

DIPLOMARBEIT

Methoden zur EU-konformen mikrobiologischen Untersuchung von Fleisch und Fleischerzeugnissen

angestrebter akademischer Grad

Magistra der Naturwissenschaften (Mag. rer.nat.)

Verfasserin / Verfasser: **Sabine Mifek**

Matrikel-Nummer: 0301475

Studienrichtung /Studienzweig A 474 Ernährungswissenschaften
(lt. Studienblatt):

Betreuerin / Betreuer: Ao. Prof. Dr. Friedrich BAUER

Veterinärmedizinische Universität Wien

Institut für Fleischhygiene, Fleischtechnologie und
Lebensmittelwissenschaft

Wien, im Juni 2009

Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei der Wirtschaftskammer Wien für den Auftrag dieser Arbeit bedanken.

Ein besonderer Dank geht an meine Betreuer Ao. Prof. Dr. Friedrich Bauer und Ass. Prof. Dr. Peter Paulsen für die Möglichkeit, meine Diplomarbeit am Institut für Fleischhygiene, Fleischtechnologie und Lebensmittelwissenschaft der Veterinärmedizinischen Universität durchführen zu können. Bedanken möchte ich mich sehr herzlich für die umfangreiche Unterstützung und die hervorragende Betreuung während der gesamten Dauer dieser Diplomarbeit.

Vielen Dank auch an alle Mitarbeiter des Instituts für die immer vorhandene Hilfsbereitschaft und das ausgezeichnete Arbeitsklima.

Über allem steht natürlich meine Familie, ohne die mein Studium niemals möglich gewesen wäre. Sie haben mich immer motiviert und mir den Rücken gestärkt. Außerdem möchte ich mich für die alltägliche Unterstützung meines Freundes bedanken, der alle meine Launen und Stimmungen stets tapfer ertragen hat.

Mein Dank gilt überdies allen Personen, die an dieser Arbeit mitwirkt und mir während meines Studiums mit Rat und Tat beigestanden haben.

Inhaltsverzeichnis

1	ZUSAMMENFASSUNG	1
2	ABSTRACT	3
3	EINLEITUNG UND FRAGESTELLUNG.....	5
4	LITERATURÜBERSICHT	7
4.1	ARBEITSSCHRITTE IN DER KULTURELLEN MIKROBIOLOGIE	7
4.1.1	Probenahme	7
4.1.2	Verdünnungsreihe	8
4.1.3	Kulturmedien.....	9
4.1.4	Bestimmung der Keimzahl.....	10
4.1.5	Bebrütung.....	11
4.1.6	Auswertung.....	11
4.1.7	Bestätigungsreaktionen	11
4.2	REFERENZMETHODEN ZUR KEIMBESTIMMUNG	11
4.3	ALTERNATIVMETHODEN ZUR KEIMBESTIMMUNG	15
4.3.1	PCR (Polymerase-Kettenreaktion).....	17
4.3.2	Biolumineszenz (ATP-Messung).....	18
4.3.3	DEFT (direkte Epifluoreszenz Filtertechnik)	20
4.3.4	Colorimetrische Verfahren.....	18
4.3.5	Durchflusszytometrie.....	19
4.3.6	Impedanzmethode.....	19
4.3.7	Bakterien Limulus-Test.....	19
4.3.8	Immunologische Verfahren	15
4.3.9	Gensonden (Hybridisierungstechnik).....	16
4.3.10	Bio- und Immunosensoren	18
4.3.11	FT-IR (Fourier-Transform-Infrarot)-Spektroskopie.....	20
4.3.12	Automatische DNA-Analyse.....	18
4.3.13	Membranfiltration	20
4.3.14	Spiralplattenmethode.....	21
4.3.15	MPN (Most Probable Number) - Verfahren	21
4.3.16	Direkte Bestimmung der Keimzahl	22
4.3.17	Bestimmung der Mikroorganismenkonzentration durch Trübungsmessung.....	22
4.3.18	Petrifilmverfahren	22
4.3.19	Tauchverfahren.....	23
4.4	RECHTLICHE RAHMENVORGABEN DER VO (EG) 2073/2005 FÜR ALTERNATIVMETHODEN	23
4.5	VERFAHREN DER VALIDIERUNG UND ZERTIFIZIERUNG.....	26

4.5.1	<i>Feststellung der Gleichwertigkeit von Methoden</i>	26
4.5.2	<i>Programme zur Validierung und Zertifizierung</i>	27
4.5.3	<i>Spezielle Fälle bei der Anerkennungen von Methoden</i>	27
4.6	VORGANGSWEISE BEI LABORINTERNEN VALIDIERUNGEN („IN HOUSE“ VALIDIERUNG)	28
4.6.1	<i>Schweizer Leitfaden zur Validierung mikrobiologischer Untersuchungsmethoden</i>	29
5	EIGENE UNTERSUCHUNGEN	31
5.1	PROBEENTNAHMESTELLEN BEI FASCHIERTEM.....	31
5.1.1	<i>Zielsetzung und Versuchsaufbau</i>	31
5.1.2	<i>Probenahme bzw. Probevorbereitung</i>	32
5.1.3	<i>Mikrobiologische Untersuchung</i>	33
5.2	VERGLEICHENDE UNTERSUCHUNG VON DESTRUKTIVER UND NICHT-DESTRUKTIVER PROBENAHME AN SCHLACHTKÖRPERHÄLFTEN	37
5.2.1	<i>Zielsetzung und Versuchsaufbau</i>	37
5.2.2	<i>Probenahme bzw. Probevorbereitung</i>	37
5.2.3	<i>Aufbereitung der Probe im Labor</i>	39
5.2.4	<i>Mikrobiologische Untersuchung</i>	40
5.3	VERGLEICHENDE UNTERSUCHUNG ZUR HERSTELLUNG VON SERIELLEN VERDÜNNUNGEN	44
5.3.1	<i>Zielsetzung und Versuchsaufbau</i>	44
5.3.2	<i>Probenahme bzw. Probevorbereitung</i>	45
5.3.3	<i>Mikrobiologische Untersuchung</i>	47
5.4	MODIFIKATION DER ISO BESTIMMUNGSMETHODE FÜR <i>ENTEROBACTERIACEAE</i> (ISO 21258-2).....	48
5.4.1	<i>Zielsetzung und Versuchsaufbau</i>	48
5.4.2	<i>Probenahme bzw. Probevorbereitung</i>	48
5.4.3	<i>Mikrobiologische Untersuchung</i>	50
5.4.4	<i>Bestätigungsreaktionen</i>	50
6	ERGEBNISSE UND DISKUSSION	52
6.1	PROBEENTNAHMESTELLEN BEI FASCHIERTEM.....	52
6.1.1	<i>Analyseergebnisse</i>	52
6.2	VERGLEICHENDE UNTERSUCHUNG VON DESTRUKTIVER UND NICHT-DESTRUKTIVER PROBENAHME AN SCHLACHTKÖRPERHÄLFTEN	54
6.2.1	<i>Analyseergebnisse</i>	54
6.3	VERGLEICHENDE UNTERSUCHUNG ZUR HERSTELLUNG VON SERIELLEN VERDÜNNUNGEN	59
6.3.1	<i>Analyseergebnisse</i>	59
6.4	MODIFIKATION DER ISO BESTIMMUNGSMETHODE FÜR <i>ENTEROBACTERIACEAE</i> (ISO 21258-2).....	62
6.4.1	<i>Analyseergebnisse</i>	62
7	SCHLUSSBETRACHTUNG	63
8	LITERATURVERZEICHNIS	67

9	ANHANG	77
9.1	PROBEENTNAHMESTELLEN BEI FASCHIERTEM	77
9.2	VERGLEICHENDE UNTERSUCHUNG ZUR HERSTELLUNG VON SERIELLEN VERDÜNNUNGEN.....	82
9.3	LISTE VALIDIERTER UND ZERTIFIZIERTER METHODEN.	87
9.3.1	<i>Salmonella</i>	87
9.3.2	<i>Listeria spp.</i>	93
9.3.3	<i>Listeria monocytogenes</i>	98
9.3.4	<i>Enterobacteriaceae</i>	102
9.3.5	Coliforme Bakterien	103
9.3.6	<i>E.coli</i>	107
9.3.7	<i>E.coli O157</i>	109
9.3.8	Gesamtkeimzahl	112
9.3.9	<i>Staphylococcus</i>	113

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Herstellung einer dezimalen Verdünnungsreihe (jeweils 1:10)	8
Abbildung 2: Probeentnahmestellen bei Faschiertem (Ansicht von oben; 4*Eckpunkte, 2*Zentrum, 2* Längsseite)	33
Abbildung 3: Zeitaufwand des automatisierten Systems zur Herstellung von seriellen Verdünnungen	60
Abbildung 4: Zeitaufwand des konventionellen Systems zur Herstellung von seriellen Verdünnungen ...	61

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: In der Verordnung (EG) 2073/2005 und 1441/2007 angeführte Referenzmethoden	12
Tabelle 2: In der VO (EG) 2073/2005 und in der österr. Leitlinie (2007) angeführte mikrobiologische Kriterien für Fleisch und Fleischerzeugnisse	12
Tabelle 3: Alternative Vorgehensweisen zur Untersuchung von Mikroorganismen nach Artikel 5 der VO (EG) 2073/2005	23
Tabelle 4: Vor 2003 bestehende ISO Normen, auf die sich die VO (EG) 2073/2005 beziehen, die ohne Einschränkungen (ggf. mit Ergänzungen oder als Neuauflage) noch gültig sind und in frühere (vor EN ISO 16140) Validierungsstudien einbezogen sein können	28
Tabelle 5: Kriterien für eine „in house“-Validierung	30
Tabelle 6: Zusammensetzung der Pepton-Kochsalzlösung	32
Tabelle 7: Zusammensetzung des Caseinpepton-Hefeextrakt-Glucose-Agars	34
Tabelle 8: Zusammensetzung des Coli ID Agars	34
Tabelle 9: Aerobe mesophile Keimzahl ($\log_{10}$ kbE/g) in verschiedenen Entnahmestellen (A bis F) von 10 Handelspackungen „gemischtes Faschiertes“	52
Tabelle 10: E. coli ($\log_{10}$ kbE/g) in verschiedenen Entnahmestellen (A bis F) von 10 Handelspackungen „gemischtes Faschiertes“	53
Tabelle 11: Bestimmung der aeroben mesophilen Gesamtkeimzahl aus destruktiv (mittels Stanze) und nicht-destruktiv (mittels Kratzschwamm) gewonnenen Oberflächenproben von Schweineschlachtkörpern	54
Tabelle 12 Bestimmung der Enterobacteriaceenkonzentration aus destruktiv (mittels Stanze) und nicht-destruktiv (mittels Kratzschwamm) gewonnenen Oberflächenproben von Schweineschlachtkörpern	56
Tabelle 13: Bestimmung der aeroben mesophilen Gesamtkeimzahl ($\log_{10}$ kbE/g oder cm^2) aus mit verschiedenen Verdünnungsmethoden untersuchten identischen Proben (ges. 62 Proben)	59
Tabelle 14: Benötigte Arbeitszeit zum Herstellen von 3 Verdünnungsstufen (in min)	60
Tabelle 15: Oxydasereaktion und Glucoseverwertung von „präsumtiven“ Enterobacteriaceenisolaten auf Violettröt-Galle-Glucose-Agar (56 Oberflächenproben von Schlachttieren)	62
Tabelle 16: Korrekturfaktoren für präsumtive Enterobacteriaceen	62
Tabelle 17: Analyseergebnisse der Gesamtkeimzahl verschiedener Probeentnahmestellen bei Faschiertem	77
Tabelle 18: Analyseergebnisse von E. coli verschiedener Probeentnahmestellen bei Faschiertem	79
Tabelle 19: Analysenergebnisse der Referenzmethode zur Herstellung von seriellen Verdünnungen	82
Tabelle 20: Analyseergebnisse der alternativen Methode zur Herstellung serieller Verdünnungen	83
Tabelle 21: Zeitmessergebnisse der Methoden zur Herstellung von seriellen Verdünnungen	85

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
μ	mikro
Abb.	Abbildung
Aqua dest.	destilliertes Wasser
Art.	Artikel
Art.-Nr.	Artikelnummer
bzw.	beziehungsweise
CO ₂	Kohlendioxid
cm	Zentimeter
d.h.	das heißt
DIN	Deutsches Institut für Normung
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dgl.	dergleichen
Eb	Enterobakterien
et al.	und andere
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EG	Europäische Gemeinschaft
etc.	und so weiter
Fa.	Firma
g	Gramm
h	Stunde
HACCP	Hazard Analysis and Critical Control Point
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
ISO	Internationale Organisation für Normung
Kap.	Kapitel
kbE	koloniebildende Einheiten
l	Liter
LFGB	Lebensmittel- und Futtermittelgesetzbuch
log ₁₀	Logarithmus zur Basis 10
min	Minute

ml	Milliliter
mm	Millimeter
MW	Mittelwert
Sd	Standardabweichung
Tab.	Tabelle
TVC	Total viable count
VO	Verordnung

1 Zusammenfassung

Das Lebensmittelhygienerecht der EU verpflichtet den Lebensmittelunternehmer zur Durchführung mikrobiologischer Untersuchungen. Neben mikrobiologischen Grenzwerten sind dabei auch Angaben zur Methodik der Probenahme, der Probenvorbereitung und zur Analyse selbst festgelegt. Zum Teil sind diese Festlegungen aber nur beispielhaft zu verstehen, das heißt, dass andere Verfahren, die eine gleichwertige Aussage ermöglichen, ebenfalls angewendet werden können.

In der vorliegenden Arbeit sollte geklärt werden, unter welchen Bedingungen Methoden als „gleichwertig“ anzusehen sind.

Im ersten Teil dieser Arbeit wurden die Möglichkeiten zur Anwendung von Alternativmethoden zu den in der Verordnung VO (EG) 2073/2005, geändert durch VO (EG) 1441/2007, vorgesehenen Referenzmethoden erläutert.

Dabei ergeben sich folgende Möglichkeiten:

- Testkits bzw. kommerzielle Verfahren gelten dann als gleichwertig, wenn sie nach dem Protokoll der Norm ISO 16140 (oder einem gleichwertigen Protokoll) gegen die entsprechenden Referenzmethoden der VO (EG) 2073/2005 validiert wurden und wenn die Validierung und ein bestehendes Qualitätssicherungssystem des Herstellers von einer dritten Stelle zertifiziert wurden.
- In der wissenschaftlichen Literatur beschriebene Verfahren- bzw. Methodenbeschreibungen gelten als gleichwertig, wenn sie im Labor gegen die Referenzverfahren der VO (EG) 2073/2005 werden. Dieser Fall ist in der VO (EG) 2073/2005 nicht explizit angeführt, und daher wäre eine Genehmigung durch die zuständige Behörde erforderlich.
- Andere Verfahren müssen gegen die Referenzverfahren der VO (EG) 2073/2005 validiert und durch die zuständige Behörde genehmigt werden.
- Die Untersuchung auf andere, als in der VO (EG) 2073/2005 angegebene, Mikroorganismen ist nur für Prozesshygienekriterien möglich. Dies bedeutet, dass eigene Grenzwerte und andere Methoden zur Anwendung kommen.

- Die Untersuchung mit anderen als mikrobiologischen Methoden ist nur für Prozesshygienekriterien möglich. Dies bedeutet, dass eigene Grenzwerte und Methoden zur Anwendung kommen. Es ist nicht festgelegt, wie eine Gleichwertigkeit zu den Prozesshygienekriterien bestimmt wird, es müssen allerdings die Ziele der VO (EG) 2073/2005 erreicht werden.

In einem gesonderten experimentellen Teil wurden Beispiele für laborinterne Validierungen von Modifikationen der Referenzverfahren beschrieben.

2 Abstract

According to the EU food law, food industries are obliged to perform microbiological analysis. There are detailed protocols for microbiological threshold values, sampling, sample preparation and for the analysis method itself. Partly those instructions work as guidelines, therefore the use of other methods that yield equivalent results is also possible. This study examines under which conditions the use of alternative methods is valid and can therefore be seen as equivalent.

In the first section the legal framework for alternative methods to the corresponding references is clarified.

Following results arose:

- Testkits, respectively commercial methods are equivalent if they are validated according to ISO Standard 16140 (or any equivalent protocol) towards the corresponding reference methods VO (EG) 2073/2005 and if the validation and an existing quality assurance of the supplier are certified by a third party.
- Methods that are described in scientific literature are equivalent if they are validated towards the corresponding reference methods VO (EG) 2073/2005, furthermore some cases require an authorization by the responsible administration.
- Other alternative methods have to be validated according to the reference methods of VO (EG) 2073/2005, contrary to the previous cases an authorization by the responsible administration is always required.
- Testing for microorganisms that are not listed in VO (EG) 2073/2005 is possible for process hygiene criteria only. In these cases other specific threshold values and methods have to be applied.
- The use of non microbiological alternative methods is also only valid for process hygiene criteria, and requires certain values and methods. However there are no specific instructions about equivalency for process hygiene criteria, necessarily the objectives by VO (EG) 2073/2005 have to be achieved.

In a separated experimental section examples for interlaboratory validations of modified reference methods are described.

3 Einleitung und Fragestellung

Die Gewährleistung der immer größer werdenden Ansprüche an die Lebensmittelsicherheit und -hygiene macht die mikrobiologische Eigenkontrolle in Lebensmittelunternehmen auf allen Stufen der Lebensmittelkette unerlässlich. Die diesbezüglichen rechtlichen Grundlagen sind in den Verordnungen (EG) 852/2004 und (EG) 2073/2005, geändert durch VO (EG) 1441/2007, verankert.

Die Verordnung (EG) 2073/2005 gibt mikrobiologische Grenzwerte für bestimmte Lebensmittel vor. Im Verbund mit diesen Grenzwerten werden auch die Untersuchungsmethoden, die Probenahme, die Prozessstufe, für die der Grenzwert gilt und Maßnahmen bei Nichteinhaltung des Grenzwertes normiert und als „Kriterium“ zusammengefasst. Dabei wird zwischen „Lebensmittelsicherheitskriterien“, die für das am Markt befindliche Lebensmittel gelten, und „Prozesshygienekriterien“, die sich auf das Ende des Herstellungsvorganges beziehen, unterschieden.

Der Lebensmittelunternehmer ist dabei verpflichtet, Untersuchungen sowohl zu Prozesshygiene-, als auch Lebensmittelsicherheitskriterien durchzuführen.

Im Anhang der Verordnung befinden sich die dafür vorgesehenen Referenzmethoden, wobei durch Artikel 5 eine gewisse Flexibilität bezüglich der Analyseverfahren eingeräumt wird. Dies geht aus der Wortwahl des Punktes 1 in Artikel 5: *„Die in Anhang I genannten ... Verfahren sind als Referenzverfahren heranzuziehen.“* hervor. Das heißt, dass die genannten Verfahren eben nicht zur Routineanwendung verwendet werden müssen, sondern Verfahren, die einem „Referenzverfahren“ entsprechen, angewendet werden können.

Dementsprechend wird Lebensmittelunternehmern die Möglichkeit zur Anwendung von Alternativverfahren zur mikrobiologischen Untersuchung eingeräumt, welche häufig bei gleicher Genauigkeit einen geringeren Ressourcenaufwand erfordern als die gängigen Referenzverfahren.

Im Rahmen dieser Arbeit soll geklärt werden, welche gegenwärtig angebotenen Analysemethoden als Alternativen zu den in der VO (EG) 2073/2005 angeführten Referenzverfahren im Rahmen der betrieblichen Eigenkontrolle anwendbar sind, wobei der Schwerpunkt auf Fleisch und Fleischerzeugnissen liegt.

Im zweiten Teil der Arbeit sollen eigene Untersuchungen durchgeführt werden, in denen die Referenzmethoden modifiziert werden, mit dem Ziel der Zeit-, Material- und somit Kostenersparnis bei gleichbleibender Analysegenauigkeit.

Analysedauer und Anforderungen an die Infrastruktur für eine Implementierung in betriebseigene Laboratorien werden berücksichtigt. Ebenso soll die Notwendigkeit der Validierung bzw. Zertifizierung der Verfahren behandelt werden.

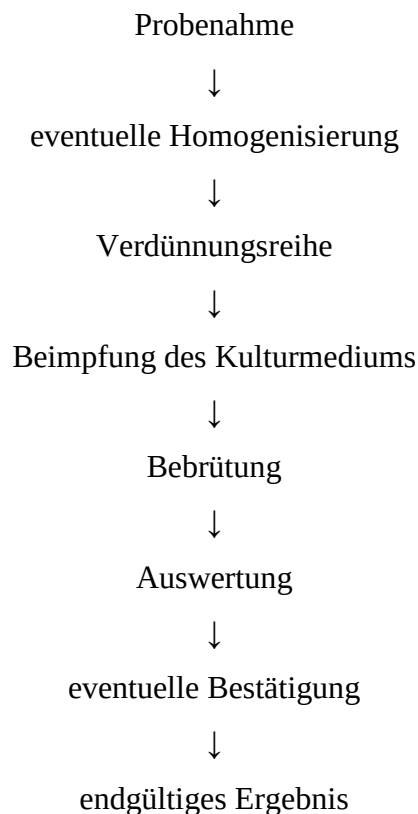
4 Literaturübersicht

4.1 Arbeitsschritte in der kulturellen Mikrobiologie

Die qualitative bzw. quantitative Untersuchung von pathogenen Mikroorganismen und Indikatorkeimen erfolgt in der Regel über kulturelle Nachweise [KRÄMER, 2005].

Bei qualitativen Verfahren wird ausschließlich auf das Vorhandensein bzw. Nichtvorhandensein von Mikroorganismen geprüft, wohingegen quantitative Methoden den Keimgehalt bestimmen (Keimzahl/g, cm² bzw. ml).

Die wesentlichen Arbeitsschritte sind in dem nachfolgenden Fließschema dargestellt.



4.1.1 Probenahme

Die sachgemäße Probenahme muss von geschultem, neutralem Personal durchgeführt werden, da sie sich entscheidend auf die Qualität der Ergebnisse der nachfolgenden

mikrobiologischen Untersuchung auswirkt. Die gezogenen Proben müssen bis zur Analyse bei 0 bis 5°C (tiefgefrorene Produkte bei 18°C) gelagert werden. Im Labor werden Teilmengen mit einem definierten Volumen bzw. Gewicht unter sterilen Bedingungen entnommen und eventuell vorzerkleinert [BAUMGART et al., 2004].

Als Referenzmethoden für die Entnahme und Aufbereitung des Probematerials sind die entsprechenden ISO-Normen und Richtlinien des Codex Alimentarius zu verwenden, ausgenommen es liegen genauere Vorschriften vor [BAUMGART, 2008].

4.1.2 Verdünnungsreihe

Um bei der späteren Auswertung eine auszählbare Keimzahl auf dem Kulturmedium zu erreichen, ist es in der Regel notwendig im Vorfeld eine Verdünnungsreihe anzulegen. In der Praxis ist die dezimale Verdünnung am gebräuchlichsten.

Zum Anlegen einer Erstverdünnung wird die Originalprobe durch Zugabe des neunfachen Volumens an Verdünnungsflüssigkeit 1:10 verdünnt. Aus dieser Verdünnungsstufe wird, nach Durchmischen auf dem Reagenzschüttler, 1 ml entnommen und zu 9 ml Verdünnungsflüssigkeit pipettiert. Ausgehend von dieser Stufe können je nach zu erwartender Keimzahl weitere Dezimalverdünnungen angelegt werden.

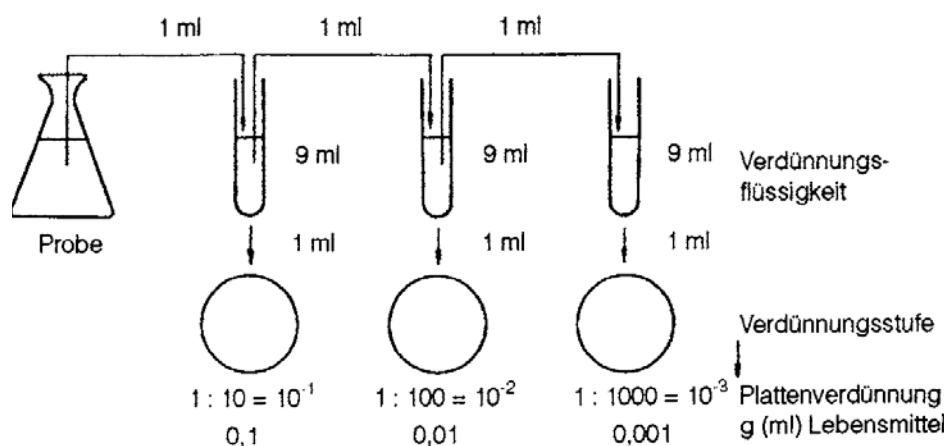


Abbildung 1: Herstellung einer dezimalen Verdünnungsreihe (jeweils 1:10) [Quelle: BAUMGART, 2008]

Die Herstellung von Verdünnungen ist in den Normen EN ISO 6887-2:2004, EN ISO 6887-3:2003 und EN ISO 6887-4:2003 geregelt [BAUMGART, 2008].

4.1.3 Kulturmedien

Kulturmedien unterscheiden sich je nach Verwendungszweck in ihrer Konsistenz und Zusammensetzung [BARTEL et al., 2003].

4.1.3.1 Nährbodenbestandteile

- Wasser (Aqua dest. oder demineralisiertes Wasser)
- stickstoffhaltige Verbindungen (z.B. Proteine)
- Kohlenstoff (z.B. Kohlehydrate)
- Wachstumsstoffe (z.B. Vitamine)
- Agar oder Gelatine (Gelierungsmittel)

Stickstoffhaltige Verbindungen, Kohlenstoffe und Wachstumsstoffe werden als komplexe Verbindungen (Fleischextrakt, Pepton, etc.) zugesetzt.

Von entscheidender Bedeutung, welche Mikroorganismen auf dem Nährboden wachsen, ist die pH-Wert Einstellung [BAUMGART, 2008].

4.1.3.2 Arten von Kulturmedien

- flüssige, halbfeste und feste Kulturmedien:
Feste Kulturmedien dienen der Keimzahlbestimmung und Untersuchung von Reinkulturen, halbfeste der Beweglichkeitsprüfung und flüssige der Kultivierung bei größeren Probenmengen und geringer erwarteter Keimzahl („Anreicherung“).
- Universalnährböden:
Auf Universalnährböden kann eine Vielzahl von Mikroorganismen wachsen (z.B. Plate-Count-Agar zur Bestimmung der Gesamtkeimzahl).
- Differentialmedien:
Durch den Einsatz von Differentialmedien können Mikroorganismen anhand bestimmter Stoffwechselleistungen identifiziert werden.

- Selektivnährböden:

Auf Selektivnährböden wird das Wachstum bestimmter Mikroorganismen gefördert und anderer gehemmt.

- Resuszitationsmedien:

In Resuszitationsmedien werden „gestresste“ Zellen wieder regeneriert bzw. „wiederbelebt“ [BAUMGART, 2008].

4.1.3.3 Art der Kultivierung

- Plattenkultur:

Bei der Plattenkultur wird das Impfmateriel entweder auf einen festen Agarnährboden in einer Petrischale ausgestrichen (Oberflächenverfahren), oder bereits mit dem noch flüssigen Medium vermischt (Gusskultur).

- Schrägagarkultur:

Mit Hilfe eines Schrägagars kann eine große Nährbodenoberfläche in einem Röhrchen erzielt werden, welche mit einer Öse beimpft werden kann.

- Stichkultur:

Das Impfmateriel wird mit einer Nadel oder Öse in ein halbfestes bzw. festes Medium eingebracht.

- Kontaktverfahren:

Durch einen auf einem Träger fixierten Nährboden können Oberflächenabdrücke gemacht werden.

- Bouillonkultur:

Bei der Bouillonkultur werden flüssige Nährmedien verwendet [BAUMGART, 2008; BARTEL et al., 2003].

4.1.4 Bestimmung der Keimzahl

- Gusskultur:

Die Probe bzw. ihre Verdünnung wird mit dem geschmolzenen Kulturmedium vermischt.

- Spatelverfahren:

Die Probelösung wird auf eine feste Nährbodenoberfläche mit einem Spatel ausgestrichen.

- Tropfplattenverfahren:

Die Analytlösung wird auf die Oberfläche von vorgetrockneten Nährmedien getropft [BAUMGART, 2008].

4.1.5 Bebrütung

Die optimale Bebrütungstemperatur und –dauer richtet sich nach den zu untersuchenden Mikroorganismen.

Bei der Bebrütung von Petrischalen muss darauf geachtet werden, dass sie mit dem Boden nach oben bebrütet werden, damit kein Kondenswasser auf die Nährböden tropft [BAUMGART, 2008].

4.1.6 Auswertung

Bei Anwendung des Spatelverfahrens, Tropfplattenverfahrens und der Gusskultur werden nach Ende der Bebrütungszeit alle „typischen“ kbE (Kolonie bildende Einheiten) der auswertbaren Verdünnungsstufen ausgezählt. Aus der gezählten Koloniezahl wird unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors das gewichtete arithmetische Mittel ermittelt [BAUMGART, 2008].

4.1.7 Bestätigungsreaktionen

Häufig sind zur Bestimmung der endgültigen Keimzahl Bestätigungsreaktionen gefordert, etwa ein Oxidasetest und Test auf Glucosefermentation zur Bestätigung von *Enterobacteriaceae* nach ISO 21528-2:2004.

4.2 Referenzmethoden zur Keimbestimmung

Referenzmethoden sind international anerkannte und akzeptierte Verfahren. Sie sind intensiv untersuchte Methoden, die eindeutig die Bedingungen und Verfahrensweisen zur Messung von Merkmalswerten beschreiben, von denen nachgewiesen ist, dass sie ihrem Verwendungszweck entsprechende Präzision und Richtigkeit besitzen.

Die in der VO (EG) 2073/2005 und VO (EG) 1441/2007 angeführten Referenzmethoden sind in Tab. 1 zusammengestellt, die für Fleisch,

Fleischererzeugnisse bzw. für Fleischbetriebe relevanten mikrobiologischen Kriterien sind in Tab. 2 zusammengefasst.

Tabelle 1: In der Verordnung (EG) 2073/2005 und 1441/2007 angeführten Referenzmethoden

Mikroorganismus /Agens	Referenzmethode
<i>Listeria monocytogenes</i>	EN/ISO 11290-1/-2
<i>Salmonella</i> sp.	EN/ISO 6579
Staphylokokken Enterotoxine	Referenzlabor-Methode*
<i>Enterobacter sakazaki</i>	ISO/TS 22964
<i>E. coli</i>	ISO 16649-1/-2; ISO/TS 16649-3
Histamin	HPLC**
Gesamtkeimzahl	ISO 4833
<i>Enterobacteriaceae</i>	ISO 21528-1/-2
koagulasepositive Staphylokokken	EN/ISO 6888-1/-2
präsumtive <i>Bacillus cereus</i>	EN/ISO 7932
Probenahme	Referenzmethode
Zur Untersuchung von Geräteoberflächen u. dgl.	ISO 18593
Zur Untersuchung von Schlachtkörpern	ISO 17604

* gemeint ist das gemeinschaftliche Referenzlaboratorium für koagulasepositive Staphylokokken

** [MALLE et al., 1996; DUFLOS et al., 1999]

Tabelle 2: In der VO (EG) 2073/2005 und in der österr. Leitlinie (2007) angeführte mikrobiologische Kriterien für Fleisch und Fleischerzeugnisse

Mikroorganismus /Agens	Referenzmethode	S/P*	Anzuwenden auf**
<i>Listeria monocytogenes</i>	EN/ISO 11290-1***	S	Andere als für Säuglinge oder für besondere medizinische Zwecke bestimmte, verzehrsfertige Lebensmittel, die die Vermehrung von <i>L. monocytogenes</i> begünstigen können
<i>Listeria monocytogenes</i>	EN/ISO 11290-2****	S	Andere als für Säuglinge oder für besondere medizinische Zwecke bestimmte, verzehrfertige Lebensmittel, die die Vermehrung von <i>L. monocytogenes</i> begünstigen können (In Verkehr gebrachte Erzeugnisse während der Haltbarkeitsdauer); Andere als für Säuglinge oder für besondere medizinische Zwecke bestimmte, verzehrfertige Lebensmittel, die die Vermehrung von <i>L. monocytogenes</i> nicht begünstigen können (bevor das Lebensmittel die unmittelbare Kontrolle des Lebensmittelherstellers verlassen hat). Nach der österr. Leitlinie (2007) betrifft dieses Kriterium generell Rohwürste, Rohpökelwaren, sowie im Ganzen erhitzte, offene oder an- bzw. aufgeschnittene Brühwürste, Kochwürste, Kochpökelwaren; weiters an- oder aufgeschnittene Brühdauerwürste.
<i>Salmonella</i> sp.	EN/ISO 6579	S	Hackfleisch, Faschiertes und Fleischzubereitungen zum Rohverzehr oder zum Verzehr in durcherhitztem Zustand; Separatorenfleisch; Fleischerzeugnisse, die zum Verzehr in rohem Zustand bestimmt sind, außer Erzeugnisse, bei denen das Salmonellenrisiko durch das Herstellungsverfahren oder die Zusammensetzung des Erzeugnisses ausgeschlossen ist (betrifft nach österr. Leitlinie (2007) nur streichfähige

			Rohwürste); Fleischerzeugnisse aus Geflügelfleisch, die zum Verzehr in durcherhitztem Zustand bestimmt sind.
<i>Salmonella</i> sp.	EN/ISO 6579	P	Schlachtkörper von Rind, Schaf, Ziege, Pferd, Schwein, Broiler, Pute
<i>E. coli</i>	ISO 16649-2	P	Faschiertes, Separatorenfleisch, Fleischzubereitungen
Gesamtkeimzahl	ISO 4833	P	Schlachtkörper von Rind, Schaf, Ziege, Pferd, Schwein; Faschiertes, Separatorenfleisch, Fleischzubereitungen
<i>Enterobacteriaceae</i>	ISO 21528-2	P	Schlachtkörper von Rind, Schaf, Ziege, Pferd, Schwein
Probenahme	Referenzmethode		
Zur Untersuchung von Geräteoberflächen und dergleichen	ISO 18593	S/P	In Verbindung mit der Untersuchung auf <i>L. monocytogenes</i> In Verbindung mit der Untersuchung auf Gesamtkeimzahl und <i>Enterobacteriaceae</i>
Zur Untersuchung von Schlachtkörpern	ISO 17604	P	In Verbindung mit der Untersuchung auf Gesamtkeimzahl und <i>Enterobacteriaceae</i>

* P = Prozesshygienekriterium; S = Lebensmittelsicherheitskriterium

** Lebensmittelsicherheitskriterien gelten, sofern nicht anders angeführt, für in Verkehr gebrachte Erzeugnisse während der Haltbarkeitsdauer; Prozesshygienekriterien gelten für das Ende des Herstellungsprozesses bzw. bei Schlachtkörpern von Broiler und Pute für den Schlachtkörper nach der Kühlung und bei Schlachtkörpern von Rind, Schaf, Ziege, Pferd und Schwein für Schlachtkörper nach dem Zurichten, aber vor der Kühlung.

*** qualitatives Verfahren (Nachweis in 25 g)

**** quantitatives Verfahren (Grenzwert 100 KbE/g)

4.3 Alternativmethoden zur Keimbestimmung

In vielen Fällen ist die Anwendung der vorliegenden ISO Referenzmethoden im Rahmen der mikrobiologischen Eigenkontrolle problematisch und nur beschränkt möglich. Häufig liegen Untersuchungsergebnisse erst nach mehreren Tagen vor, bzw. ist der Ressourcenaufwand dieser Methoden sehr hoch.

Zahlreiche alternative Verfahren werden bereits angeboten bzw. schon erfolgreich eingesetzt, die auf Grund ihrer Präzision, einfachen Ausführbarkeit, Automatisierbarkeit, erhöhten Geschwindigkeit, Genauigkeit, sowie in Bezug auf Miniaturisierung und Kostenersparnis Vorteile bieten. Einige dieser Verfahren sind in nationale Normenwerke (z.B. DIN) oder Methodensammlungen (z.B. §64 LFGB) aufgenommen worden.

Die nachstehende Aufzählung soll einen Überblick der wichtigsten Alternativmethoden verschaffen.

4.3.1 Immunologische Verfahren

Immunologische Analyseverfahren beruhen auf einer Antigen-Antikörperreaktion. Die Bindung zwischen Antigen und Antikörper ist dabei sehr spezifisch und kann mit verschiedenen Methoden nachgewiesen werden. In der Lebensmittelanalytik wird in der Regel mit bekannten Antikörpern gearbeitet, um das gesuchte Antigen (in diesem Fall meist Oberflächenstrukturen der Bakterienzelle oder Geißelbestandteile) aufzuspüren.

Das älteste immunologische Verfahren beruht auf Agglutinationsreaktionen. Dabei kommt es zu einer sichtbaren Verklumpung zwischen Antigen und Antikörper. Heutzutage wird dieses Testprinzip meist mit Hilfe von Partikeln, wie etwa Latex (Reverse Passive Latexagglutination → RPLA) oder Erythrozyten durchgeführt.

Eine wesentliche Verbesserung der Nachweisempfindlichkeit auf diesem Gebiet bringt der Einsatz enzymmarkierter Nachweisreagenzien (Enzymimmunoassay → EIA, Enzyme Linked Immunosorbent Assay → ELISA).

Im Wesentlichen können zwei Systeme unterschieden werden: Sandwich-ELISA und kompetitiver ELISA.

Mit dem Sandwich-ELISA können Antigene erst ab einer gewissen Mindestgröße nachgewiesen werden, da wenigstens zwei Antikörperbindungsstellen (Epitope) im

Molekül vorhanden sein müssen. Die Epitope müssen räumlich soweit voneinander entfernt sein, dass die Bindung von zwei unterschiedlichen Antikörpern möglich ist.

Die zentralen Schritte des Sandwich-ELISA sind:

1. Antikörper, welche gegen das gesuchte Antigen gerichtet sind, werden an eine Festphase (etwa eine Mikrotiterplatte) gebunden.
2. Durch Hinzufügen der Probe kommt es, falls die gesuchten Antigene enthalten sind, zur Antigen-Antikörperbindung.
3. Nach einem Waschschrift wird ein zweiter spezifischer Antikörper, welcher mit einem Enzym markiert ist, hinzugefügt. Dieser bindet wiederum an das Antigen und bildet gemeinsam mit dem am Träger fixierten Antikörper einen sogenannten Sandwich-Komplex.
4. Nachdem die nicht gebundenen Reagenzien heraus gewaschen sind, wird die Enzym-Substratreaktion durchgeführt, wobei die Konzentration der Reaktionsprodukte direkt proportional zur Antigenkonzentration der Probe ist.

Im Gegensatz dazu wird das kompetitive ELISA zur Analyse niedermolekularer Antigene verwendet. Der erste Schritt ist identisch mit dem Sandwich-ELISA-Test. Daraufhin wird die Probe gleichzeitig mit einem enzymgebundenen Antigen zugefügt. Auf diese Weise konkurriert das gesuchte Antigen aus der Probe mit dem enzymmarkierten Antigen um die Bindungsstellen der, an einer Festphase fixierten, Antikörper. Nach einem Waschschrift erfolgt die Messung der Enzym-Substratintensität, welche in diesem Fall umgekehrt proportional zur Antigenkonzentration ist, da sie umso geringer ist, je mehr Antigene in der Probe sind [KRÄMER, 2007; BELITZ et al., 2007; BUCHANAN & SCHULZ, 1992; ENGVALL & PERLMANN, 1971; VAN WEEMEN & SCHUURS, 1971; WIENECKE & GILBERT, 1987].

4.3.2 Gensonden (Hybridisierungstechnik)

Gensonden sind einsträngige DNA-Moleküle, die sich spezifisch an komplementäre DNA-Stränge binden. Sie haben eine Länge von 15 bis über 1000 Basen. Ihre Spezifität basiert auf der Anordnung der vier DNA-Basen (Adenin, Cytosin, Guanin, Thymin).

Die Bindung von zwei einzelsträngigen Nukleinsäuren (in diesem Fall der Gensonde an die Ziel-DNA-Sequenz) wird als Hybridisierung und das dabei gebildete Produkt, der Doppelstrang, als Hybrid bezeichnet. Auf diese Weise können durch eine bekannte Basensequenz und Markierung (Fluoreszenzfarbstoffe, Enzyme, radioaktive Isotope, etc.) der Sonden bestimmte Gene molekularbiologisch detektiert werden [EHRMANN & VOGEL, 2008; AMANN et al., 1992].

4.3.3 PCR (Polymerase-Kettenreaktion)

Diese molekularbiologische Methode hat sich weltweit in verschiedenen Anwendungsbereichen sehr rasch durchgesetzt.

Sie wird eingesetzt, um bestimmte DNA-Abschnitte *in vitro* millionenfach zu kopieren. Üblicherweise durchläuft der PCR-Zyklus drei Stufen.

Die erste Phase wird als Denaturierung bezeichnet und führt zur Spaltung der DNA-Doppelstränge in ihre Einzelstränge bei Temperaturen zwischen 92 und 98 °C. In der zweiten Stufe kommt es beim Abkühlen auf <50°C zur Hybridisierung der Primer (Starter-Oligonukleotide zur Markierung des Startpunktes der DNA Synthese). Die Primer lagern sich dabei jeweils an die komplementären Basenabschnitten an. Im letzten Schritt des Zyklus wird die Temperatur auf 72°C erhöht. Bei dieser Temperatur hat die zugegebene, hitzestabile Taq-Polymerase ihr Aktivitätsmaximum. Sie kopiert den festgelegten DNA-Abschnitt anhand der Vorlage des komplementären Stranges. Anschließend wird die Temperatur erneut auf 92 – 98°C angehoben, um die DNA wieder in ihre Einzelstränge aufzutrennen.

Der PCR-Zyklus kann auf diese Weise bis zu 35-mal wiederholt werden. Durch diesen Vorgang erhält man aus relativ geringen DNA-Mengen ein exponentiell vermehrtes Amplifikationsprodukt, welches mit verschiedenen Nachweismethoden (hauptsächlich elektrophoretisch) detektiert werden kann. Die PCR bietet aufgrund vieler unterschiedlicher Techniken ein sehr weites Anwendungsspektrum, ist aber auch durch ihre Fehlerquote im Verlauf der einzelnen PCR Schritte begrenzt [BAUMGART, 2008; JANSOHN, 2007; LOTTSPPEICH & ENGELS, 2006; NEWTON & GRAHAM, 1994; REGENASS-KLOTZ, 2005].

4.3.4 Automatische DNA-Analyse

Bei dieser Methode werden Keime durch Hitze zuerst inaktiviert und deren DNA extrahiert. Daraufhin wird die DNA mit Hilfe einer Gelelektrophorese abgetrennt und nach Hybridisierung mit einer markierten Sonde detektiert. Auf diese Weise liegen Ergebnisse schon nach etwa 8 Stunden vor [BAUMGART, 2008].

4.3.5 Biolumineszenz (ATP-Messung)

Jede lebende Zelle (bakterielle und somatische) enthält Adenosintriphosphat (ATP) in relativ konstanter Menge zur chemischen Energiebereitstellung. Aufgrund dieser Tatsache ist es möglich, durch Analyse des ATP-Gehaltes indirekt den Gehalt lebender Mikroorganismenzellen zu bestimmen. Durch die sogenannte Luciferin-Luciferase-Reaktion kommt es zur Freisetzung von Lichtquanten (Biolumineszenz), deren Energiegehalt proportional zur ATP-Konzentration ist. Der Nachweis von Mikroorganismen erfolgt innerhalb weniger Minuten [KYRIAKIDES & PATEL, 1994].

4.3.6 Bio- und Immunosensoren

Bio- bzw. Immunosensoren sind Messfühler, die spezielle, sensitive biologische Elemente (Enzyme, Antikörper, DNA) besitzen, mit denen sie die gesuchten Objekte aufspüren können. Diese Elemente sind wiederum an Empfänger (z.B. Optoden) gekoppelt [BAUMGART, 2008].

4.3.7 Colorimetrische Verfahren

Colorimetrische Verfahren beruhen auf einer pH-Wert Änderung, welche durch die Bildung von Kohlendioxid und organischen Säuren hervorgerufen wird. Das System enthält einen colorimetrischen Sensor, der sich verfärbt, wenn Mikroorganismen Säuren oder CO₂ bilden.

Bei anderen colorimetrischen Verfahren werden die durch pH- und Eh-Wert Änderungen entstehenden Farbindikatorumschläge photometrisch gemessen [BAUMGART, 2008].

4.3.8 Durchflusszytometrie

Bei der Durchflusszytometrie werden Keime mit einem Fluorochrom angefärbt und anschließend durch eine Messzelle mit Fluoreszenzanregung geschickt. Die entstehenden Emissionsimpulse werden mit einem Photodetektor automatisch ausgewertet.

Durch Kombination mit immunomagnetischer Separation ist es möglich, pathogene Keime in kürzester Zeit zu analysieren [MEYER & SINELL, 1996; SLAVIK & WANG, 1999].

4.3.9 Impedanzmethode

Das Impedanzverfahren hat seit mehr als einem Jahrzehnt im Bereich der mikrobiologischen Analytik an Bedeutung gewonnen [EISGRUBER et al., 1999].

Das Prinzip dieser Methode beruht auf einer Änderung der elektrischen Leitfähigkeit oder des Widerstandes in einem entsprechenden Kulturmedium durch den Anstieg der Stoffwechselprodukte beim Bakterienwachstum. Je höher der Anfangskeimgehalt ist, umso schneller kann eine Widerstandsänderung nachgewiesen werden bzw. erfolgt eine Detektion erst ab einem Keimgehalt von $>10^6$ /ml. Durch die Wahl eines geeigneten Kulturmediums bei der Inkubation kann außerdem eine Selektion der Mikroorganismen erfolgen.

Die Methode ist einerseits an spezifische Geräte gebunden, hat aber andererseits den Vorteil, dass damit große Probemengen in relativ kurzer Zeit bearbeitet werden können [BAUMGART, 2008; BALTES & KROH, 2004].

4.3.10 Bakterien Limulus-Test

Das Testprinzip beruht darauf, dass das Blut von Pfeilschwanzkrebse (in Form von Lysaten) beim Kontakt mit Lipopolysacchariden gramnegativer Bakterien gerinnt. Aufgrund einer Agglutinationsreaktion kommt es zur Gelbildung der Zellwandbestandteile dieser Bakterien und der Amöbozyten (Blutkörperchen) des Krebses. Durch lineare Korrelation zwischen der Gelbildung und dem Endotoxingehalt kann auf die Keimzahl gramnegativer Bakterien rückgeschlossen werden.

Neben Röhren- und Mikrotitertests werden auch automatisierte Systeme angeboten, die mit Trübungsmessung und chromogenen Nachweisverfahren arbeiten [BAUMGART, 2008].

4.3.11 FT-IR (Fourier-Transform-Infrarot)-Spektroskopie

Das Prinzip der FT-IR-Spektroskopie beruht darauf, dass Atome von Molekülen durch infrarotes Licht (eines bestimmten Frequenzbereiches) angeregt werden. Auf diese Weise ergeben sich für Keime spezielle, reproduzierbare Infrarotspektren. Durch den Vergleich dieser Spektren mit Datenbanken erfolgt die Zuordnung von Mikroorganismen [BAUMGART, 2008].

4.3.12 DEFT (direkte Epifluoreszenz Filtertechnik)

Bei der direkten Epifluoreszenz Filtertechnik wird die Untersuchungsprobe durch Membranfilter (vom Nucleopore-Typ) filtriert. Dabei wird eine Aufkonzentrierung der Mikroorganismen erreicht, außerdem werden sie homogen über den Siebfilter verteilt. Im Anschluss werden die Keime mit einem Fluoreszenzfarbstoff (meist Acridinorange) angefärbt und im Fluoreszenzmikroskop mit Hilfe eines Bildanalysegerätes ausgezählt. Ergebnisse sind nach etwa einer Stunde verfügbar.

Entscheidend hierbei ist, dass die Untersuchungsprobe filtrierbar ist und dass der enthaltene Keimgehalt über $10^4/\text{ml}$ oder g liegt [MEYER & SINELL, 1996; BAUMGART, 2008]. Die Anwendung als Schnellmethode zur Keimzahlbestimmung auf Schlachtkörpern beschreiben DEIBL et al. (1998).

4.3.13 Membranfiltration

Mit Hilfe von Membranfiltern können je nach Zusammensetzung und Porengröße (zwischen 0,22 und 0,45 μm) bestimmte Keime von einer Probelösung abgetrennt werden. Nach Bebrütung auf einem Nährmedium erfolgt die Bestimmung der Keimzahl. Das Verfahren ist auf filtrierbare Proben beschränkt.

Eine spezielle, vorteilhafte Methode, das HGMF-(Hydrophobic-Grid-Membran-Filter)Verfahren, stellt eine Kombination aus Membranfiltrertechnik und MPN (Most Probable Number)-Verfahren dar [AUCKENTHALER & HUGGENBERGER, 2002; BAUMGART, 2008].

4.3.14 Spiralplattenmethode

Bei dieser Methode wird eine genau definierte Menge an Probelösung mit einem Präzisionsdispenser spiralförmig auf einer sich drehenden Agarplatte vom Rand bis zur Mitte verteilt. Die Bestimmung der Keimzahl erfolgt mittels Bildanalyse, Schablone oder Laser-Counter. Das Verfahren ist auf partikelfreie Probelösungen beschränkt [DASCHNER et al., 2006; BAUMGART, 2008].

4.3.15 MPN (Most Probable Number) - Verfahren

Das MPN-Verfahren beruht auf statistischen Grundlagen und liefert einen Schätzwert der Lebendkeimzahl. Die Methode ist durch einen speziellen Probenansatz gekennzeichnet. Aus jeder Einwaage bzw. hergestellten Verdünnung werden parallel mehrere (meist drei), mit Flüssignährboden befüllte, Röhrchen mit der Analytlösung beschickt. Nach der Bebrütung werden alle bewachsenen Röhrchen ermittelt. Aus den drei aufeinanderfolgenden Verdünnungsstufen erhaltenen Ergebnissen wird die sogenannte Stichzahl ermittelt, mit der anschließend aus passenden MPN-Tabellen die wahrscheinlichste Keimzahl ermittelt werden kann [JURINKA & MIFEK, 1994; BAUMGART, 2008; HOUGHTBY et al., 1992; PAULSEN et al., 2006, 2008].

Die Entwicklung des MPN Verfahrens wurde von KOBURGER und OBLINGER (1975) zusammengefasst. Demnach ist bei einer kleineren Anzahl Wiederholungen verschieden großer Probenaliquote eine ebenso gute Genauigkeit der Ergebnisse gegeben wie bei der Untersuchung einer großen Anzahl von Probenaliquoten gleicher Größe. Die Präzision steigt mit der Anzahl untersuchter Aliquote. MPN Verfahren mit z.B. 10 Wiederholungen je Verdünnungsstufe haben relativ enge 95% Konfidenzintervalle von etwa $0,6 \log_{10}$. Dies ist aber extrem arbeitsaufwendig. Auch die Umrechnung der positiv/negativ Ergebnisse erfolgt nicht ganz ohne Schwierigkeiten und unterliegt immer wieder gewissen Revisionen [KOBURGER & OBLINGER, 1975; USDA-FDA, 2001; BLODGETT & GARTHRIGHT, 2003].

In neuerer Zeit wurden einige anwenderfreundliche MPN Verfahren entwickelt. Die manuelle Arbeit (Verdünnen, Dispensieren) wird dabei durch automatisierte Partitionierungsverfahren reduziert. Dabei gibt es Verfahren, bei denen eine hohe Anzahl von Aliquoten einheitlicher Größe untersucht wird.

4.3.16 Direkte Bestimmung der Keimzahl

Dieses Verfahren kann zur Bestimmung der Gesamtkeimzahl verwendet werden. Die Auszählung der Keime erfolgt in Zählkammern (0,02 mm Tiefe) mit einem Phasenkontrastmikroskop. Bei stark beweglichen Mikroorganismen muss der Probe Formalin beigefügt werden, um die Bakterien zu immobilisieren und damit die Zählung zu ermöglichen [BAUMGART, 2008].

4.3.17 Bestimmung der Mikroorganismenkonzentration durch Trübungsmessung

Die Keimzahlbestimmung einer Probensuspension kann durch Ermittlung der Trübung erfolgen. Dabei wird die optische Dichte der Lösung mit Hilfe eines Photometers oder eines Trübungsmessgerätes entweder in Form der Intensität des gestreuten Lichtes bzw. als Extinktion gemessen.

Um eine zu große Eigentrübung der Untersuchungsprobe auszuschließen, muss auf eine ausreichende Verdünnung geachtet werden [BAST, 1999; BARTEL et al., 2003].

4.3.18 Petrifilmverfahren

Das Petrifilmverfahren stellt eine einfache und schnelle Alternative zu herkömmlichen agarhaltigen Nährmedien in Petrischalen dar. Das gebrauchsfertige System besteht aus einer Deck- und Unterfolie, welche das getrocknete Medium und ein kaltquellendes, wasserlösliches Guar enthalten. Außerdem ist ein Indikatorfarbstoff enthalten, um die Kolonien sichtbar zu machen.

Bei der praktischen Anwendung wird die Deckfolie angehoben und 1 ml Probelösung auf die Inokulationszone pipettiert. Mit Hilfe eines Stempels wird der Tropfen gleichmäßig verteilt. Nach der Bebrütung werden wie bei der klassischen Methode in Petrischalen alle Kolonien ausgezählt.

Die einzige Einschränkung der „PetrifilmTM“-Plates“ mit Standard-Medium besteht bei gleichzeitiger Anwesenheit einiger Bazillen und Schimmelpilze, da diese den Guar im Medium abbauen können [JORDANO & MEDINA, 1999; BAUMGART, 2008].

4.3.19 Tauchverfahren

Beim Tauchverfahren werden Kunststoffträger, die auf einer oder auf beiden Seiten mit Kulturmedium beschichtet sind, in die Probelösung getaucht. Nach Bebrütung im Röhrchen wird die Keimdichte durch Vergleich mit Vorlagen bestimmt. Die Methode ist semiquantitativ und für Koloniezahlen ab ca. 10^3 /ml anwendbar [BAUMGART, 2008; BÜLTE & REUTER, 1982].

4.4 Rechtliche Rahmenvorgaben der VO (EG) 2073/2005 für Alternativmethoden

Die VO (EG) 2073/2005 legt in Artikel 5 fest, welche, bzw. unter welchen Bedingungen Abweichungen von den in Anhang 1 der Verordnung genannten Referenzverfahren bzw. Vorgangsweisen zulässig sind.

Dies betrifft:

1. die Anzahl der untersuchten Proben und den Probenahmeplan (Punkt 3 der Verordnung);
2. die Untersuchung auf alternative Mikroorganismen oder die Anwendung anderer als mikrobiologischer Untersuchungsmethoden bei Prozesshygienekriterien (Punkt 5 der Verordnung);
3. die Verwendung anderer mikrobiologischer Methoden bei Prozesshygiene- und Lebensmittelsicherheitskriterien (Punkt 5 der Verordnung).

Die möglichen „alternativen“ Vorgangsweisen sind in Tab. 3 zusammengestellt.

Tabelle 3: Alternative Vorgehensweisen zur Untersuchung von Mikroorganismen nach Artikel 5 der VO (EG) 2073/2005

	Änderung möglich	Sofern:	Betrifft:*
Probenzahl	Ja	Nachweis, dass funktionierende HACCP gestützte Verfahren vorliegen	S, P

	Nein	wenn die Untersuchung dazu dient, die Akzeptabilität einer bestimmten Charge zu bewerten	S,P
Probenahmeverfahren	Ja	sofern der Lebensmittelunternehmer der Behörde nachweisen kann, dass diese Verfahren zumindest gleichwertige Garantien bieten wie die in VO (EG) 2073/2005 vorgeschriebenen	S,P
Mikroorganismen und dazugehörige Grenzwerte	Ja	siehe Analysenmethoden	P
Analysenmethoden	Ja, ohne Genehmigung der Behörde	Bei kommerziellen Methoden oder Testkits („proprietary“ method), wenn: • sie gegen die ISO Referenzverfahren der VO (EG) 2073/2005 validiert wurden und • das Validierungsverfahren nach dem EN ISO 16140 Protokoll oder anderen international anerkannten Protokollen** erfolgt ist. • eine dritte Stelle bestätigt (zertifiziert***), dass die Validierung wie oben beschrieben durchgeführt wurde.	S,P
	Nicht explizit in VO (EG) 2073/2005 behandelt.	In nationale Normensammlungen (z.B. AOAC Official Methods) oder Sammlungen amtlicher Untersuchungsverfahren (z.B. §64 LFGB) aufgenommene Methoden	

	Ja, mit Genehmigung der Behörde	Bei Methoden, zu denen keine zertifizierte Validierung vorliegt (siehe oben), hat eine Validierung (gemäß international anerkannten Protokollen, d.h. nicht notwendigerweise ISO 16140) gegen das Referenzverfahren zu erfolgen.	S,P
--	---------------------------------------	---	-----

* P ... Prozesshygienekriterium; S ... Lebensmittelsicherheitskriterium

** Die Norm EN ISO 16140 sieht auch die Möglichkeit der Anerkennung von früheren Vergleichsstudien vor, sofern bestimmte Bedingungen erfüllt sind; das betrifft die validierende Organisation (in der ISO Norm werden explizit einige „internationally recognized organisation performing method validations“ genannt), aber auch die Art der Studie (z.B. Produktkategorien, mind. 60 Proben je Kategorie, davon 50% positiv).

*** Es besteht eine Validierung und Zertifizierung (im Sinn von Punkt 4 der Norm EN ISO 16140, d.h. Angaben über die zertifizierende Organisation, ein Qualitätssicherungssystem des Herstellers und der Nachweis regelmäßiger Verifizierung). Dieser Fall entspricht Art. 5, Pkt. 5, Abs. 3 der VO (EG) 2073/2005.

4.5 Verfahren der Validierung und Zertifizierung

„Validierung“ ist nach DIN EN ISO/IEC 17025 die Bestätigung, dass durch Untersuchung und Bereitstellung eines Nachweises die besonderen Anforderungen für einen speziellen Gebrauch erfüllt werden [DIN EN ISO/IEC 17025, 2005].

4.5.1 Feststellung der Gleichwertigkeit von Methoden

Die Norm EN ISO 16140 gibt Protokolle für qualitative und quantitative mikrobiologische Untersuchungsverfahren vor. Dabei werden Proben gleichzeitig mit alternativen Methoden und den entsprechenden Referenzmethoden untersucht und die Ergebnisse verglichen. Referenzmethoden können dabei internationale, europäische Normen oder vergleichbare nationale Normen sein. Dabei ist zu beachten, dass die Methoden denselben Analyten (wie etwa eine Bakteriengruppe) nachweisen müssen (Kapitel 3, ISO 16140).

Zur Beurteilung der Gleichwertigkeit werden verschiedene Kennzahlen für die Alternativmethoden und die Referenzmethoden errechnet. Die Berechnung und Interpretation der Ergebnisse wird in der ISO Norm ausführlich dargestellt, ist vergleichsweise umfangreich und involviert mehrere Untersuchungsstellen (Ringversuche, „inter-laboratory studies“). Das bedeutet, dass diese Protokolle nicht immer vollumfänglich für Einzellaborvalidierungen bzw. „in-house“ Validierungen anwendbar sind (Kapitel 1, ISO 16140).

Der Validierungsvorgang umfasst zwei Phasen:

1. den Methodenvergleich gegen eine Referenzmethode, der nur von einem Labor durchgeführt wird und
2. „Inter-laboratory studies“

Für beide Phasen gibt es genaue Vorgaben in der Norm EN ISO 16140.

Validierungen, die nicht dem EN ISO 16140 Protokoll entsprechen, können unter bestimmten Bedingungen anerkannt werden (siehe unten).

Die Zertifizierung von Validierungen (Kapitel 4, ISO 16140) durch eine Zertifizierungsstelle (als „Dritte“ in der Terminologie der VO (EG) 2073/2005

bezeichnet) setzt voraus, dass der Validierungsvorgang dokumentiert ist, der Hersteller des Alternativverfahrens ein Qualitätssicherungssystem (QS-Systems) implementiert hat und dass das Funktionieren des QS-Systems und die Kontrolle der laufenden Produktion regelmäßig verifiziert bzw. auditiert wird.

Zu beachten ist, dass die Protokolle der EN ISO 16140 für nicht-mikrobiologische Verfahren nur begrenzt anwendbar sind. Dies betrifft den Nachweis von Staphylokokken-Enterotoxinen und die Bestimmung von Histamin [VO (EG) 2073/2005; EN ISO 16140:2003].

Aus den Ausführungen ist ersichtlich, dass

1. der Hersteller des Alternativverfahrens für die Validierung und Zertifizierung Sorge zu tragen hat, und dass
2. solche Zertifizierungen nicht nur sachlich beschränkt sind [VO (EG) 2073/2005], sondern auch eine begrenzte zeitliche Gültigkeit haben werden.

4.5.2 Programme zur Validierung und Zertifizierung

Nach der VO (EG) 2073/2005 sind auch andere, international anerkannte Validierungsprotokolle akzeptabel. Dies betrifft unter anderem: AFNOR Validierungen (Association Française de Normalisation; Frankreich), AOAC official methods (Association of Analytical Chemists; USA) und Microval (Europäische Union). Dabei ist aber zu klären, ob die Validierung gegen die in der VO (EG) 2073/2005 angegebenen Referenzmethoden erfolgte.

Bei AOAC „performance tested“ Status wird nur bestätigt, dass die vom Hersteller angegebenen Spezifikationen erfüllt werden. Dies bedeutet nicht automatisch eine Gleichwertigkeit mit ISO Referenzmethoden.

Eine Tabelle der derzeit (Stand Juni 2009) nach AFNOR, AOAC und Microval zertifizierten und validierten Methoden befindet sich im Anhang (Kapitel 9.3).

4.5.3 Spezielle Fälle bei der Anerkennungen von Methoden

Der Anhang A der Norm EN ISO 16140 behandelt die Anerkennung von früheren (nicht ISO 16140 basierten) Vergleichsstudien.

Dabei wird zwischen Validierungen gegen ISO Normen und gegen andere Normen unterschieden. Zu beachten ist aber, dass in der VO (EG) 2073/2005 festgelegt ist, welche Referenzmethoden verwendet werden müssen.

Da die EN ISO 16140 Norm aus dem Jahr 2003 datiert, besteht eine Möglichkeit der Anerkennung eigentlich nur für Verfahren, die vor dem bzw. im Jahr 2003 gegen Referenzmethoden validiert wurden, wobei diese Referenzmethoden auch nach 2003 im Prinzip gültig sein müssen (d.h. dass 2003 und später zwar Ergänzungen und Neuauflagen herausgegeben wurden, die Norm unter der angegebenen Nummer aber noch gültig ist; Beispiele sind in Tab. 4 zusammengestellt) [VO (EG) 2073/2005; EN ISO 16140:2003].

Tabelle 4: Vor 2003 bestehende ISO Normen, auf die sich die VO (EG) 2073/2005 beziehen, die ohne Einschränkungen (ggf. mit Ergänzungen oder als Neuauflage) noch gültig sind und in frühere (vor EN ISO 16140) Validierungsstudien einbezogen sein können

Norm	Für
ISO 6579 (2003)	<i>Salmonella</i>
ISO 11290-1; ISO 11290-2	<i>Listeria monocytogenes</i>
ISO 4833 (2003)	Aerobe mesophile Keimzahl
ISO 6888-1 (1999); ISO 6888-2 (1999)	koagulasepositive Staphylokokken
ISO 16649-2 (2001)	<i>E. coli</i>

4.6 Vorgangsweise bei laborinternen Validierungen („In house“ Validierung)

Für „in house“ Validierungen ermöglicht die Norm EN ISO 16140 vereinfachte Verfahren. Ein, darauf beruhender, praktikabler Leitfaden wurde von GAUTSCH et al. (2002) erarbeitet und bildet die Grundlage für den aktuellen Schweizer Leitfaden zur Validierung mikrobiologischer Untersuchungsverfahren. Dieser Leitfaden präsentiert auch typische, praktische Beispiele, z.B. Verwendung neuerer Selektivnährböden, abweichende Inokulationstechniken und Änderungen in der Lagerung/Aufbereitung von

Selektivnährböden [BAUMGARTNER et al., 2006; GAUTSCH et al., 2002; EN ISO 16140/2003].

4.6.1 Schweizer Leitfaden zur Validierung mikrobiologischer Untersuchungsmethoden

Das grundsätzliche Ziel der Verfahrensvalidierung besteht darin, eindeutig nachzuweisen, dass es den vorgegebenen Prüfaufgaben entspricht, wobei der Schwerpunkt auf die Spezifität und Sensitivität der Methode gelegt wird.

Prinzipiell müssen Validierungen vorgenommen werden bei:

- mikrobiologischen Verfahren, welche nicht genormt sind
- substantiell veränderten, genormten mikrobiologischen Verfahren
- mikrobiologischen Verfahren, bei denen die Validierung nicht durch einen „proficiency test“ bzw. einen Ringversuch erfolgt ist

Entscheidend für den Validierungsumfang und die Auswahl der Matrices ist, ob das Verfahren qualitativ oder quantitativ ist und ob es sich um eine neue oder alternative Methode handelt.

Für neue Untersuchungsverfahren existieren, im Gegensatz zu Alternativmethoden, keine genormten Referenzmethoden.

Die Validierung alternativer Verfahren geschieht, gemäß Schweizer Hygieneverordnung (1995; Art. 4), prinzipiell mittels Methodenvergleich.

Als Mindestumfang einer Validierung sieht der Schweizer Leitfaden die Bestimmung nachfolgender Kriterien an (Tab. 5).

Tabelle 5: Kriterien für eine „in house“-Validierung

Kriterium	qualitatives Verfahren		quantitatives Verfahren	
	Neu	alternativ	neu	alternativ
Anwendungsbereich	×	×	×	×
Spezifität	×	×	×	×
Sensitivität	×	×	×	×
Richtigkeit	×		×	
relative Richtigkeit		×		×
Wiederholbarkeit	×	×	×	×
Nachweisgrenze	×	×		
Bestimmungsgrenze			×	×
statistische Übereinstimmung		×		×
Falsch-Positiv-Rate	×	×		
Falsch-Negativ-Rate	×	×		
Messunsicherheit			×	×

[Quelle: BAUMGARTNER et al., 2006]

5 Eigene Untersuchungen

Im praktischen Teil dieser Arbeit wurden, im Rahmen eines Forschungsauftrages, vier eigene Untersuchungen durchgeführt, welche Aspekte der Probenahme (Kap. 5.1, Kap. 5.2), der Herstellung von seriellen Verdünnungsreihen (Kap. 5.3) sowie der Vereinfachung der ISO Referenzmethode zur Bestimmung der Enterobacteriaceenkonzentrationen (Kap. 5.4) behandeln.

Alle durchgeführten experimentellen Arbeiten stellen Modifikationen bestehender validierter bzw. normierter Verfahren dar, mit dem Ziel der Zeit-, Material- und Kostenersparnis bei gleichbleibender Analysegenauigkeit.

5.1 Probeentnahmestellen bei Faschiertem

5.1.1 Zielsetzung und Versuchsaufbau

Faschiertes Fleisch stellt auf Grund seiner großen Oberfläche und seiner Morphologie (große Anzahl zerstörter Zellen) ein ideales Medium für Mikroorganismen dar. Aus diesem Grund ist der Ausgangskeimgehalt ein ausschlaggebendes Kriterium. Laut VO (EG) 2073/2005 ist die bakteriologische Untersuchung hinsichtlich der Lebensmittelsicherheit und der Prozesshygiene gefordert.

Um ein repräsentatives Ergebnis zu erzielen, wird eine Homogenisierung des Ausgangsmaterials angestrebt, da von einer inhomogenen Keimverteilung innerhalb des Probenmaterials ausgegangen wird.

Zielsetzung der Untersuchung war, ob die Entnahme von 25 g an einer Stelle repräsentativ für den Packungsinhalt ist.

Insgesamt wurden für die Untersuchung 10 Proben mit der Sachbezeichnung „gemischtes Faschiertes“ (je 2 Packungen aus 5 verschiedenen Betrieben; 6 Packungen mit Dehnfolie, 4 Packungen unter Schutzatmosphäre verpackt) herangezogen. Das Faschierte wurde unmittelbar aus der Verpackung heraus untersucht. Dazu wurden je

Probe acht verschiedene Entnahmestellen hinsichtlich der Gesamtkeimzahl (ISO 4833) und dem Vorhandensein von *Escherichia coli* (ISO 16649-2) untersucht.

5.1.2 Probenahme bzw. Probevorbereitung

5.1.2.1 Geräte und Hilfsmittel

- Waage; Oberschalig; max.: 2100g; d: 0,01g; Electronic Balance FX-2000; Fa. AND Mercury PTY. LTD
- Pepton-Kochsalzlösung
- Laboratory Blender Stomacher® 400, Fa.: Seward
- Stomachersäcke mit Filterrohr; Fa.: Seward
- Pipettierhilfe
- sterile 1 ml Glasmesspipetten; Graduierung 0,01ml
- Eprövetten mit Alukappen
- Eprövettenständer
- Schüttelgerät Vortex-Genie 2; Fa.: Scientific Industries
- sterile Pinzetten und Scheren
- diverses Laborglas

5.1.2.1.1 Pepton-Kochsalzlösung

Tabelle 6: Zusammensetzung der Pepton-Kochsalzlösung

Aqua dest.	1000 ml
NaCl; Fa. Merck; Art.-Nr.: 6404	8,5 g
Fleischpepton; neutral; tryptisch verdaut; Art.-Nr.: 1134; Fa.: Oxoid	1,0 g

Zur Herstellung wurde das Pepton und das NaCl eingewogen und in einem Liter Aqua dest. bei Zimmertemperatur gelöst. Anschließend wurde die Lösung bei 121°C 15 min sterilisiert.

5.1.2.2 Durchführung

Pro Faschiertenpackung wurden an je 8 Stellen (siehe Abb. 2) Proben zu 25 g (+/- 0,1 g) entnommen und in sterile Stomachersäcke übergeführt, wobei darauf geachtet wurde, dass die Probe über die ganze Dicke gezogen wurde.

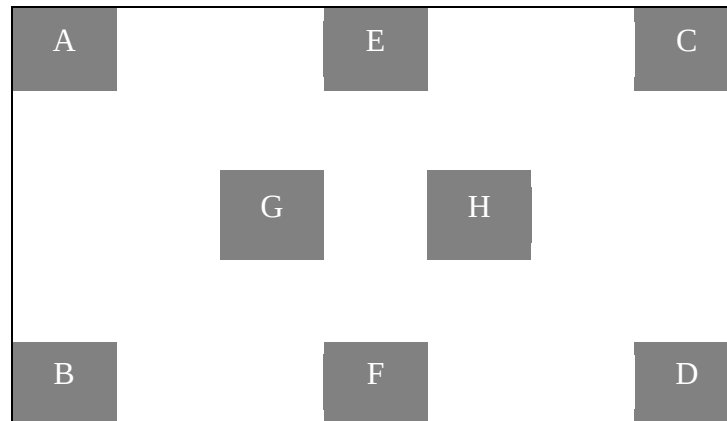


Abbildung 2: Probeentnahmestellen bei Faschiertem (Ansicht von oben; 4*Eckpunkte, 2*Zentrum, 2* Längsseite)

Durch Zugabe der 9-fachen Menge an steriler Verdünnungsflüssigkeit (siehe Tab. 1) und anschließender Homogenisierung im Stomacher (für 120 Sekunden bei „high speed“) wurde eine Erstverdünnung hergestellt.

Ausgehend von dieser Primärverdünnung wurde eine dezimale Verdünnungsreihe (bis zur Verdünnungsstufe 10^{-4}) angelegt.

5.1.3 Mikrobiologische Untersuchung

5.1.3.1 Geräte und Hilfsmittel

- Einweg-Kunststoff-Petrischalen; 90 mm Durchmesser; Fa.: Sterilin
- Caseinpepton-Hefeextrakt-Glucose-Agar (Plate-Count-Agar); Fa.: Oxoid; Art.-Nr.: CM325 (Tab. 7)
- Coli ID Agar (ColiID-F); Fa.: bioMérieux; Art.-Nr.: 42017 (Tab. 8)
- sterile 1 ml Glasmesspipetten; Graduierung 0,01ml
- Schüttelgerät Vortex-Genie 2; Fa.: Scientific Industries
- Brutschrank BK 4266; Fa. EHRET Labor- und Pharmatechnik GmbH & Co.KG

- Wasserbad
- diverses Laborglas

5.1.3.1.1 Herstellung des Caseinpepton-Hefeextrakt-Glucose-Agars

Tabelle 7: Zusammensetzung des Caseinpepton-Hefeextrakt-Glucose-Agars

Bestandteile	Menge (g/l)
Caseinpepton	5,0
Hefeextrakt	2,5
Glucose	1,0
Agar	9,0
pH 7,0 ± 0,2 bei 25°C	

17,5 g des Trockennährbodens (Tab.7) wurden in einen Erlenmeyerkolben eingewogen. Die Einwaage wurde in einem Liter Aqua. dest. suspendiert und bis zum vollständigen Lösen auf einer Heizplatte erhitzt. Anschließend wurde der Nährboden für 15 min bei 121°C autoklaviert. Danach wurde der geschmolzene Nährboden auf Petrischalen verteilt und bis zum Verfestigen stehen gelassen. Die Platten wurden unmittelbar zur Untersuchung verwendet.

5.1.3.1.2 Vorbereitung des Coli ID Agar (Coli ID-F)- Nährbodens

Tabelle 8: Zusammensetzung des Coli ID Agars

Bestandteile	Menge (g/l)
Gelatinpepton	7,0
Hefeextrakt	3,0
NaCl	5,0
Gallensalze	1,5
Aktivator-Mischung	0,3
chromogene Mischung	0,3

Agar	15,0
pH-Wert 7,2	

Nach Lockerung der Verschlusskappe wurde der Agar 45 min lang bei 95°C verflüssigt. Anschließend wurde die Flasche verschlossen und der Inhalt homogenisiert. Die Flasche wurde bis zum Gebrauch im Wasserbad (bei 47°C) warm gehalten.

5.1.3.2 Durchführung

5.1.3.2.1 Bestimmung der aeroben mesophilen Keimzahl

Zur Bestimmung der aeroben mesophilen Keimzahl wurde das Spatelverfahren in Anlehnung an die Referenzmethode ISO 4833 angewendet.

Aus den hergestellten Verdünnungsstufen wurden jeweils 0,1 ml mit einer sterilen Glasmesspipette entnommen und auf eine Agarplatte (Caseinpepton-Hefeextrakt-Glucose-Agar) gegeben. Dabei wurde mit der höchsten Verdünnung begonnen. Der Tropfen wurde mittels Pipettenspitze gleichmäßig und zügig auf dem Nährboden verteilt. Die Platten wurden so lange stehen gelassen, bis die Impfmenge angetrocknet war. Die Petrischalen wurden bei 30°C und 72 h im Brutschrank inkubiert.

Nach Ablauf der Bebrütungszeit wurden die gewachsenen Kolonien gezählt. Zur Berechnung der Keimzahl wurden nur jene Verdünnungsstufen mit einer Koloniezahl zwischen 1 und 300 herangezogen.

5.1.3.2.2 Bestimmung von *Escherichia coli*

Zum Nachweis von β -D-Glucuronidase-positiven *Escherichia coli* wurde das Plattengussverfahren in Anlehnung an die Referenzmethode ISO 16649-2 angewendet.

Die Funktionsweise des Agars beruht auf zwei, im Medium enthaltenen, chromogenen Substraten. Eines davon dient dem Nachweis von β -D-Glucuronidase, welche *Escherichia coli* Kolonien rosa färbt. Das andere Substrat detektiert β -Galaktosidasen,

die Kolonien der anderen coliformen Keime blau färbt. Das Wachstum der meisten grampositiven Keime wird durch diesen Agar gehemmt.

Bei der praktischen Durchführung wurde 1 ml aus der zuvor hergestellten 10^{-1} Verdünnung mit einer Pipette entnommen und in eine sterile Petrischale übergeführt. Dazu wurden etwa 15 ml flüssiges Medium gegossen und durch kreisförmige Bewegungen gründlich homogenisiert. Nach Verfestigung des Agars wurden die Platten im Brutschrank (bei 44°C) inkubiert.

Nach 24 h wurden alle rosa bis violetten Kolonien zur Auswertung herangezogen und ausgezählt.

5.2 Vergleichende Untersuchung von destruktiver und nicht-destruktiver Probenahme an Schlachtkörperhälften

5.2.1 Zielsetzung und Versuchsaufbau

Die Zielsetzung dieser Untersuchung ist die Beurteilung der Vergleichbarkeit einer destruktiven („Stanzmethode“) und einer nicht-destruktiven Methode („Kratzschwamm“).

Die nicht-destruktive Probenahme bei Schlachtkörpern kann lt. VO (EG) 2073/2005 auch zur Untersuchung auf aerobe mesophile Gesamtkeimzahl und *Enterobacteriaceae* angewendet werden, wobei die in der Verordnung angegebenen Grenzwerte keine Anwendung finden. Sofern allerdings die Ergebnisse der destruktiven jenen der nicht-destruktiven Probenahme entsprechen, ist es vertretbar, diese Grenzwerte anzuwenden. Dies ist insbesondere dann vorteilhaft, wenn nicht nur die zeitlichen Verläufe auf Betriebsebene dokumentiert werden sollen, sondern auch ein Vergleich mit den Ergebnissen anderer Betriebe vorgenommen werden soll.

Als Probematerial wurden Schweineschlachtkörperhälften gewählt. Der Oberflächenkeimgehalt wurde zur Beurteilung der Vergleichbarkeit auf *Enterobacteriaceae* und anaerobe mesophile Gesamtkeimzahl überprüft (Prozesshygienekriterien).

5.2.2 Probenahme bzw. Probevorbereitung

5.2.2.1 Geräte und Hilfsmittel

- Edelstahlrohr; 2,5 cm weit; an einem Ende angeschliffen
- Ethanol 96% (zum Abflammen)
- sterile Pinzetten und Scheren
- transportabler Gasbrenner; Fa.: Camping Gaz
- Stomachersäcke mit Filterrohr; Fa.: Seward
- Verschlüsse Anaeroclip®; Fa. Merck
- autoklavierte Schablonen; 10 mal 10 cm

- 3M™ Hydra-Sponge; 10 ml gepuffertes Peptonwasser; 500 ml Beutel; 2 Handschuhe; Fa. Biotrace; Art.-Nr.: HS-10BPW/2G
- Einweg - Schutzkleidung
- Kühltasche

5.2.2.2 Durchführung

Die Probenahme wurde an fünf Tagen über einen Zeitraum von vier Wochen vor Ort in einem österreichischen Schlachthof durchgeführt.

Insgesamt wurden 67 Schweinehälften, jeweils mit der destruktiven und der nicht-destruktiven Methode, auf den Oberflächenkeimgehalt hin, im Rahmen der Normalschlachtung untersucht. Die Schweinehälften wurden fertig zugerichtet und noch schlachtwarm, kurz nach dem Eingang in den Kühlraum, überprüft.

Alle Proben wurden im Bereich der Schulter entnommen, wobei sich die Probenahmestellen der beiden zu vergleichenden Untersuchungsmethoden in unmittelbarer Nähe befanden.

Die gewonnenen Proben wurden unter Kühlung (Kühltasche bzw. Kühlauto bei maximal 4°C) in das Labor gebracht.

5.2.2.2.1 Destruktive Methode

Mit einer sterilen, an einer Seite angeschliffenen Edelstahlstanze wurde ein 5 cm² großer und 0,5 cm dickes Gewebestück entnommen. Mit Hilfe einer sterilen Pinzette, und gegebenenfalls einer Schere, wurde die Probe in einen sterilen Stomachersack mit Filterrohr transferiert und der Sack verschlossen.

Zur Keimfreimachung wurde die Stanze vor jedem Arbeitsgang in Alkohol getaucht und abgeflammt.

5.2.2.2.2 Nicht – destruktive Methode

Das Probenahmeset besteht aus einem wiederverschließbaren Kunststoffsack, in dem sich ein steriles, mit 10 ml gepuffertem Peptonwasser angefeuchtetes Schwämmchen befindet. Außerdem ist ein zweiter Beutel mit sterilen Handschuhen an dem Kunststoffsack befestigt. Das Schwämmchen besteht aus biozid-freier Zellulose, welche die Zellviabilität begünstigt.

Bei der Probenahme wurde zuerst der Beutel mit dem darin enthaltenen Schwämmchen aufgerissen und durch Auseinanderziehen der beiden Laschen geöffnet. Anschließend wurde der Kratzschwamm erfasst und etwas Flüssigkeit ausgedrückt. Mit Hilfe einer autoklavierten Schablone wurden 100 cm² Schlachtkörperoberfläche mit hohem Druck abgerieben.

5.2.3 Aufbereitung der Probe im Labor

5.2.3.1 Geräte und Hilfsmittel

- Waage; oberhalb; max.: 2100g; d: 0,01g; Electronic Balance FX-2000; Fa.: AND Mercury PTY. LTD
- Laboratory Blender Stomacher® 400, Fa.: Seward
- Stomachersäcke mit Filterrohr; Fa.: Seward
- Pepton-Kochsalzlösung (Tab.6)
- Pipettierhilfe
- sterile 1 ml Glasmesspipetten; Graduierung 0,01ml
- Epruvetten
- Epruvettenständer
- Schüttelgerät Vortex-Genie 2; Fa.: Scientific Industries
- diverses Laborglas

5.2.3.2 Durchführung

In die Stomachersäcke, mit den darin enthaltenen Stanzproben, wurden jeweils 50 ml Verdünnungsflüssigkeit zugefügt. Im Anschluss wurden je drei Beutel übereinandergelegt und im Stomacher für 120 Sekunden homogenisiert.

Die Kratzschwämme wurden direkt in den mitgelieferten Kunststoffsäcken weiterbearbeitet. Hierzu wurde den Beuteln 100 ml Verdünnungsflüssigkeit zugegeben und im Stomacher für 120 Sekunden bearbeitet. Zur weiteren Verdünnung wurde je 1 ml mit einer sterilen Messpipette aus den Beuteln entnommen und in Epruvetten mit 9 ml Verdünnungsflüssigkeit übergeführt. Die Röhrchen wurden danach mit dem Schüttelgerät für etwa 5 Sekunden durchmischt.

5.2.4 Mikrobiologische Untersuchung

Die Analyse beider Methoden erfolgte mit dem TEMPO® - System.

Das TEMPO® - System ist eine automatische, auf der Most-Probable-Number (MPN) – Technik, basierende Methode zur Keimzahlbestimmung in Lebensmitteln. Das System besteht aus zwei Arbeitsstationen, einer Filling und einer Reading Station. In der Filling Station erfolgt die Befüllung und Versiegelung der TEMPO – Karten. In der Reading Station werden die TEMPO – Karten ausgewertet und interpretiert.

5.2.4.1 Testprinzip

Das TEMPO® - System arbeitet mit so genannten TEMPO – Karten. Auf jeder Karte befinden sich 48 Kavitäten, die in drei Gruppen mit unterschiedlichen Volumina eingeteilt sind. Die größten Kavitäten befinden sich im unteren Bereich der Reaktionskarte und besitzen ein Volumen von 225 µl, die mittlere Reihe 22,5 µl und die oberste Gruppe ein Volumen von 2,25 µl.

Während der Inkubation der Karten metabolisieren die vorhandenen Mikroorganismen das Substrat im Kulturmedium. Die dabei entstehende Fluoreszenz wird im TEMPO Reader detektiert. Mit einer 16 – MPN – Tabelle wird je nach Anzahl der ermittelten positiven Kavitäten, in Relation zu deren Volumen und Verdünnung, die Keimzahl in der Originalprobe in kbE (koloniebildende Einheiten) pro Gramm, oder Milliliter errechnet.

5.2.4.2 TEMPO® TVC (Total Viable Count) Kit zum Nachweis der Gesamtkeimzahl

Der TEMPO® TVC Test zur Bestimmung der mesophilen aeroben Gesamtkeimzahl in Lebensmitteln wurde gemäß dem EN ISO Standard 16140 als alternative Untersuchungsmethode zu der internationalen Referenzmethode EN ISO Norm 4833 durch die AFAQ (Association Française pour l'Assurance de la Qualité) AFNOR validiert und durch das AOAC® Research Institute zertifiziert.

Diese Methode ermöglicht die Bestimmung der Gesamtkeimzahl aus Lebensmitteln innerhalb von 40-48 Stunden.

Das Testprinzip beruht auf einer Fluoreszenzreaktion. Durch bestimmte Enzyme, die in der Probe vorkommenden Mikroorganismen, wird das Kulturmedium abgebaut und es entsteht eine messbare Fluoreszenz.

5.2.4.3 TEMPO® EB Kit (Enterobacteria) Kit zum Nachweis der Enterobakterien

Die TEMPO® *EB* Methode wurde gemäß dem EN ISO Standard 16140:2003 als alternative Untersuchungsmethode zu der internationalen Referenzmethode EN ISO Norm 21528 -2 durch die AFAQ AFNOR Certification validiert.

Enterobacteriaceen werden mit dieser Methode durch eine Fluoreszenzreaktion innerhalb von 24 Stunden detektiert.

Während der Inkubation bauen Enterobacteriaceen den Zucker im Kulturmedium unter Säurebildung ab, dies führt zu einer pH-Wert Senkung und somit zur Löschung der Fluoreszenz von 4-Methylumbelliferone. Durch Ablesen der nicht-fluoreszierenden Kavitäten wird die ursprüngliche Keimzahl kalkuliert [PAULSEN et al., 2008].

5.2.4.4 Geräte und Hilfsmittel

- TEMPO® Filling Station; Fa.: bioMérieux
- TEMPO® Reading Station; Fa.: bioMérieux
- TEMPO® Inkubation Racks; Fa.: bioMérieux
- TEMPO® Reading Racks; Fa.: bioMérieux
- TEMPO® TVC Test Kit; Fa.: bioMérieux; Art.-Nr.:80007
- TEMPO® EB Test Kit; Fa.: bioMérieux; Art.-Nr.:80003
- Dispenser für 3,9 und 3,0 ml
- Pepton-Kochsalzlösung (Tab.6)
- Pipettierhilfe
- sterile 1 ml Messpipetten; Graduierung 0,01ml

- Schüttelgerät Vortex-Genie 2; Fa.: Scientific Industries
- Brutschrank BK 4266; Fa.: EHRET Labor- und Pharmatechnik GmbH & Co.KG
- diverses Laborglas

5.2.4.5 Durchführung

Aus den beiden Test-Kits (TEMPO® TVC, TEMPO® EB) wurde für jede zu testende Probe ein Fläschchen mit dem getrockneten Kulturmedium entnommen.

Anschließend wurden die Kulturmedien in den Fläschchen verdünnt, indem mit Hilfe eines Dispensers 3 ml (TEMPO® EB) bzw. 3,9 ml (TEMPO® TVC) sekundäres Verdünnungsmittel zugegeben wurde.

Mit einer Vollpipette wurde 1 ml (TEMPO® EB) bzw. 0,1 ml (TEMPO® TVC) verdünnte Probe aus den Stomachersäcken entnommen und zu den aufgelösten Kulturmedien pipettiert. Danach wurde der Inhalt aller Fläschchen auf dem Vortex für jeweils 3 Sekunden homogenisiert. Auf diese Weise erhält man bei beiden Test Kits 4 ml beimpftes Medium.

Für jedes Fläschchen wurde eine Reaktionskarte aus dem entsprechendem Testkit entnommen. Auf jeder Karte befindet sich ein Barcode, der mit dem Reader der Vorbereitungsstation gescannt wird, wodurch das Gerät erkennt, welcher Test durchgeführt werden soll und gleichzeitig der Probe eine individuelle Kennung zuordnet.

Die Karten wurden anschließend gemeinsam mit den dazugehörigen Fläschchen so in das Filling Rack gestellt, dass der Ansaugschlauch der Karte in das Fläschchen reicht. Im Tempo Filler wurde der Befüllungsvorgang gestartet, wobei das beimpfte Medium komplett in die Karten übergeführt wird. Gleichzeitig wurde der Ansaugschlauch abgeschnitten und versiegelt.

Danach wurden die Karten aus dem Filling Rack in das Reading Rack übergeführt und bei 30°C für 40 – 48 h (TEMPO® TVC) bzw. bei 35 °C für 22 – 27 h (TEMPO® EB) inkubiert.

Nach der Inkubation wurden die Karten in der TEMPO® Reading Station abgelesen. Dieser scannt durch Anheben jeder Karte den Barcode und wertet die Fluoreszenzstärke der einzelnen Kavitäten aus. Das Gerät ist durch die vorhergehende Identifizierung in der Lage den jeweiligen Testtyp und die Verdünnung automatisch zuzuordnen und die Messergebnisse in kbE/g bzw. ml umzuwandeln.

5.3 Vergleichende Untersuchung zur Herstellung von seriellen Verdünnungen

5.3.1 Zielsetzung und Versuchsaufbau

Die Herstellung dezimaler Verdünnungsreihen ist eine Voraussetzung bei der Keimzahlbestimmung [BAUMGART, 1993].

Dafür sind die Proben-Erstverdünnung, und folgend, eine dezimale Verdünnungsreihe nötig, um die Probe in eine Form zu bringen, in der sie auf Nährböden aufgetragen werden kann, bzw. in der die erwartete Koloniezahl im auswertbaren Bereich je Nährboden (z.B. Gesamtkeimzahl 1-300 Kolonien) liegt.

Bei Verfahren mit weitem Nachweisbereich (z.B. Spiralplattenverfahren oder bestimmte MPN Anwendungen) werden nur wenige oder keine Dezimalverdünnungen, außer der Erstverdünnung, gebraucht. Es sind allerdings spezielle Gerätschaften erforderlich.

Neben der manuellen Herstellung von Verdünnungsreihen (Pipettieren von 1 ml Probensuspension in 9 ml Verdünnungsflüssigkeit; Mischen auf einem Rüttelgerät, z.B. Vortex; Pipettieren von 1 ml dieser 1:10 Verdünnung zu 9 ml Verdünnungsflüssigkeit etc.) gibt es auch teil-automatisierte Systeme.

Die Fa. LabRobot (LabRobot Products AB) bietet einen Rütteltisch mit Näherungsschalter an (Dilushaker®), der zur Aufnahme von Nöpfchen eingerichtet ist, die bereits mit 9 ml Verdünnungsflüssigkeit beschickt sind (Dilucups®). Die praktische Anwendung erfolgt so, dass von der benötigten Anzahl an Nöpfchen die Deckfolie entfernt wird und die Nöpfchen in der Aufnahmeplatte des Rüttlers platziert werden. Die Nöpfchen werden wie die üblichen Verdünnungsröhrchen mit Probensuspension befüllt, müssen aber zum Durchmischen nicht mehr in die Hand genommen und auf einen Vortex-Rüttler gedrückt werden.

Ziel der Untersuchung ist, ob der Einsatz von fabrikmäßig abgefüllten Näpfchen hinsichtlich des Ressourcenaufwandes, bei gleich bleibender Qualität der Ergebnisse, Vorteile bietet. Zusätzlich soll die Handhabung vergleichend beurteilt werden.

Bei der Herstellung der seriellen Verdünnung wurden 2 Varianten betrachtet:

1. Verdünnungsreihe mit selbst abgefüllten und sterilisierten Eprouvetten (mit Alukappen verschlossen)
2. teil-automatisiertes System (Dilucups®; Fa. LabRobot)

Insgesamt wurden 59 Proben mit der Sachbezeichnung „gemischtes Faschiertes“ aus dem Handel und 3 Proben von Schlachtkörperoberflächen (vom Schwein) für die Untersuchung herangezogen. Alle Proben wurden tiefgekühlt gelagert und vor der Untersuchung bei Zimmertemperatur aufgetaut.

Der Vergleich beider Methoden wurde durch Bestimmung der aeroben mesophilen Gesamtkeimzahl auf Keimzahlagar nach ISO 4833 durchgeführt.

5.3.2 Probenahme bzw. Probevorbereitung

5.3.2.1 Geräte und Hilfsmittel

- DiluShaker; Fa.: LabRobots
- DiluCups; Inhalt: 9 ml Dilucup-Pepton-Lösung; Fa.: LabRobots; Art.-Nr.: 400100
- Waage; Oberschalig; max.: 2100g; d: 0,01g; Electronic Balance FX-2000; Fa.: AND Mercury PTY. LTD
- Pepton-Kochsalzlösung (Tab.)
- Laboratory Blender Stomacher® 400, Fa.: Seward
- Stomachersäcke mit Filterrohr; Fa.: Seward
- Pipettierhilfe
- sterile 1 ml Glasmesspipetten; Graduierung 0,01ml
- Eprouvetten mit Alukappen
- Eprouvettenständer

- Schüttelgerät Vortex-Genie 2; Fa.: Scientific Industries
- sterile Pinzetten und Scheren
- diverses Laborglas

5.3.2.2 Durchführung

Es wurden jeweils 20 g (± 1 g) der Probe unter sterilen Bedingungen aus der Verpackung entnommen und in einen Stomacherbeutel mit Filterrohr übergeführt. Zur Herstellung der Erstverdünnung (Verdünnungsstufe 10^{-1}) wurde zu jeder Probe die neunfache Menge sterile Pepton-Kochsalzlösung (Verdünnungsflüssigkeit) zugegeben und anschließend für 120 Sekunden bei der Geschwindigkeitseinstellung „high“ homogenisiert.

5.3.2.2.1 herkömmliche Methode zur Herstellung von seriellen Verdünnungen

Bei dieser Methode wurden selbst abgefüllte Epruvetten verwendet. Dabei wurden jeweils 9 ml Pepton-Kochsalzlösung, mit Hilfe eines auf der Flasche befindlichen Dispenseraufsatzes, in Epruvetten transferiert. Die Epruvetten wurden mit Alukappen verschlossen und bei 121°C und 15 Minuten sterilisiert.

Zur Herstellung der Verdünnungsstufe 10^{-2} wurde je 1 ml Erstverdünnung mit einer sterilen 1 ml Glasmesspipette aus dem Filterrohr des Stomacherbeutels entnommen und in eine mit Verdünnungsflüssigkeit befüllte Epruvette übergeführt. Danach wurde der Epruvetteninhalt durch dreimaliges Aufsetzen für je 2 Sekunden auf dem Schüttelgerät durchmischt.

Dieser Vorgang wurde bis zum Erreichen einer Endverdünnung von 10^{-4} wiederholt.

5.3.2.2.2 Alternative Methode zur Herstellung von seriellen Verdünnungen

Das zu vergleichende System besteht aus fabrikmäßig abgefüllten, mit Kunststofffolie verschlossenen, Näpfchenreihen (zu 9 Stück) und einem eigenen Rüttelgerät.

Jeder Behälter ist mit 9 ml Verdünnungsflüssigkeit befüllt und durch Gammastrahlung sterilisiert. Durch Auseinanderschneiden der Reihe kann je nach benötigter Verdünnungsstufe die entsprechende Anzahl an Cups entnommen werden.

Das Rüttelgerät ist mit einem Gestell für 25 Näpfchen und einem Sensor ausgestattet.

Zur Erstellung einer Dezimalverdünnung (bis zur Endverdünnung 10^{-4}) wurden drei Näpfchen herausgeschnitten und auf das Rüttelgestell gesetzt. Nach Entfernen der Kunststofffolie wurde jeweils 1 ml Erstverdünnung mit einer sterilen Glaspipette in den ersten Cup pipettiert. Anschließend wurde wiederum 1 ml aus dem ersten Näpfchen mit einer neuen sterilen Messpipette entnommen und in den nächsten Cup übergeführt. Nach diesem Schema wurde auch die letzte Verdünnungsstufe hergestellt. Das Rüttelgerät wurde mittels Bewegungssensor betätigt.

5.3.3 Mikrobiologische Untersuchung

5.3.3.1 Geräte und Hilfsmittel

- Einweg-Kunststoff-Petrischalen; 90 mm Durchmesser; Fa.: Sterilin
- Caseinpepton-Hefeextrakt-Glucose-Agar-Pulver (Plate-Count-Agar); Fa.: Oxoid; Art.-Nr.: CM325 (Tab. 7)
- sterile 1 ml Glasmesspipetten; Graduierung 0,01ml
- Schüttelgerät Vortex-Genie 2; Fa.: Scientific Industries
- Brutschrank BK 4266; Fa.: EHRET Labor- und Pharmatechnik GmbH & Co.KG
- diverses Laborglas

5.3.3.2 Durchführung

Zur Bestimmung der aeroben mesophilen Keimzahl wurde das Spatelverfahren in Anlehnung an die Referenzmethode ISO 4833 angewandt.

Nach Ablauf der Bebrütungszeit wurden die gewachsenen Kolonien gezählt. Zur Berechnung der Keimzahl wurden nur die Verdünnungsstufen mit einer Koloniezahl zwischen 1 und 300 herangezogen.

5.4 Modifikation der ISO Bestimmungsmethode für Enterobacteriaceae (ISO 21258-2)

5.4.1 Zielsetzung und Versuchsaufbau

Die ISO Methode zur Bestimmung der Enterobacteriaceae-Konzentration (ISO 21528-2, 2004) sieht vor, dass Violettröt-Galle-Glucose Agar (VRBG) mit entsprechenden Probensuspensionen im Plattengussverfahren beimpft wird. Nach Erstarren der Agarschicht wird eine dünne Lage VRBG Agar aufgegossen („overlay“). Nach Bebrütung werden „typische“ Kolonien ausgezählt, fünf davon ausgewählt und Bestätigungsreaktionen unterzogen.

Die Kolonien werden nach Reinzucht (Trypton-Soja Agar, Bebrütung 24 Stunden bei 37°C) auf Oxidasereaktion getestet und die Fähigkeit der Glucosefermentation (Glucose-Agar; Beimpfung im Stichverfahren) geprüft.

Der Anteil bestätigter (d.h. oxidasenegativer-glucosefermentierender) Kolonien an den fünf untersuchten Isolaten wird als Korrekturfaktor für das vorläufige Ergebnis verwendet.

Während die Bestimmung der vorläufigen Koloniezahl 24 Stunden benötigt, dauert die Bestätigung zumindest 48 Stunden. Davon entfallen ca. 24 Stunden auf die Reinzucht der ausgewählten Kolonien, ca. 10 Minuten auf die Bestimmung der Oxidasereaktion und etwa 24 bis ggf. 48 Stunden für die Bestimmung der Glucosefermentation.

In der Untersuchung sollte nun geklärt werden, ob die aus den aus Schlachtkörperoberflächen isolierten präsumtiven *Enterobacteriaceae* tatsächlich weiteren Bestätigungsreaktionen unterzogen werden müssen. Der Wegfall dieser Bestätigung bedeutet nicht nur eine Ersparnis von 48 Stunden, sondern auch eine Materialersparnis.

5.4.2 Probenahme bzw. Probevorbereitung

5.4.2.1 Geräte und Hilfsmittel

- Einweg-Kunststoff-Petrischalen; 90 mm Durchmesser; Fa.: Sterilin

- Edelstahlrohr; 2,5 cm weit; an einem Ende angeschliffen
- Ethanol 96% (zum Abflammen)
- sterile Pinzetten und Scheren
- transportabler Gasbrenner; Fa.: Camping Gaz
- Stomachersäcke mit Filterrohr; Fa.: Seward
- Waage; Oberschalig; max.: 2100g; d: 0,01g; Electronic Balance FX-2000; Fa.: AND Mercury PTY. LTD
- Pepton-Kochsalzlösung (Tab.6)
- Laboratory Blender Stomacher® 400, Fa.: Seward
- Pipettierhilfe
- sterile 1 ml Glasmesspipetten; Graduierung 0,01ml
- Eprövetten mit Alukappen
- Eprövettenständer
- Schüttelgerät Vortex-Genie 2; Fa.: Scientific Industries
- sterile Pinzetten und Scheren
- diverses Laborglas

5.4.2.2 Durchführung

Bei der praktischen Durchführung wurden insgesamt 56 Schlachtkörperoberflächen untersucht (28 Rinderschlachtkörper, 28 Schweineschlachtkörper).

Aus den Schlachtkörperoberflächen wurden jeweils 25 g mit einem Edelstahlrohr ausgestanzt und in Stomachersäcke übergeführt. Zwischen den Arbeitsgängen wurde die Stanze in Ethanol getaucht, abgeflammt und somit sterilisiert.

Durch Zugabe von Pepton-Kochsalzlösung wurden Erstverdünnungen aus den Proben hergestellt, die mittels Stomacher (hohe Geschwindigkeit, 120 Sek.) mazeriert wurden.

Ausgehend von dieser Erstverdünnung wurde eine dezimale Verdünnungsreihe (bis Endverdünnung 10^{-3}) hergestellt.

5.4.3 Mikrobiologische Untersuchung

5.4.3.1 Geräte und Hilfsmittel

- Kristallviolett-Neutralrot-Galle-Glucose-Agar (VRBG); Fa.: bioMérieux; Art.Nr.: 42601
- Einweg-Kunststoff-Petrischalen; 90 mm Durchmesser; Fa.: Sterilin
- sterile 1 ml Glasmesspipetten; Graduierung 0,01ml
- Schüttelgerät Vortex-Genie 2; Fa. Scientific Industries
- Brutschrank BK 4266; Fa.: EHRET Labor- und Pharmatechnik GmbH & Co.KG
- diverses Laborglas

5.4.3.2 Durchführung

Die mikrobiologische Untersuchung auf *Enterobakterien* erfolgte im Plattengussverfahren mit Overlay (ISO 21528-2, 2004).

Hiefür wurde mit einer sterilen Pipette jeweils 1 ml Probe aus den Verdünnungsansätzen in Petrischalen übergeführt und mit etwa 10 ml temperiertem VRBG-Agar aufgefüllt. Nach vollständigem Erstarren erfolgte eine Überschichtung mit einer dünnen Schicht VRBG-Agar (ca. 15 ml).

Nach anschließender Bebrütung (37°C, 24h) wurden die „typischen“ Kolonien, zur Bestimmung des vorläufigen Ergebnisses, ausgezählt. Charakteristische Kolonien sind rot bzw. rosafarben mit mind. 0,5 mm Durchmesser, mit oder ohne Präzipitathof.

Ausgezählt wurden nur Agarplatten mit mehr als 15 und weniger als 150 Kolonien.

5.4.4 Bestätigungsreaktionen

5.4.4.1 Geräte und Hilfsmittel

- Trypton-Soja Agar; fertige Platten; Fa.:bioMérieux; Art.Nr.: 43011
- O/F-Medium; Fa.: bioMérieux; Art.Nr.: 50110
- Paraffin; flüssig; Fa.: bioMérieux; Art.Nr.: 70100
- Öse

- Impfnadel
- Oxidase Reagent; Fa.: bioMérieux; Art.Nr.: 55635
- Filterpapier
- sterile 1 ml Glasmesspipetten; Graduierung 0,01ml
- Brutschrank BK 4266; Fa.: EHRET Labor- und Pharmatechnik GmbH & Co.KG
- diverses Laborglas

5.4.4.2 Durchführung

Zur Reinzucht wurden jeweils fünf verdächtige, zufällig ausgewählte, Kolonien auf Trypton-Soja Agar ausgestrichen und bei 37°C für 24 h aerob bebrütet.

Für die biochemischen Bestätigungstests wurde jeweils eine gut isolierte Kolonie aus der Reinkultur ausgewählt und einem Oxidasetest unterzogen.

Hierfür wurde mit Hilfe einer sterilen Öse eine Einzelkolonie entnommen und auf einem mit Oxidase Reagens befeuchtetem Filterpapier verteilt (Blaufärbung → Oxidase-positiv).

Oxidase-negative Kolonien wurden anschließend auf Glucosefermentation untersucht.

Dabei wurde das O/F Medium mit der Kolonie im Stichverfahren beimpft und mit Paraffinöl überschichtet. Bei Glucose-positiven Kolonien erfolgt ausgehend von einem pH Umschlag ein Farbumschlag (grün → blau), besonders im Bereich des Stichkanals.

Die endgültige Enterobacteriaceenkonzentration wurde aus dem Anteil präsumtiver Kolonien auf VRBG Agar, multipliziert mit der Anzahl anschließend bestätigter Kolonien (Oxidase-negativ und Glucose-positiv) ermittelt.

6 Ergebnisse und Diskussion

6.1 Probeentnahmestellen bei Faschiertem

Bei 10 Packungen „gemischtes Faschiertes“ wurden nach Entfernen der Verpackung jeweils 25g Material an den in Abb. 1 bezeichneten Stellen steril entnommen und die aerobe mesophile Gesamtkeimzahl (ISO 4833) und die Konzentration von *E. coli* (ISO 16649-2) bestimmt. Zielsetzung der Untersuchung war, ob die Entnahme von 25 g an einer Stelle repräsentativ für den Packungsinhalt ist und somit das Homogenisieren vor der Probenahme unnötig wäre.

Die Analyseergebnisse zeigen, dass die Probenahmestelle keinen signifikanten Einfluss auf das Ergebnis hatte (ANOVA, $F=0,02$ für aerobe mesophile Gesamtkeimzahl bzw. $0,07$ für *E. coli*; $P = 1,000$ bzw. $0,9995$)¹.

Die Ergebnisse sind in Tab. 10 und Tab. 11 wiedergegeben. Die gesamte Analyseliste befindet sich im Anhang (Tab. 16 und 17).

6.1.1 Analyseergebnisse

Tabelle 9: Aerobe mesophile Keimzahl ($\log_{10}$ kbE/g) in verschiedenen Entnahmestellen (A bis F; s. Abb.2) von 10 Handelspackungen „gemischtes Faschiertes“

Probe	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Teilprobe A	4,98	7,10	5,10	7,28	5,20	6,22	5,75	5,74	6,48	5,95
Teilprobe B	5,08	7,16	4,91	7,30	5,16	6,26	5,88	5,63	6,56	5,84
Teilprobe C	5,09	7,16	4,95	7,18	5,25	5,99	5,93	5,95	6,23	5,98
Teilprobe D	4,98	7,18	5,06	7,20	5,21	6,15	5,83	5,74	6,49	5,76
Teilprobe E	5,09	7,20	4,95	7,45	5,13	6,34	5,95	5,88	6,43	6,20
Teilprobe F	5,05	7,13	4,93	7,12	5,15	6,31	5,98	5,90	6,61	5,88
Teilprobe G	5,03	7,17	5,00	7,41	5,18	6,23	5,88	5,82	6,69	6,13

¹ ANOVA: Varianzanalyse zur Untersuchung mehrerer Stichproben, F: Wert der Prüfgröße, P: ausgewählte „Irrtumswahrscheinlichkeit“

Teilprobe H	5,06	7,16	4,97	7,26	5,21	6,29	6,05	5,70	6,18	5,98
Mittelwert	5,04	7,16	4,98	7,27	5,18	6,22	5,90	5,80	6,46	5,97
Standardabweichung	0,04	0,03	0,06	0,11	0,04	0,11	0,09	0,11	0,18	0,15

Tabelle 10: *E. coli* ($\log_{10}$ kbE/g) in verschiedenen Entnahmestellen (A bis F) von 10 Handelspackungen „gemischtes Faschiertes“

Probe	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Teilprobe A	3,49	2,78	3,11	2,78	3,85	<1	<1	<1	<1	<1
Teilprobe B	3,04	2,70	2,95	2,90	4,04	<1	<1	<1	<1	<1
Teilprobe C	3,63	2,30	2,95	2,78	4,18	<1	<1	<1	<1	<1
Teilprobe D	3,23	2,70	3,11	2,48	4,61	<1	<1	<1	<1	<1
Teilprobe E	3,08	2,00	3,20	2,85	3,95	<1	<1	<1	<1	<1
Teilprobe F	3,04	2,30	3,15	2,60	4,15	<1	<1	<1	<1	<1
Teilprobe G	3,20	2,95	2,95	2,70	3,85	<1	<1	<1	<1	<1
Teilprobe H	3,18	2,48	2,85	2,48	4,32	<1	<1	<1	<1	<1
Mittelwert	3,24	2,53	3,04	2,69	4,12	<1	<1	<1	<1	<1
Standardabweichung	0,22	0,31	0,12	0,16	0,26					

6.2 Vergleichende Untersuchung von destruktiver und nicht-destruktiver Probenahme an Schlachtkörperhälften

Der Methodenvergleich wurde bei 67 Schlachtschweinehälften durchgeführt, wobei darauf geachtet wurde, dass sich die Probenahmestellen der Destruktivprobe und der Tupferprobe in unmittelbarer Nähe befanden.

Aus den Werten in Tab. 11 und 12 ist zu entnehmen, dass sowohl bei der Untersuchung der Gesamtkeimzahl, als auch bei der Enterobacteriaceenkonzentration kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Messwerten beider Methoden besteht. Daraus kann geschlossen werden, dass die destruktive und die untersuchte nicht-destruktive Probenahmetechnik gleichwertige Ergebnisse liefern.

Mehreren Studien haben bereits gezeigt, dass die Ausbeute bei nicht-destruktiver Probenahme durch Wischen mit angefeuchteten, rauen Kunststoff-Schwämmchen jener von destruktiven Verfahren im Wesentlichen entspricht (etwa die Studien von BYRNE et al., 2005 und PEARCE & BOLTON, 2005). Die durchschnittlichen Differenzen können dabei bis 0,2 log₁₀ Einheiten betragen.

Weiters ist aber zu beachten, dass bei niedrigen Bakterienkonzentrationen bzw. ungleichmäßiger Verteilung dieser am Schlachtkörper die Beprobung größerer Oberflächen (wie dies bei der Probenahme mit einem Kratzschwamm der Fall ist) auch höhere Ergebnisse erhalten werden bzw. ist die Wiederfindung besser [GILL & JONES, 2000].

6.2.1 Analyseergebnisse

Tabelle 11: Bestimmung der aeroben mesophilen Gesamtkeimzahl aus destruktiv (mittels Stanze) und nicht-destruktiv (mittels Kratzschwamm) gewonnenen Oberflächenproben von Schweineschlachtkörpern

	Stanze	Schwamm	Stanze	Schwamm	
Tag 1	TVC kbE/g	TVC kbE/g	log ₁₀	log ₁₀	logdiff*
1	210,00	450,00	2,32	2,65	-0,33
2	99,00	440,00	2,00	2,64	-0,65
3	100,00	100,00	2,00	2,00	0,00
4	99,00	100,00	2,00	2,00	0,00
5	99,00	680,00	2,00	2,83	-0,84
6	210,00	99,00	2,32	2,00	0,33

7	99,00	100,00	2,00	2,00	0,00
8	2600,00	1500,00	3,41	3,18	0,24
9	100,00	1400,00	2,00	3,15	-1,15
10	99,00	100,00	2,00	2,00	0,00
11	320,00	330,00	2,51	2,52	-0,01
12	99,00	100,00	2,00	2,00	0,00
median			2,00	2,26	
mittel			2,21	2,41	
MW±Sd			2,25±0,42	2,45±0,47	
P-Wert**				0,148	
Tag 2	TVC kbE/g	TVC kbE/g	log₁₀	log₁₀	logdiff
13	380000,00	330000,00	5,58	5,52	0,06
14	90000,00	88000,00	4,95	4,94	0,01
15	300000,00	148000,00	5,48	5,17	0,31
16	200000,00	113000,00	5,30	5,05	0,25
17	75000,00	67000,00	4,88	4,83	0,05
18	820000,00	900000,00	5,91	5,95	-0,04
19	2000000,00	1140000,00	6,30	6,06	0,24
20	1740000,00	1000000,00	6,24	6,00	0,24
21	64000,00	152000,00	4,81	5,18	-0,38
Median			5,48	5,18	
mittelwert			5,49	5,41	
MW±Sd			5,56±0,57	5,46±0,48	
P-Wert**				0,27	
Tag 3	TVC kbE/g	TVC kbE/g	log₁₀	log₁₀	logdiff
22	2400,00	12000,00	3,38	4,08	-0,70
23	99,00	99,00	2,00	2,00	0,00
24	99,00	1100,00	2,00	3,04	-1,05
25	210,00	14000,00	2,32	4,15	-1,82
26	2800,00	1400,00	3,45	3,15	0,30
27	7100,00	5700,00	3,85	3,76	0,10
28	2100,00	1500,00	3,32	3,18	0,15
Median			3,32	3,18	
Mittel			2,90	3,33	
MW±Sd			3,01±0,77	3,44±0,74	
P-Wert**				0,195	
Tag 4	TVC kbE/g	TVC kbE/g	log₁₀	log₁₀	logdiff
29	13090,91	15181,82	4,12	4,18	-0,06
30	4000,00	2590,91	3,60	3,41	0,19
31	1454,55	1500,00	3,16	3,18	-0,01
32	16363,64	13000,00	4,21	4,11	0,10
33	173000,00	159000,00	5,24	5,20	0,04
34	95000,00	73000,00	4,98	4,86	0,11
35	1000,00	1290,91	3,00	3,11	-0,11
Median			4,12	4,11	
Mittel			4,04	4,01	
MW±Sd			4,17±0,86	4,12±0,82	

P-Wert**				0,393	
Tag 5	TVC kbE/g	TVC kbE/g	log₁₀	log₁₀	logdiff
36	2909,09	2454,55	3,46	3,39	0,07
37	4818,18	2963,64	3,68	3,87	0,21
38	2200,00	2236,36	3,34	3,35	-0,01
39	42000,00	34000,00	4,62	4,53	0,09
40	700,00	527,27	2,85	2,82	0,12
41	4909,09	3636,36	3,69	3,66	0,13
42	563,64	572,73	2,75	2,76	-0,01
Median			3,46	3,39	
Mittel			3,49	3,40	
MW±Sd			3,57±0,62	3,57±0,61	
P-Wert**				0,969	

* logdiff bedeutet die Differenz der log₁₀ Ergebnisse.

** P-Wert über dem gewählten Signifikanzniveau (hier $\alpha=0,05$), d.h. die Nullhypothese auf Gleichheit der Proben kann nicht verworfen werden; t-Test.

Tabelle 12 Bestimmung der Enterobacteriaceenkonzentration aus destruktiv (mittels Stanze) und nicht-destruktiv (mittels Kratzschwamm) gewonnenen Oberflächenproben von Schweineschlachtkörpern

	Stanze	Schwamm	Stanze	Schwamm	
Tag 1	Eb kbE/g	Eb kbE/g	log₁₀	log₁₀	logdiff
1	9,00	9,00	0,95	0,95	0,00
2	9,00	9,00	0,95	0,95	0,00
3	10,00	9,00	1,00	0,95	0,05
4	10,00	10,00	1,00	1,00	0,00
5	10,00	9,00	1,00	0,95	0,05
6	10,00	9,00	1,00	0,95	0,05
7	9,00	9,00	0,95	0,95	0,00
8	9,00	9,00	0,95	0,95	0,00
9	9,00	9,00	0,95	0,95	0,00
10	9,00	9,00	0,95	0,95	0,00
11	9,00	9,00	0,95	0,95	0,00
12	9,00	9,00	0,95	0,95	0,00
13	9,00	9,00	0,95	0,95	0,00
14	9,00	9,00	0,95	0,95	0,00
median			0,95	0,95	
mittel			0,97	0,96	
MW±Sd			0,97±0,02	0,95±0,01	
P-Wert**				0,082	
Tag 2	Eb kbE/g	Eb kbE/g	log₁₀	log₁₀	logdiff
15	9,00	9,00	0,95	0,95	0,00
16	9,00	9,00	0,95	0,95	0,00
17	9,00	9,00	0,95	0,95	0,00
18	9,00	9,00	0,95	0,95	0,00
19	9,00	9,00	0,95	0,95	0,00

20	9,00	9,00	0,95	0,95	0,00
21	9,00	9,00	0,95	0,95	0,00
22	9,00	9,00	0,95	0,95	0,00
23	9,00	10,00	0,95	1,00	-0,05
24	9,00	10,00	0,95	1,00	-0,05
25	9,00	33,00	0,95	1,52	-0,56
26	9,00	33,00	0,95	1,52	-0,56
27	9,00	9,00	0,95	0,95	0,00
28	9,00	9,00	0,95	0,95	0,00
29	9,00	9,00	0,95	0,95	0,00
median			0,95	0,95	
mittel			0,95	1,04	
MW±Sd			0,95±0	1,05±0,2	
P-Wert**				0,129	
Tag 3	Eb kbE/g	Eb kbE/g	log₁₀	log₁₀	logdiff
30	9,00	9,00	0,95	0,95	0,00
31	9,00	10,00	0,95	1,00	-0,05
32	21,00	10,00	1,32	1,00	0,32
33	10,00	9,00	1,00	0,95	0,05
34	45,00	9,00	1,65	0,95	0,70
35	130,00	9,00	2,11	0,95	1,16
36	9,00	9,00	0,95	0,95	0,00
37	55,00	10,00	1,74	1,00	0,74
38	9,00	10,00	0,95	1,00	-0,05
39	110,00	9,00	2,04	0,95	1,09
40	10,00	9,00	1,00	0,95	0,05
41	10,00	9,00	1,00	0,95	0,05
42	21,00	9,00	1,32	0,95	0,37
43	10,00	32,00	1,00	1,51	-0,51
44	9,00	10,00	0,95	1,00	-0,05
Median			1,00	0,95	
Mittel			1,26	1,01	
MW±Sd			1,29±0,42	1,01±0,14	
P-Wert**				0,052	
Tag 4	Eb kbE/g	Eb kbE/g	log₁₀	log₁₀	logdiff
45	10,00	150,00	1,00	2,18	-1,18
46	200,00	160,00	2,30	2,20	0,10
47	50,00	9,00	1,70	0,95	0,74
48	10,00	20,00	1,00	1,30	-0,30
49	10,00	9,00	1,00	0,95	0,05
50	4000,00	4000,00	3,60	3,60	0,00
51	23000,00	2000,00	4,36	3,30	1,06
52	300,00	100,00	2,48	2,00	0,48
53	1000,00	800,00	3,00	2,90	0,10
Median			2,30	2,18	
Mittel			2,27	2,16	
MW±Sd			2,41±1,22	2,26±0,98	
P-Wert**				0,597	

Tag 5	Eb kbE/g	Eb kbE/g	log ₁₀	log ₁₀	logdiff
54	280,00	360,00	2,45	2,5	-0,11
55	9,00	10,00	0,95	1,00	-0,05
56	9,00	10,00	0,95	1,00	-0,05
57	10,00	10,00	1,00	1,00	0,00
58	1900,00	3700,00	3,28	3,37	-0,29
59	770,00	980,00	2,89	2,99	-0,10
60	10,00	10,00	1,00	1,00	0,00
61	10,00	10,00	1,00	1,00	0,00
62	10,00	10,00	1,00	1,00	0,00
63	9,00	10,00	0,95	1,00	-0,05
64	130,00	172,00	2,11	2,14	-0,12
65	10,00	10,00	1,00	1,00	0,00
66	9,00	10,00	0,95	0,90	-0,05
67	9,00	10,00	0,95	0,90	-0,05
median			1,00	1,00	
mittel			1,46	1,53	
MW±Sd			1,52±0,84	1,55±0,87	
P-Wert**				0,082	

** P-Wert über dem gewählten Signifikanzniveau (hier $\alpha=0,05$), d.h. die Nullhypothese auf Gleichheit der Proben kann nicht verworfen werden

6.3 Vergleichende Untersuchung zur Herstellung von seriellen Verdünnungen

Insgesamt wurden 59 Proben Faschiertes und 3 Proben von Schlachtkörperoberflächen vergleichend mit beiden Methoden (konventionelle Methode und teil-automatisiertes System zur Herstellung von seriellen Verdünnungen) untersucht.

Zur Klärung, ob die mittels Dilucup erhaltenen Verdünnungen jenen der mit der konventionellen Methode erhaltenen Verdünnungen entsprechen, wurden die Proben auf ihre aerobe mesophile Gesamtkeimzahl hin untersucht.

Die gebildeten Koloniezahlen wurden als dekadische Logarithmen der gewichteten Mittel dargestellt. Der Vergleich der Ergebnisse erfolgte nach den Vorgaben des Schweizer Leitfadens zur Validierung mikrobiologischer Prüfverfahren [BAUMGARTNER et al., 2006].

Die Untersuchungsergebnisse sind in den nachfolgenden Tabellen (Tab. 12, Tab. 13) dargestellt.

Demnach ergab sich bei Verwendung des Dilucup Systems zur Bestimmung der aeroben mesophilen Gesamtkeimzahl bei Schlachtkörperoberflächen und Faschiertem kein signifikanter Unterschied in den Keimzahlen. Allerdings zeigte sich eine signifikante Zeitersparnis von durchschnittlich 0,69 Minuten bzw. 41 Sekunden für drei Verdünnungsstufen (Abb. 3, Abb. 4), was gut mit der Firmenangabe von ca. 13 Sekunden je Verdünnungsstufe übereinstimmt (laut Firmenangaben ist eine Zeitersparnis von zumindest 10-13 Sekunden pro Verdünnung möglich).

6.3.1 Analyseergebnisse

Tabelle 13: Bestimmung der aeroben mesophilen Gesamtkeimzahl ($\log_{10}$ kbE/g oder cm^2) aus mit verschiedenen Verdünnungsmethoden untersuchten identischen Proben (ges. 62 Proben)

Ergebnisse	Minimum	Maximum	MW $\pm$ Sd*
Konventionelles Verfahren	3,88	7,42	5,58 $\pm$ 0,79
Dilucup	3,80	7,39	5,59 $\pm$ 0,79
Differenz der Verfahren	-0,21	+0,32	0,01 $\pm$ 0,10

t-Test			$P=0,501^{**}$
Korrelationskoeffizient			0,992

* Mittelwert $\pm$ Standardabweichung;

** d.h. die Nullhypothese, dass kein Unterschied besteht, kann bei $\alpha=0,05$ nicht abgelehnt werden.

Tabelle 14: Benötigte Arbeitszeit zum Herstellen von 3 Verdünnungsstufen (in min)

Ergebnisse	Minimum	Maximum	MW $\pm$ Sd*
Konventionelles Verfahren	3,03	3,39	3,21 $\pm$ 0,09
Dilucup	2,28	3,07	2,52 $\pm$ 0,19
Differenz der Verfahren	0,01	1,03	0,69 $\pm$ 0,22
t-Test			$P=0,000^{**}$

** d.h. die Nullhypothese, dass kein Unterschied besteht, kann bei $\alpha=0,05$ abgelehnt werden.

Abbildung 3: Zeitaufwand des automatisierten Systems zur Herstellung von seriellen Verdünnungen (3 Stufen)

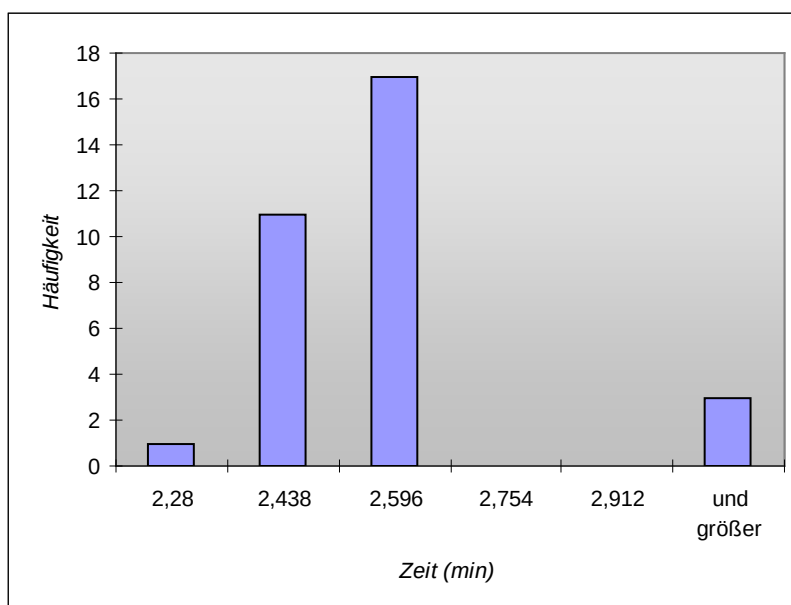
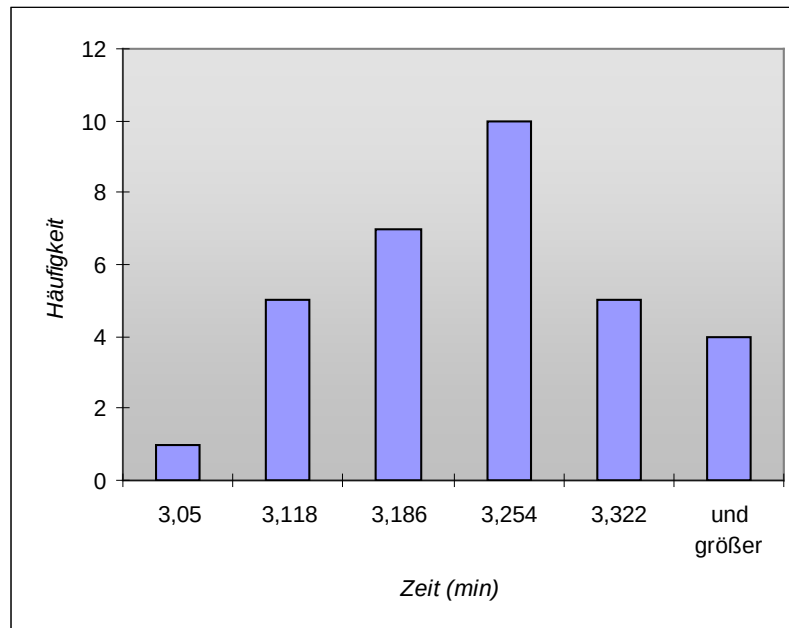


Abbildung 4: Zeitaufwand des konventionellen Systems zur Herstellung serieller Verdünnungen (3 Stufen)



6.4 Modifikation der ISO Bestimmungsmethode für Enterobacteriaceae (ISO 21258-2)

Zur Klärung der Frage, ob die Bestätigungsreaktionen (Oxidasereaktion und die Prüfung auf Glucosefermentation) einen wesentlichen Einfluss auf das Endergebnis haben und somit notwendig sind, wurden die Enterobacteriaceenzahlen in 56 Oberflächenproben auf VRBG Agar nach ISO 21528-2 (2004) bestimmt und der Anteil oxidasepositiver und glucoseverwertender Isolate bestimmt.

Die Ergebnisse bezogen auf die Gesamtheit der untersuchten Isolate sind in Tab.15 dargestellt. Tab.16 zeigt die Auswirkung auf die Ergebnisse der 56 Proben. Demnach waren bei etwa 9% der Proben Abweichungen zwischen der präsumtiven und der bestätigten Enterobacteriaceenzahl $> 0,5 \log_{10}$ Einheiten bzw. bei 24% Abweichungen $> 0,25 \log_{10}$ Einheiten feststellbar. Dabei ist zu beachten, dass alle oxidasenegativen Kolonien auch Glucosefermentation aufwiesen (Tab.15). Dies bedeutet, dass der Wegfall der Prüfung auf Glucosefermentation (und damit eine Verkürzung der Untersuchung um 24 Stunden) bei den 56 Proben keinen Einfluss auf das Endergebnis hatte.

6.4.1 Analyseergebnisse

Tabelle 15: Oxidasereaktion und Glucoseverwertung von „präsumtiven“ Enterobacteriaceenisolaten auf Violettröt-Galle-Glucose-Agar (56 Oberflächenproben von Schlachttieren)

Ergebnisse	oxidasepos.	oxidaseneg./ glucosepos.	oxidaseneg./ glucoseneg.	Summe
N=	105	222	0	327
%	32,1	67,9	0	100

Tabelle 16: Korrekturfaktoren für präsumtive Enterobacteriaceen

Anteil der Ergebnisse →	5%	25%	50%	75%	95%
Anteil bestätigter Kolonien (= Korrekturfaktor)	0,24	0,60	0,80	1,00	1,00
Korrekturfaktor in $\log_{10}$	-0,62	-0,22	-0,1	0	0

7 Schlussbetrachtung

Im ersten Teil dieser Arbeit wurden die Möglichkeiten zur Anwendung von Alternativmethoden zu den in der Verordnung VO (EG) 2073/2005 vorgesehenen Referenzmethoden erläutert.

Dabei ergeben sich folgende Möglichkeiten:

1. Bei der Untersuchung von in der VO (EG) 2073/2005 vorgeschriebenen Mikroorganismen:

1.a. Testkits bzw. kommerzielle Verfahren gelten im Sinn der VO (EG) 2073/2005 immer dann als gleichwertig, wenn sie nach dem Protokoll der Norm ISO 16140 (oder einem gleichwertigen Protokoll) gegen die Referenzmethoden der VO (EG) 2073/2005 validiert wurden und wenn die Validierung und ein bestehendes Qualitätssicherungssystem des Herstellers von einer dritten Stelle zertifiziert wurden. Für den Anwender bedeutet das, dass der Hersteller ein entsprechendes Zertifikat vorzulegen hat, das einerseits zeitlich gültig sein und andererseits auch für die entsprechende Probenmatrix (z.B. Fleisch) gelten muss.

1.b. In der wissenschaftlichen Literatur beschriebene Verfahren- bzw. Methodenbeschreibungen gelten als gleichwertig, wenn sie (vom Anwender) gegen die Referenzverfahren der VO (EG) 2073/2005 im Labor validiert wurden. Dieser Fall ist in der VO (EG) 2073/2005 nicht explizit angeführt, und daher wäre, wie unter Punkt 2, eine Genehmigung durch die zuständige Behörde erforderlich.

1.c. Andere Verfahren müssen (vom Anwender) gegen die Referenzverfahren der VO (EG) 2073/2005 validiert werden, anders als in den Fällen 1.a und 1.b, ist eine Genehmigung durch die zuständige Behörde aber immer erforderlich.

2. Bei der Untersuchung auf andere, als in der VO (EG) 2073/2005 angegebene, Mikroorganismen:

Die Untersuchung auf andere Mikroorganismen ist nur für Prozesshygienekriterien möglich. Dies bedeutet, dass eigene Grenzwerte und

andere Methoden zur Anwendung kommen. Es ist nicht festgelegt, wie eine Gleichwertigkeit zu den Prozesshygienekriterien bestimmt wird. Es sind aber zwei Fälle denkbar:

- 2.a. Bei nach Genus und Spezies festgelegten Mikroorganismen (z.B. *Listeria monocytogenes*, *E. coli*) wird eine weiter gefasste Mikroorganismengruppe gewählt (z.B. *Listeria* sp. statt *Listeria monocytogenes*; Enterobacteriaceen statt *E. coli*). Dies bedeutet, dass die in der VO (EG) 2073/2005 angeführten Mikroorganismen zwar mit- aber nicht exklusiv erfasst werden, d.h. eine weniger spezifische Vorgangsweise gewählt wird. Bei der Beibehaltung der Grenzwerte der VO (EG) 2073/2005 würde sich eine „strengere“ Beurteilung ergeben. Sinngemäß könnte die Anwendung „abgekürzter“ ISO Referenzverfahren (d.h. es wird auf Bestätigungsreaktionen mehr oder weniger vollständig verzichtet) in diese Kategorie fallen.
- 2.b. Es handelt sich um tatsächlich andere Mikroorganismen (z.B. *Enterococcus* sp. statt Enterobacteriaceen/*E.coli*). Hier sind sowohl Methode als auch Grenzwerte unter Berücksichtigung des Ziels der VO (EG) 2073/2005 zu wählen. In wie weit eine Genehmigung der Behörde erforderlich ist, ist nicht geregelt. Dies entspricht dem Konzept der sog. „Indikatorkeime“.

3. Bei der Anwendung anderer als mikrobiologischer Untersuchungsverfahren:

Die Untersuchung mit anderen als mikrobiologischen Methoden ist nur für Prozesshygienekriterien möglich. Dies bedeutet, dass eigene Grenzwerte und Methoden zur Anwendung kommen. Es ist nicht festgelegt, wie eine Gleichwertigkeit zu den Prozesshygienekriterien bestimmt wird, es müssen allerdings die Ziele der VO (EG) 2073/2005 erreicht werden.

4. Es werden Proben bei den zur Lebensmittelherstellung genutzten Verarbeitungsbereichen und Ausrüstungsgegenständen untersucht:

Dabei ist nach den Vorgaben der Norm ISO 18593 vorzugehen, wonach bei der Untersuchung auf pathogene Bakterien (bzw. sinngemäß bei bestimmten

Lebensmittelgruppen auch Enterobacteriaceen als Indikator für *Enterobacter sakazakii*) Tupferproben (Stieltupfer, Schwamm etc.) zu verwenden und Oberflächen nicht unter 100 cm² zu untersuchen sind. Bei der Untersuchung auf nicht-pathogene Bakterien können Kontaktverfahren (mind. 7-10 cm² Probenfläche) oder Tupferverfahren angewendet werden bzw. ist die Verwendung anderer Verfahren (z.B. ATP Nachweis) grundsätzlich möglich.

Die im zweiten Abschnitt dieser Studie durchgeführten praktischen Arbeiten behandeln Aspekte der Probenahme (Kap. 5.1, Kap. 5.2), der Herstellung von seriellen Verdünnungsreihen (Kap. 5.3) sowie der Vereinfachung der ISO Referenzmethode zur Bestimmung der Enterobacteriaceakonzentrationen (Kap. 5.4) Die Untersuchungen sind als Modifikationen bestehender validierter bzw. normierter Verfahren anzusehen.

Die wesentlichen Ergebnisse der durchgeführten Untersuchungen sind:

- I. Die Entnahmestelle von Probenmaterial aus handelsüblichen Packungen von Faschiertem hatte keinen signifikanten Einfluss auf das Ergebnis, d.h. dass das Homogenisieren eines solchen Packungsinhaltes vor der Probenahme nicht nötig erscheint.
- II. Bei der Untersuchung von nicht-destruktiv gewonnenen Proben von Schlachtkörperoberflächen mit Schwämmen wurden Ergebnisse erhalten, die jenen der mit der vorgeschriebenen destruktiven Methode gewonnenen Proben entsprachen.
- III. Die Anwendung eines teilautomatisierten Verfahrens zur Herstellung serieller Verdünnungen im Vergleich zur manuellen Herstellung von Verdünnungsreihen hatte keinen signifikanten Einfluss auf die erhaltenen Ergebnisse. Die Zeitersparnis durch das teilautomatisierte Verfahren betrug dabei ca. 13 Sekunden je Verdünnungsstufe.

- IV. Der Wegfall der Prüfung auf Glucosefermentation (und damit eine Verkürzung der Analyse um 24 Stunden) bei der Untersuchung auf *Enterobacteriaceae* (Bestimmungsmethode ISO 21258-2) hatte keinen Einfluss auf das Ergebnis.

8 Literaturverzeichnis

AMANN, R.; LUDWIG, W.; SCHLEIFER, K.H. (1992): Gensonden und ihre Anwendung in der Mikrobiologie. Naturwissenschaften Vol. 79 (5), 213 – 219

AUCKENTHALER, A.; HUGGENBERGER, P. (2002): Pathogene Mikroorganismen im Grund- und Trinkwasser – Transport, Nachweismethoden und Wassermanagement. (Huggenberger P. Hrsg). Birkhäuser Verlag, 1. Auflage

BALTES, W.; KROH, L. W. (2004): Schnellmethoden zur Beurteilung von Lebensmitteln und ihren Rohstoffen (Kroh L. W., Hrsg). Behr's Verlag, Hamburg

BARTEL, B.; MALCZAN, M.; RIEMELT, I. (2003): Milchwirtschaftliche Mikrobiologie (Riemelt I., Hrsg). Behr's Verlag, Hamburg, 2. Auflage

BAST, E. (1999): Mikrobiologische Methoden: Eine Einführung in grundlegende Arbeitstechniken. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg

BAUMGART, J. (2008): I.4 Kultivierung von Mikroorganismen. In: Mikrobiologische Untersuchung von Lebensmitteln (Baumgart J., Hrsg). Behr's Verlag, Hamburg

BAUMGART, J. (2008): II.3 Bestimmungen über die Entnahme und Aufbereitung von Untersuchungsproben. In: Mikrobiologische Untersuchung von Lebensmitteln (Baumgart J., Hrsg). Behr's Verlag, Hamburg

BAUMGART, J. (2008): II.4 Herstellung von Verdünnungen. In: Mikrobiologische Untersuchung von Lebensmitteln (Baumgart J., Hrsg). Behr's Verlag, Hamburg

BAUMGART, J. (2008): II.5 Bestimmung der Keimzahl. In: Mikrobiologische Untersuchung von Lebensmitteln (Baumgart J., Hrsg). Behr's Verlag, Hamburg

BAUMGART, J.; HEESCHEN, W.; RHEINBABEN, F.; ZSCHALER, R. (2004): Lexikon Lebensmittel -Mikrobiologie und -Hygiene (Holzapfel W. Hrsg). Behr's Verlag, Hamburg, 3. Auflage

BAUMGARTNER, A.; BISCHOFBERGER, T.; BISSIG-CHOISAT, B.; DALLA; TORRE, M.; EMCH, H.; GAFNER, J.-L.; HÜBNER, Ph.; MEYER, R.; MÜLLER, Ch.; SCHEFFELDT, P.; SPAHR, U.; STEPHAN, R.; WÄSPI, U. (2006): Leitfaden zur Validierung mikrobiologischer Prüfverfahren und zur Abschätzung der Messunsicherheit im Bereich Lebensmittel- und Umweltmikrobiologie. Eidgen. Volkswirtschaftsdepartement EVD, Dokument Nr. 328.dw, Ausg. Februar 2006, Rev. 01

BELITZ, H. D.; GROSCHE, W.; SCHIEBERLE, P. (2007): Lehrbuch der Lebensmittelchemie. Springer Verlag, Berlin, 6. Auflage

BLODGETT, R. J.; GARTHRIGHT, W. E. (2003): FDA's preferred MPN methods for standard, large or unusual tests, with a spreadsheet. Food Microbiol. 20:439-445

BUCHANAN, R.L.; SCHULTZ, F.J. (1992): Evaluation of the BCET-RPLA kit for the detection of *Bacillus cereus* diarrheal enterotoxin as compared to cell culture cytotoxicity. J.Food Prot. 55, 440–443

BÜLTE, M.; REUTER, G. (1982): Die Einsatzfähigkeit von Eintauchobjektträgern (Dip-Slides) zur Ermittlung des Oberflächenkeimgehaltes auf Schlachttierkörpern, Arch. Lebensmittelhyg. 33, 11 – 17

BYRNE, B.; DUNNE, G.; LYNG, J.; BOLTON, D.J. (2005): Microbiological carcass sampling methods to achieve compliance with 2001/471/EC and new hygiene regulations. Research in Microbiology 156, 104-106.

DASCHNER, F.; DETTENKOFER, M.; FRANK, U.; SCHERRER, M. (2006):
Praktische Krankenhaushygiene und Umweltschutz. (Daschner F., Hrsg). Springer
Verlag, Berlin, 3. Auflage

DEIBL, J.; PAULSEN, P.; BAUER, F.(1998): Die direkte Epifluoreszenz Filtertechnik
als Methode der raschen Ermittlung der Gesamtkeimzahl in Fleisch und Fleischwaren.
Wien. Tierärztl. Mschr. 85, 327-333.

DIN EN ISO/IEC 17025:2005. Allgemeine Anforderungen an die Kompetenz von Prüf-
und Kalibrierlaboratorien. deutsche Fassung: Deutsches Institut für Normung

DUFLOS, G.; DERVIN, C.; MALLE, P.; VALLE, M.; BOUQUELET, S. (1999):
Relevance of matrix effect in determination of biogenic amines in plaice (*Pleuronectes
platessa*) and whiting (*Merlangus merlangus*). J. AOAC Internat. 82, 1097-1101.

EHRMANN, M.; VOGEL, R. F. (2008): Molekularbiologische Methoden. In:
Mikrobiologische Untersuchung von Lebensmittel (Baumgart J., Hrsg). Behr's Verlag,
Hamburg

EISGRUBER, H.; SCHALCH, B.; STOLLE, A.; WAWERLA, M. (1999): Impedance
microbiology : Applications in food hygiene. J. Food Protection 1999; 62: 1488 – 1496

ENGVAL, E.; PERLMANN, P. (1971): Enzyme-linked immunosorbent assay
(ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. Immunochemistry 8, 871–874

GAUTSCH, S.; HÜBNER, P.; JEMMI, T. (2002): In house-Validierung
mikrobiologischer Prüfverfahren. Mitt. Geb. Lebens. Hyg. 93, 118-139

GILL, C.O.; JONES, T. (2000): Microbiological sampling of carcasses by excision or
swabbing. Journal of Food Protection 63, 167–173.

HOUGHTBY, G.A.; PEELER, J. T.; RAINOSEK, A. P. (1992): The most probable number technique. In: Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods (Vanderzant C. & Splittstoesser D. F., Hrsg). American Public Health Association, Washington DC, 1992; 105 – 119

JANSOHN, M. (2007): Gentechnische Methoden: Eine Sammlung von Arbeitsanleitungen für das molekularbiologische Labor. 4. Auflage, Elsevier GmbH, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg

JORDANO, R.; MEDINA, L. M. (1999): Petrifilm - An Enhanced Cultural Technique. In: Encyclopedia of food microbiology. Robinson R.K., Batt C.A., (Patel P.D., Hrsg.), Academic Press, San Diego, Vol. 3, S. 1662-1671

JURINKA, A.; MIFEK, K. (1994): Impedanzverfahren zur Untersuchung wichtiger mikrobiologischer Parameter. Ernährung Vol. 18; 210-213

KOBURGER, J.A.; OBLINGER, J. L. (1975): Understanding and teaching the Most Probable Number technique. J. Milk Food Technol. 38:540-545

KRÄMER, J. (2005): Kultureller Nachweis der Mikroorganismen und ihrer Stoffwechselprodukte. In: Taschenbuch für Lebensmittelchemiker (Frede W., Hrsg). Springer Verlag, Berlin, 2. Auflage, 2005; S. 444-445

KRÄMER, J. (2007): Lebensmittel-Mikrobiologie. 5. Auflage, Verlag Eugen Ulmer KG, Stuttgart, 5. Auflage

KYRIAKIDES, A. L.; PATEL, P. D. (1994): Luminescence techniques for microbiological analysis of foods. In: Rapid analysis techniques in food microbiology (Patel P. Hrsg), Chapman & Hall, London, 196 – 231

Leitlinie für eine gute Hygienepaxis und die Anwendung der Grundsätze des HACCP bei der Schlachtung und Zerlegung von Rindern, Schweinen, Schafen, Ziegen und

Pferden sowie bei der Herstellung von Fleischerzeugnissen (2007) Veröffentlicht mit Erlass: BMGFJ-75220/0030-IV/B/7/2007 v. 6.8.2007

LOTTSPREICH, F.; ENGELS, J. W. (2006): Bioanalytik. 2. Auflage, Elsevier GmbH Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg

MALLE, P.; VALLE, M; BOUQUELET, S. (1996): Assay of biogenic amines involved in fish decomposition. J. AOAC Internat. 79, 43-49. 2.

MEYER, H.; SINELL, H. J. (1996): Lebensmittelsicherheit HACCP in der Praxis. (Sinell H. J. Hrsg). Behr's Verlag, Hamburg, 1. Auflage

NEWTON, C. R.; GRAHAM, A. (1994): PCR. Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg

PAULSEN, P.; SCHOPF, E.; SMULDERS, F.J.M. (2006): Enumeration of Total Aerobic Bacteria and *E. coli* in Minced Meat and on Carcass Surface Samples with an Automated Most-Probable-Number Method Compared to Colony Count Protocols. J. Food Prot. 69 (10), 2500-2503

PAULSEN, P.; BORGETTI, C.; SCHOPF, E.; SMULDERS, F.J.M. (2008): Enumeration of *Enterobacteriaceae* in Various Foods with a New Automated MPN Method, Compared to Petrifilm and ISO Procedures. J. Food Prot. 71, 376-379.

PEARCE, R.A.; BOLTON, D.J. (2005): Excision vs sponge swabbing - a comparison of methods for the microbiological sampling of beef, pork and lamb carcasses. Journal of Applied Microbiology 98, 896-900.

REGENASS-KLOTZ, SM. (2005): Grundzüge der Gentechnik Theorie und Praxis. 3. Auflage, Birkhäuser Verlag AG, Basel

SLAVIK, M. F.; WANG, X. (1999): Rapid detection of Salmonella in chicken washes by immunomagnetic separation and flow cytometry, J. Food Protection 62, 1488 – 1496

VAN WEEMEN, B.K.; SCHURRS, A.H.W.M. (1971): Immunoassay using antigen-enzyme conjugates. FEBS Lett. 15, 232–236

WIENECKE, A.A.; GILBERT, R.J. (1987): Comparison of four methods for the detection of staphylococcal enterotoxins in foods from outbreaks of food poisoning. Int. J. Food Microbiol. 4, 135–143

Gesetzestexte:

EN ISO 16140:2003. Microbiology of food and animal feeding stuffs - Protocol for the validation of alternative methods. International Organization for Standardization

Verordnung (EG) Nr. 2073/2005 der Kommission vom 15. November 2005 über mikrobiologische Kriterien für Lebensmittel. Amtsblatt der Europäischen Union L 338, 22.12

VO (EG) 1441/2007 DER KOMMISSION vom 5. Dezember 2007 zur Änderung der Verordnung (EG) Nr. 2073/2005 über mikrobiologische Kriterien für Lebensmittel. Online im Internet:

<http://eurlex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2007:322:0012:0029:DE:PDF> (Stand Mai 2009)

Elektronische Ressourcen:

AFNOR-Validation, validierte Methoden in der Lebensmittelindustrie. Online im Internet: <http://www.afnor-validation.com/afnor-validation-validated-methods/validated-methods.html> (Stand März 2009)

AOAC International, performance tested methods. Online im Internet:

<http://www.aoac.org/testkits/testedmethods.html> (Stand März 2009)

MicroVal, validierte Methoden. Online im Internet: [http://www.microval.org/validated-](http://www.microval.org/validated-methods.html)

[methods.html](http://www.microval.org/validated-methods.html) (Stand März 2009)

USDA-FDA (2001): Bacteriological Analytical Manual Online, Jan. 2001, Appendix 2:

Most Probable Number from Serial Dilutions. Available at:

<http://www.cfsan.fda.gov/~ebam-a2.html>.

Lebenslauf

Sabine Mifek

Hernalser Hauptstraße 79/2/47

1170 Wien

Persönliche Daten

Sabine Mifek

Geboren am 13.5.1983 in Wien

Österr. Staatsbürgerin

Studium

WS 2003 – SS 2009 Studium der Ernährungswissenschaften; Universität Wien

Juni 2005 Abschluss des ersten Studienabschnitts

Seit WS 2005 Studium der Lebensmittel- und Biotechnologie

Ausbildung

2001-2003 Kolleg für Tourismus und Freizeitwirtschaft,
Tourismusschule Modul
Peter-Jordan-Str. 78; 1190 Wien

1993-2001 8 Klassen AHS,
Institut Neulandschule
L.v.Höhnelgasse 17; 1100 Wien

Berufliche Tätigkeiten

10/2007	Laborpraktikum am Institut für Ernährung der Veterinärmedizinischen Universität Wien
07/2007	Praktikum bei der Österreichischen Agentur für Gesundheit und Ernährungssicherheit (AGES) im Bereich Lebensmitteluntersuchung (Nahrungsergänzungsmittel, Novel Food)
03/2007	Praktikum bei der Österreichischen Gesellschaft für Ernährung (ÖGE)
2007 – 2009	organisatorische Tätigkeit und Assistenz bei der Akademie für Ernährung und Lebensmittelqualität (Fortbildungsplattform für KindergartenpädagogInnen, -assistentInnen)
2006-2008	organisatorische Tätigkeit und Mitarbeit im Bereich der Ernährungsbildung bei dem Projekt „Eltern-Kinder-Kochreise“ in Wiener Kindergärten
09/2006	Laborpraktikum in der Lebensmitteluntersuchungsanstalt der Stadt Wien, MA 38
2005 – 2009	Ernährungsberatung im Auftrag des Wiener Lebensmittel- und Ernährungsservice (MA 38) bei diversen

Veranstaltungen

07/2003

Ferialpraktikum bei der Feinkosterzeugung Wojnar im
Bereich Lebensmittelproduktion

9 Anhang

9.1 Probeentnahmestellen bei Faschiertem

Tabelle 17: Analyseergebnisse der Gesamtkeimzahl verschiedener Probeentnahmestellen bei Faschiertem

	GKZ Verdünnung 10^{-3}	GKZ Verdünnung 10^{-4}	GKZ Verdünnung 10^{-5}	kbE/g	log
Probenr.: 1					
Probestelle A	96	9	0	95455	4,98
Probestelle B	117	14	1	119091	5,08
Probestelle C	123	13	2	123636	5,09
Probestelle D	98	8	2	96364	4,98
Probestelle E	125	11	1	123636	5,09
Probestelle F	113	10	1	111818	5,05
Probestelle G	110	8	1	107273	5,03
Probestelle H	112	13	1	113636	5,06
Probenr.: 2					
Probestelle A	> 300	> 300	126	12600000	7,10
Probestelle B	> 300	> 300	144	14400000	7,16
Probestelle C	> 300	> 300	143	14300000	7,16
Probestelle D	> 300	> 300	153	15300000	7,18
Probestelle E	> 300	> 300	157	15700000	7,20
Probestelle F	> 300	> 300	135	13500000	7,13
Probestelle G	> 300	> 300	149	14900000	7,17
Probestelle H	> 300	> 300	144	14400000	7,16
Probenr.: 3					
Probestelle A	123	15	2	125455	5,10
Probestelle B	76	14	1	81818	4,91
Probestelle C	89	10	1	90000	4,95
Probestelle D	113	14	1	115455	5,06
Probestelle E	83	15	2	89091	4,95
Probestelle F	86	8	0	85455	4,93
Probestelle G	99	10	1	99091	5,00
Probestelle H	96	7	0	93636	4,97
Probenr.: 4					
Probestelle A	> 300	> 300	191	19100000	7,28
Probestelle B	> 300	> 300	200	20000000	7,30
Probestelle C	> 300	> 300	150	15000000	7,18
Probestelle D	> 300	> 300	160	16000000	7,20

Probestelle E	> 300	> 300	280	28000000	7,45
Probestelle F	> 300	> 300	131	13100000	7,12
Probestelle G	> 300	> 300	260	26000000	7,41
Probestelle H	> 300	> 300	180	18000000	7,26
Probenr.: 5					
Probestelle A	156	18	3	158182	5,20
Probestelle B	143	15	1	143636	5,16
Probestelle C	175	19	2	176364	5,25
Probestelle D	165	13	2	161818	5,21
Probestelle E	135	12	2	133636	5,13
Probestelle F	142	15	1	142727	5,15
Probestelle G	153	12	1	150000	5,18
Probestelle H	163	15	1	161818	5,21
Probenr.: 6					
Probestelle A	> 300	165	19	1672727	6,22
Probestelle B	> 300	185	16	1827273	6,26
Probestelle C	> 300	95	13	981818	5,99
Probestelle D	> 300	135	19	1400000	6,15
Probestelle E	> 300	213	25	2163636	6,34
Probestelle F	> 300	198	26	2036364	6,31
Probestelle G	> 300	165	23	1709091	6,23
Probestelle H	> 300	195	21	1963636	6,29
Probenr.: 7					
Probestelle A	> 300	58	4	563636	5,75
Probestelle B	> 300	75	8	754545	5,88
Probestelle C	> 300	82	11	845455	5,93
Probestelle D	> 300	65	9	672727	5,83
Probestelle E	> 300	86	11	881818	5,95
Probestelle F	> 300	97	7	945455	5,98
Probestelle G	> 300	78	5	754545	5,88
Probestelle H	> 300	109	15	1127273	6,05
Probenr.: 8					
Probestelle A	> 300	53	7	545455	5,74
Probestelle B	> 300	44	3	427273	5,63
Probestelle C	> 300	88	11	900000	5,95
Probestelle D	> 300	57	4	554545	5,74
Probestelle E	> 300	75	8	754545	5,88
Probestelle F	> 300	81	7	800000	5,90
Probestelle G	> 300	68	5	663636	5,82
Probestelle H	> 300	51	4	500000	5,70

Probenr.: 9					
Probestelle A	> 300	> 300	30	3000000	6,48
Probestelle B	> 300	> 300	36	3600000	6,56
Probestelle C	> 300	> 300	17	1700000	6,23
Probestelle D	> 300	> 300	31	3100000	6,49
Probestelle E	> 300	> 300	27	2700000	6,43
Probestelle F	> 300	> 300	41	4100000	6,61
Probestelle G	> 300	> 300	49	4900000	6,69
Probestelle H	> 300	219	15	2127273	6,33
Probenr.: 10					
Probestelle A	> 300	85	12	881818	5,95
Probestelle B	> 300	65	11	690909	5,84
Probestelle C	> 300	102	4	963636	5,98
Probestelle D	> 300	57	7	581818	5,76
Probestelle E	> 300	> 300	16	1600000	6,20
Probestelle F	> 300	78	6	763636	5,88
Probestelle G	> 300	132	17	1354545	6,13
Probestelle H	> 300	96	10	963636	5,98

Tabelle 18: Analyseergebnisse von *E. coli* verschiedener Probenentnahmestellen bei Faschiertem

Probenr.: 1	<i>E. coli</i> Verdünnung 10 ⁻¹	kbE/g	log
Probestelle A	210	2100	3,32
Probestelle B	110	1100	3,04
Probestelle C	330	3300	3,52
Probestelle D	170	1700	3,23
Probestelle E	120	1200	3,08
Probestelle F	110	1100	3,04
Probestelle G	160	1600	3,20
Probestelle H	150	1500	3,18
Probenr.: 2			
Probestelle A	50	500	2,70
Probestelle B	40	400	2,60
Probestelle C	30	300	2,48
Probestelle D	40	400	2,60
Probestelle E	30	300	2,48
Probestelle F	30	300	2,48
Probestelle G	50	500	2,70
Probestelle H	35	350	2,54
Probenr.: 3			

Probestelle A	120	1200	3,08
Probestelle B	90	900	2,95
Probestelle C	90	900	2,95
Probestelle D	120	1200	3,08
Probestelle E	140	1400	3,15
Probestelle F	130	1300	3,11
Probestelle G	90	900	2,95
Probestelle H	70	700	2,85
Probenr.: 4			
Probestelle A	60	600	2,78
Probestelle B	80	800	2,90
Probestelle C	60	600	2,78
Probestelle D	40	400	2,60
Probestelle E	70	700	2,85
Probestelle F	40	400	2,60
Probestelle G	50	500	2,70
Probestelle H	40	400	2,60
Probenr.: 5			
Probestelle A	80	800	2,90
Probestelle B	110	1100	3,04
Probestelle C	130	1300	3,11
Probestelle D	210	2100	3,32
Probestelle E	90	900	2,95
Probestelle F	120	1200	3,08
Probestelle G	80	800	2,90
Probestelle H	150	1500	3,18
Probenr.: 6			
Probestelle A	< 10		
Probestelle B	< 10		
Probestelle C	< 10		
Probestelle D	< 10		
Probestelle E	< 10		
Probestelle F	< 10		
Probestelle G	< 10		
Probestelle H	< 10		
Probenr.: 7			
Probestelle A	< 10		
Probestelle B	< 10		
Probestelle C	< 10		
Probestelle D	< 10		
Probestelle E	< 10		

Probestelle F	< 10		
Probestelle G	< 10		
Probestelle H	< 10		
Probenr.: 8			
Probestelle A	< 10		
Probestelle B	< 10		
Probestelle C	< 10		
Probestelle D	< 10		
Probestelle E	< 10		
Probestelle F	< 10		
Probestelle G	< 10		
Probestelle H	< 10		
Probenr.: 9			
Probestelle A	< 10		
Probestelle B	< 10		
Probestelle C	< 10		
Probestelle D	< 10		
Probestelle E	< 10		
Probestelle F	< 10		
Probestelle G	< 10		
Probestelle H	< 10		
Probenr.: 10			
Probestelle A	< 10		
Probestelle B	< 10		
Probestelle C	< 10		
Probestelle D	< 10		
Probestelle E	< 10		
Probestelle F	< 10		
Probestelle G	< 10		
Probestelle H	< 10		

9.2 Vergleichende Untersuchung zur Herstellung von seriellen Verdünnungen

Tabelle 19: Analysenergebnisse der Referenzmethode zur Herstellung von seriellen Verdünnungen

Probennummer	Koloniezahl bei V 10 ⁻³	Koloniezahl bei V 10 ⁻⁴	Koloniezahl bei V 10 ⁻⁵	gewichtetes Mittel	log ₁₀
10738	34	3	0	33636,3636	4,53
10650	36	7	0	39090,9091	4,59
10710	43	5	0	43636,3636	4,64
10735	52	5	0	51818,1818	4,71
10736	53	4	0	51818,1818	4,71
10724	54	6	1	54545,4545	4,74
10737	71	6	0	70000	4,85
10734	87	9	1	87272,7273	4,94
10645	90	11	1	91818,1818	4,96
10725	96	13	3	99090,9091	5,00
10712	98	10	1	98181,8182	4,99
10747	110	10	2	109090,909	5,04
10728	135	14	2	135454,545	5,13
10746	143	10	2	139090,909	5,14
10727	162	14	2	160000	5,20
10740	165	19	1	167272,727	5,22
10702	167	15	2	165454,545	5,22
10652	170	18	0	170909,091	5,23
10701	213	24	3	215454,545	5,33
10743	216	23	2	217272,727	5,34
10651	220	19	2	217272,727	5,34
10714	273	28	3	273636,364	5,44
10726	282	29	3	282727,273	5,45
10739	286	26	3	283636,364	5,45
10703	291	28	3	290000	5,46
10699	309	29	4	307272,727	5,49
10700	313	25	3	307272,727	5,49
10744	> 300	32	4	327272,727	5,51
10745	> 300	34	3	336363,636	5,53
10721	> 300	38	4	381818,182	5,58
10742	> 300	42	5	427272,727	5,63
10709	> 300	43	4	427272,727	5,63

10732	> 300	44	4	436363,636	5,64
10723	> 300	45	4	445454,545	5,65
10715	> 300	46	3	445454,545	5,65
10718	> 300	49	7	509090,909	5,71
10722	> 300	51	3	490909,091	5,69
10750	> 300	58	5	572727,273	5,76
10717	> 300	62	5	609090,909	5,78
10704	> 300	65	7	654545,455	5,82
10716	> 300	72	6	709090,909	5,85
10751	> 300	83	7	818181,818	5,91
10729	> 300	91	10	918181,818	5,96
10730	> 300	93	11	945454,545	5,98
10741	> 300	96	12	981818,182	5,99
10646	> 300	112	13	1136363,64	6,06
10711	> 300	115	11	1145454,55	6,06
10713	> 300	155	17	1563636,36	6,19
10733	> 300	162	16	1618181,82	6,21
10731	> 300	188	17	1863636,36	6,27
10647	> 300	202	19	2009090,91	6,30
10752	> 300	264	25	2627272,73	6,42
10708	> 300	> 300	56	5600000	6,75
10705	> 300	> 300	95	9500000	6,98
10706	> 300	> 300	116	11600000	7,06
10639	> 300	> 300	175	17500000	7,24
10640	> 300	> 300	182	18200000	7,26
10707	> 300	> 300	213	21300000	7,33
10668	> 300	> 300	265	26500000	7,42
10683	93,00	14,00	1,00	9727,27	3,99
10682	86,00	8,00	2,00	8545,45	3,93
10684	72,00	11,00	1,00	7545,45	3,88

Tabelle 20: Analyseergebnisse der alternativen Methode zur Herstellung serieller Verdünnungen

Probennummer	Koloniezahl bei V 10 ⁻³	Koloniezahl bei V 10 ⁻⁴	Koloniezahl bei V 10 ⁻⁵	gewichtetes Mittel	log ₁₀
10738	41	3	0	40000	4,60
10650	29	2	1	28181,8182	4,45
10710	89	12	1	91818,1818	4,96
10735	46	4	0	45454,5455	4,66
10736	57	4	0	55454,5455	4,74
10724	41	5	1	41818,1818	4,62

10737	66	5	0	64545,4545	4,81
10734	91	8	1	90000	4,95
10645	88	9	1	88181,8182	4,95
10725	122	17	2	126363,636	5,10
10712	82	10	0	83636,3636	4,92
10747	97	11	1	98181,8182	4,99
10728	132	16	1	134545,455	5,13
10746	140	22	1	147272,727	5,17
10727	156	13	2	153636,364	5,19
10740	139	16	2	140909,091	5,15
10702	202	33	3	213636,364	5,33
10652	246	12	3	234545,455	5,37
10701	> 300	41	5	418181,818	5,62
10743	192	18	1	190909,091	5,28
10651	164	25	4	171818,182	5,24
10714	> 300	31	6	336363,636	5,53
10726	234	21	3	231818,182	5,37
10739	> 300	28	3	281818,182	5,45
10703	> 300	37	4	372727,273	5,57
10699	> 300	45	6	463636,364	5,67
10700	298	31	3	299090,909	5,48
10744	> 300	31	3	309090,909	5,49
10745	283	26	2	280909,091	5,45
10721	> 300	43	3	418181,818	5,62
10742	> 300	43	4	427272,727	5,63
10709	> 300	65	4	627272,727	5,80
10732	> 300	66	7	663636,364	5,82
10723	> 300	37	4	372727,273	5,57
10715	> 300	41	3	400000	5,60
10718	> 300	54	7	554545,455	5,74
10722	> 300	59	4	572727,273	5,76
10750	> 300	51	3	490909,091	5,69
10717	> 300	49	4	481818,182	5,68
10704	> 300	59	7	600000	5,78
10716	> 300	65	6	645454,545	5,81
10751	> 300	115	10	1136363,64	6,06
10729	> 300	113	15	1163636,36	6,07
10730	> 300	110	9	1081818,18	6,03
10741	> 300	98	13	1009090,91	6,00
10646	> 300	117	10	1154545,45	6,06
10711	> 300	103	13	1054545,45	6,02

10713	> 300	97	10	972727,273	5,99
10733	> 300	131	15	1327272,73	6,12
10731	> 300	151	17	1527272,73	6,18
10647	> 300	150	14	1490909,09	6,17
10752	> 300	> 300	34	3400000	6,53
10708	> 300	> 300	71	7100000	6,85
10705	> 300	> 300	73	7300000	6,86
10706	> 300	> 300	135	13500000	7,13
10639	> 300	> 300	170	17000000	7,23
10640	> 300	> 300	156	15600000	7,19
10707	> 300	> 300	244	24400000	7,39
10668	> 300	> 300	243	24300000	7,39
10683	106,00	16,00	2,00	11090,91	4,04
10682	83,00	12,00	1,00	8636,36	3,94
10684	63,00	7,00	2,00	6363,64	3,80

Tabelle 21: Zeitmessergebnisse der zu vergleichenden Methoden zur Herstellung von seriellen Verdünnungen

konventionelle Methode	automatisierte Methode
3,36 min	2,36 min
3,35 min	2,5 min
3,31 min	2,48 min
3,21 min	2,56 min
3,29 min	2,49 min
3,23 min	2,55 min
3,36 min	2,35 min
3,24 min	2,41 min
3,09 min	2,43 min
3,17 min	2,49 min
3,27 min	2,55 min
3,10 min	2,57 min
3,13 min	2,41 min
3,21 min	2,56 min
3,05 min	3,04 min
3,21 min	2,49 min
3,13 min	2,5 min
3,19 min	2,39 min
3,25 min	2,57 min
3,09 min	2,48 min
3,17 min	2,28 min
3,11 min	2,41 min

3,19 min	2,5 min
3,22 min	2,47 min
3,17 min	2,43 min
3,29 min	3,07 min
3,15 min	2,55 min
3,39 min	2,36 min
3,19 min	2,35 min
3,13 min	3,01 min
3,29 min	2,42 min
3,10 min	2,55 min

9.3 Liste validierter und zertifizierter Methoden.

9.3.1 Salmonella

Art	Marke	Anbieter	AFNOR*	AOAC perf.tested**	Nat. Norm (DIN oder Methodensammlung)
Immun-Enzym Test	Rapidyme <i>Salmonella</i>	BIO ART SA	LM ^{***} , FM ^{****}		
	Transia Plate <i>Salmonella</i> Gold	BioControl Systems	LM, FM, UP ^{****}		
	TAG 24 <i>Salmonella</i>	BioControl Systems	X		
	Bioline <i>Salmonella</i> Elisa Test Selecta	BIOLINE	LM, FM		
	Bioline <i>Salmonella</i> Elisa Test Optima	BIOLINE	LM, FM	LM, FM	
	Vidas <i>Salmonella</i> Dual selective enrichment protocol	bioMérieux	LM, FM		
	Vidas <i>Salmonella</i> Simple selective enrichment protocol	bioMérieux	LM, FM		

	Vidas ICS2-SLM	bioMérieux	LM, FM (außer Rohmilch)		
	Vidas ICS2-Plate	bioMérieux	LM, FM (außer Rohmilch)		
	Vidas Easy <i>Salmonella</i>	bioMérieux	LM, FM, UP		
	<i>Salmonella</i> OPTIMA	RAYAL	LM, FM, UP		
	<i>Salmonella</i> SELECTA	RAYAL	LM, FM, UP		
	RIDASCREEN <i>Salmonella</i>	R-Biopharm	LM, FM, UP		
	Tecra Ultima <i>Salmonella</i>	TECRA INTERNATIONAL Pty Ltd	LM, FM		
	Tecra Unique <i>Salmonella</i>	TECRA INTERNATIONAL Pty Ltd	X		
	Reveal <i>Salmonella</i> Test System	Neogen Corporation		LM	
					DIN 10121 oder.: §64 LFGB Nr. 00.00-66
Impedanzverfahren					DIN 10120

					oder.: §64 LFGB Nr. 00.00-67
PCR	TAQMAN <i>Salmonella</i>	Applied Biosystems S.A.	LM, FM	Rinderfaschiertes, Hühnerflügel, Cheddar, trockenes Haustierfutter	
	Assurance GDS <i>Salmonella</i>	BioControl Systems	X	rohes Rindfleisch, Schweinefleisch, Truthahnfaschiertes, Hühnerspülwasser, rohe Shrimps, Milch, Eier, UP (Gummi, Stahl, Beton)	
	iQ-Check <i>Salmonella</i> II	BIO-RAD	LM, FM, UP	rohes Rindfleisch, rohes Hühnerfleisch, Melonen, Eier	
	GeneDisc <i>Salmonella</i> spp.	GENESYSTEMS	X		
	Systeme BAX <i>Salmonella</i> automatised	DuPont Qualicon	LM, FM, UP	Vielzahl an LM	
	ADIAFOOD Rapid Pathogen Detection System	AES Chemunex		Vielzahl an LM	

	LightCycler® foodproof Detection Kit	BIOTECON Diagnostics GmbH		Vielzahl an LM	
	R.A.P.I.D. LT Food Security System	Idaho Technology, Inc		rohes Hühnerfleisch, gekochter Schinken, Schokolade	
					DIN 10135 oder.: §64 LFGB Nr. 00.00-52
					§64 LFGB Nr. 00.00-98
Hybridisierung	Lumiprobe 24 <i>Salmonella</i>	EUROPROBE SA	LM, FM		
	GENE TRAK <i>Salmonella</i> DLP Assay	Neogen Corporation		LM, FM, UP	
	GeneQuence <i>Salmonella</i> Microwell assay	Neogen Corporation		Vielzahl an Lebensmittel	
Kultur	Simple Method For <i>Salmonella</i>	AES Chemunex	LM, FM, UP (außer breeding samples)		

	Rapid' Salmonella	BIO-RAD	LM, FM	rohe Hühnerbrust, Eier, Melonen	
	Salmonella Inhibigen	OXOID Thermofisher Scientific	X		
	SESAME Salmonella Test	SOLABIA BIOKAR	X		
	BBLTM CHROMagarTM	BD Diagnostics		Vielzahl an LM	
	Rapid Culture Methode using one Broth	Remel and OXOID		Rinderfaschiertes, Hühnerfaschiertes, Salat, Shrimps, Eierschale	
Immunologischer Test	Oxoid Sallmonella rapid test	OXOID Thermofisher Scientific	LM, FM	LM, FM, UP	
	ULTRA System for Salmonella species	Matrix MicroScience Ltd		Vielzahl an LM	
	ULTRA Salmonella Species Pooling test system	Matrix MicroScience Ltd		gekochtes Huhn, rohes Vollei, Schokolade, Milchpulver, gefrorene Garnelen	
	ULTRA Salmonella "10" Pooling	Matrix MicroScience Ltd		gekochter Schinken, Schokolade, Tomaten	

	DuPont Lateral Flow System Test Kit	DuPont Qualicon		Vielzahl an LM	
	RapidChek Salmonella Assay	Strategic Diagnostics Inc		Vielzahl an LM	
	RapidChek SELECT	Strategic Diagnostics Inc		Vielzahl an LM	
	Singlepath® Lateral Flow Assay	Merck KGaA / EMD Chemicals, Inc.		Vielzahl an LM	
	Transia Card	Raisio Diagnostics AB		Vielzahl an LM und FM	

* [http://www.afnor-validation.com/afnor-validation-validated-methods/validated-methods.html]

** [http://www.aoac.org/testkits/testedmethods.html]

*** LM: alle Lebensmittel, die für den menschlichen Verzehr vorgesehen sind

**** FM: Futtermittel

***** UP: Umweltproben

9.3.2 *Listeria* spp.

Art	Marke	Anbieter	AFNOR	AOAC perf.tested	Nat. Norm (DIN oder Methodensammlung)
Immun-Enzym Test	Transia Plate Listeria	BioControl Systems	LM		
	Vidas Listeria	bioMérieux	LM, UP	rohes Fleisch, Geflügel, Meeresfrüchte, Gemüse, Fleisch-, Milchprodukte, UP	
	Vidas Listeria Species Xpress	bioMérieux	Fleischprodukte, Milchprodukte, UP	Fleisch, Milch, UP	

	Vidas Listeria DUO	bioMérieux	LM, UP	rohes Schweinefleisch, Hühnerfaschiertes, Frankfurter, tiefgekühltes Rinderfaschiertes, Schinken, Rinderbraten, Cheddar, Camembert, past. Milch, Joghurt, grüne Bohnen, Kabeljau, Shrimps, Krabbenfleisch, Blumenkohl, Vanilleeis	
	Tecra Ultima Listeria	TECRA INTERNATIONAL Pty Ltd	LM, UP		
PCR	iQ Check Listeria spp	BIO-RAD	LM, UP	UP (Stahl, Plastik, Keramik, Beton)	
	BAX® Listeria spp	DuPont Qualicon	X	UP	

	ADIAFOOD Rapid Pathogen Detection System	AES Chemunex		Vielzahl an LM	
	Assurance GDS	BioControl Systems		past. Milch, Weichkäse, Frankfurter, essfertiger Truthahn, grüne Bohnen, roher Fisch, UP (Gummi, Beton, Stahl, Plastik)	
	R.A.P.I.D. LT Food Security System	Idaho Technology, Inc		Truthahn, Weichkäse, UP (Stahl, Keramik)	
Hybridisierung	GENE TRACK Listeria DPL Assay	Neogen Corporation		Milchprodukte, Fleisch, Meeresfrüchte, UP	
	GeneQuence Listeria Microwell test	Neogen Corporation		Fleisch, Meeresfrüchte, Milchprodukte, Gemüse, UP	
Kultur	Ottaviani Agosti Agar	bioMérieux	LM, UP	UP (Stahl, Plastik, Keramik, Beton)	
	Rapid Listeria spp.	BIO-RAD	LM, UP		

Immunologischer Test	TRANSIA STRIP Listeria	BioControl Systems	X		
	Oxoid Listeria rapid test	OXOID Thermofisher Scientific	LM	LM, UP	
	ULTRA Listeria species test system	Matrix MicroScience Ltd		Vielzahl an LM	
	ULTRA Listeria species pooling test system	Matrix MicroScience Ltd		gekochtes Huhn, rohes Vollei, Schokolade, Milchpulver, gefrorene Garnelen	
	DuPont Lateral Flow System Test Kit	DuPont Qualicon		Vielzahl an LM, UP	
	RapidChek Listeria species Test	Strategic Diagnostics Inc		Vielzahl an LM, UP	
	RapidChek Listeria species Media	Strategic Diagnostics Inc		Vielzahl an LM, UP	
	Reveal® One- Step Listeria Environmental	Neogen Corporation		Vielzahl an LM, UP	

biochemischer Test	MicrogenTM Listeria-ID	Microgen Bioproducts Limited		X	
---------------------------	---------------------------	------------------------------------	--	---	--

9.3.3 *Listeria monocytogenes*

Art	Marke	Anbieter	AFNOR	AOAC perf.tested	Nat. Norm (DIN oder Methodensammlung)
Immun-Enzym Test	Transia Plate <i>Listeria monocytogenes</i>	BioControl Systems	X		
	Vidas <i>Listeria monocytogenes</i> 2 (30 °C)	bioMérieux	LM (außer rohe Produkte), UP		
	Vidas <i>Listeria monocytogenes</i> 2	bioMérieux	LM, UP		
	Vidas <i>Listeria</i> DUO	bioMérieux	LM, UP		
PCR	iQ Check <i>Listeria monocytogenes</i>	BIO-RAD	LM, UP	geräucherter Lachs, Hüttenkäse, Hotdogs, Truthahn	
	GeneDisc Cyclor <i>Listeria monocytogenes</i>	GENESYSTEMS	LM (außer Milchprodukte)		
	BAX® <i>Listeria</i> genus	DuPont Qualicon	X	Vielzahl an LM, UP	

	ADIAFOOD Rapid Pathogen Detection System	AES Chemunex		Vielzahl an LM	
	LightCycler® Detection Kit	BIOTECON Diagnostics GmbH		Vielzahl an LM	
	Assurance GDS	BioControl Systems		past. Milch, Weichkäse, Frankfurter, essfertiger Truthahn, grüne Bohnen, roher Fisch, UP (Gummi, Beton, Stahl, Plastik)	
	R.A.P.I.D. LT Food Security System	Idaho Technology, Inc		Truthahn, Weichkäse, UP (Stahl, Keramik)	
					§64 LFGB Nr. 00.00-95 (V)
Hybridisierung	Lumiprobe 24 <i>Listeria monocytogenes</i>	EUROPROBE SA	LM (außer Käse der Sorte „cantal“, „salers“), UP		
	Accuprobe <i>Listeria monocytogenes</i>	GEN-PROBE Inc	LM, UP		

	GeneQuence Test	Neogen Corporation		rohes, gekochtes Fleisch, Meeresfrüchte, Milchprodukte, Obst, Gemüse	
Kultur	ALOA One Day	AES Chemunex	LM, UP		
	Ottoviani Agosti Agar (Detection)	bioMérieux	LM, UP		
	Ottoviani Agosti Agar (Enumeration)	bioMérieux	X		
	ALOA Count™	AES Chemunex	LM		
	Rapid L'Mono (Detection)	BIO-RAD	LM, UP	Brie, Surimi, gemischter Salat, Pute	
	Rapid L'Mono (Enumeration)	BIO-RAD	LM, UP	Brie, Surimi, gemischter Salat, Pute	
	AL Recherche	BIO-RAD	X		
	AL Dénombrement	BIO-RAD	X		
	CHROMagar™ <i>Listeria</i> (Detection)	CHROMagar	LM, UP	rohes Rinderfaschiertes, geräucherter Lachs, Salat, Brie	

	CHROMagar™ <i>Listeria</i> (Enumeration)	CHROMagar	LM, UP	rohes Rinderfaschiertes, geräucherter Lachs, Salat, Brie	
	<i>Listeria</i> Precis™ (Detection)	OXOID ThermoFisher Scientific	LM		
	<i>Listeria</i> Precis™ (Enumeration)	OXOID ThermoFisher Scientific	LM, UP		
	COMPASS <i>Listeria</i> Agar (Detection)	SOLABIA / Division BIOKAR	X		
	COMPASS <i>Listeria</i> Agar (Enumeration)	SOLABIA / Division BIOKAR	X		
Immunologischer Test	VIP®	BioControl Systems		past. Milch, Weichkäse, rohes Rindfleisch , essfertiger Truthahn, grüne Bohnen, roher Fisch, UP (Gummi, Stahl, Plastik)	

9.3.4 Enterobacteriaceae

Art	Marke	Anbieter	AFNOR	MICROVAL*	AOAC perf. tested	Nat. Norm (DIN oder Methodensammlung)
Impedanzverfahren	BACTRAC detection of <i>Enterobacteriaceae</i>	SY-LAB	X			
Kultur	3M™ Petrifilm <i>Enterobacteriaceae</i> Count Plate	3M Health Care	LM			
	REBECCA BASE	AES Chemunex	LM, FM			
	Tempo <i>EB</i>	bioMérieux	LM, FM (außer Getränke, Rindfutter)			
chromogener Test	Compact Dry ETB	Nissui Pharmaceutical Co. Ltd.		LM		

* [<http://www.microval.org/validated-methods.html>]

9.3.5 Coliforme Bakterien

Art	Marke	Anbieter	AFNOR	MICROVAL	AOAC perf.tested	Nat. Norm (DIN oder Methodensammlung)
Kultur	3M™ Petrifilm™ <i>Coliform</i> Count Plate (alle Kolonien)	3M Health Care	LM (außer rohe Muscheln)			
	3M™ Petrifilm™ <i>Coliform</i> Count Plate (Gas produzierende Kolonien)	3M Health Care	LM (außer rohe Muscheln)			
	3M™ Petrifilm™ <i>Coliform</i> Count Plate (thermostabile Kolonien)	3M Health Care	LM			
	3M™ Petrifilm™ Rapid <i>Coliform</i> Count Plate (14 h)	3M Health Care	LM			

	3M™ Petrifilm™ Rapid <i>Coliform</i> Count Plate (24 h)	3M Health Care	LM			
	3M™ Petrifilm™ Rapid <i>Coliform</i> Count Plate (Gas produzierende Kolonien)	3M Health Care	LM (außer Fleischwaren)			
	3M™ Petrifilm™ High-Sensitivity <i>Coliform</i> Count Plate	3M Health Care	LM (nur Studie, kein Zertifikat)			
	Tempo CC	bioMérieux	LM, FM (außer Rohmilch, Getränke, Rindfutter)		Vielzahl an LM	
	<i>Coli</i> ID – Medium (Agar)	bioMérieux	LM			

	Rapid´E. coli 2	BIO-RAD	LM		Faschiertes, Schweinefleisch ohne Knochen, Würste, Schinken, Truthahn, Hüttenkäse, Ricotta, Rohmilch, Trockenformula für Säuglinge	
chromogener Test	Compact Dry CF	Nissui Pharmaceutical Co. Ltd.		LM		
colorimetrischer Test	Soleris / MicroFoss	Neogen Corporation / FOSS			Vielzahl an LM	
Oxygen Elektrode	DOX 60F/30F	Bio- Theta, Ltd			Rohes Rindfleisch, Rinderfaschiertes, Hühnerkarkasse	
Fluoreszenzoptisches Verfahren						DIN 10183 (Teil 3) oder.: §64 LFGB Nr. 01.00- 54
						§64 LFGB Nr. 02.00-22
						§64 LFGB Nr. 02.07-10
						§64 LFGB Nr. 03.00-22
						§64 LFGB Nr. 04.00-18

						§64 LFGB Nr. 42.00-15
						§64 LFGB Nr. 48.01-23

9.3.6 E.coli

Art	Marke	Anbieter	AFNOR	MICROVAL	AOAC perf.tested	Nat. Norm (DIN oder Methodensammlung)
Kultur	Test 3M™ Petrifilm™ Select <i>E. Coli</i> Count Plate	3M Health Care	LM			
	REBECCA BASE	AES Chemunex	LM, FM			
	<i>Coli</i> ID – Medium (37 °C)	bioMérieux	LM			
	<i>Coli</i> ID – Medium (44 °C)	bioMérieux	LM			
	Tempo <i>EC</i>	bioMérieux	LM, FM (außer Rohmilch, Getränke, Rindfutter)		Vielzahl an LM	

	Rapid <i>E. coli</i>	BIO-RAD	LM		Faschiertes, Schweinefleisch ohne Knochen, Würste, Schinken, Truthahn, Spinat Hüttenkäse, Ricotta, Rohmilch, Trockenformula für Säuglinge	
chromogener Test	Compact Dry <i>EC</i>	Nissui Pharmaceutical Co. Ltd.		LM		
Oxygen Elektrode	DOX 60F/30F	Bio- Theta, Ltd			rohes Rindfleisch, Rinderfaschiertes, Hühnerkarkasse	
Fluoreszenzoptisches Verfahren						DIN 10183 (Teil 3) oder.: §64 LFGB Nr. 01.00- 54
						§64 LFGB Nr. 02.00-22
						§64 LFGB Nr. 02.07-10
						§64 LFGB Nr. 03.00-22
						§64 LFGB Nr. 04.00-18
						§64 LFGB Nr. 42.00-15
						§64 LFGB Nr. 48.01-23

9.3.7 E.coli O157

Art	Marke	Anbieter	AFNOR ¹	AOAC perf.tested	Nat. Norm (DIN oder Methodensammlung)
Immun-Enzym Test	Vidas ECO ICE	bioMérieux	LM	rohes Faschiertes	
	Vidas <i>E.coli</i> O157	bioMérieux	X		
	TECRA <i>E.coli</i> O157 Visual Immunoassay und Immunocapture	TECRA INTERNATIONAL Pty Ltd		rohes, gekochtes Rinder-, Hühnerfaschiertes	
PCR	iQ-Check <i>E.coli</i> O157:H7	BIO-RAD	X	Rinderfaschiertes, Cider, Spinat	
	ADIAFOOD Rapid Pathogen Detection System	AES Chemunex		Rinderfaschiertes	
	BAX® <i>E.coli</i> O157:H7 MP	DuPont Qualicon	rohes Rind-, Schweine-, Hühner-, Schafffleisch, Rohmilch, Obst, Gemüse, Fertiggerichte	Apfelmilch, Orangensaft, Rinderfaschiertes, Rindfleisch	

	LightCycler® Detection Kit	BIOTECON Diagnostics GmbH		Vielzahl an LM	
Kultur	RAPID <i>E.coli</i> <i>O157:H7</i>	BIO-RAD	X		
	CHROMagar	BD Diagnostics		rohes Rinderfaschiertes, Cider	
Immunologischer Test	ULTRA <i>E.coli</i> <i>O157</i> Test System	Matrix MicroScience Ltd		Rinderfaschiertes	
	DuPont Lateral Flow System Test Kit	DuPont Qualicon		Rinderfleisch ohne Knochen, Rinderfaschiertes, Cider	
	RapidChek Lateral Flow Assay	Strategic Diagnostics Inc.		rohes Fleisch ohne Knochen, Rinderfaschiertes, Cider	
	RapidChek SELECT	Strategic Diagnostics Inc		rohes Rinderfaschiertes, Rindfleisch ohne Knochen	

	Singlepath® Lateral Flow Assay	Merck KGaA / EMD Chemicals, Inc.		rohes Rinderfaschiertes, past. Milch	
	Transia Card	Raisio Diagnostics AB		rohes Rinderfaschiertes	

9.3.8 Gesamtkeimzahl

Art	Marke	Anbieter	AFNOR	MICROVAL	AOAC perf.tested	Nat. Norm (DIN oder Methodensammlung)
Impedanzverfahren						DIN 10122 oder.: §64 LFGB Nr. 00.00-99
Kultur	3M™ Petrifilm™ <i>Aerobic Count Plate</i>	3M Health Care	LM			
	Tempo TVC	bioMérieux	LM, FM (außer Rohmilch, Getränke, Rinderfutter)		Vielzahl an LM	
chromogener Test	Compact Dry TC	Nissui Pharmaceutical Co. Ltd.		LM		
Oxygen Elektrode	DOX 60F/30F	Bio- Theta, Ltd.			rohes Rindfleisch, Rinderfaschiertes, Hühnerkarkasse	

9.3.9 Staphylococcus

Art	Marke	Anbieter	AFNOR	AOAC perf.tested	Nat. Norm (DIN oder Methodensammlung)
Immun-Enzym Test	VIDAS® <i>Staph enterotoxin II</i> (SET2)	bioMérieux		Vielzahl an LM	
PCR	BAX® System Real time PCR Assay	DuPont Qualicon		Rinderfaschiertes, Sojaprotein, Soja- und Milchbasierte Säuglingsformula	
Kultur	3M™ Petrifilm™ <i>Staph Express</i> Count System	3M Health Care	LM, FM		
	Test 3M™ Petrifilm™ <i>Staph Express</i> Count System	3M Health Care	LM, FM		
	Rapid´ <i>Staph</i>	BIO-RAD	LM, FM, UP	past. Vollmilch, Schinken, geräucherter Lachs, Eierkuchen	

	CHROMagar	BD Diagnostics		Rinderbraten, geräucherter Lachs, Eierschale	
--	-----------	----------------	--	--	--