παραγωγή εντεροτοξίνης Α εντός 6h στους 35 °C, 18h στους 25 °C και 36h στους 20 °C, ενώ αρχικό ενοφθάλμισμα 10⁴ CFU/ml έδωσε εντεροτοξίνη σε 12h στους 35 °C. Σε γάλα το οποίο είχε μεγάλο πληθυσμό φυσικής χλωρίδας, μόνο ενοφθαλμίσματα μεγαλύτερα από 10⁶ CFU *S. aureus*/ml οδήγησαν στην παραγωγή εντεροτοξίνης (Donnelly et al., 1968).

2.2 Άπαχη σκόνη γάλακτος

Η τεχνολογία παραγωγής σκόνης γάλακτος περιλαμβάνει παστερίωση του γάλακτος, συμπύκνωση και αφυδάτωση (αποξήρανση). Η συνολική θερμική επεξεργασία συμβάλλει στην εξυγίανση του προϊόντος. Συνεπώς οποιαδήποτε προβλήματα εμφάνισης *S. aureus* στο τελικό προϊ-

όν οφείλονται συνήθως σε μεταπαστεριωτικές μολύνσεις που είναι όμως πολύ σπάνιες. Οι σταφυλόκοκκοι μπορεί να πολλαπλασιαστούν και να παραγάγουν εντεροτοξίνη στο γάλα, το παστεριωμένο ή το συμπυκνωμένο γάλα, εάν η θερμοκρασία είναι ευνοϊκή ($>10^{\circ}\text{C}$) (Asperger, 1994).

Η μέθοδος παραγωγής σκόνης γάλακτος με εκνέφωση (spray drying) μειώνει τον αριθμό των σταφυλόκοκκων, εάν υπάρχουν στο συμπύκνωμα, αλλά ορισμένα κύτταρα του βακτηρίου μπορεί να επιβιώσουν και να πολλαπλασιαστούν εάν οι συνθήκες μετά την αναγέννηση της σκόνης γάλακτος είναι ευνοϊκές. Ως εκ τούτου ελλοχεύει πάντα ο κίνδυνος για παραγωγή εντεροτοξίνης στα παράγωγα προϊόντα τα οποία χρησιμοποιούν μια τέτοια σκόνη γάλακτος (Galesloot and Stadhouders, 1968; Chopin et al., 1977). Μια άλλη περίπτωση είναι να έχει παραχθεί η εντεροτοξίνη στα γάλα πριν από την αφυδάτωση, οπότε το τελικό προϊόν (σκόνη γάλακτος) θα φέρει την εντεροτοξίνη, η οποία παραμένει δραστική στη σκόνη γάλακτος για χρόνια (Chopin et al., 1978).

3. ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΕΝΤΕΡΟΤΟΞΙΝΩΝ ΣΤΑ ΓΑΛΑΚΤΟΚΟΜΙΚΑ ΠΡΟΪΟΝΤΑ

3.1 Τυριά

3.1.1 Γενικά

Σύμφωνα με τον Codex Alimentarius (FAO/WHO, 1973) "Τυρί είναι το νοπλό ή ώριμο προϊόν που λαμβάνεται από την πήξη και στράγγιση του πηγματος πλήρους γάλακτος, μερικώς αποβουτυρωμένου ή αποβουτυρωμένου γάλακτος ή βουτυρογάλακτος ή μίγματος μερικών ή όλων των παραπάνω προϊόντων".

Ο πολύ ευρύς αυτός ορισμός αντανάκλα τη μεγάλη ποικιλία που υπάρχει στις μεθόδους παραγωγής τυριών. Πάντως σε γενικές γραμμές η μεθοδολογία παραγωγής που ακολουθείται περιλαμβάνει τα εξής στάδια: Το γάλα, παστεριωμένο ή όχι, πηχίζεται με πυτιά ή οξύ ή και θέρμανση, το τυρόπηγμα αναθερμαίνεται ή όχι, στραγγίζεται, πιέζεται ή όχι, αλατίζεται και ωριμάζει για διαφορετικές χρονικές περιόδους (Scott, 1986). Η ωρίμαση επιτυγχάνεται με τη δράση ειδικών μικροοργανισμών γνωστών ως οξυγαλακτικών βακτηρίων ή starters. Οι εκκνητές (starters) στην αρχή ζυμώνουν τη λακτόζη του γάλακτος και το πηγμα γίνεται όξινο ($\text{pH}=5,0-5,2$).

Η παρουσία μεγάλου αριθμού οξυγαλακτικών βακτηρίων (Lactic acid bacteria ή LAB), η πτώση του pH, η συγκέντρωση του χλωριούχου νατρίου και η θερμοκρασία επεξεργασίας του τυροπήγματος, θεωρούνται ως πρωταρχικής σημασίας παράγοντες που ρυθμίζουν την τύχη των μικροοργανισμών στο τυρί κατά την παρασκευή και ωρίμασή του. Συνεπώς η επίδραση των συνθηκών παραγωγής στην ανάπτυξη του *S. aureus* και την παραγωγή εντεροτοξίνης θα εξεταστεί σε συνδυασμό με τις κατηγορίες των διαφόρων ειδών τυριών, επειδή υστείσερονται οι διαφορές στην τεχνολογία παραγωγής.

Θα ακολουθηθεί η κατηγοριοποίηση με βάση κυρίως τη σύσταση της τυρομάζας (μαλακά, σκληρά, ημίσκληρα) αλλά θα δοθεί έμφαση και σε ορισμένες κατηγορίες τυριών που ταξινομούνται με βάση άλλα κριτήρια (Scott, 1986 και Mayrand and Vernozy-Rozand, 1999) όπως:

- α) Νοπά.
- β) Επιφανειακής ή εσωτερικής ωρίμασης με μύκητες.
- γ) Επιφανειακής ωρίμασης με βακτήρια.
- δ) Τυριά με πλαστική τυρομάζα (pasta filata).
- ε) Τυριά άλμης.
- στ) Τυριά τυρογάλακτος.

3.1.2 Νοπά τυριά

Τα νοπά τυριά παρασκευάζονται από νοπλό ή παστεριωμένο γάλα, με προσθήκη ή όχι οξυγαλακτικής καλλιέργειας αν και στις περισσότερες περιπτώσεις το τυρόπηγμα υφίσταται ζύμωση από τα οξυγαλακτικά βακτήρια ή από άλλα βακτήρια που υπάρχουν στη φυσική μικροχλωρίδα του γάλακτος. Η οξύτητά τους συνήθως μειώνεται γρήγορα σε επίπεδα κάτω του $\text{pH}=5,0$ και η περιεκτικότητά τους σε νερό παραμένει υψηλή ($\alpha_w=0,95-0,97$). Μετά την παρασκευή τους καταναλώνονται ως νοπά χωρίς περαιτέρω ωρίμαση. Διακινούνται υπό ψύξη και έχουν χρόνο ζωής από 5-30 ημέρες σε θερμοκρασία ψύξεως.

Αντιπροσωπευτικοί τύποι τέτοιων τυριών είναι τα Cottage, Baker's, Cream cheese, Neufchatel, Quesco blanco, Ymer, Quarg, Πηχτόγαλο Χανίων κ.ά. Νοπά τυριά είναι και τα τυριά τυρογάλακτος όπως το Μανούρι, η νοπή Μυζήθρα, ο Ανθότυρος, το Riccotone, τα οποία εξετάζονται ξεχωριστά, καθώς και η Mozzarella (κεφ. 3.1.6), η οποία είναι ο εκπρόσωπος των τυριών τύπου Pasta filata (Anifantakis, 1991; Kosokowski and Mistry, 1997; Papageorgiou et al., 1998).

Οι Zarate και συν. (1997) μελέτησαν την τύχη του *S. aureus* σε κατοικίσιο τυρί της Τενερίφης, το οποίο γίνεται από απαστερίωτο γάλα χωρίς προσθήκη οξυγαλακτικής καλλιέργειας και καταναλώνεται είτε ως νοπλό (εντός 2-3 ημερών) είτε ύστερα από ωρίμαση 2 μηνών. Οι συγγραφείς παρατήρησαν μια αύξηση 2-3 λογαρίθμων στον πληθυσμό του *S. aureus* ανά γραμμάριο τυριού εντός 2 ημερών, αλλά στη συνέχεια ο πληθυσμός του βακτηρίου άρχισε να μειώνεται.

Οι Hamana και συν., (2002) παρασκεύασαν τυρί Iben, ένα παραδοσιακό Μαροκινό νοπλό τυρί με προσθήκη ή όχι ενός στελέχους *Lactococcus lactis* που παρήγαγε νισίνη. Το γάλα ενοφθαλμίστηκε με πληθυσμούς με 10^3 έως 10^5 CFU/ml στελέχους *S. aureus* που παρήγαγε εντεροτοξίνη C. Παρατηρήθηκε ότι οι πληθυσμοί του *S. aureus* μειώθηκαν γρήγορα στο τυρί που είχε προστεθεί στέλεχος *L. lactis*, ενώ επιβίωσε για μεγαλύτερη χρονική διάρκεια στο τυρί που δεν περιείχε *L. lactis*. Πάντως όταν χρησιμοποιήθηκαν μεγάλα αρχικά ενοφθαλμίσματα *S. aureus* ($>10^5$ CFU/ml), διαπιστώθηκε παραγωγή εντεροτοξίνης C εντός 3 ημερών. Αντίθετα, ο Daminelli (1999) δεν διαπίστωσε την παραγωγή εντεροτοξίνης, όταν παρασκεύασε ένα νο-

πό Ιταλικό τυρί τύπου "Crescenza" από παστεριωμένο γάλα με καλή δραστηριότητα οξυγαλακτικής χλωρίδας και ενοφθαλμίσματα έως 10^6 CFU/ml γάλακτος. Στο Πηχτόγαλο Χανίων διαπιστώθηκαν πληθυσμοί *S. aureus* από 10^2 έως 10^4 , σε ποσοστό 6,45% των δειγμάτων που εξετάστηκαν (Papageorgiou et al., 1998).

Οι Lodi και συν., (1994) ταξινομήσαν 32 νωπά τυριά σε 3 κατηγορίες.

α. Τυριά με μεγάλο αριθμό οξυγαλακτικών βακτηρίων (LAB).

β. Τυριά χωρίς LAB και με μικρό αριθμό φυσικής μικροχλωρίδας και

γ. Τυριά χωρίς LAB αλλά με μεγάλο πληθυσμό φυσικής μικροχλωρίδας.

Οι συγγραφείς συμπεραίνουν ότι στα νωπά τυριά της κατηγορίας (α) τα παθογόνα βακτήρια που τυχόν θα υπάξουν δεν πολλαπλασιάζονται αλλά ο πληθυσμός τους μειώνεται γρήγορα, ενώ στις κατηγορίες (β) και (γ) τα παθογόνα βακτήρια συνήθως επιβιώνουν για αρκετές εβδομάδες.

Τα υπάρχοντα δεδομένα συνηγορούν στο ότι η ανάπτυξη του *S. aureus* είναι προβληματική και περιορισμένη στα νωπά τυριά, στα οποία η πήξη γίνεται με βάση μια ταχεία γαλακτική ζύμωση ή ανεξάρτητα προς τον τρόπο πήξης γίνεται προσθήκη στο γάλα ικανοποιητικής ποσότητας οξυγαλακτικών βακτηρίων (starters). Οποσδήποτε όμως, έχει διαπιστωθεί η δυνατότητα παραγωγής εντεροτοξίνης A και D σε νωπά τυριά χωρίς καλή δραστηριότητα οξυγαλακτικών βακτηρίων ή όταν χρησιμοποιήθηκαν μεγάλα ενοφθαλμίσματα *S. aureus* (10^4 - 10^5 CFU/ml). Η ανάπτυξη και η παραγωγή εντεροτοξινών επηρεάζεται από τον αρχικό πληθυσμό του *S. aureus* στο γάλα, τη δραστηριότητα της οξυγαλακτικής χλωρίδας ή την ανταγωνιστική δράση της φυσικής μικροχλωρίδας, τη συγκέντρωση του χλωριούχου νατρίου, το ρυθμό μείωσης του pH και τη θερμοκρασία της επεξεργασίας του τυροπήγματος (Mayrand and Vernozy-Rozand, 1999).

Ο *S. aureus* είναι ένα αρκετά αλατοάντοχο βακτήριο, ικανό να αναπτύσσεται και να παράγει εντεροτοξίνη σε συγκεντρώσεις NaCl έως 10% ($\alpha_w=0,92$), ενώ η ανάπτυξη πολλών ανταγωνιστικών του *S. aureus* βακτηρίων που υπάρχουν στο γάλα αναστέλλεται (Latondeur-Lafarge and Lahellec, 1997).

Συμπερασματικά, στα νωπά τυριά ο *S. aureus* μπορεί να παράγει εντεροτοξίνη, όταν η δραστηριότητα της οξυγαλακτικής καλλιέργειας είναι μειωμένη. Αντίθετα, στα νωπά τυριά τα οποία έχουν καλή δραστηριότητα LAB, οι σταφυλόκοκκοι μειώνονται γρήγορα σε πληθυσμό και δεν παρατηρείται σχηματισμός εντεροτοξίνης ακόμη και με αρχικούς πληθυσμούς 10^3 - 10^5 CFU/ml γάλακτος προς τυροκόμηση.

3.1.3 Μαλακά τυριά

Η κατηγορία των μαλακών τυριών απαρτίζει τη μεγαλύτερη οικογένεια τυριών με εκατοντάδες είδη και ονό-

ματα τυριών στην Ευρώπη και παγκοσμίως. Πολλά από τα είδη αυτά είναι Προστατευόμενης Ονομασίας Προέλευσης (Π.Ο.Π.) που παράγονται παραδοσιακά και είναι μοναδικά ως προς την τεχνολογία και τις συνθήκες παραγωγής. Έτσι το καθένα από αυτά είναι και ένα ιδιαίτερο περιβάλλον, όσον αφορά την ανάπτυξη των παθογόνων βακτηρίων. Πολλά είδη παράγονται από απαστερίωτο γάλα και η ζύμωσή τους βασίζεται στη φυσική μικροχλωρίδα του γάλακτος, η δράση της οποίας κατευθύνεται μέσα από την τεχνολογία παραγωγής. Εξαιτίας όμως συχνών προβλημάτων υγιεινής, τα οποία εμφανίζονται στα τυριά αυτά, έχει αρχίσει και συνδυάζεται η παραδοσιακή τεχνολογία με μια θερμοκή επεξεργασία του γάλακτος σε ζώνη 62 - 65°C για 5 - 15 min (θερμισμένο γάλα), ή σε ζώνη 72°C για 15 sec (παστεριωμένο γάλα), καθώς και με χρήση επιλεγμένων οξυγαλακτικών βακτηρίων (Scott, 1986; Mayland and Vernozy-Rozand, 1999). Μέσα στη μεγάλη οικογένεια των μαλακών τυριών μπορούν να διαχωριστούν ορισμένες ομάδες όπως:

α) Τα μαλακά τυριά με γαλακτική ζύμωση, όπως τα είδη Petit Suisse, Lactic, Bondon, Colwich, Carrick, Kingston, Mont d' Or κ.ά.

β) Τα μαλακά τυριά επιφανειακής ωρίμασης με μύκητες, όπως τα Camembert, Brie, Sainte Maure, Coulommiers, Carrè de L' Est κ.ά.

γ) Τα μαλακά τυριά επιφανειακής ωρίμασης με βακτήρια, όπως τα Limburger, Munster, Bel Paesa, Brick, Tilsit κ.ά.

δ) Τα τυριά άλμης όπως η Φέτα και τα άλλα λευκά τυριά άλμης όπως τα Domiati, Brinza, Haloumi κ.ά.

α. Μαλακά τυριά μόνο γαλακτικής ζύμωσης

Τα μαλακά αυτά τυριά χαρακτηρίζονται από την κλασική γαλακτική ζύμωση, χωρίς επιπρόσθετες ζυμώσεις. Το ευνοϊκό ή όχι του περιβάλλοντός τους για την ανάπτυξη του *S. aureus* εξαρτάται κυρίως από την ταχύτητα ζύμωσης κατά τα πρώτα στάδια της πήξεως του γάλακτος και στράγγισης του τυροπήγματος. Οι Degremonet και συν., (1995) δεν διαπίστωσαν την παραγωγή εντεροτοξίνης σε τυριά αυτού του τύπου ακόμη και όταν χρησιμοποιήσαν μεγάλα αρχικά ενοφθαλμίσματα *S. aureus* και οι πληθυσμοί του βακτηρίου έφθασαν το 10^7 CFU/ml τυριού. Αντίθετα, μετά από μια αρχική αύξηση του πληθυσμού του *S. aureus* κατά 1 - 3 λογάριθμους, παρατηρήθηκε μείωση κατά 3 λογάριθμους εντός 30 ημερών.

Οι Tham και συν. (1990) δεν διαπίστωσαν την παραγωγή εντεροτοξίνης σε τυρί που παρασκευάσαν από κατσίκισιο θερμισμένο γάλα με προσθήκη οξυγαλακτικής καλλιέργειας και διάφορους πληθυσμούς *S. aureus*. Αντίθετα, όταν παρασκευάσαν το ίδιο τυρί αλλά από απαστερίωτο γάλα και χωρίς την προσθήκη οξυγαλακτικής καλλιέργειας, ο *S. aureus* μπόρεσε να πολλαπλασιαστεί και να παραγάγει εντεροτοξίνη.

Οι Vernozy-Rozand και συν. (1998) μελέτησαν την ανάπτυξη του *S. aureus* και την παραγωγή εντεροτοξίνης σε

δύο τυριά από κατσικίσιο γάλα και διαπίστωσαν παραγωγή εντεροτοξίνης μόνο όταν χρησιμοποίησαν ενοφθαλμίσματα της τάξεως του 10^5 CFU/ml γάλακτος και μεγαλύτερα. Παρεμφερή αποτελέσματα αναφέρει και ο Provent (1986), ο οποίος παρασκεύασε τυρί Mont d' Or από παστεριωμένο γάλα με προσθήκη οξυγαλακτικής καλλιέργειας. Ο συγγραφέας τονίζει ότι η δραστηριότητα της οξυγαλακτικής καλλιέργειας είναι πρωταρχικής σημασίας για τη διατήρηση των πληθυσμών του *S. aureus* σε επίπεδα μη ικανά να παράγουν ανιχνεύσιμα ποσά εντεροτοξίνης. Στα ίδια περίπου αποτελέσματα καταλήγει και ο Daminelli (1999), ο οποίος παρασκεύασε μαλακό τυρί τύπου "Italico" στο οποίο ενοφθάλμισε πληθυσμούς *S. aureus* από 10^3 - 10^6 CFU/ml γάλακτος, χωρίς να διαπιστώσει παραγωγή εντεροτοξίνης. Αντίθετα, οι Anunciacao και συν. (1994) διαπίστωσαν παραγωγή εντεροτοξίνης Α, σε βραζιλιάνικο μαλακό τυρί, όταν χρησιμοποίησαν ενοφθαλμίσματα *S. aureus* μεγαλύτερα του 10^4 CFU/ml γάλακτος.

Οι Santos και Genigeorgis (1981) μελέτησαν την παραγωγή εντεροτοξινών Α, Β και C, σε τυρί Minas, χρησιμοποιώντας απαστερίωτο ή παστεριωμένο γάλα με ή όχι προσθήκη οξυγαλακτικής καλλιέργειας. Οι συγγραφείς διαπίστωσαν ότι όταν χρησιμοποιούσαν οξυγαλακτική καλλιέργεια με καλή δραστηριότητα, μόνο μεγάλα αρχικά ενοφθαλμίσματα του *S. aureus* είχαν δυνατότητα να πολλαπλασιαστούν και να παραγάγουν εντεροτοξίνη. Τελικά καταλήγουν στο συμπέρασμα ότι η καλή παστερίωση του γάλακτος σε συνδυασμό με προσθήκη οξυγαλακτικής καλλιέργειας είναι η καλύτερη μέθοδος για την πρόληψη της παραγωγής εντεροτοξίνης στο τυρί αυτό.

β. Μαλακά τυριά που ωριμάζουν με επιφανειακή ανάπτυξη μυκήτων

Τα τυριά της κατηγορίας αυτής, εκτός από τη γαλακτική ζύμωση, υφίστανται περαιτέρω ωρίμαση από μύκητες (π.χ. *Penicillium camemberti*). Οι μύκητες αναπτύσσονται επιφανειακά και μεταβάλλουν τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά του τυριού (π.χ. pH, δυναμικό οξειδοαναγωγής) μέχρι ορισμένο βάθος.

Οι De Buyser και Lapeyre (1995) ενοφθάλμισαν τυρί Brie με *S. aureus* και παρατήρησαν αύξηση του πληθυσμού έως 10^5 CFU/g και στη συνέχεια ο *S. aureus* άρχισε να μειώνεται. Δεν διαπίστωσαν παραγωγή εντεροτοξίνης. Η συμπεριφορά του *S. aureus* σε τυρί Camembert μελετήθηκε από τους Mueller και συν., (1996). Οι συγγραφείς ενοφθάλμισαν παστεριωμένο γάλα που περιείχε κανονική οξυγαλακτική καλλιέργεια με πληθυσμούς *S. aureus* από 10^3 έως 10^5 CFU/ml και διαπίστωσαν ότι στους 10 από τους 11 πειραματισμούς είχαν παραγωγή εντεροτοξίνης εντός 24 ωρών. Όταν ανιχνεύθηκε η εντεροτοξίνη ο *S. aureus* είχε αυξηθεί σε 10^6 CFU/g τυριού. Παρόμοια αποτελέσματα είχαν και οι Meyrand και συν. (1998), οι οποίοι διαπίστωσαν την παραγωγή εντεροτοξίνης Α, σε τυρί Camembert, το οποίο παρασκευάστηκε από γάλα που ενοφθαλμίστηκε με 10^4 - 10^6 CFU *S. aureus*/ml. Οι ίδιοι συγγραφείς δεν

διαπίστωσαν παραγωγή εντεροτοξίνης σε τυρί γαλακτικής ζύμωσης που ενοφθαλμίστηκε με τον ίδιο πληθυσμό *S. aureus*.

γ. Μαλακά τυριά με επιφανειακή ανάπτυξη βακτηρίων

Τα τυριά της κατηγορίας αυτής, εκτός από τα οξυγαλακτικά βακτήρια που δημιουργούν την τυπική γαλακτική ζύμωση, ενοφθαλμίζονται επιφανειακά και με ένα ειδικό βακτήριο, το *Brevibacterium linens* ή *Bacillus linens*. Η επιφανειακή αυτή ανάπτυξη οδηγεί σε αλλαγή του pH των επιφανειακών στρωμάτων από την όξινη ζώνη (pH=4,5) προς την ουδέτερη ζώνη (pH=7,0). Έτσι δίνεται η ευκαιρία σε τυχόν υπάρχοντα παθογόνα βακτήρια να πολλαπλασιαστούν και να δημιουργήσουν "κρίσιμους" πληθυσμούς. Αυτό έχει αποδειχθεί με τη *Listeria monocytogenes*, η οποία προκάλεσε κρούσματα λιστερίωσης στον άνθρωπο με υπεύθυνο τρόφιμο τυρί της κατηγορίας αυτής (Ryser, 1998; Bula et al., 1995).

Οι Tatini και συν. (1973) παρασκεύασαν τυρί Brick από παστεριωμένο γάλα με προσθήκη οξυγαλακτικής καλλιέργειας (*Streptococcus thermophilus* ή *Streptococcus lactis*). Σε όλες τις περιπτώσεις, εκτός μίας, ο *S. aureus* αυξήθηκε σε πληθυσμό σε επίπεδα μεγαλύτερα από 10^7 CFU/g και διαπιστώθηκε η παραγωγή εντεροτοξίνης. Οι συγγραφείς δεν σχολιάζουν την τυχόν επίδραση της επιφανειακής ανάπτυξης βακτηρίων στην ανάπτυξη του *S. aureus*.

δ. Φέτα και παρεμφερή λευκά τυριά άλμης

Η Φέτα, παραδοσιακό ελληνικό τυρί, παράγεται από πρόβειο γάλα ή από μίγμα πρόβειου και γίδινου (70:30). Είναι ένα τυρί με γρήγορη ζύμωση και πτώση του pH σε επίπεδα του 5,5 εντός 2-3 ωρών και κάτω του 5,0 εντός 2-3 ημερών. Παραδοσιακά το γάλα δεν παστεριωνόταν, αλλά σήμερα η Φέτα παράγεται από παστεριωμένο γάλα στο οποίο προστίθεται ειδική οξυγαλακτική καλλιέργεια (*Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* και *Streptococcus salivarius subsp. thermophilus*). Λευκά τυριά άλμης είναι και τα Haloumi (Κύπρος), Briza (Ισραήλ) και Domiati (Αίγυπτος).

Σε μελέτη σχετική με τις συνθήκες παραγωγής Φέτας που ευνοούν ή όχι τον πολλαπλασιασμό του *S. aureus* και την παραγωγή εντεροτοξινών, ο Mantis (1973) διαπίστωσε ότι όταν υπάρχει καλή δραστηριότητα οξυγαλακτικής χλωρίδας και η ζύμωση του τυριού προχωρεί κανονικά, ο *S. aureus* πολλαπλασιάζεται μόνο κατά τις 2-3 πρώτες ώρες μετά την πήξη και μόνο με αρχικά ενοφθαλμίσματα μεγαλύτερα του 10^3 CFU/ml γάλακτος. Οι πληθυσμοί αυτοί αυξάνονται κατά 2-3 λογαρίθμους αλλά χωρίς παραγωγή εντεροτοξίνης. Αντίθετα, τα κύτταρα του *S. aureus* θνήσκουν κατά την ωρίμαση και αρχικοί πληθυσμοί της τάξεως του 5×10^5 CFU/ml γάλακτος μειώνονται σε πληθυσμούς $< 10/g$ τυριού εντός 15 ημερών από την πήξη. Σε μειωμένη όμως δραστηριότητα οξυγαλακτικής χλωρίδας ή σε πλήρη αδράνειά της, ακόμη και μικρά ενοφθαλμίσματα *S. aureus* (2×10^2 CFU/ml) μπορούν να πολλαπλασιαστούν και

να παραγάγουν εντεροτοξίνη.

Στις περιπτώσεις έντονου πολλαπλασιασμού του *S. aureus* κατά τις πρώτες ημέρες ο πληθυσμός του μειωνόταν κατά την πορεία της ωρίμασης και στο τέλος του χρόνου ωρίμασης (60 ημέρες) δεν ανιχνευόταν. Η εντεροτοξίνη όμως, εφ' όσον είχε παραχθεί, ανιχνευόταν για μεγάλο χρονικό διάστημα. Τέλος ενοφθαλμισμός ώριμου τυριού Φέτα με *S. aureus* (τεχνική σάντουιτς) δεν οδηγούσε σε παραγωγή εντεροτοξίνης, αλλά σε μείωση του πληθυσμού του βακτηρίου. Παρεμφερή αποτελέσματα αναφέρονται για το τυρί Domiati (Ahmed et al., 1983) και για ένα τύπο τουρκικής φέτας (Erkmen, 1995).

3.1.4 Ημίσκληρα τυριά

Τα τυριά της κατηγορίας αυτής, όπως και τα μαλακά τυριά, συνιστούν μια μεγάλη οικογένεια με πολλές ποικιλίες. Η πλειονότητά τους παράγεται από παστεριωμένο γάλα, με προσθήκη οξυγαλακτικής καλλιέργειας. Το τυρόπηγμα συνήθως αναθερμαίνεται και πιέζεται. Ωριμάζουν σε διαφορετικά χρονικά διαστήματα (από 4-5 εβδομάδες έως 3 μήνες). Μία υποκατηγορία των τυριών αυτών είναι αυτά που ωριμάζουν με εσωτερική ανάπτυξη μυκήτων.

α. Ημίσκληρα τυριά με κανονική γαλακτική ζύμωση

Αντιπροσωπευτικά είδη της υποκατηγορίας αυτής είναι τα τυριά Edam, Gouda, Danbo, Caerfilly, Lancashire, Reblochon, Cantal, Cremos, Port-Salut, Providence κ.ά.

Οι Van Schouwenburg - Van Foecken και συν., (1978) παρασκεύασαν τυρί Gouda με κανονική δραστηριότητα οξυγαλακτικής χλωρίδας και ενοφθάλμισαν διάφορους πληθυσμούς εντεροτοξινογόνου *S. aureus* στο γάλα. Διαπίστωσαν ότι εντεροτοξίνες Α, Β, και C παρήχθησαν εντός 24 ωρών. Στα θετικά δείγματα ο πληθυσμός του *S. aureus* έφθασε έως και 10^8 CFU/g τυριού. Η συγκέντρωση της εντεροτοξίνης κυμάνθηκε από 0,5 μg έως 2,0 μg/100 g τυριού.

Οι Degremeont και συν., (1995) μελέτησαν την παραγωγή εντεροτοξίνης στο τυρί Port-Salut ενοφθαλμίζοντας πληθυσμούς *S. aureus* από 10^3 έως 10^6 CFU/ml γάλακτος προς πήξη. Οι ερευνητές παρατήρησαν αύξηση του πληθυσμού του *S. aureus* κατά 1-3 λογαρίθμους αλλά δεν ανίχνευσαν εντεροτοξίνη ακόμη και με αρχικό ενοφθάλμισμα *S. aureus* σε επίπεδα 10^5 CFU/ml γάλακτος, στα δε τυριά ο *S. aureus* έφθασε πληθυσμό έως 10^7 CFU/g.

Η ανάπτυξη του *S. aureus* στα τυριά Reblochon και Cantal μελετήθηκε από τους De Buyser και Lapreye (1995), οι οποίοι ενοφθάλμισαν στο προς πήξη γάλα πληθυσμούς *S. aureus* από 10^2 έως 10^4 CFU/ml και παρατήρησαν αύξηση 1-2 λογαρίθμων. Στη συνέχεια ο πληθυσμός του *S. aureus* παρέμεινε σταθερός για το τυρί Reblochon ενώ μειώθηκε στο τυρί Cantal. Παρόμοια αποτελέσματα είχε και ο Hoffner (1996) για το τυρί Reblochon. Τέλος, οι Medina και συν., (1992) παρατήρησαν αύξηση 2 λογαρίθμων του *S. aureus* σε τυρί Cremos που παρασκευάστηκε από απαστεριωτό κατσικίσιο γάλα. Στη συνέχεια όμως ο πληθυσμός του *S. aureus* μειώθηκε και δεν ήταν ανιχνεύ-

σιμος μετά από ωρίμαση 30 ημερών.

β. Ημίσκληρα τυριά με ανάπτυξη μύκητα στο εσωτερικό τους.

Αντιπροσωπευτικοί τύποι των τυριών της κατηγορίας αυτής είναι τα Roquefort, Gorgonzola, Stilton, Danablu, Blue cheese, Adelost, Tiroler-Gran käse κ.ά.

Η ανάπτυξη στο εσωτερικό της τυρομάζας ειδικού στελέχους μύκητα (*Penicillium roqueforti* ή *Penicillium glaucum*) δημιουργεί δυσμενές περιβάλλον για την ανάπτυξη των παθογόνων βακτηρίων.

Οι Boer και Kuik (1987) μελέτησαν τη μικροβιολογική κατάσταση 256 δειγμάτων τυριών με εσωτερική ανάπτυξη *Penicillium* spp. και διαπίστωσαν ότι στα θετικά για *S. aureus* δείγματα, ο πληθυσμός του βακτηρίου ήταν πάντοτε μικρότερος από 100 CFU/g.

Οι Nunez και Medina (1980) μελέτησαν δύο ισπανικά τυριά με εσωτερική ανάπτυξη μυκήτων και διαπίστωσαν, και στα δύο, μικρό πληθυσμό *S. aureus*. Παρόμοια αποτελέσματα είχαν και οι Lopez-Diaz και συν., (1995). Τέλος, οι Tatini και συν., (1973) μελέτησαν τη δυνατότητα παραγωγής εντεροτοξίνης Α σε Blue cheese και δεν διαπίστωσαν παραγωγή εντεροτοξίνης, ακόμη και όταν χρησιμοποίησαν ενοφθαλμίσματα μεγαλύτερα του 10^6 CFU/ml γάλακτος.

Τα υπάρχοντα ερευνητικά δεδομένα συνηγορούν ότι τα τυριά που ωριμάζουν με εσωτερική ανάπτυξη μυκήτων είναι δυσμενές περιβάλλον για τον *S. aureus*. Αυτό προφανώς οφείλεται στη συνδυασμένη ανταγωνιστική δράση των οξυγαλακτικών βακτηρίων και του μύκητα *Penicillium* spp. (Tatini et al., 1973; Meyrand and Vernozzy-Rozand, 1999).

3.1.5 Σκληρά τυριά

Τα τυριά της κατηγορίας αυτής διακρίνονται από τη σκληρή έως πολύ σκληρή σύστασή τους. Αντιπροσωπευτικά είδη της κατηγορίας αυτής είναι τα Cheddar, Colby, Manchego, Kefalotiri, Grana, Asiago, Pecorino, Emmental, Gruyere, Romano, Samsoe, Ras, Majorero, Derby κ.ά.

Παρασκευάζονται κυρίως από παστεριωμένο γάλα και με χρήση ειδικών οξυγαλακτικών καλλιεργειών. Το τυρόπηγμα αναθερμαίνεται στους $45^\circ\text{C} - 55^\circ\text{C}$ για αποβολή περισσώτερου ορού και ορισμένα από αυτά, όπως τα Grana, Asiago, Romano, έχουν πολύ σκληρή σύσταση και μεγάλο χρόνο (έως 2 χρόνια) ωρίμασης.

Οι Fonteca και συν., (1990) μελέτησαν τη μικροβιακή χλωρίδα στο τυρί Majorero (ένα ισπανικό σκληρό τυρί) που παράγεται από νωπό ή παστεριωμένο γάλα και παρατήρησαν ότι ο *S. aureus* επιβίωσε έως και 90 ημέρες. Στο τυρί Manchego (επίσης σκληρό ισπανικό τυρί), οι Gomez-Lucia και συν., (1992) διαπίστωσαν την παραγωγή εντεροτοξινών Α και D με ενοφθάλμισμα της τάξεως του 10^4 CFU/ml γάλακτος σε 5 από τους 16 πειραματισμούς. Οι Naquib και συν., (1979) διαπίστωσαν ότι ο *S. aureus* πολλαπλασιάζεται στα πρώτα στάδια παραγωγής του τυριού

Ras (σκληρό Αιγυπτιακό τυρί) αλλά αργότερα ο πληθυσμός του μειώνεται σε επίπεδα κάτω των 10 CFU/g εντός 38 ημερών.

Οι Tatini και συν. (1971α) μελέτησαν την παραγωγή εντεροτοξίνης Α στα τυριά Cheddar και Colby, στα οποία προστέθηκε κανονική αναλογία οξυγαλακτικής καλλιέργειας. Οι ερευνητές αυτοί διαπίστωσαν την παραγωγή εντεροτοξίνης πιο συχνά στο τυρί Colby απ' ό,τι στο Cheddar, αλλά μόνο όταν ο πληθυσμός του *S. aureus* υπερέβαινε τα 10⁶ CFU/g τυριού. Η εντεροτοξίνη έμεινε σταθερή στο τυρί Cheddar για 3 χρόνια. Επίσης εντεροτοξίνη Α ανιχνεύτηκε σε τυρί Emmendal (Swiss) που ενοφθαλμίστηκε με διάφορους πληθυσμούς του *S. aureus* (Tatini et al., 1973).

Οι Koeming και Marth (1982) αναφέρουν ότι το αλατισμένο Cheddar (2,5% NaCl) είναι περισσότερο ευνοϊκό υπόστρωμα απ' ό,τι το ανάλατο για την ανάπτυξη του *S. aureus* και την παραγωγή εντεροτοξίνης. Εξάλλου οι Reiter και συν. (1964) παρατήρησαν ότι ο *S. aureus* πολλαπλασιάζοταν ταχύτερα σε τυρί Cheddar στο οποίο προκλήθηκε αναστολή δραστηριότητας οξυγαλακτικών με τη χρήση βακτηριοφάγων.

Η επίδραση της οξυγαλακτικής καλλιέργειας στην ανάπτυξη του *S. aureus* και την παραγωγή εντεροτοξινών μελετήθηκε και από άλλους ερευνητές (Tatini et al., 1971α; Ibrahim et al., 1981α, 1981β). Οι συγγραφείς παρατήρησαν ότι όταν υπήρχε αναστολή ανάπτυξης της οξυγαλακτικής χλωρίδας, οι σταφυλοκόκκοι αναπτύσσονταν σε μεγάλους πληθυσμούς και το αποτέλεσμα ήταν συνήθως η παραγωγή εντεροτοξινών. Το αλάτισμα του τυριού ενίσχυε περαιτέρω τον πολλαπλασιασμό του *S. aureus* και την παραγωγή εντεροτοξινών.

3.1.6 Τυριά τύπου Pasta filata

Αντιπροσωπευτικά είδη της κατηγορίας αυτής είναι τα τυριά Mozzarella, Provolone, Kaskaval, Κασέρι κ.ά. Τα τυριά αυτά χαρακτηρίζονται από το γεγονός ότι το τυρόπηγμα μετά από μια πρώτη θέρμανση στους 45°C-48°C, ωριμάζει στους 13°C-17°C έως ότου το pH κατέλθει στο 5,0-5,2, στη συνέχεια αναθερμαίνονται σε νερό θερμοκρασίας 78°C-80°C και ακολούθως η τυρομάζα μαλάσσεται, με τα χέρια ή μηχανικώς, ώστε να καταστεί πλαστική. Ακολουθεί η αλάτιση και η μορφοποίηση σε διάφορα σχήματα. Τέλος, το προϊόν ωριμάζει για χρόνο 2-3 μηνών. Εξαίρεση αποτελεί το τυρί Mozzarella που καταναλώνεται αμέσως ως νωπό χωρίς να ωριμάζει.

Η οξύτητα του τυροπήγματος και η θέρμανσή του στους 80°C επιδρά τα μέγιστα στην επιβίωση τυχόν παθογόνων βακτηρίων, στα τυριά της κατηγορίας αυτής. Οι Tatini και συν. (1973) παρασκεύασαν Mozzarella από γάλα το οποίο ενοφθάλμισαν με *S. aureus* που παράγει εντεροτοξίνη Α και με χρήση οξυγαλακτικών καλλιεργειών (*Streptococcus thermophilus* / *Lactobacillus bulgaricus*). Ο *S. aureus* πολλαπλασιάστηκε μόνο μέχρι το τέλος της στράγγισης. Η μετέπειτα διαδικασία της θέρμανσης στους 80°C και το πλάσιμο της τυρομάζας μείωσαν τον πληθυσμό

του *S. aureus*. Σε κανένα πειραματισμό δεν ανιχνεύτηκε εντεροτοξίνη Α, παρ' ό,τι σε ορισμένες περιπτώσεις ο *S. aureus* υπερέβη τα 2x10⁷ CFU/g τυριού.

3.1.7 Τυριά τυρογάλακτος

Τα τυριά τυρογάλακτος (νωπή Μυζήθρα, Μανούρι, Ανθότυρος, Ricottone, Mysot κ.ά.) παράγονται με θέρμανση στους 90°C - 95°C του τυρογάλακτος, στο οποίο προστίθεται 10-15% πλήρες γάλα ή και 0-15% κρέμα γάλακτος. Οι πρωτεΐνες του ορού του γάλακτος μαζί με μικρή ποσότητα καζεϊνών πήζουν στις συνθήκες θέρμανσης και pH που εφαρμόζονται και το πήγμα συλλέγεται, στραγγίζεται, αλατίζεται ελαφρά (1,0-1,5%) και μορφοποιείται. Είναι γνωστό ότι η θερμοκή επεξεργασία του τυρογάλακτος (90-95°C/15-30 min) καταστρέφει τους σταφυλοκόκκους. Μικρές όμως επιμολύνσεις κατά τα στάδια της στράγγισης και μορφοποίησης, του τεμαχισμού και της συσκευασίας, οδηγούν σε υψηλούς πληθυσμούς σταφυλοκόκκων αν η θερμοκρασία είναι ευνοϊκή (> 10°C). Τα τυριά τυρογάλακτος θεωρούνται νωπά και διακινούνται υπό ψύξη. Θεωρούνται ευνοϊκό υπόστρωμα για την ανάπτυξη των βακτηρίων λόγω του υψηλού pH (6,0-6,3), της έλλειψης οξυγαλακτικής χλωρίδας και του υψηλού ποσοστού υγρασίας τους (α_w = 0,94-0,96).

Οι Karaiannoglou και συν. (1983) ενοφθάλμισαν τυρί Μανούρι με 10³-10⁴ CFU/g και το συντήρησαν στους 10°C, 20°C και 33°C. Παρατήρησαν ότι εντεροτοξίνη Β παρήχθη στους 20°C και 33°C εντός 24 ωρών ανάλογα με τον αρχικό πληθυσμό του *S. aureus* και τη θερμοκρασία επώασης. Κατά το χρόνο που ανιχνευόταν εντεροτοξίνη ο πληθυσμός των σταφυλοκόκκων είχε υπερβεί τα 10⁷ CFU/g τυριού.

3.1.8 Μετουσιωμένα (ανακατεργασμένα) τυριά

Η τεχνολογία των μετουσιωμένων τυριών περιλαμβάνει, εκτός των άλλων, προσθήκη πολυφωσφορικών αλάτων και θέρμανση στους 80-85°C για πήξη της τυρομάζας. Οι δύο αυτοί παράγοντες συμβάλλουν ώστε τα μετουσιωμένα τυριά να είναι από τα πλέον ασφαλή, μικροβιολογικώς, τρόφιμα και να μην ενοχοποιούνται, για πρόκληση τροφικής δηλητηρίασης (Glass et al., 1998; Johnson et al., 1990).

Οι Glass και συν. (1998) ενοφθάλμισαν μετουσιωμένο τυρί με 10³ CFU/g και το συντήρησαν στους 30°C για 96 ώρες. Παρατήρησαν ότι ο πληθυσμός του *S. aureus* έμεινε σταθερός και πάντα κάτω από το όριο παραγωγής ανιχνεύσιμης ποσότητας εντεροτοξίνης.

3.1.9 Προϊόντα απομίμησης τυριών

Η δυνατότητα ανάπτυξης και παραγωγής εντεροτοξίνης σε προϊόντα απομίμησης τυριών μελετήθηκε από τους Bennet και Amos (1983). Δοκίμασαν έντεκα διαφορετικά είδη προϊόντων απομίμησης τυριών ενοφθαλμίζοντας πληθυσμούς του *S. aureus* της τάξεως των 30 CFU/g και επωάζοντάς τα στους 26°C. Διαπίστωσαν ότι σε 7 από τους έντεκα πειραματισμούς παρήχθη εντεροτοξίνη εντός 4 ημερών όταν ο *S. aureus* ανήλθε σε 3x10⁶ CFU/g. Οι συγ-

γραφείς δεν συσχέτισαν την ανάπτυξη του *S. aureus* και παραγωγή εντεροτοξίνης σε ορισμένα είδη προϊόντων απομύμησης τυριών με το pH, το συντελεστή ενεργού ύδατος ή τη σύνθεση του προϊόντος.

3.2 Γιαούρτη και οξυγάλακτα

Τα γαλακτοκομικά προϊόντα της κατηγορίας αυτής δεν αναφέρονται, μέχρι σήμερα, ως υπεύθυνα για πρόκληση σταφυλοκοκκικής τοξίνωσης. Αυτό προφανώς οφείλεται στο γεγονός ότι η παραγωγή των προϊόντων αυτών ξεκινά με ισχυρή θέρμανση του γάλακτος (90-95°C για 5 min) και ενοφθαλμισμό με μεγάλη αναλογία (1,5-2,5%) οξυγαλακτικής καλλιέργειας. Έτσι υπάρχει έντονη δραστηριότητα των οξυγαλακτικών βακτηρίων και ταχεία ζύμωση (pH=4,8 εντός 2-3 ωρών στη γιαούρτη) της λακτόζης. Το περιβάλλον γίνεται γρήγορα δυσμενές για τον *S. aureus* του οποίου τα κύτταρα όχι μόνο αναστέλλουν την ανάπτυξή τους, αλλά και σε μεγάλο βαθμό θνήσκουν. Τοιουτοτρόπως εάν επισυμβεί μία μόλυνση μετά τη θέρμανση του γάλακτος ο *S. aureus* δεν έχει πιθανότητα να πολλαπλασιαστεί από τη στιγμή που θα προστεθεί η οξυγαλακτική καλλιέργεια και αρχίσει η δράση της, ανεξάρτητα από τη θερμοκρασία επώασης (Minor and Marth, 1970; 1972; 1972a).

3.3 Κρέμα γάλακτος και Βούτυρο

Το βούτυρο έχει ενοχοποιηθεί για πρόκληση κρούσματος σταφυλοκοκκικής τοξίνωσης τύπου A, με 24 περιστατικά στις ΗΠΑ το 1970 (CDC, 1970). Για το λόγο αυτό οι Minor και Marth (1972β) μελέτησαν την παραγωγή εντεροτοξίνης A στην κρέμα στους 37°C και παρατήρησαν παραγωγή εντεροτοξίνης. Αντίθετα, στο βούτυρο, το οποίο ενοφθάλμισαν με 10⁵ - 10⁶ CFU *S. aureus*/g δεν παρατήρησαν σχηματισμό εντεροτοξίνης στους 23°C για 14 ημέρες, τόσο σε δείγματα με 1,0% NaCl όσο και 1,5% NaCl. Η εντεροτοξίνη που σχηματιζόταν στην κρέμα, περνούσε στο βούτυρο, κατά τη βουτυροποίηση σε αναλογία 8:1 έως 16:1.

Η ικανότητα της κρέμας με συγκέντρωση έως 40% σε λιπαρά να υποστηρίζει την ανάπτυξη του *S. aureus* σε πληθυσμούς ικανούς για παραγωγή ανιχνεύσιμης εντεροτοξίνης επιβεβαιώθηκε και από τους Halpin και Marth (1986). Αντίθετα, το βούτυρο όχι μόνο δεν είναι ευνοϊκό για την ανάπτυξη του *S. aureus*, αλλά σε συντήρηση 10°C ο πληθυσμός του βακτηρίου μειώνεται (Minor και Marth, 1972b).

3.4 Παγωτό

Το παγωτό και τα άλλα καταψυγμένα επιδόρπια γάλακτος έχουν ευρεθεί να περιέχουν εντεροτοξινογόνα στελέχη *S. aureus* (Batish and Chander, 1987; Tamminga et al., 1980; Massa et al., 1989), αλλά δεν έχουν αναφερθεί κρούσματα τροφικής τοξίνωσης από την κατανάλωση τέτοιων προϊόντων. Πάντως όλοι οι ερευνητές συμφωνούν ότι είναι πάντοτε πιθανός ο πολλαπλασιασμός του *S. aureus* και η παραγωγή εντεροτοξίνης στο μίγμα παγωτού, πριν από τη φάση κατάψυξης, εάν η θερμοκρασία του μίγ-

ματος κατά την ωρίμασή του είναι ευνοϊκή. Παρόμοιες συνθήκες μπορούν να υπάρξουν σε μονάδες παραγωγής μικρής κλίμακας με ατελή εξοπλισμό (π.χ. ζαχαροπλαστεία, μικρές βιοτεχνίες). Στην περίπτωση αυτή η εντεροτοξίνη θα υπάρξει στο έτοιμο καταψυγμένο προϊόν και θα παραμείνει δραστική για αρκετούς μήνες (Gogon et al., 1984).

4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Από την ανασκόπηση της διεθνούς βιβλιογραφίας σχετικά με τις συνθήκες παραγωγής σταφυλοκοκκικών εντεροτοξινών στο γάλα και τα γαλακτοκομικά προϊόντα μπορούν να εξαχθούν τα παρακάτω συμπεράσματα.

1. Το γάλα είναι άριστο υπόστρωμα για την ανάπτυξη του *S. aureus* και την παραγωγή εντεροτοξινών, διότι έχει ευνοϊκό pH, άριστο α_w και άφθονα θρεπτικά συστατικά. Έτσι σε ευνοϊκές θερμοκρασίες (άνω των 7°C) τα εντεροτοξινογόνα στελέχη του *S. aureus* μπορεί να πολλαπλασιαστούν γρήγορα και να παραγάγουν εντεροτοξίνη ακόμη και όταν ο αρχικός αριθμός κυττάρων του *S. aureus* είναι μικρός. Εάν παραχθεί τοξίνη, αυτή επιβιώνει από την οιαδήποτε περαιτέρω επεξεργασία του γάλακτος (παστερίωση, αφυδάτωση κτλ.) και ανευρίσκεται στα προϊόντα με όλες τις συνέπειες για τον καταναλωτή.

2. Στο αφυδατωμένο γάλα τοξίνη μπορεί να παραχθεί πριν από την αφυδάτωση, εάν υπάρξει μόλυνση του προϊόντος και η θερμοκρασία είναι ευνοϊκή. Εάν παραχθεί τοξίνη πριν από την αφυδάτωση, αυτή θα υπάρχει στη σκόνη γάλακτος. Εξάλλου, ύπαρξη έστω και λίγων κυττάρων *S. aureus* στο αφυδατωμένο γάλα μπορεί να δημιουργήσει πρόβλημα μετά την αναγέννηση της σκόνης γάλακτος, εφ' όσον το αναγεννημένο προϊόν ή τα προϊόντα στα οποία υπεισέλθη η σκόνη γάλακτος ως συστατικό, διατηρούνται σε ευνοϊκή για τον πολλαπλασιασμό του *S. aureus* θερμοκρασία.

3. Σε ό,τι αφορά στα τυριά, η ιδιαιτερότητα των εκατοντάδων ειδών δεν επιτρέπει τη γενίκευση των συμπερασμάτων. Παρά ταύτα, τα μέχρι σήμερα ερευνητικά δεδομένα επιτρέπουν να συμπεράνουμε ότι:

α. Γενικά κατά την παραγωγή τυριών, οι εντεροτοξινογόνοι σταφυλόκοκκοι μπορούν να πολλαπλασιαστούν και να παράγουν εντεροτοξίνες κατά τα πρώτα στάδια της παραγωγής, όταν το pH του τυροπήγματος είναι ακόμη υψηλό (6,0-5,0) και τα ανταγωνιστικά οξυγαλακτικά βακτήρια δεν έχουν ακόμη δημιουργήσει μεγάλους πληθυσμούς. Η ευνοϊκή αυτή για την ανάπτυξη του *S. aureus*, χρονική περίοδος εκτείνεται στα διάφορα είδη τυριών από μερικές (5-8) ώρες έως 48 ώρες το μέγιστο.

β. Στα νοπιά τυριά οι εντεροτοξινογόνοι σταφυλόκοκκοι μπορούν να πολλαπλασιαστούν και να παράγουν εντεροτοξίνη εάν δεν χρησιμοποιηθεί οξυγαλακτική καλλιέργεια και η φυσική οξυγαλακτική μικροχλωρίδα δεν είναι επαρκής. Τα υπάρχοντα δεδομένα δείχνουν ότι στα νοπιά τυριά με καλή δραστηριότητα οξυγαλακτικής χλωρίδας ο *S. aureus* γρήγορα αρχίζει να μειώνεται σε πληθυ-

σμό και δεν παράγεται εντεροτοξίνη ακόμη και με αρχικούς πληθυσμούς της τάξεως του 10^3 - 10^5 /ml γάλακτος.

γ. Τα μαλακά τυριά με μόνο γαλακτική ζύμωση (lactic types) καθώς και τα τυριά άλμης (π.χ. Φέτα) δεν αποδεικνύονται ευνοϊκό περιβάλλον για τον πολλαπλασιασμό του *S. aureus* και την παραγωγή εντεροτοξινών. Εντεροτοξίνη κατέστη δυνατό να παραχθεί μόνο με ισχυρά ενοφθαλμίσματα (10^4 - 10^5 CFU/ml γάλακτος) και μειωμένη δραστηριότητα ή πλήρη αδράνεια της οξυγαλακτικής καλλιέργειας. Αυτό υποδηλώνει λάθος στην τεχνολογία και δεν αντιπροσωπεύει τις κανονικές συνθήκες παραγωγής. Αντίθετα, τα μαλακά τυριά που εκτός από γαλακτική ζύμωση υφίστανται και επιφανειακή ζύμωση από μύκητες, (π.χ. *Penicillium camemberti*), ή από βακτήρια (*Brevibacterium linens*), είναι ευνοϊκό υπόστρωμα για τον πολλαπλασιασμό του *S. aureus* και την παραγωγή εντεροτοξινών.

δ. Στα σκληρά και ημισκληρά τυριά, η ανάπτυξη του *S. aureus* είναι πάντα δυνατή με επακόλουθο την παραγωγή εντεροτοξίνης, εάν ο αρχικός πληθυσμός του παθογόνου είναι υψηλότερος του 10^3 CFU/ml γάλακτος. Οι συνθήκες pH και οξυγαλακτικής χλωρίδας που επικρατούν κατά τα πρώτα στάδια τυροκόμησης επιτρέπουν τον πολλαπλασιασμό του *S. aureus* από 3 έως 5 λογαρίθμους/g, προτού η τιμή του pH κατέλθει σε ανασχετικά για τον *S. aureus* επίπεδα (κάτω του 5,0). Εξαίρεση αποτελούν τα ημισκληρά τυριά με εσωτερική ανάπτυξη ειδών *Penicillium* (π.χ.

Roquefort, Blue cheese κ.ά.) τα οποία δεν αποτελούν ευνοϊκό περιβάλλον για την ανάπτυξη του *S. aureus* και την παραγωγή εντεροτοξινών.

ε. Για τα τυριά τύπου Pasta filata ερευνητικά δεδομένα υφίστανται μόνο για το τυρί Mozzarella και αυτά δείχνουν ότι δεν ευνοείται η ανάπτυξη του *S. aureus*. Το ίδιο και για τα μετουσιωμένα τυριά.

στ. Τέλος, τα τυριά τυρογάλακτος και τα διάφορα προϊόντα απομίμησης τυριών (imitation cheeses) αποδεικνύονται ευνοϊκό υπόστρωμα για την ανάπτυξη του *S. aureus* και την παραγωγή εντεροτοξινών.

4. Τα προϊόντα ζυμώσεως όπως η γιαούρτη και τα ξυνογάλακτα δεν ευνοούν τον πολλαπλασιασμό του *S. aureus* και την παραγωγή εντεροτοξινών, λόγω της ταχείας μείωσης του pH (< 4,8) και του ισχυρού ανταγωνισμού της οξυγαλακτικής καλλιέργειας.

5. Η κρέμα με περιεκτικότητα σε λιπαρά έως 40% είναι ευνοϊκό υπόστρωμα για την παραγωγή εντεροτοξινών, ενώ το βούτυρο όχι. Εντεροτοξίνη που παράγεται στην κρέμα διέρχεται σε ποσοστό περίπου 10% στο βούτυρο.

6. Τέλος, στο παγωτό ο *S. aureus* μπορεί να πολλαπλασιαστεί στη φάση της ωρίμασης του μίγματος, εάν η θερμοκρασία είναι ευνοϊκή (> 10°C) και να παράγει εντεροτοξίνη η οποία μένει δραστική στο καταψυγμένο προϊόν για πολύ χρόνο. □

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ - REFERENCES

- Adesiyun AA, Tatini SR, Hoover DG (1984). Production of enterotoxins by *Staphylococcus hyicus*. *Vet. Microbiol.* 9:487-495.
- Ahmed A A-H, Mustafa MK, Marth EH (1983). Growth and survival of *Staphylococcus aureus* in Egyptian Domiati cheese. *J. Food Prot.* 46:412-415.
- Anifantakis FM (1991). Greek cheese: A tradition of centuries. National Dairy Committee of Greece. Athens.
- Anonymous (2001). *Staphylococcus* food poisoning in Japan. *IARS*, 22, 185-186.
- Anunciacao LLC, Linardi WR, Docarnco LS, Bergdoll MS (1994). Production of Staphylococcal enterotoxin in a white cheese. *Revista de Microbiologia* 25:68-71.
- Asao T, Kumeda Y, Kawai T, Shibata T, Oda H, Haruki K, Nakazawa H, Kozaki S (2003). An extensive outbreak of staphylococcal food poisoning, due to low-fat milk in Japan: estimation of enterotoxin A in the incriminated milk and powdered skim milk. *Epidemiol. Infect.*, 130:33-40.
- Asperger H (1994). *Staphylococcus aureus*. In "The significance of pathogenic microorganisms in raw milk" Int. Dairy Federation, Bulletin 9405 (S.I.).
- Asperger H, Zangerl P (2002). *Staphylococcus aureus*. In *Encyclopedia of Dairy Sciences* (eds. Roginski, H., Fuquay, J.W., Fox, P.) Academic press, Elsevier Science, London, p. 2563-2569.
- Batish VK, Chander H (1987). Occurrence of *Staphylococcus aureus* and their preformed enterotoxins in frozen dairy desserts. *Aust J. Dairy Technol.* 42:22-24.
- Becker K, Keller B, Von Eiff C, Bruck M, Lubritz G, Etienne J, Peters G (2001). Enterotoxigenic potential of *Staphylococcus intermedius*. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 12, 5551-5557.
- Bennet RW, Amos WT (1983). *Staphylococcus aureus* growth and toxin production in Imitation cheeses. *J. Food Sci.* 48:1670-1673.
- Boer E, Kuil D (1987). A survey of the microbiological quality of blue veined cheeses. *Neth. Milk dairy L.* 41:227-237.
- Bula CJ, Bolle J, Glauser MP (1995). An epidemic of foodborne listeriosis in Western Switzerland: description of 57 cases involving adults. *Clin. Inf. Dis.* 20-66.
- CDC (Center for Disease Control) (1970). Staphylococcal food poisoning traced to butter. *Alabama. Morb. Mort. Weekly Rep.* 19:217.
- Chopin A, Mocquot G, Le Great T (1977). Destruction de *Microbacterium lacticum*, *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus* au cours du lait par atomization. II. Influence des conditions de sechage. *Can J. Microbiol* 23:755-763.
- Chopin A, Tesone S, Vila J-P, Le Graet Y, Mocquot G (1978). Survie de *Staphylococcus aureus* au cours de la preparation et de la conservation de lait ecreme en poudre. Problemes poses par le denombrement des survivants. *Can J. Microbiol.* 24:1371.
- Clark WS and Nelson FE (1961). Multiplication of coagulase positive staphylococci in grade A raw milk samples. *J. Dairy Sci.* 44:232-236.
- Daminelli P, (1999). Dinamica della sopravvivenza di *Staphylococcus aureus* in fromaggi tipo crescenza ed Italico artificialmente contaminati. *Le Selezione Veterinaria*, 11/815-829.
- De Buyser ML et Lapeyre C (1995). Inventaire des souches isolées de 5 types de fromages au lait cru: le méthodes d'analyse, le dénombrement de *Staphylococcus aureus*, le détection des toxines. In "Compte-rendu de la journée Thématique Staphylocoques". ARILAIT-Recherches, 30 Mars 1995. Paris. pp.67-72.
- Dengrecont E, Vincent JP, Catteau M (1995). Comportement de souches de *Staphylococcus aureus* en expérimentation planifiée.

- Croissance et production de toxins. In "Compte-rendu de la journée Thématique Staphylocoques". ARILAIT-Recherches, 30 Mars 1995. Paris. pp.73-87.
- Donnelly CB, Lesli JE, Black LA (1968). Production of enterotoxin A in milk. *Appl. Microbiol.* 16:917-924.
- Erkmen O (1995). Behavior of *Staphylococcus aureus* in Turkish feta cheese during manufacturing and ripening. *J. Food Prot.* 58:1201-1205
- Evenson ML, Hinds, MW, Berstein RS, Bergdoll MS (1988). Estimation of human dose of staphylococcal enterotoxin A from a large outbreak of staphylococcal food poisoning, involving chocolate milk. *Int. J. Food Microbiol.*, 7, 311-316.
- FAO/WHO (1973). Code of principles concerning milk and milk products. International standard and standard methods of sampling and analysis for milk products. 7th Edit. FAO, CAC/M-1, 1973. Rome.
- Fonteca J, Pelaez C, Juarem M, Requena T, Gomez C, Ramos M (1990). Biochemical and microbiological characteristics of artisanal hard goat's cheese. *J. Dairy Sci.* 73:1150-1157.
- Galesloot TE, Stadhouders J (1968). The microbiology of spray dried milk products with special reference to *Staphylococcus aureus* and *Salmonella*. *Neth. Milk. Dairy J.* 22:158-172.
- Genigeorgis CA (1989). Present state of knowledge on staphylococcal intoxication. *Int. J. Food Microbiol.*, 9, 327-360.
- Glass KA, Kaufman KM, Johnson EA (1998). Survival of bacterial pathogens in pasteurized process cheese slices stored at 30°C. *J. Food Prot.* 61:290-294.
- Gogov Y, Slavchev G, Peeva T (1984). Cold resistance of *S. aureus* and A and C2 staphylococcus enterotoxins in ice cream. *Vet. Sci. (Sofia)*, 21:46.
- Gomez-Lucia E, Goyache J, Orden JA, Domenech A, Hernandez FJ, Quiteria JAR, Lopez B, Blanco JL, Suarez Q (1992). Growth of *Staphylococcus aureus* and synthesis of enterotoxin during ripening of experimental Manchego-type cheese. *J. Dairy Sci.* 75:19-26.
- Halpin MI, Marth EH (1986). Growth and enterotoxin production by *Staphylococcus aureus* in cream with various amounts of milk fat. *J. Food Prot.* 49:851.
- Hamama A, El Hankouri N, El Ayadi M, (2002). Fate of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in the presence of nisin producing *Lactococcus lactis* strain during manufacture of Iben, Moroccan traditional fresh cheese. *Int. Dairy J.* 12:933-938.
- Hoffner F (1996). *Staphylococcus aureus* en fabrication de Reblochon. Thèse de Doctorat Vétérinaire. Nantes.
- Ibrahim GF, Baldock AK, Radford DR, Ireland LB (1981a). Inhibition of *Staphylococcus aureus* growth and enterotoxin A production in Cheddar cheese produced with variable starter activity. *J. Food Prot.* 44:263-267.
- Ibrahim GF, Radford DR, Baldock AK, Ireland LB (1981b). Inhibition of growth of *Staphylococcus aureus* and enterotoxin A production in Cheddar cheese produced with induced starter failure. *J. Food Prot.* 44:189-193.
- ICMSF (International Commission on Microbiological Specifications for Foods) (1996). Microorganisms in Food 5: Characteristics of Microbial Pathogens. Blackie Academic and Professional, London. Klwers Academic/Plenum Publishers, New York. *Staphylococcus aureus*, Ch. 17, pp. 299-333.
- Ikram M, Leudecke O (1977). Growth and enterotoxin A production by *Staphylococcus aureus* in fluid dairy products. *J. Food Prot.* 40:769-771.
- Johnson EA, Nelson JH, Johnson M (1990). Microbiological safety of cheese made from heat treated milk, part II. Microbiology. *J. Food Prot.* 53:519-540.
- Karaioannoglou Pr, Koidis P, Mantis A (1983). Growth and enterotoxin production by *Staphylococcus aureus* in whey cheese Manouri. *Acta Microbiologica Hellenica* 28:86-95.
- Koenig S, Marth EH (1982). Behavior of *Staphylococcus aureus* in Cheddar cheese made with sodium chloride or mixture of sodium chloride and potassium chloride. *J. Food Prot.* 45:996-1002.
- Kosikowski FW, Mistry VV (1997). Cheese and fermented milk foods (F.V. Kosikowski, L.L.C., Publs, Westport, Conn).
- Letondeur-Lafarge V, Lahellec C (1997). Aspects hygiénique. (In "Le Fromage". Techn. Et Doc. Lavoisier, Paris, pp. 741-755.
- Lodi R, Malaspina P, Brasca M, (1994). Lactic acid bacteria: a quality parameter for fresh cheese. *Industria del latte.* 30:3-16.
- Lopez-Diaz TM, Santos JA, Gonzales CJ, Moreno B, Garcia M (1995). Bacteriological quality of a traditional Spanish Blue cheese. *Milchwissenschaft*, 50:503-505.
- Mantis A (1973). Production of staphylococcal enterotoxins in white-brined cheese Feta. Docent-Doctoral Thesis. School of Vet. Med. Univ. Thessaloniki (in Greek).
- Massa S, Poda G, Cesaroni D, Trovatelli LD, (1989). A bacteriological survey of ice-cream. *Food Microbiol.* 6:129.
- Medina M, Gaya P, Nunez M (1992). Gredos goat's milk cheese: microbiological and chemical changes throughout ripening. *J. Dairy Res.* 59:563-566.
- Meyrand A, Boutrand-Loei S, Ray-Gueniot S, Mazuy C, Gaspard CE, Jaubert G, Perrin G, Lapeyre C, Vernory-Rozand C (1998). Growth and enterotoxin production of *Staphylococcus aureus* during the manufacture and ripening of Camembert type cheeses from raw goat's milk. *J. Appl. Microb.* 85:537-544.
- Meyrand A, Vernozy-Rozand (1999). Croissance et enterotoxinogenese de *Staphylococcus aureus* dans différents fromages. *Revue Med. Vet.* 150:601-616.
- Minor TE, Marth EH (1970). Growth of *Staphylococcus aureus* in acidified pasteurized milk. *J. Milk Food Technol.* 33:516.
- Minor TE, Marth EH (1972). Fate of *Staphylococcus aureus* in cultured buttermilk, sour cream and yogurt during storage. *J. Milk and Food Technol.* 35:302-306.
- Minor TE, Marth EH (1972a). Loss of viability by *Staphylococcus aureus* in acidified media. Inactivation by several acids, mixtures of acids and salts of acids. *J. Milk Food Technol.* 35:191-196.
- Minor TE, Marth EH (1972b). *Staphylococcus aureus* and enterotoxin A in cream and butter. *J. Dairy Sci.* 55:1410-1414.
- Mueller M, Hahn G, Heeschen W (1996). Multiplication and production of enterotoxin by *Staphylococcus aureus* during the experimental manufacture of Camembert cheese. *Kieler Milchwirtschaftliche-forschungsberichte*, 48:195-207.
- Naguib MM, Nour MA, Noaman AA (1979). Survival of *Staphylococcus aureus* in Ras cheese. *Arch. Lebensmittelhygiene*, 30:227-228.
- Nunez M, Medina M (1980). Les microcoques et les staphylocoques dans le fromage bleu de Cabrabes. *Le Lait*, 60:171-183.
- Papageorgiou DK, Abraham A, Bori M, Doudounakis S (1998). Chemical and bacteriological characteristics of Pichtogalo Chanion cheese and mesophilic starter cultures for its production. *J. Food Prot.* 61:688-692.
- Provent C (1986). Contribution a l' étude de l' origine et de la maîtrise de la contamination du fromage Mont d' Or par *Staphylococcus aureus*. Thèse de Doctorat Vétérinaire, Lyon, 1986.
- Reiter B, Fewins BG, Fryer TF, Sharpe ME (1964). Factors affecting the multiplication and survival of coagulase positive staphylococci in Cheddar cheese. *J. Dairy Res.* 31:261-272.
- Ryser ET (1998). Public Health Concerns. In "Applied Dairy Microbiology". E.H. Marth and J.L. Steele, eds. Marcel Dekker. Inc. New York.
- Santos EC, Genigeorgis C (1981). Survival and growth of *Staphylococcus aureus* in commercially manufactured Minas cheese. *J. Food Prot.* 44:177-184.
- Scott R (1986). Cheesemaking practice. 2nd Edition. Elsevier Appl. Sci. Publisher. London, 1986.

- Tamminga SK, Beumer RR, Kampelmacher EH (1980). Bacteriological examination of ice-cream in the Netherlands. Comparative studies on methods. J. Appl. Bacteriol. 49:239-253.
- Tatini SP, Jezeski JJ, Olson JC, Casman EP (1971b). Factors influencing the production of staphylococcal enterotoxin A in milk. J. Dairy Sci., 54, 312-320.
- Tatini SR (1973). Influence of food environments on growth of *Staphylococcus aureus* and production of various enterotoxins. J. Milk Food Technol., 36, 559-563.
- Tatini SR, Jezeski JJ, Morris HA, Oslon JC Jr, and Casman EP (1971a). Production of *Staphylococcus enterotoxin A* in Cheddar and Colby cheeses. J. Dairy Sci. 54:815-825.
- Tatini SR, Soo HM, Cords BR, Bennett RW (1975). Heat stable nuclease for assessment of staphylococcal growth and likely presence of enterotoxins in foods. J. Food Sci. 40:352-356.
- Tatini SR, Wesala WD, Jezeski JJ, Morris HA (1973). Production of Staphylococcal enterotoxin A in Blue, Brick, Mozzarella and Swiss cheeses. J. Dairy Sci. 56:429-435.
- Tham WA, Hadju LJ, Danielson-Tham V (1990). Bacteriological quality of farm manufactured goat cheese. Epidemiol. Infect. 104:87-100.
- Van Schouwenburg-Van Foeken AW, Stadhouders JJ, Witsenburg WW (1978). The number of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* reached in Gouda cheese made under normal acidification conditions and the amount of enterotoxin produced. Neth. Milk Dairy J. 33:49-59.
- Vernozy-Rozand C, Meyrand A, Mazny C, Delignette-Muller ML, Jaubert G, Perrzin G, Lapeyer C, Richard Y (1998). Behaviour and enterotoxin production by *Staphylococcus aureus* during the manufacture and ripening of raw goat's milk lactic cheeses. J. Dairy Res. 65:273-281.
- WHO Surveillance programme for control of foodborne infections and intoxications in Europe 1993-1998. 7th report.
- Zarate V, Belda F, Perez C, Cardell E (1997). Changes in the microbial flora of Tenerife goats milk cheese during ripening. Int. Dairy J. 7:635-641.