

Disseminationspapier Projekt „Verhinderung von Rekontamination“

- ein durch die FFG kofinanziertes Branchenprojekt



FFG

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG	3
1.1	Projektstruktur:.....	4
1.2	Projektdesign:.....	4
2	ERGEBNISSE DES 1. TESTLAUFES.....	5
3	ERGEBNISSE DES 2. TESTLAUFES.....	10
4	ERGEBNISSE DER ARBEITSGRUPPEN	11
4.1	Kreuzung Roh-/ Fertigprodukte	11
4.2	Kreuzung zw. Produktklassen	12
4.3	Prozesse.....	12
4.4	Luft.....	13
4.5	Wasser.....	13
4.6	Maschinen-/Anlagendesign.....	14
4.7	Reinigung / Desinfektion	14
4.8	Mensch	15
4.9	Material.....	15
4.10	Schädlinge	24
4.11	Methoden der Messung.....	25

1 Einleitung und Problemstellung

Ausgangspunkt für das vorliegende Projekt ist das durch die FFG genehmigte und mit Ende März 2014 abgeschlossene, zweijährige Branchenprojekt „Pathogene Keime“ (FFG Projekt Nr. 835133 und 840462). In diesem Projekt wurden Primärkontaminationen sowie Eliminierungsmethoden von pathogenen Keimen auf Fleischwaren erforscht und validiert.

Die daraus entstandenen Maßnahmen und Empfehlungen tragen zu einer signifikanten Verringerung des Keimdrucks bei. Um eine wirklich umfassende Keimverhinderungsstrategie für österreichische Fleischwaren zu schaffen, mussten neben den Möglichkeiten zur Eliminierung von Kontaminationen durch Herstellungsverfahren nun auch die Möglichkeiten zur Verhinderung von Rekontaminationen mittels Prozess- und Anlagendesign bei der Herstellung von Fleischwaren erforscht werden. Dabei wurde der Schwerpunkt auf die pathogenen Keime *Listeria monocytogenes*, *Salmonella ssp.*, *Campylobacter ssp.*, *Staphylococcus aureus* sowie EHEC gelegt.

Besonders über das Zusammenspiel der unterschiedlichen Kontaminationsfaktoren und deren Wechselwirkungen auf Produktionsanlagen waren zum Start des Projekts noch wenig fundierte und validierte Erkenntnisse vorhanden (siehe Abb. 1). Dieser Punkt stellte daher auch einen Schwerpunkt der technischen Zielsetzungen dar.

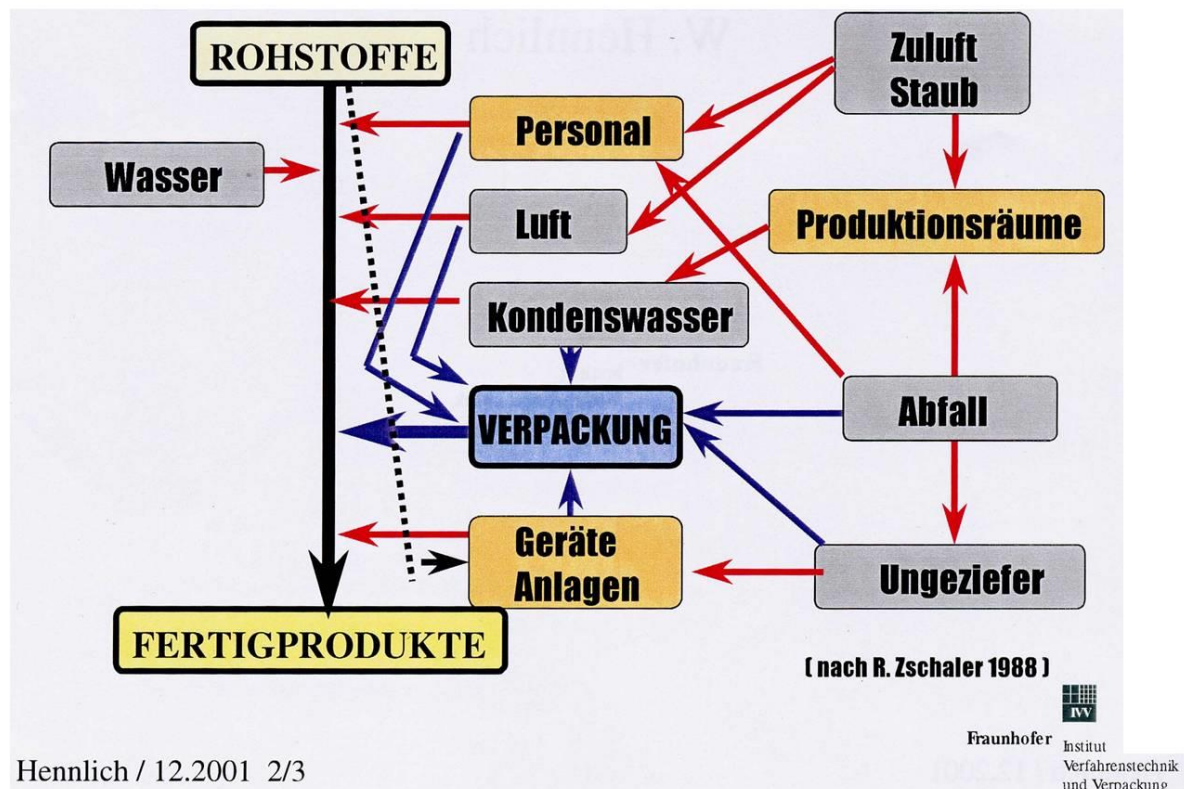


Abbildung 1: Zusammenspiel der unterschiedlichen Kontaminationsfaktoren

1.1 Projektstruktur:

Das Projekt, an dem 9 Branchenbetriebe teilgenommen haben, wurde unter der Trägerschaft der Lebensmittelakademie des Österreichischen Gewerbes in der Bundesinnungsgruppe Lebensmittel & Natur und der fachlichen Koordination der GLi GmbH (Gemeinnützige Lebensmittelinitiative Österreich) durchgeführt.

Als Fachexperten zur Durchführung von Gefahrenevaluationen, Laboranalysen und Challengetesten wurden die Universität für Bodenkultur (Wien), die Hygienicum, Institut für Mikrobiologie und Hygieneconsulting GmbH (Graz) sowie OFI, Technologie & Innovation GmbH (Wien) beauftragt. Für die Lenkung und Zusammenfassung der fachlichen Ergebnisse bzw. des Kommunikationsflusses war die August Staudinger & Partner GmbH verantwortlich. Das Projekt konnte durch maßgebliche finanzielle Unterstützung der FFG (Projekt „Collective Research: Verhinderung von Rekontamination mittels Prozess- und Anlagendesign bei der Herstellung von Fleischwaren“ Projekt Nr. 846202, 851645 sowie 859168) im Zeitraum 01.05.2014 – 30.06.2017 realisiert werden.

1.2 Projektdesign:

Folgende Arbeitspakete wurden geplant und durchgeführt:

- FJ 1 / AP 1** Einteilung/Durchführung der Workshops, Keimdruckerhebung
 - FJ 1 / AP 2** Risikobewertung und Literaturrecherche
 - FJ 1 / AP 3** Erstellung einer Checkliste zur Erfassung von Vorbeugemaßnahmen
 - FJ 1 / AP 4** Erhebung der Checkliste in den Betrieben
 - FJ 1 / AP 5** Ableitung der möglichen Risiken, Einteilung der Betriebe und Kontaminationsrisiken in Risikokategorien und Herstellung relevanter Zusammenhänge
 - FJ 1 / AP 6** Erhebung möglicher Vorbeugemaßnahmen und Versuchsplanerstellung
-
- FJ 2 / AP 1** Testlauf 2
 - FJ 2 / AP 2** Optimierungsphase Testlauf 2
 - FJ 2 / AP 3** Testlauf 3
 - FJ 2 / AP 4** Optimierungsphase Testlauf 3
 - FJ 2 / AP 5** Spezialuntersuchungen
 - FJ 2 / AP 6** Zusammenfassung Ergebnisse

- FJ 3 / AP 1** Optimierungsphase Testlauf & Spezialthemen aus 2. Projektjahr
- FJ 3 / AP2** Durchführung Testlauf & Untersuchungen Spezialthemen im 3. Projektjahr
- FJ 3 / AP 3** Zusammenfassung & Auswertung der Ergebnisse aus 1. bis 3. Projektjahr

2 Ergebnisse des 1. Testlaufes

1. Erläuterungen Testläufe Allgemein:

Die Ist-Situation in den teilnehmenden Betrieben wurde mittels eines Fragebogens auf Vergleichbarkeit der Prozesse und auf Durchführung der Probennahme in den Testläufen erhoben.

Aufgrund der Aussagen dieser Basisdatenerhebungen wurden Probennahmeplan und –methodik festgelegt, welche in der Folge in jedem Betrieb durchgeführt wurden.

Es wurde auf eine einheitliche Probennahme in den Testläufen geachtet, um auch die einzelnen Teilprozesse transparent und vergleichend abbilden zu können.

Die Kontamination bzw. Rekontamination des Produktes in den einzelnen Prozessschritten wurden mittels eines eigens hergestellten sterilen Dummies (die Nachbildung eines Produkts mit allen relevanten typischen Eigenschaften) simuliert.

Die Dummies wurde in einem Betrieb produziert, verpackt und autoklaviert.

Danach wurden die Dummies unmittelbar zu den Betrieben gebracht und dort innerhalb von 24 Stunden in den Prozessschritt „Erhitzung“ direkt zu den zu testenden Produkten beigelegt.

Die Anzahl der Dummies wurde aufgrund des Produktdurchlaufes und der Untersuchungshäufigkeit in den einzelnen Prozessschritten festgelegt.

Es wurden in einem Dummydurchlauf bis zu 20 Dummies eingebracht und durch den gesamten Prozess bis zur fertigen Packung und auch anschließenden Lagerung beprobt.

Die Dummies wurden im Prozessschritt entnommen und in einen Sterilbeutel verpackt und unter gekühlten Bedingungen unverzüglich in das Projektlabor gebracht.

Als Musterprozess wurde grundsätzlich die Schinkenherstellung mit folgenden Prozessschritten definiert:

1. Erhitzung – in Koch- oder Selchkammer – Einbringung der Produktdummies
2. Abkühlung in Dusche extern oder in Kammer
3. Abkühlung / Lagerung in Kühlraum
4. Ausformung – hier werden die Schinken bzw. Dummy aus der Form entnommen
5. Optional: nochmaliger Erhitzungsprozess mit anschließender Kühlung im Kühlhaus
6. Lagerung im Kühlhaus

7. Schnellkühler
8. Schälbereich – hier wird der Darm entfernt
9. Slicen
10. Verpacken und Lagern bis Ende MHD

Die Herstellung der Dummies wurde vor dem ersten Prozessversuch mittels eines Challenge-testes auf Eignung überprüft. Die mikrobiologischen Befunde dieser Dummies waren bei allen pathogenen Keimen und auch bei den Gesamtkeimen aerob und anaerob negativ und somit geeignet.

Da in diesem Projekt vor allem die Oberflächenverkeimung der Dummies in den Testläufen zu analysieren war, wurde ein Schäldarm eingesetzt, welcher nach der Entnahme des Dummies im Labor abgenommen wurde.

Bei jedem Prozessschritt wurden neben Produkt- und Dummyproben auch diverse Umfeldproben mittels Schwämmchen und Tupfer entnommen und folgend eingeteilt:

- A) Umgebung: Proben von Personal, Equipment (Messer, Telefon, Schürzen), Oberflächen von Anlagen/Maschinen
- B) Wasser: Wasserproben von Reinigungsschläuchen, Duschen und Prozesswasser
- C) Produkt: Dummy und Produktproben
- D) Luft: Keimgehalte von Luft in den Prozessschritten

Im ersten Testlauf wurden folgende Keime bzw. Keimgruppen in den einzelnen Prozessschritten und auch bei den Umfeldproben untersucht:

- Salmonellen ssp.
- Listeria ssp.,
- Enterobacteriaceae
- Escherichia coli
- Lactobacillen

Lactobacillen wurden als Referenzkeim eingesetzt, da dieser Keim zwar kein pathogener Keim ist, aber auch als Beurteilungskriterium in vielen geslicten Wurstwaren Anwendung findet.

Produktgestehungskette in „mikrobiologischer Betrachtung“ – Testlauf 1

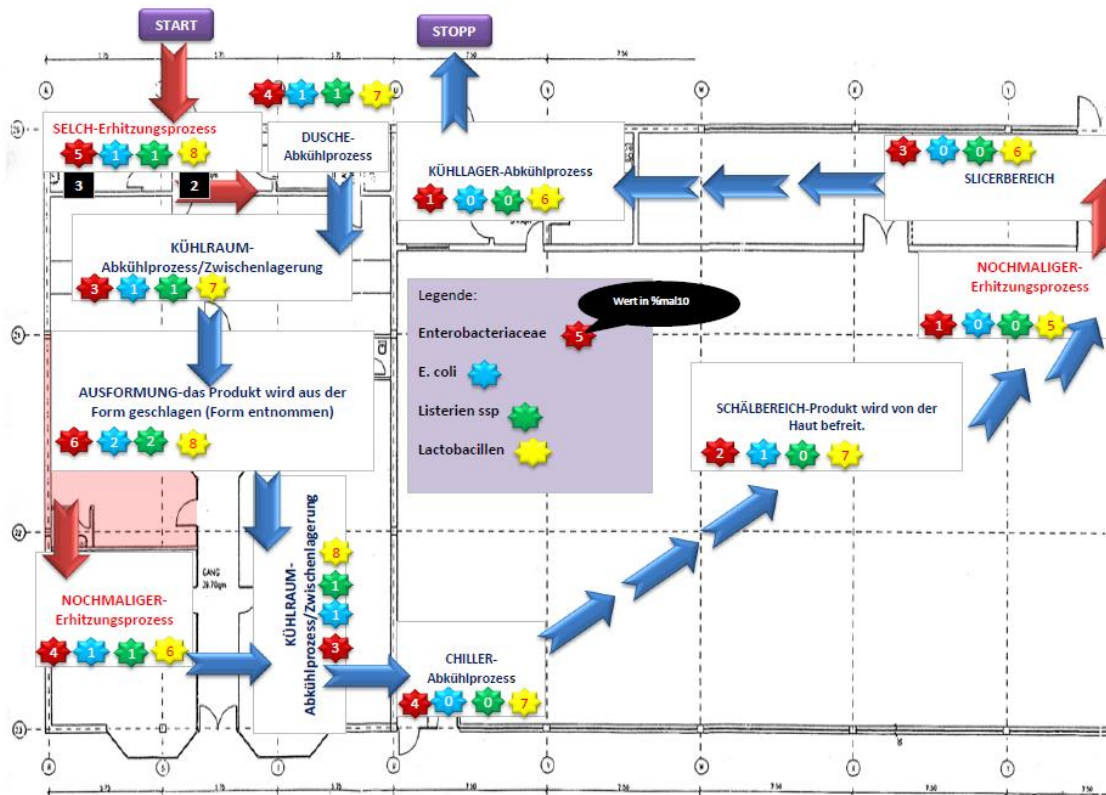


Abbildung 2 Darstellung des Prozessablaufs inklusive des Keimdrucks bei Testlauf 1

Salmonellen:

Auffallend war, dass in keinem Betrieb in keiner Stufe Salmonellen festgestellt werden konnten.

Listerien ssp:

Am Produkt konnten keine Listerien festgestellt werden.

Im Umfeld in den Prozessschritten in der Nähe des Rohfleischbereichs waren noch Listerien feststellbar – siehe Grafik

Enterobacteriaceae:

Hier wurde durch den Schälprozess vor dem Slicen die Belastung auf ein Viertel gesenkt. Diese Keimgruppe kommt durch die Umgebung im Laufe des Prozessdurchlaufes wieder auf das Produkt und durch die Entfernung der Schutzhülle „Darm“ vor dem Slicen wird dieser stark reduziert.

Escherichia coli:

Dieser Keim wird durch den Erhitzungsprozess eliminiert und taucht nur mehr in Umgebungsproben ganz vereinzelt wieder auf.

Lactobacillen:

Lactobacillen konnten in allen Stufen, auch direkt nach dem Erhitzungsschritt in der Koch/Selchkammer festgestellt werden. Es ist zu erwarten, dass die Lactobacillen zum Teil auch die Erhitzungsprozesse (in der Regel bei 72°C) überleben und sich auch durch das Umfeld wieder auf das Produkt niederschlagen.

Es wurden in Summe 371 Proben entnommen und jede Probe auf die angeführten Keime analysiert und den einzelnen Prozessschritten zugeordnet und teilweise dem Straintyping zugeführt.

Aufgrund der Ergebnisse des ersten Testlaufes wurden in den Betrieben Änderungen in den Abläufen durch Änderung von Personal – und Produktwegen, Installation von Durchlaufkochanlagen anstatt Diskontinuierlichen Anlagen, Wasserbehandlung etc. eingebracht.

Aufgrund der Tatsache dass keine Belastung durch Salmonellen festgestellt wurde, wurde im 2. Testlauf die Keimgruppe Salmonellen durch Enterokokken ersetzt.

Enterokokken werden oft fälschlicherweise auch als Lactobacillen bestimmt und stellen im zweiten Durchlauf auch eine zusätzliche Differenzierung der Lactobacillengruppe dar.

Es wurde im zweiten Testdurchlauf die Lagerung im Kühlhaus ebenfalls reduziert behandelt, da die Lagerdauer am Dummy keine Änderung der Belastung der zu untersuchenden Keimgruppen aufgewiesen hat.

Es wurden auch im 2. Testdurchlauf Dummies eingesetzt und auch der zu beprobende Prozessdurchlauf beibehalten.

Produktgestehungskette in „mikrobiologischer Betrachtung“ – Testlauf 2

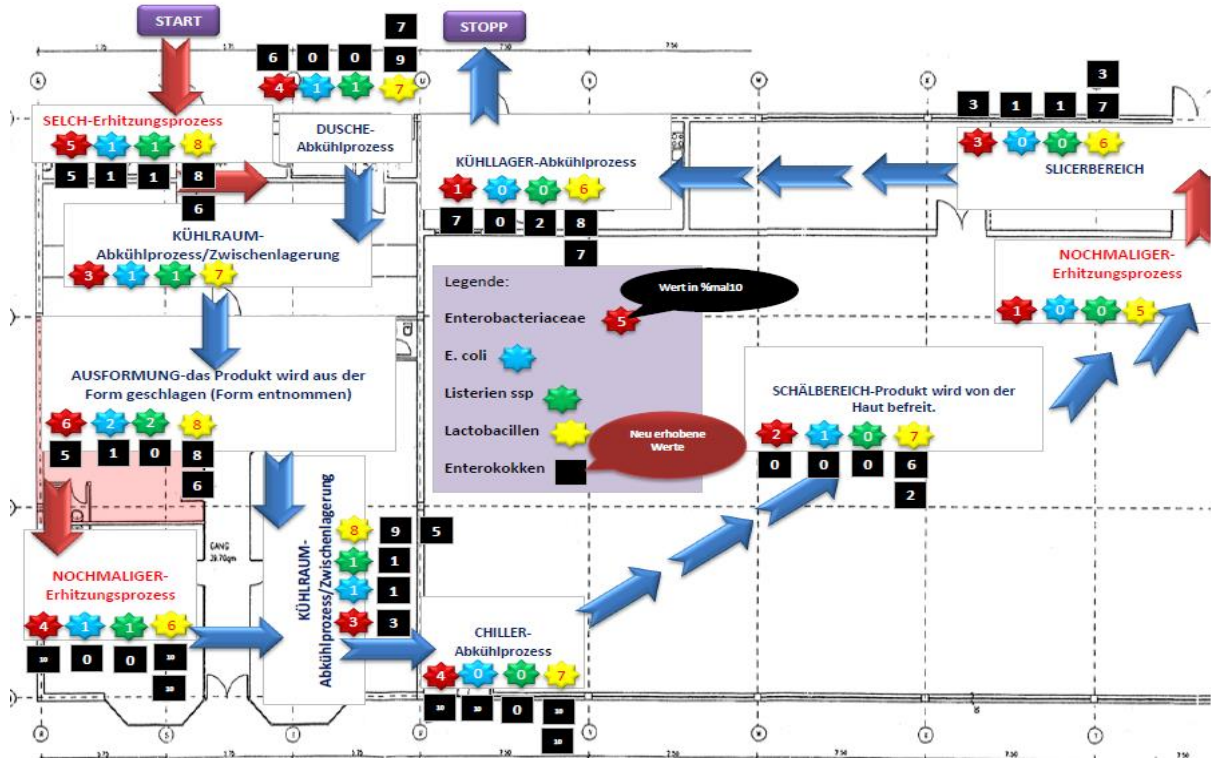


Abbildung 3 Darstellung des Prozessablaufs inklusive des Keimdrucks bei Testlauf 2

3 Ergebnisse des 2. Testlaufes

Enterokokken:

Wurden in jedem Prozessschritt identifiziert und sind auch durch den Erhitzungsschritt nicht zu eliminieren.

Listerien ssp:

Am Produkt konnten auch im 2. Durchlauf keine Listerien festgestellt werden. Die positiven Proben sind in Wasserpfützen am Boden sowie an Rädern von Transportfahrzeugen zu finden.

Enterobacteriaceae:

Es ist hier die Reduktion von Enterobacteriaceae durch Installation von Durchlaufanlagen bei richtiger Realisierung der Abwasserführung signifikant. Ist die Wasserabführung aus der Kammer nicht ordnungsgemäß gelöst, ist keine Reduktion nachweisbar. Die Installation von Personalhygieneschleusen trägt als zusätzliche Hürde für die Minimierung des Rekontaminationsrisiko bei, konnte aber nicht über den gesamten Verwendungszeitraum eines Benützungstages bestätigt werden.

Escherichia coli:

Dieser Keim wurde wie auch schon im ersten Testdurchlauf nur vereinzelt in den nach der Erhitzung folgenden Schritten festgestellt.

Lactobacillen:

Lactobacillen wurden wie im ersten Durchgang in allen Prozessschritten festgestellt – siehe Grafik.

Alle positiven Proben wurden dem Straintyping zugeführt.

4 Ergebnisse der Arbeitsgruppen

4.1 Kreuzung Roh-/ Fertigprodukte

Es wurden im Zuge der Testläufe die Kreuzungspunkte von Rohfleisch und gegarten/ erhitzten Produkten begutachtet.

Gerade diese Bereiche stellen im Zuge von Transportwegen eine erhöhte Rekontaminationsquelle bzw. eine erhöhtes Risiko bezüglich Rekontamination dar.

Vor allem durch Wasserpfützen bzw. kontaminiertes Equipment, wie z.B. Handschuhe von Transportpersonal.

Das nebeneinander Lagern der Produkte stellt kein besonders großes Risiko in Bezug auf Rekontamination dar, solange die gegarte Ware noch heiß ist und abdampft.

Um das Risiko der Verschleppung zwischen den Bereichen mittels Transporteinheiten wie Ständerwagen und durch Schuhsohlen von Personal zu verringern, werden oft Durchlaufdesinfektionsbecken eingesetzt.

Es wurden Ständerwagen und auch Schuhsohlen vor und nach Durchlaufen eines Desinfektionsbades beprobt und untersucht.

Folgende Desinfektionsmittel wurden dabei in der Konzentration von 2% verwendet:

- Peressigsäure
- Aminbasis
- Hypochloritbasis

Die Räder der Ständerwagen und auch die Schuh/Stiefelsohlen des Personals wurden mit einer Einwirkzeit von ca. 8 Sekunden mit dem Desinfektionsmittel im Tauchverfahren beaufschlagt und danach noch ca. 10 Minuten stehen gelassen.

Die Beprobung zeigt folgendes Bild:

Räder von Ständerwagen:

Alle Desinfektionsmittel zeigen eine gute Wirkung auf Listerien, Escherichia coli.

Keine Wirkung zeigt sich bei Enterobacteriaceen, Lactobacillen und Enterokokken.

Auch die anschließende Standzeit hatte keine Auswirkung auf die Keimreduktion.

Zu beachten ist auch, dass die Räder tatsächlich in die Lösung eintauchen und sich drehen. Es kann durch eine Kippbewegung des Wagens zu einem Anheben des Rades kommen und dadurch taucht das Rad nicht bzw. wenig ein und dreht sich nicht.

Eine Unterstützung durch Mechanik, mit z.B. einem Bürstenteppich, verbessert die Ergebnisse.

Stiefel und Schuhsohlen:

Hier ist das Profil der Sohle ein Hauptfaktor. Ist das Profil sauber, dann zeigt sich eine geringe Reduktion.

Hier ist der Haupteinflussfaktor eine mechanische Unterstützung durch Borstenteppiche bzw. rotierende Bürstengeräte.

Hier ist bei allen Desinfektionsmitteln eine stark reduzierende Wirkung bestimmt worden.

Ohne Mechanik sind Durchlaufbecken keine wirksame Methode um eine Keimreduktion herbeizuführen.

4.2 Kreuzung zw. Produktklassen

Das Risiko durch Kreuzung verschiedener Produktgruppen bzw. -klassen kann in vielen Bereichen

- durch getrennt geführte Produktwege,
- durch Umhüllung und Schutzverpackung vom Produkt bei Lagerung und
- durch eine gute Produktionsplanung in den Entstehungsprozessen

gering gehalten werden.

Schwierig wird die Planung bei gemeinsam genutzten Anlagen wie z.B. Slicern. Hier ist eine sehr trockene Zwischenreinigung mittels Wischtechnik sehr gut etabliert und bei regelmäßigen Innenreinigungen der Anlagen ein beherrschbares Risiko.

4.3 Prozesse

In allen Betrieben sind die einzelnen Prozesse und deren Parameter sehr gut identifiziert. Es wurden nach dem Reinigungsprozess Proben im Zuge der Testläufe genommen und es konnte keine Belastung festgestellt werden.

Es gibt in Summe sehr wenig Ausreißer bei Listerien und Escherichia coli.

Bei den Keimen Lactobacillen, Enterokokken und Enterobacteriaceae werden durch das Umfeld die Produkte wieder kontaminiert und sind somit überall zu finden.

Die Räderdesinfektion ist im Punkt Kreuzung von Roh- und Fertigprodukten behandelt worden. Die Desinfektion von Handschuhen und deren Auswahl ist im Punkt Handschuhe behandelt worden.

Als sehr wirksam stellt sich hier auch der strikte Wechsel von produktberührenden Teilen von Anlagen und Personalschutz wie z.B. durch Handschuhe oder Schürzen dar.

Dies war in allen Projektbetrieben ausreichend definiert und wird auch entsprechend durchgeführt.

4.4 Luft

Es galt zu beurteilen inwieweit pathogene Keime in der Luft zu finden sind und als Risiko identifiziert werden kann.

Es wurde mittels eines Luftkeimsammlers 250ltr Luftvolumen auf den entsprechenden Agar angesaugt.

Listerien und E. coli wurden in sehr geringem Ausmaß in den Produktionsräumen in der Luft detektiert.

Enterobacteriaceae wurden in geringem Ausmaß festgestellt.

Lactobacillen und Enterokokken wurden in hohem Ausmaß in allen Betriebsteilen festgestellt.

Dadurch kann man davon ausgehen, dass die Luft in den Betrieben in den kritischen Bereichen in Bezug auf Listerien und Escherichia coli keine Rolle als Rekontaminationspotential spielt, da sie so gut wie nicht vorhanden sind.

Lactobacillen, Enterokokken sind durch die permanente Anwesenheit sehr wohl ein Rekontaminationsfaktor, der durch Filtertechnik nach derzeitigen Stand nicht zur Gänze zu eliminieren ist.

4.5 Wasser

Es wurden im Zuge der Testläufe Restwasser von den Reinigungsschläuchen, Spülwasserschläuchen und den Waschbecken im Abflussbereich genommen.

Das Wasserleitungssystem ist in allen Projektbetrieben sehr gut dokumentiert und wird auch engmaschig beprobt.

Altleitungen sind in der Regel identifiziert und werden entsprechend bis zum Hauptwasserstrang eliminiert.

Es konnten in einigen Schlauchteilen, die auch bei rohen Produkten z.B. zum Abspülen eingesetzt werden, Pathogene festgestellt werden.

Es konnten auch im Abflussbereich von Waschbecken und in stehenden Wasserpfützen am Boden pathogene Keime, insbesondere Listerien und Enterobacteriaceae, bestimmt werden.

Es gibt in den Slicerbereichen keine Waschbecken im offenen Produktbereich und auch die Räumlichkeiten sind sehr trocken und dadurch ist auch die Rekontamination seitens schlecht gereinigter Waschbecken oder Pfützen am Boden in diesem Prozessschritt nicht gegeben.

Wenn die Bodenreinigung in den Fahrbereichen von E-Ameisen in kurzen Abständen gereinigt und danach trocken gezogen wird, konnten keine Pathogenen festgestellt werden. Verbleiben Wasserpfützen am Boden ist das Risiko hoch, dass sich pathogene Keime festsetzen.

Die verschiedenen Wasserbehandlungen wie z.B. Filter und Enthärtung haben keinen Einfluss auf die Belastung der im Projekt untersuchten pathogenen Keime.

Lactobacillen konnten auch hier in allen Betrieben im Wasser bzw. in den Schläuchen gefunden werden.

Das Risiko einer Rekontamination ist somit nur durch stehendes Wasser – Boden, Schläuche - bzw. schlechte Reinigung gegeben.

4.6 Maschinen-/Anlagendesign

Alle Maschinen und Anlagen sind durch die komplexen Aufgaben in der Slicerei sehr schwierig zu reinigen.

Es bedarf eines hohen Zerlegungsgrades der Maschinen um eine ausreichende Reinigung durchführen zu können.

Wird die Zerlegung der Maschine ausreichend durchgeführt, dann ist auch eine entsprechende Reinigung möglich.

Ein Risiko stellen die vielen nicht zugänglichen Stellen in den Antriebsteilen der Bänder und Wellen dar.

Die produktberührenden Teile der Maschinen wurden beprobt und es konnten keine pathogenen Keime – Listerien, E.coli, Enterobacteriaceae – sehr wohl aber Laktobacillen und Enterokokken festgestellt werden.

Ein Rekontaminationsrisiko besteht somit nur in geringen Ausmaß.

Hier ist die thermische Dekontamination für die Entkeimung von unzugänglichen Anlagenteilen und die entsprechende Zerlegung der Maschinen und Wartung der Bänder eine Möglichkeit zur Reduzierung des Risikos.

4.7 Reinigung / Desinfektion

Es wird in allen Betrieben die Niederdruckschaumreinigung als Endreinigung eingesetzt. Als Zwischenreinigung kommt die Wischreinigung mittels getränkten Tüchern zum Einsatz.

Wichtig ist eine schnelle Auftrocknung und Vermeidung von Pfützenbildungen.

Mechanische Teile die in die kritischen Bereiche eingebracht werden, werden vor Einbringung gereinigt und desinfiziert.

Die Lüftungsgeräte innen werden regelmäßig im Zuge der Wartung der Anlagen gereinigt und desinfiziert.

Werkzeuge, Messer und Reinigungsutensilien sind extra gekennzeichnet und werden nur in den kritischen Bereichen verwendet.

Es konnten in allen Beprobungen keine Abweichungen nach einer Reinigung / Desinfektion festgestellt werden.

Die Werkzeugkoffer in den Slicerbereichen sind in den Testläufen als ein mögliches Risiko einer Rekontamination identifiziert worden, wenn sie nicht im Reinigungsplan erfasst sind. Hier wurden pathogene – Escherichia coli und Enterobacteriaceae – festgestellt.

4.8 Mensch

In allen Betrieben, die am Projekt teilgenommen haben, ist ein Bekleidungswechsel bzw. eine gesonderte Überbekleidung inkl. Schuhwechsel mittels einer Barriere sowie eine zusätzliche Händereinigung und -desinfektion vor Betreten des Slicerbereiches vorgegeben.

Bei Verlassen wird die Bekleidung zur Reinigung gegeben und bei Wiedereintritt ist eine neue Zusatzbekleidung zu verwenden.

Mundschutz und zusätzliche Handschuhe sind vorgeschrieben.

In allen Betrieben gibt es für die Handhygiene einen sehr detaillierten Plan inklusive Pflegeprodukte.

Es wurde im Zuge der Testläufe der Nasen/Mundbereich abgestrichen und auf *Listerien ssp.*, *Salmonellen ssp.*, *Escherichia coli*, koagulase-positive Staphylokokken, *Staphylococcus aureus* untersucht.

Aus 7 Betrieben wurden insgesamt 37 Proben gezogen. Bei der Analyse der Proben zeigt sich folgendes Bild:

- *Listerien*, *Salmonellen* – KEINE positiven Befunde
- Koagulase-positive Staphylokokken inkl. *Aureus* – 10 positive (27%) aus 5 Betrieben
- *Staphylococcus aureus* – 4 positive (11%) aus 2 Betrieben
- *E. coli* – 1 positiver Befund (3%)

Analabstriche wurden auf *Listerien ssp.* und *Salmonellen ssp.* untersucht.

Es wurden keine positiven Personen identifiziert.

Das zeigt, dass die Rekontamination durch den Mensch, unter Berücksichtigung der besonderen Bekleidungs Vorschriften eine sehr geringe Rolle spielt.

4.9 Material

Richtiger Handschuh und Reinigung Mehrweghandschuhe

Förderbänder

Därme

Beim Rekontaminations-Bereich „Material“ wurden die Spezialthemen „Handschuhe“ und „Förderband-Oberflächen“ näher betrachtet und werden im Folgenden vorgestellt.

Spezialthema 1: Einsatz von Handschuhen in fleischverarbeitenden Betrieben

Recherche der Ist-Situation

Im Spezialthema Handschuhe wurde eine Erfassung der in Verwendung befindlichen Handschuhe der interessierten Fleischerbetriebe vorgenommen. Hier zeigte sich, dass Einwegprodukte aus Latex grundsätzlich nicht mehr zum Einsatz kommen, sondern stattdessen nur noch

Nitril-Einweghandschuhe in Gebrauch sind. Ein Verzicht von Latexhandschuhe hat insofern mehrere Vorteile, da neben einer geringeren Chemikalien und Fettbeständigkeit gegenüber Nitrilhandschuhen auch eine Vermeidung des allergenen Potentials von Latex, und einer möglicherweise nicht irrelevanten Kontamination des Lebensmittels durch selbiges, von Bedeutung sind.

Beobachtet wurde unterdessen die gängige Praxis des Desinfizierens der Einweghandschuhe um eine Verlängerung der Gebrauchsdauer zu erhalten. Diese Vorgehensweise sollte nach Möglichkeit möglichst reduziert werden, da eine (falsch angewendete) Sprühinfektion zu erheblichen Kreuzkontaminationen kommen kann, wenn ein und derselbe Handschuh über mehrere Stunden getragen wird. Darüber hinaus sollte unbedingt vom Gebrauch rückfettender Händedesinfektionsmittel vermieden werden, weil es dadurch zu einer Kontamination des Lebensmittels mit der rückfettenden, schwerflüchtigen Komponente des Mittels kommen kann. Die stoffliche Migration lebensmitteltauglicher Nitril-Handschuhe nach Desinfektionsbelastung liegt grundsätzlich unterhalb der gesetzlich festgelegten Grenzwerte und nimmt ebenso mit steigender Zahl an Desinfektionen ab, hier zeigte sich auch kein signifikanter Unterschied zwischen den untersuchten Flächen- und Händedesinfektionsmitteln.

Die Verwendung von Mehrweghandschuhen wurde von den Betrieben deutlich unterschiedlich gehandhabt, weswegen allgemeine Aussagen hierzu schwieriger sind. Grundsätzlich werden lebensmitteltaugliche Mehrweghandschuhe, mit Ausnahme von Handschuhen zum Manipulieren von Selchwagen, verwendet. Dies birgt in gewisser Weise die Gefahr einer unbeabsichtigten Berührung des Produktes mit den Lebensmittel-untauglichen Handschuhen. Problematisch ist hier, dass lebensmitteltaugliche Handschuhe oftmals nur über mangelhafte thermische und v.a. mechanische Beständigkeit verfügen, weswegen es wiederum zu Brüchigkeit des Handschuhes kommen kann, was die grundsätzliche Compliance beeinflusst.

Leitfaden für den Einsatz von Handschuhen für fleischverarbeitende Betriebe

Auf Basis der hervorgehenden Recherche der IST-Situation in den Betrieben wurde ein Leitfaden für den Einsatz von Handschuhen für alle am Projekt teilnehmenden fleischverarbeitenden Betriebe erarbeitet, der den Firmen und Mitarbeitern als kurze und prägnante Entscheidungshilfe dienen soll. Die folgenden wichtigsten Punkte wurden im Rahmen der Recherche erfasst und erläutert:

- **Lebensmitteltauglichkeit der Handschuhe:**

Handschuhe, die mit dem Lebensmittel direkt in Kontakt kommen, müssen grundsätzlich lebensmittelgeeignet sein, dies wird mit dem sogenannten Glas-Gabel Symbol gekennzeichnet und betrifft sowohl Einweg – als auch Mehrweghandschuhe.

- **Chemikalienbeständigkeit und Thermische Anforderungen**

Wenn mit den Handschuhen Reinigungs – oder Desinfektionsarbeiten durchgeführt werden, müssen diese Handschuhe besondere Anforderungen hinsichtlich Chemikalienbeständigkeit erfüllen, wenn diese als Teil der Persönlichen Schutzausrüstung zum Einsatz kommen. Hier sind besonders die Verträglichkeiten der unterschiedlichen Handschuhmaterialien zu den gebräuchlichsten Chemikalien und die entsprechenden Permeationszeiten nach EN 374 zu berücksichtigen. Generell sind die Handschuhe mit entsprechenden Piktogrammen (bzgl. Chemikalienbeständigkeit sowie thermischen Eigenschaften) markiert, um eine korrekte Auswahl zu erleichtern.

- **Besondere Anforderungen an Einweg- bzw. Mehrweghandschuhe**

Die Anforderungen an Einweg und Mehrweghandschuhe unterscheiden sich zum Teil erheblich, so werden Einmalhandschuhe oft (aber nicht ausschließlich) für den Produktschutz, d.h. die Einhaltung der Hygienevorschriften, verwendet. Mehrweghandschuhe hingegen kommen insbesondere als Teil der Persönlichen Schutzausrüstung (PSA) gegen verschiedene Gefahrenquellen (Chemie, Hitze, Kälte, Mechanische Belastung, etc...) zum Einsatz.

- Betreffend die Verwendung von Einweghandschuhe wurden folgende Aspekte als bedeutend erachtet:

Bei hygienisch relevanten Anwendungen ist generell immer ein Einweghandschuh vorzuziehen, das Tragen von Handschuhen ersetzt aber grundsätzlich keine korrekt durchgeführte Handdesinfektion. Eine Desinfektion der Handschuhe, um die Tragedauer zu verlängern, ist nach Möglichkeit zu reduzieren. Besser ist es die Einmalhandschuhe öfters wechseln, um Kreuzkontaminationen durch inadäquate Desinfektion der Handschuhe zu verringern. Wird der Handschuh trotzdem desinfiziert, darf dies nicht mit rückfettenden Hautdesinfektionsmitteln erfolgen, da diese speziell für den Hautkontakt und nicht Handschuhmaterialien konzipiert sind und eine Gefahr der Kontamination des Lebensmittels gegeben sein kann. Latex als Material ist kritisch, da es einerseits nur geringe Chemikalienbeständigkeit hat und andererseits ein allergenes Potential besitzt. Nitril ist für die meisten hygienischen Anwendungen in Hinblick auf Produktschutz ausreichend, in Bezug auf Chemikalienbeständigkeit ist auch hier gute Verträglichkeit mit vielen typischen Wirkstoffen gegeben. Generell müssen (Einmal-)Handschuhe in richtiger Größe für Tragekomfort und bessere Handhabung zur Verfügung stehen.

- Bei Mehrweghandschuhen ist vor allem Folgendes zu berücksichtigen:

Modelle sollten nach Möglichkeit waschmaschinentauglich sein. Dies erlaubt eine regelmäßige Reinigung unter definierten Bedingungen, unabhängig vom Mitarbeiter durchführbar und mittels Arbeitsanweisung genau regelbar. Handschuhe mit leicht zu desinfizierbaren Oberflächen, d.h. besonders glatt, sind zu bevorzugen, (Mehrweg-)Handschuhe mit textilen Komponenten sind nach Möglichkeit zu vermeiden. Mehrweghandschuhe sind hygienisch immer kritisch, Abhilfe schaffen kann der Überzug von regelmäßig gewechselten Einmalhandschuhen.

Wenn Pflegeanleitungen für Handschuhe mitgeliefert werden, soll die empfohlene Höchstzahl der Anwendungen sowie Desinfektions- bzw. Reinigungszyklen nicht überschritten werden, dies ist besonders kritisch bei Handschuhen für die Handhabung von Chemikalien. Eine regelmäßige (Sicht-)Kontrolle ob Handschuhe dicht oder intakt sind ist unabdingbar, bei aufgetretenen starken Gebrauchsspuren wie Löchern, Risse, Sprödigkeit, Abblättern müssen diese Handschuhe entsorgt werden. Zwischen der Anwendung muss auf eine korrekte Lagerung (Aufhängen nach Desinfektion, etc...) geachtet werden.

Spezialthema 2: Hygienische Eigenschaften der Förderband-Materialien

Förderbänder in der Slicing Bereich wurden als ein mögliches Rekontaminationsrisiko identifiziert. Seitens der Fleischereibetriebe stellte sich die Frage ob die gewählten Desinfektions- und Reinigungsprotokolle für die Förderbänder geeignet sind. Dabei ging es nicht nur um die Reinigungs- und Desinfektionswirkung, sondern insbesondere auch um eine mögliche Materialschädigung durch aggressive Reinigungs- und Desinfektionsmittel. Ein vollständiges Reinigungs- und Desinfektionsprotokoll aus der betrieblichen Praxis wurde daher unter reproduzierbaren und kontrollierten Bedingungen am OFI nachgestellt. Das simulierte Reinigungs- und Desinfektionsprotokoll umfasste dabei vier verschiedene Mittel: alkalisch (Calvatis CF300), alkoholisch (Calvatis DS622), sauer (DS 629) und amin-basiert (DS 683).

Materialverträglichkeit – Kompatibilität mit Reinigungs- und Desinfektionsmittel

In einem ersten Schritt wurde eine mögliche Materialschädigung durch die Reinigungs- und Desinfektionsmittel evaluiert. Dafür wurden in Rücksprache mit den Betrieben folgende Annahme für eine maximale Belastung der Förderbänder getroffen:

- 1x täglich: Abwechselnd alkalisch (Calvatis CF300) oder sauer (DS 629), Einwirkzeit: 20 min
- 6x täglich: alkoholische Zwischendesinfektion, Einwirkzeit: 5 min
- 1x täglich Amin-basiert (DS 683): Einwirkzeit: 15 min

Für die Simulation wurde mit einem Einsatz der Förderbänder von einem halben Jahr (130 Werktagen) kalkuliert. Folgende Förderbandmaterialien wurden in Rücksprache mit Projektpartnern ausgewählt:



Abbildung 4 Evaluerte Förderbandoberflächen

Im Anschluss an die simulierten Desinfektions- und Reinigungszyklen wurden die Probestücke zuerst optisch evaluiert, und dann mittels eines Auflichtmikroskops auch auf Mikrorisse und andere mit freiem Auge nicht erkennbare Oberflächenschäden untersucht. Unter den gewählten Bedingungen konnte bei keinem der getesteten Desinfektionsmittel eine sichtbare Materialschädigung beobachtet werden.

Tabelle 1: Evaluierung der Materialverträglichkeit von vier routinemäßig eingesetzten Reinigungs- und Desinfektionsmittel auf die fünf in Abbildung 4 Evaluierete Förderbandoberflächen dargestellten Förderbandmaterialien

	alkalisch (Calvatis CF300)	alkoholisch (Calvatis DS622)	sauer (DS 629)	amin-basiert (DS 683).	Kombina- tion	Wasser (Blank)
FB1	-	-	-	-	-	-
FB2	-	-	-	-	-	-
FB3	-	-	-	-	-	-
FB4	-	-	-	-	-	-
FB5	-	-	-	-	-	-

-keine Auswirkung auf Förderbandoberfläche, keine Schäden

Effizienz der Reinigungs- und Desinfektionsprotokolle

Um die Entkeimungswirkung des gewählten Reinigungs- und Desinfektionsprotokolls unter kontrollierten Bedingungen zu überprüfen, wurden die fünf ausgewählten Förderbandoberflächen mit einer definierten Menge von im Projekt isolierten Bakterienstämmen versetzt: *Listeria monocytogenes* (isoliert im Slicerei und Schleusenbereich), *Enterococcus faecium* (isoliert im Slicereibereich und auf Handschuhen).

Die kürzest anzunehmende Einwirkzeit wurde verwendet, um einen Worst-Case abzudecken. Um eine realistische, aber reproduzierbare Verschmutzung zu simulieren wurden die Förderbänder mit definierten Mengen von Pferdeblut (Thermo Fisher) und Schweineschmalz künstlich verschmutzt (im Weiteren als „organische Belastung“ bezeichnet). Im Vergleich wurden auch unbelastete, saubere Förderbänder untersucht. In einem ersten Schritt wurde eine sehr starke (unrealistisch hohe) Verkeimung simuliert (10^6 KBE/cm²), um die Effizienz der Desinfektionsmittel besser vergleichen zu können. Da bei dieser hohen Verkeimung unter Simulation einer starken Verschmutzung keine starke Entkeimungswirkung beobachtet werden konnte, wurde in einem zweiten Schritt, auf Basis der Ergebnisse der Oberflächenkeimzahlmessungen an Förderbänder, eine realistische Verkeimung simuliert. Auf Basis von Feedback von den Vertrieben wurde ein weiterer Versuch vorgenommen, wo anstatt des an bestehenden Normen orientierten Auftrags der Reinigungsmittel mit Pipette, ein Einschäumen mittels Handspritzflasche, analog zur tatsächlichen Durchführung im Betrieb vorgenommen wurde.

Tabelle 2: Reduktionsfaktoren bei der Entkeimung von mit Bakterienisolaten beimpften Förderband-oberflächen mit unterschiedlichen Versuchsaufbauten.

Parameter	Versuchsbedingungen				
Ausgangs-Keimzahl	10 ⁶ KBE/cm ²	10 ⁶ KBE/cm ²	10 ² KBE/cm ²	10 ³ KBE/cm ²	10 ³ KBE/cm ²
Organische Belastung	-	+	-	-	+
Aufbringung Desinfektionsmittel	Pipettiert (200ul)	Pipettiert (200ul)	Pipettiert (200ul)	Eingeschäumt	Eingeschäumt
Desinfektionsmittel	Reduktionsfaktor R bei diesen Versuchsbedingungen Log (Ausgangskeimzahl) – Log (Keimzahl nach Entkeimung)				
Alkalisch (CF 300): 10 min	2,0	0 (keine Reduktion)	1,2	4,0	2,7
Alkoholisch (DS 622): 1 min	2,1	1,5	2,5	3,8	2,7
Sauer (DS 629): 10 min	4,6	0,8	4,2	> 4,0	> 4,0
Amin-basiert (DS 683): 10 min	2,8	1,0	3,1	3,9	2,1

Bei realistischer Worst-Case Verkeimung von 10³ KBE/cm² und Simulation einer möglichst realistischen Auftrageweise (Einschäumen) konnten zufriedenstellende Entkeimungswirkungen festgestellt werden. Als kritischer Einflussfaktor ist die „organische Belastung“ zu sehen, bei starker Verschmutzung kommt es zu einer deutlich geringeren Entkeimungswirkung. Eine mechanische Entfernung von groben Verunreinigungen vor der Entkeimung ist, wie in der betrieblichen Praxis üblich, ist daher auf jeden Fall anzuraten.

Anhaftung von Keimen an den Förderbandoberflächen

In einem weiteren Schritt sollte das Anhaftevermögen der isolierten Bakterienstämme an neuen und gealterten Förderbändern evaluiert werden. Nachdem sich in Vorversuchen gezeigt hatte, dass eine Färbung mit Kristallviolett zu unspezifisch zum Nachweis der Bakterien war, und auch eine hohe Färbung von manchen Blindwerten zu beobachten war, wurde eine hochspezifische Methode, bei der Bakterien über ihren ATP-Gehalt nachgewiesen wurden verwendet. Wie in Abbildung 5 ersichtlich, führte die Lagerung mit Desinfektionsmitteln bei simulierter Anwendung von sechs Monaten zu keiner signifikanten Verschlechterung der hygienischen Eigenschaften, die Anhaftung der Bakterien lag bei gealterten Proben im gleichen Bereich wie bei neuwertigen Förderbändern. Die isolierten Bakterienstämme zeigten eine deutlich stärkere Anhaftung an der Förderband-Oberfläche, als typische Modellkeime, was auf eine Selektionierung von Bakterien die sich gut an die Oberflächen anhaften können spricht. Die niedrigste Anhaftung zeigte sich erwartungsgemäß auf einem Teflon-Blindwert. Zwischen den unterschiedlichen Förderband-Materialien zeigten sich nur kleine Unterschiede.

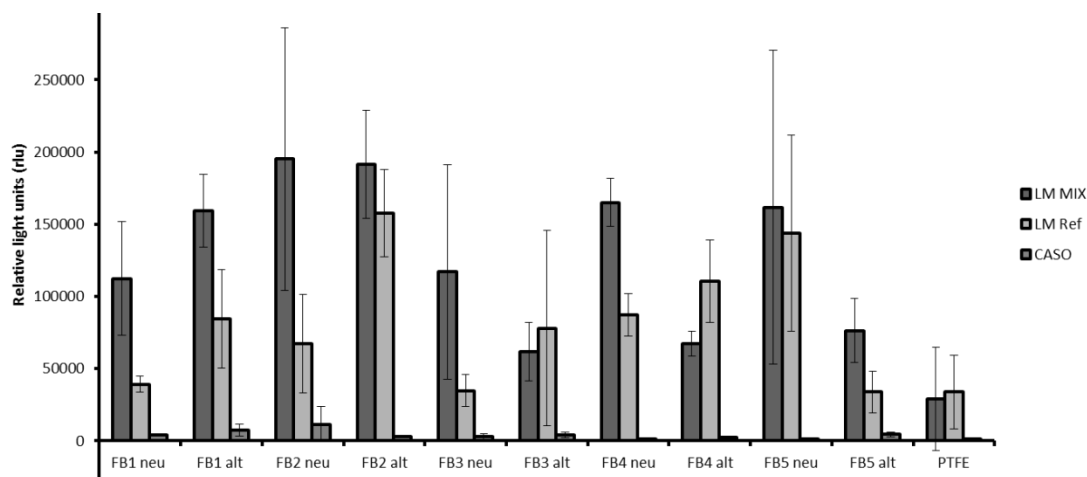


Abbildung 5 Versuch zur relativen Anhaftung von *Listeria monocytogenes* an der Oberfläche von Förderbändern, beim Abspülen mit Wasser.

Därme:

Jeder Betrieb verarbeitet Kunst- oder Naturdärme.

Es wurde durch eine Beprobung einer Produktion von Kunstdärmen und einer Produktion von füllfertigen Naturdärmen – Schafsaitling – auf die definierten pathogenen Keime durchgeführt.

Bei den Kunstdärmen konnte kein pathogener Keim festgestellt werden.

Bei der füllfertigen Naturdarm – Produktion konnte nur eine geringe Belastung durch Lactobacillen und Enterokokken festgestellt werden.

Zusätzlich wurden noch die mikrobiologische Werte laut ENSCA (European Natural Sausage Casings Association) herangezogen und untersucht.

GKZ aerob	– 1.0×10^5 KbE/g – MAX 5.0×10^6
Enterobacteriaceae	– 1.0×10^2 KbE/g – MAX 1.0×10^4
Staphylococcus aureus	– 1.0×10^2 KbE/g – MAX 1.0×10^3
Clostridium perfringens	– 1.0×10^2 KbE/g – MAX 1.0×10^3
Bacillus cereus	– 1.0×10^4 KbE/g – MAX 1.0×10^5

Es konnte keine Überschreitung der Grenzwerte festgestellt werden.

Zusätzlich wurde versucht durch Behandlung des Waschwassers und des Produktionswassers mittels Einsatz von Chlorierten Sodawasser UV-behandelten Sodawasser in Zusammenhang mit verschiedenen Lagertemperaturen von +4°C und +8°C die mikrobiologische Kontamination während der Lagerung im Vergleich zur unbehandelten Sodalake zu bestimmen.

Es zeigt sich, dass die Lagertemperatur +4°C mit unbehandelten Sodawasser keinen Unterschied zu behandelten Proben aufweisen.

Die Lagerdauer wurde auf 12 Wochen ausgedehnt.

Die Därme werden nach ca. 10 Wochen aber so weich, dass sie wahrscheinlich bei der Befüllung problematisch sein werden und somit sehr schwer zu verarbeiten sind.

Es ist aufgrund der Ergebnisse davon auszugehen, dass keine mikrobiologische Belastung durch die Därme auftritt.

4.10 Schädlinge

In jedem Betrieb gibt es in den angrenzenden Betriebsbereichen Fluginsekten. Sie werden im offenen Produktbereich mittels Klebefallen gefangen und eliminiert.

Es wurden diese Klebefallen im Zuge der Testläufe in einem kurzen Intervall und nach einem „frischen“ Befall ins Labor geschickt und auf Pathogene untersucht.

Bei 21 Probenahmen aus 4 Betrieben zeigt sich folgendes Bild:

- Listerien – keine positiven Befunde
- Enterobacteriaceae – 7 positive (33%) aus 3 Betrieben
- Escherichia coli – 3 positive (14%) aus 2 Betrieben
- Lactobacillen – 19 (90%) aus 4 Betrieben
- Enterokokken – 4 (19%) aus 1 Betrieb

In den kritischen Betriebsbereichen konnten keine Fliegen gesammelt werden, da dort kein Befall war.

Es ist auch in den angrenzenden Bereichen mit keinem Risiko einer Rekontamination durch Fluginsekten in Bezug auf die definierten pathogenen Keime zu rechnen.

4.11 Methoden der Messung

Ozon:

Ozon – O₃ – wird in vielen Bereichen als Geruchsbeseitiger – Brandsanierung, Abluft – eingesetzt.

Von Ozon geht laut [EU-Richtlinie 92/72/EWG](#) keine Gefahr für die Gesundheit bei einer Konzentration von 120 µg/m³ (0,06 ppm) aus, obwohl sie sich bei einem Zehntel der Konzentration über den Geruch bemerkbar macht.

Ozon ist ein sehr gutes Desinfektionsmittel und kann für die Luftdesinfektion verwendet werden.

Es wurde in einer Konzentration von 0,04 ppm in einem Reiferaum eingesetzt und parallel dazu wurden Luftkeime gemessen.

Ozon hat in dieser geringen Konzentration keine keimreduzierende Wirkung in der Raumluft bewirkt.

Bei einer Konzentration von ca. 8 bis 10 ppm laut Vorgabe von diversen Gerätelieferanten konnten Sporen nachweisbar reduziert werden.

Hier ist aber die Auswirkung auf das Produkt noch zu prüfen.

Thermische Behandlung:

Es wurde im Zuge eines Versuchs Anlagen und Räume als gesamtes zu dekontaminieren eine thermische Niedertemperaturerhitzung über mind. 36 Stunden versucht.

Es sollten keine Anlagenteile, insbesondere elektrische Teile, durch die Temperatur beeinträchtigt oder demontiert werden müssen, da auch diese Teile dekontaminiert werden sollten.

Es wurden im Zuge der Behandlung die Anlagen und Räume auf ca. 56°C erhitzt und die Temperatur für mind. 36 Stunden gehalten.

Die Keime wurden kultiviert und als Keimsuspension in Kunststoffubes 2ml mit einem Keimgehalt von 10⁴ KbE / ml abgefüllt.

Es wurden *Listeria innocua*, *Lactobacillus sakei*, *Enterococcus faecium*, *Citrobacter freundii* und *Escherichia coli* angereichert und getrennt in die Tubes gefüllt.

Im Labor wurden zu Beginn, nach 6, 8, 12, 24, 30 und 36 Stunden thermischer Behandlung die Tubes untersucht.

Nach 30 Stunden konnte keine Belastung festgestellt werden.

In einigen Betrieben wurden diese Verfahren auf gesamte Räume inklusive Anlagen getestet und ebenfalls mit angereicherten Keimen aus dem Betrieb an kritischen Stellen belegt.

Nach 36 Stunden Behandlungszeit waren keine Keime nachweisbar.

Diese Dekontamination kann in jeden Betrieb eingesetzt werden und die Temperaturlogger zeigten auch in den für eine Reinigung nicht zugänglichen Stellen eine ausreichende Temperatur über die vorgegebene Zeit.

Wellenantriebe werden in dieser Zeit ebenfalls zur Gänze durcherhitzt und sind somit auch innen dekontaminiert.

Milchsäurebakterien, Listerien und Enterobakterien aus Umgebungsproben und Produktproben (Dummys)

Die Probenahme und Kultivierung auf spezifischen Nährmedien erfolgte im Hygienicum Graz. Die Proben wurden in regelmäßigen Abständen, je nach Probenahmetermin in den jeweiligen Unternehmen an die BOKU geschickt. Die Platten waren in Folie verpackt und wurden gekühlt transportiert. Dort wurden sie im Labor bei 4°C bis zur Aufreinigung der Isolate gelagert. Sämtliche Listerienisolate wurden durch das Hygienicum Graz mittels VITEK auf Speziesebene identifiziert. Milchsäurebakterien und Enterobakterien wurden an der BOKU identifiziert.

Aufreinigung der Milchsäurebakterienisolate

Die Bakterienisolate wurden durch Überimpfen in frischer MRS Bouillon wiederbelebt. Problematisch erwies die enorme Schimmel und Hefebelastung als Begleitflora auf den Platten. Mittels Tupfer in 0.9% NaCl wurden die Kolonien feucht abgewischt. Die Kolonien wurden in 7 ml MRS broth (De Man, Rogosa and Sharpe) und 0.1 g/L Cycloheximid inokuliert und bei 37°C, anaerob 24–48 h inkubiert. Nach erfolgter Inkubation wurde mittels Impföse die Kultur auf MRS Agar (0.1 g/L Cycloheximid) ausgestrichen, um die Begleitflora zu inhibieren und Reinkolonien zu erhalten. Die Agarplatten wurden bei 37°C für 72h anaerob inkubiert. Auf Basis der unterschiedlichen Koloniemorphologien wurden diese erneut in 5 ml MRS Bouillon inokuliert und über Nacht bei 37°C anaerob inkubiert.

Aufreinigung der Listerienisolate

TSA Platten wurden mittels Impföse direkt aus dem TSA-Schrägagarröhrchen (Hygienicum) überimpft. Die Platten wurden bei 37°C inkubiert, anschließend eine Einzelkolonie in 5 ml BHI (Brain Heart Infusion) überführt und weitere 24h bei 37°C inkubiert.

Aufreinigung der Enterobakterien

Nachweis und Isolierung von typischer Enterobakterienkolonien wurde nach ISO 21528-2:2004 durchgeführt. Enterobakterien bilden charakteristische Kolonien auf Kristallviolett-Neutralrot-Galle-Glukose-Agar (VRBD), sind Oxidase negativ und können Glukose vergären. Die Röhrchen mit flüssigem Anreicherungsmedium (Pepton Wasser) werden mit Hilfe von einer Impföse beimpft und über Nacht (18 Stunden) bei 37°C Inkubiert.

DNA Extraktion aller Isolate

Die Übernachtskultur (MRS, Nährbouillon und BHI) wurde für eine weitere DNA Extraktion herangezogen. Die Extraktion erfolgte mittels kommerziellem Kit nexttec cleanPlate 96 (nexttec, Deutschland). 0,5 ml der Bakteriensuspension (1.5 OD600) wurden in eine Deepwell Platte pipettiert und anschließend 10 min bei 2.000 x g zentrifugiert. Das Pellet wurde in 90 µl Puffer B, 10 µl Lysozym und 20 µl RNase A und bei 56°C, 200 rpm für weitere 20 min inkubiert. Anschließend wurden 90 µl SDS-Lösung, 10 µl Proteinase K, 2.5 µl DTT und 2 µl EDTA hinzugefügt und das Pellet für weitere 60 min bei 56°C und 200 rpm inkubiert. Schlussendlich wurden 100 µl vom Lysat in den nexttec Kit transferiert und 3 min bei Raumtemperatur inkubiert und für 1 min vakuumiert. Die aufgereinigte DNA wurde bis auf weitere Analysen bei 4°C gelagert.

16S rDNA PCR aller Isolate

Die aufgereinigte DNA wurde in einem 25 µl Volumen amplifiziert: 22 µl Mastermix solution (10 x Buffer, 15 mM MgCl₂, 10 mM dNTP-Mix, 2 U/µl Polymerase, UHQ Wasser), 1 µl forward primer bak4 (5'AGGAGGTGATCCARCCGCA 3'), 1 µl rewind primer bak11w (5' AGTT-TGATCMTGGCTCAG 3') and 1 µl DNA. Nach der Initialphase bei 95°C 3 min, folgen 30 Denaturierungszyklen bei 95°C für 30 s, Annealing bei 56°C für 30 s und Elongation bei 72°C 2 min. Final Extension 7 min bei 72°C. Die PCR Produkte wurden elektrophoretisch (2% w/v Agarose) untersucht.

Sequenzanalysen aller Isolate

Die amplifizierte DNA wurde zu Eurofins zwecks Sequenzanalyse verschickt. Nach Erhalt der Rohdaten wurden die Nukleotidsequenzen in die NCBI gene databank (National Centre for Biotechnology Information; www.blast.ncbi.nlm.nih.gov/) eingegeben und mit dem bestehenden Datensatz abgeglichen.

Subtyping von Milchsäurebakterien mittels RAPD PCR

Alle Bakterienisolate, die nach 16S Sequenzierung als Milchsäurebakterien (Gattung und Speziesebene) bestätigt wurden, wurden einer weiteren Feintypisierung unterzogen. Hierfür erwies sich die RAPD Amplifikation als geeignete Methode. Aufgrund der Erfahrungswerte an der BOKU wurde der sogenannte M13 Primer (5' GAGGGTGGCGGTTCT 3') gewählt.

Die PCR wurde mit folgenden Parametern durchgeführt: In einem 25 µl Volumen: 22 µl Mastermix Lösung (10 x Puffer, 15 mM MgCl₂, 10 mM dNTP-Mix, 2 U/µl Polymerase, UHQ Wasser), 1 µl primer M13, 1 µl UHQ Wasser and 1 µl DNA. Initialphase bei 95°C 5 min, 45 Denaturierungszyklen bei 95°C 1 min, Annealing bei 36°C für 1 min und bei 72°C Elongation für 1 min. Final extension wurde für 8 min bei 72 °C durchgeführt. RAPD-PCR Produkte wurden elektrophoretisch in 2 % (w/v) Agarose untersucht.

Die spezifischen RAPD Fingerprints wurden einer Clusteranalyse unterzogen. Hierfür wurden die Gele in der Bionumerics Software, Version 6.5 (Applied Maths, Belgien) bearbeitet und für weitere Interpretation herangezogen. Die Daten sollen Rückschlüsse auf die (klonale) Herkunft der einzelnen Isolate auf Stammebene darstellen. Die Clusteranalyse wurde mittels UPGMA Algorithmus durchgeführt mit 1,5% Toleranz und Optimierung.

Subtyping der Listerienisolate mittels REP-PCR

Sämtliche Listerienisolate wurden mittels REP-PCR (Primer GTG5 (5' GTGGTGGTGGTGGT 3')) feintypisiert. Die Amplifikation wurde in einem 25 µl Volumen mit 22 µl Mastermix Lösung (10 x Buffer, 15 mM MgCl₂, 10 mM dNTP-Mix, 2 U/µl Polymerase, UHQ Wasser), 1 µl Primer GTG5, 1 µl UHQ Wasser und 1 µl DNA durchgeführt. Initialphase bei 95 °C 7 min, 30 Denaturierungszyklen bei 90°C für 30 s, Annealing bei 40°C 1 min und Elongation bei 65°C für 8 min. Final Extension für 16 min bei 65 °C. Rep-PCR Produkte wurden elektrophertisch in einem 2 % (w/v) Agarosegel untersucht. Die spezifischen REP Fingerprints wurden einer Clusteranalyse unterzogen. Hierfür wurden die Gele in der Bionumerics Software, Version 6.5 (Applied Maths, Belgien) bearbeitet und für weitere Interpretation herangezogen. Die Daten sollen Rückschlüsse auf die (klonale) Herkunft der einzelnen Isolate auf Stammebene darstellen. Die Clusteranalyse wurde mittels UPGMA Algorithmus durchgeführt mit 1,5% Toleranz und Optimierung.

Serotypisierung der Listerienisolate

Sämtliche *Listeria monocytogenes* Isolate (Auswahl der Stämme wurde auf Basis der Clusteranalyse nach REP- Feintypisierung durchgeführt) wurden zur weiteren Gruppierung aufgrund Ihres Serotyps untersucht. Die Serotypisierung ist eine Methode zur Unterscheidung von Serotypen innerhalb einer Spezies. Bei *L. monocytogenes* erfolgt die Unterscheidung anhand von somatischen Antigenen (O) und Flagellen Antigenen (H) (Seeliger 1979). Man kennt für *L. monocytogenes* 13 Serotypen, die einen Hinweis geben, ob es sich um potentielle Ausbruchsstämme oder Lebensmittelisolate handelt. Dabei ist vor allem Serotyp 4b in Ausbruchssituationen nachgewiesen worden.

Listeria spp. Isolate wurden mittels Multiplex-basierter PCR serotypisiert. Ein PCR Ansatz setzt sich folgendermaßen zusammen: Probenansatz 25 µl mit 12.5 µl ReadyMix KAPA2GTM, 1 µl primer lmo0737 forward, 1 µl primer lmo0737 rewind, 1 µl primer lmo1118 forward, 1 µl primer lmo1118 rewind, 1 µl primer ORF2819 forward, 1 µl primer ORF2819 rewind, 1 µl primer ORF2110 forward, 1 µl primer ORF2110 rewind, 1 µl primer prs forward, 1 µl primer prs rewind, 1.5 µl UHQ Wasser and 1 µl DNA. Initialphase bei 95°C 3 min, 25 Denaturierungszyklen bei 95°C 15 s, Annealingtemperatur bei 60°C 30 s und Elongation bei 72°C 1 min. Final Extension 7 min bei 72°C. Die Multiplex-PCR Produkte wurden elektrophoretisch in einem 2 % (w/v) Agarosegel untersucht.

Lagerung der Kulturen für zukünftige Arbeiten und Projekte

Alle identifizierten Milchsäurebakterien, Enterobakterien und Listerien Kolonien wurden nach Übernachtenokulation und Inkubation mit 200 µl sterilem Glycerol vermischt und in sogenannten Cryotubes bei -18°C und -80°C dauerhaft gelagert.

Übersicht zu den Identifizierungen gesamt

Es kann schlussgefolgert werden, dass die eingesetzten Methoden, trotz des enormen Aufkommens an Probenmaterial (> 1.000 Platten) sich als geeignet erwiesen und deren Informationsgehalt für die einzelnen Betriebe ausreichend waren. Lediglich die Sequenzierung mittels 16S PCR zeigte sich teilweise ungenau für eine Enterobakterienidentifizierung. Hier wird nach dem Projekt noch eine weitere Optimierung für eine erfolgreiche Identifizierung durchgeführt. Dabei kommt die sogenannte MALDI-TOF Methode zum Einsatz. Diese wird im Anschluss mit der 16S Methode abgeglichen. Die Untersuchungen laufen derzeit in Kooperation mit den ATB Leibniz-Institut für Agrartechnik und Bioökonomie e.V. Dieser Methodenvergleich soll soweit möglich in einem SCI Paper veröffentlicht werden.

I. Listerienverteilung in unterschiedlichen Prozessstufen

Es konnte eine deutliche Rekontamination auf betrieblicher Ebene (nach Erhitzung) nachgewiesen werden. In Summe wurden 171 Listerienisolate einer Feintypisierung unterzogen. Davon wurden 4 Listerienspezies identifiziert (nach Häufigkeit in abnehmender Reihenfolge): *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *L. welshimeri*, *L. grayi*. Eine deutliche Reduktion nach dem ersten Dummylauf (nach den getroffenen Maßnahmen) konnte erzielt werden (Abbildung 6). Die Prävalenz an *L. monocytogenes* reduzierte sich auf einige wenige Projektpartner. Ein Betrieb zeigte ein deutliches und ausschließliches *L. innocua* Vorkommen unabhängig von den Dummyläufen auf.

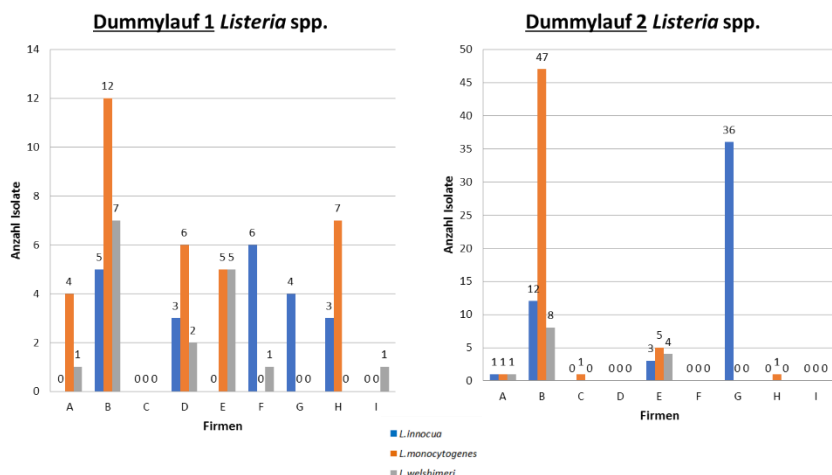


Abbildung 6 Listeriennachweis nach Betrieben und Dummylauf sortiert.

Sämtliche Probenahmestellen wurden aufgrund der großen Anzahl auf Übersichtsprozesse reduziert, um eine bessere Übersicht zum Vorkommen von L. spp. erhalten. Dabei stellte sich heraus, dass ein häufiges Vorkommen an Listerien im Kühlbereich als auch im Slicerprozess (typische Rekontamination) ersichtlich war. Vor allem im zweiten Dummylauf nahm die Diversität an Listerienspezies im Slicerbereich zu. Prozesse, die unter „Sonstiges“ fallen sollten mehr Beachtung erhalten. Diese Probenahmestellen konnten keinem konkreten Prozess zugeordnet werden, jedoch sind diese Stellen zum Teil auf Schulungsmangel der Mitarbeiter bzw. Fehlverhalten zurückzuführen (Abbildung 7).

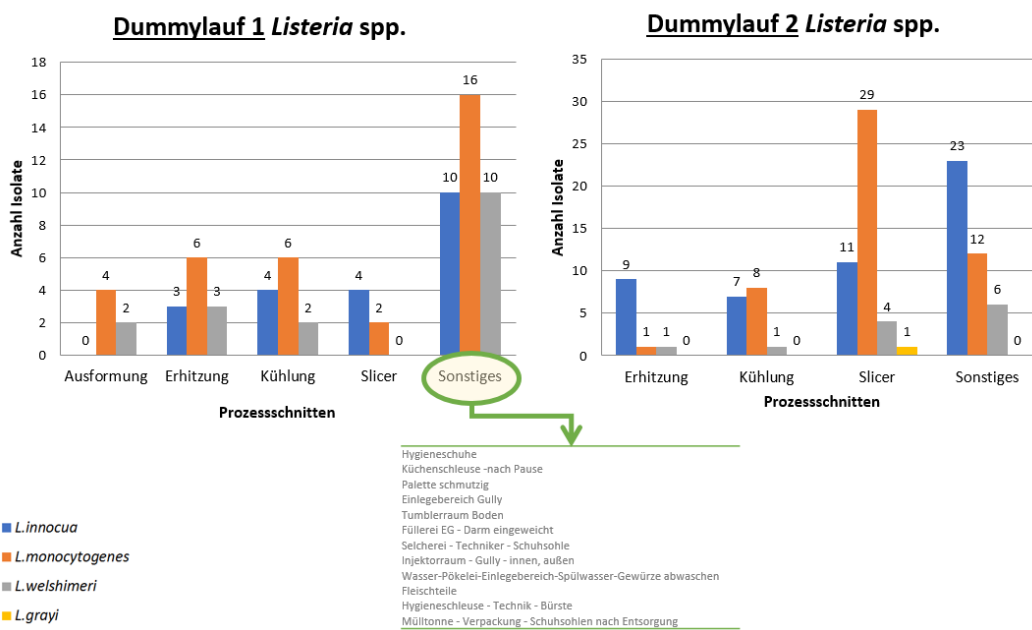


Abbildung 7 Listerienprävalenz nach Prozess und Dummylauf sortiert

In der folgenden Abbildung werden beispielhaft die Clusteranalysen nach *Listerienspezies* dargestellt. Vergleicht man Abbildung 6 und 7 so erkennt man, dass die Diversität von *Listerien* auf Stammebene nach dem zweiten Dummylauf abnimmt. D.h. dass sich die listeriziden Maßnahmen offensichtlich auf bestimmte Probenahmestellen ausgewirkt haben. Nichtsdestotrotz sollte man die geringere Teilnahme an Betrieben im zweiten Dummylauf berücksichtigen und die Ergebnisse mit Vorsicht genießen.

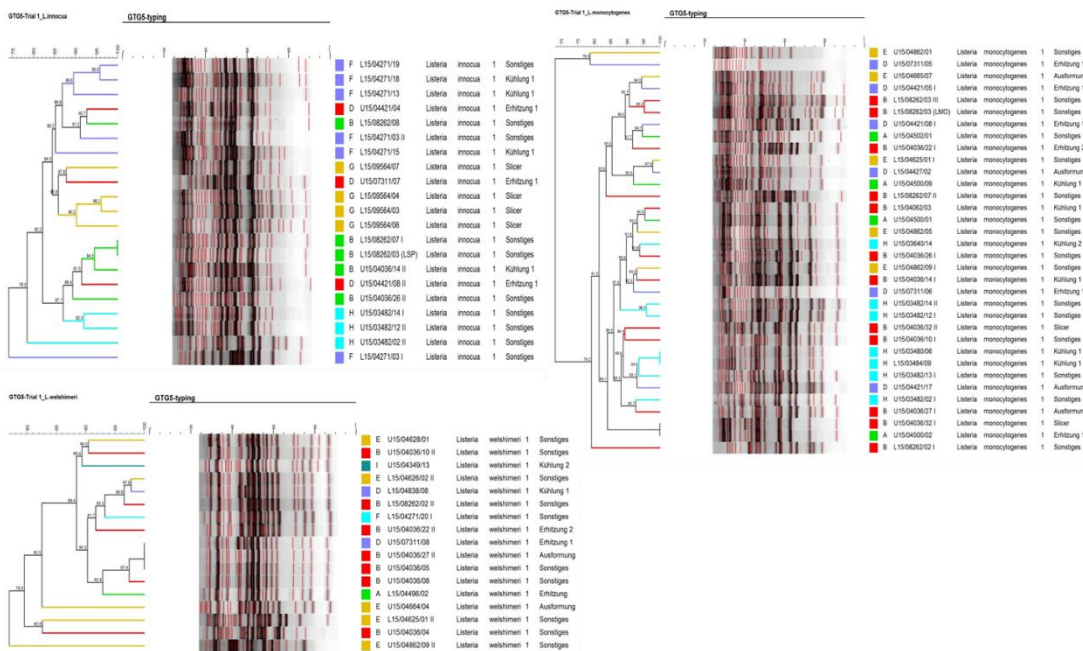


Abbildung 8 Dummylauf 1 Clusteranalysen nach *Listerienspezies* (*L. innocua*, *L. monocytogenes*, *L. welshimeri*)

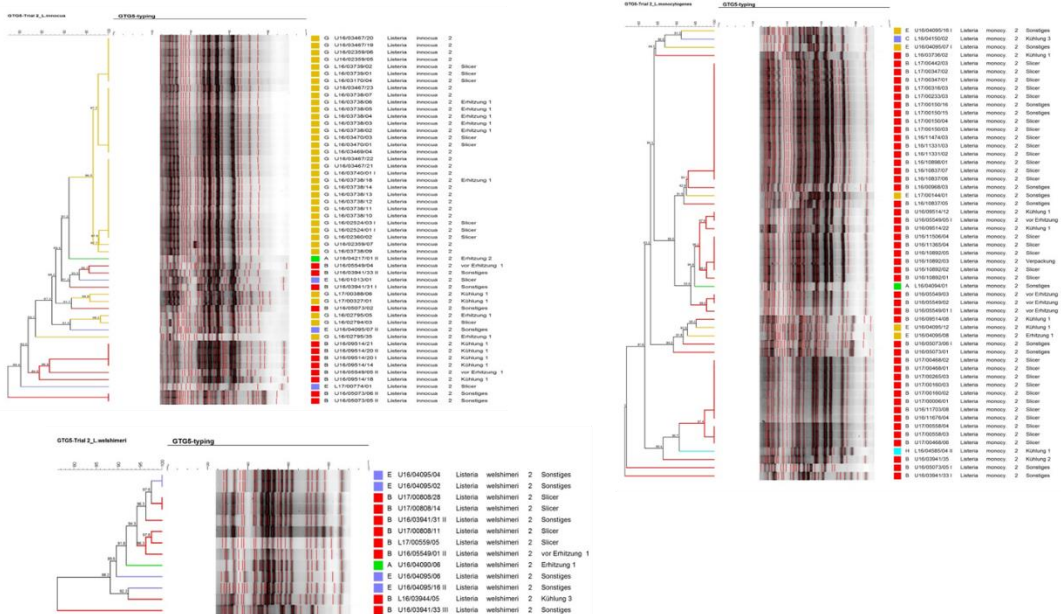


Abbildung 9 Dummmlauf 2 Clusteranalysen nach *Listerienspezies* (*L. innocua*, *L. monocytogenes*, *L. welshimeri*)

Die Ergebnisse der Serotypisierung (Abbildung 8) ergaben ein gemischtes Bild über die Verbreitung innerhalb der Betriebe. Aufgrund der enormen Anzahl an *Listeria monocytogenes* wurde eine Auswahl (24 Isolate) auf Basis der bestehenden Clusteranalyse unter Rücksichtnahme einer Abdeckung aller Betriebe und Prozesse getroffen. Die Serotypisierung ergab für 3 Prozesse (Kühlung 1 und Sonstiges) Serotyp 4b und die übrigen Isolate wiesen zumeist in allen Prozessen Serotyp 1/2a, 3a, 1/2c, 3c auf. Die dem 1/2a Serotyp zugehörigen Isolate sind üblicherweise lebensmittel-assoziiert. Serotyp 4b wird öfters in Verbindung mit Erkrankungsfällen assoziiert. Jedoch kann zum derzeitigen Standpunkt keine Aussage über das tatsächliche Risiko getroffen werden. Die Ergebnisse werden mit den Betrieben diskutiert und sollen für die Betriebe zukünftige Maßnahmen eingeleitet werden.

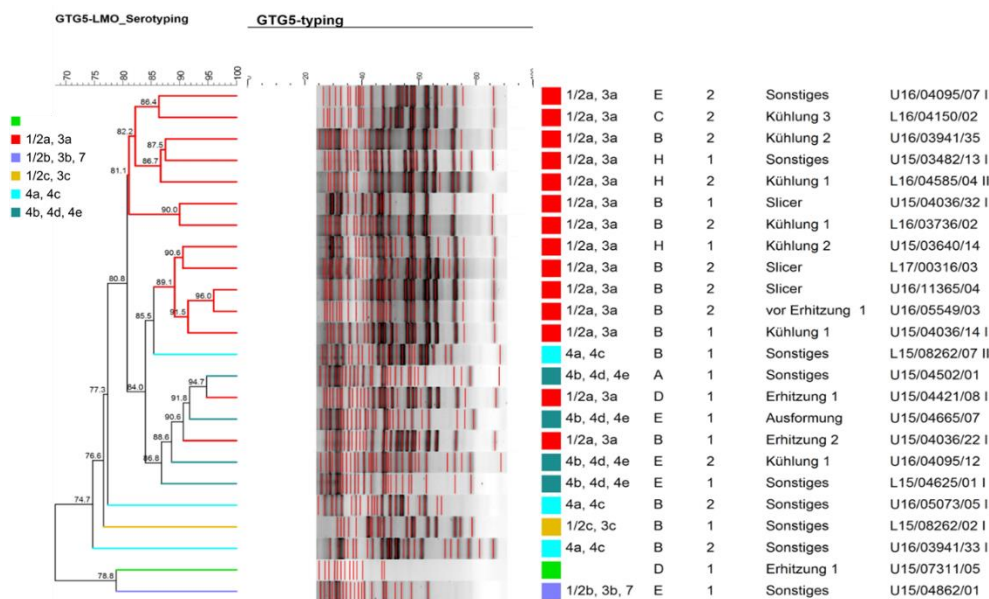


Abbildung 10 Ergebnisse der Serotypisierung von *Listeria monocytogenes* (n=24) nach Prozessen und Betrieben

II. Milchsäurebakterien identifiziert

In Abbildung 9 ist die Wiederfindungsrate nach Übergabe der Platten der Probenahme abgebildet. Hierbei zeigt sich, dass in etwa 50% der Kulturen nicht mehr wiederbelebbar waren. Dabei zeigt sich, dass in manchen Betrieben (mit Buchstaben codiert) die Isolierung und Probenahmen deutlich höher waren. Mit diesen Isolaten wurden folgende Identifizierungen (16S basiert) durchgeführt (Abbildung 10 und 11). Die Ergebnisse sind nicht nach Dummylauf aufgeschlüsselt.

Tabelle 1 fasst die Ergebnisse der Isolierungen zusammen. Es zeigt sich, dass die Beteiligung der Betriebe im 2 Durchlauf deutlich abgenommen hat. Dies ist aufgrund von Umbauarbeiten und innerbetrieblichen Maßnahmen der Fall gewesen.

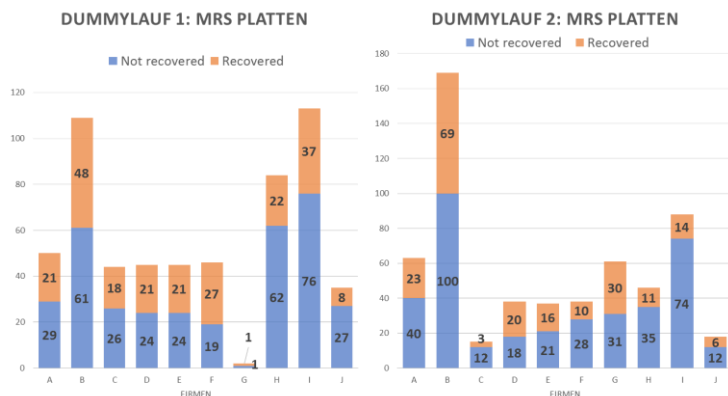


Abbildung 11 Wiederfindungsrate nach Dummylauf und Betrieb dargestellt.

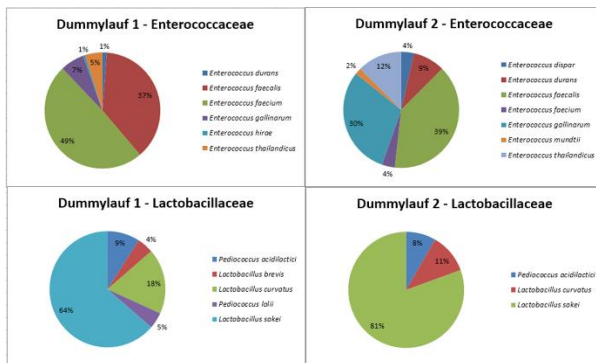


Abbildung 12 Tortendiagramm nach Dummylauf und Familienebene identifizierter Milchsäurebakterienisolate

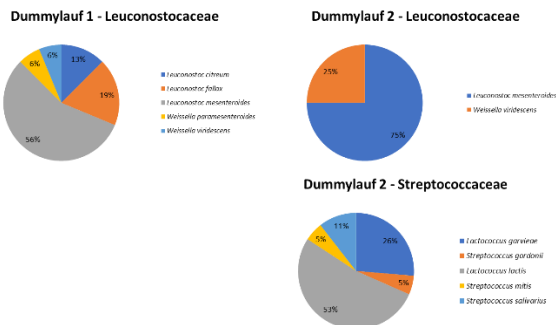


Abbildung 13 Tortendiagramm nach Dummylauf und Familienebene identifizierter Milchsäurebakterienisolate

Es hat sich gezeigt, dass Enterokokken in sämtlichen Betrieben die höchste Prävalenz aufgewiesen haben. Dies kann einerseits aufgrund der Isolierungsmethode oder andererseits aufgrund des ubiquitären Vorkommens zurückgeführt werden.

Abbildung 12 zeigt beispielhaft die Ergebnisse der RAPD Typisierung von *Lactobacillus* Species. Diese Gruppe wurde in sämtlichen Betrieben isoliert und hauptsächlich im Kühlbereich vorgefunden.

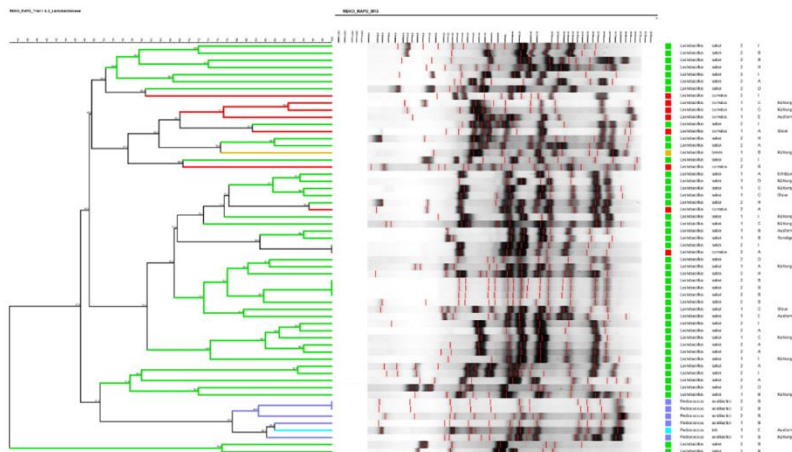


Abbildung 14 Dendrogramm Lactobacillen über alle Dummyläufe

Weiters eine Aufstellung anhand eines komplexen Prozesses, der Ausformung (Abbildung 13). Es geht deutlich hervor, dass die Diversität bei Enterokokken vergleichsweise sehr hoch in allen Betrieben ist. Allerdings war die häufigste Spezies *Enterococcus faecalis* und *faecium* auf allen Prozessstufen in allen Betrieben.

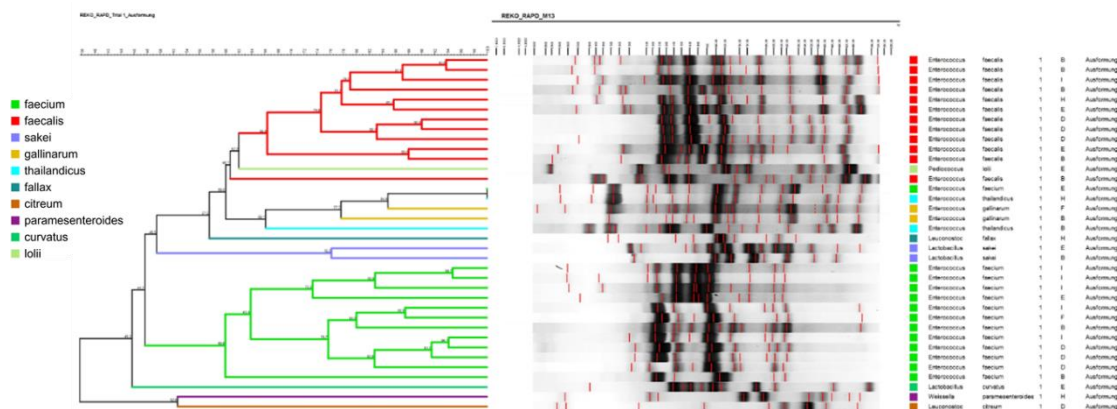


Abbildung 15 Enterococcus spp. Verbreitung im Bereich der Ausformung

Tabelle 3: Vergleich sämtlicher Isolate auf Familienebene

	Dummylauf 1	Dummylauf 2
Enterococcaceae	165	56
Lactobacillaceae	22	36
Leuconostocaceae	16	4
Streptococcaceae	0	19

III. Enterobakterien identifiziert

Enterobakterien sind ubiquitär vorkommende gramnegative Bakterien, die zahlreichen Familien zuzuordnen sind. Daher ist eine Identifizierung nicht mit einem Protokoll durchführbar. Es wurde beschlossen nach Morphologie der Kolonien eine Identifizierung durchzuführen, anschließend eine 16S PCR (Auflösung eher schwächer im Vergleich Spezies spezifischer Primersysteme). Aufgrund von Ressourcen und Zeitmangel hat man eine PCR Methode herangezogen (siehe Methodenteil). Im ersten Dummylauf konnte eine weitaus geringere Wiederfindung der Isolate durchgeführt werden (von 316 Platten nur 141 anzüchtbar) als nach dem zweiten Durchlauf (von 285 Platten waren 269 anzüchtbar). Dazu auch Abbildungen 14 und 15 zur Verdeutlichung.

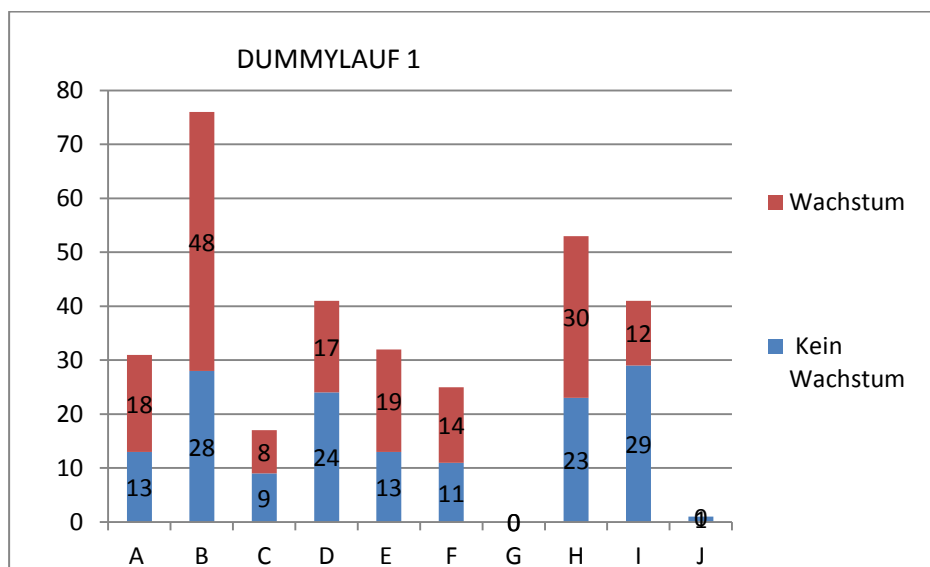


Abbildung 16 Wiederfindungsrate von Enterobakterien im ersten Dummylauf nach Betrieb sortiert

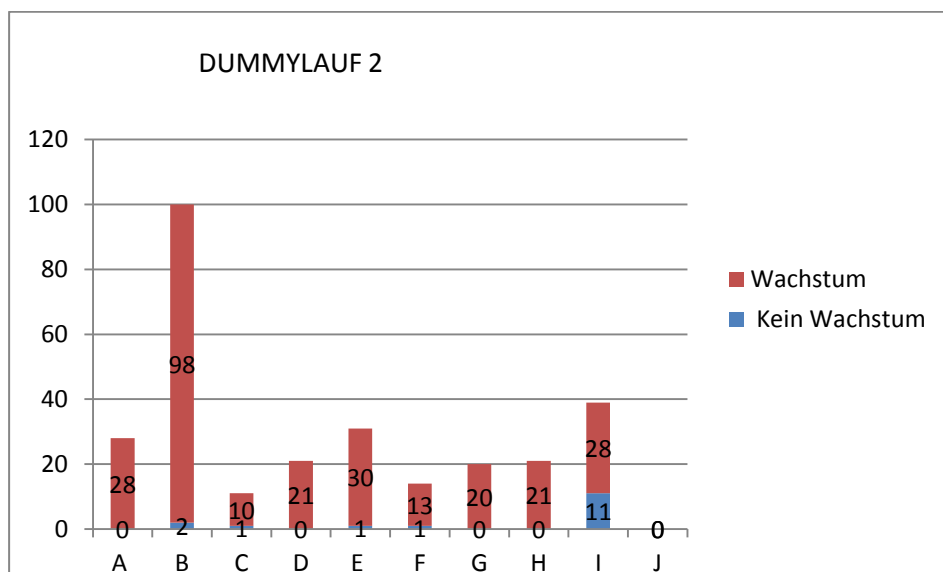


Abbildung 17 Wiederfindungsrate von Enterobakterien im zweiten Dummylauf nach Betrieb sortiert

In Abbildung 16 wird erkennbar, dass es vergleichsweise zu den Milchsäurebakterien eine dominante Gattung im Rahmen der Isolierungen gegeben hat. In der Gruppe der Enterobakterien waren *Serratia* Arten die am häufigsten isolierte Gattung, gefolgt von *Hafnia* spp. und *Citrobacter* spp. Die restlichen Isolate verteilten sich in etwa zu einem gleichen Anteil. Von 270 Isolaten wurden 261 sequenziert. Es wurden in Summe 14 Gattungen nachgewiesen.

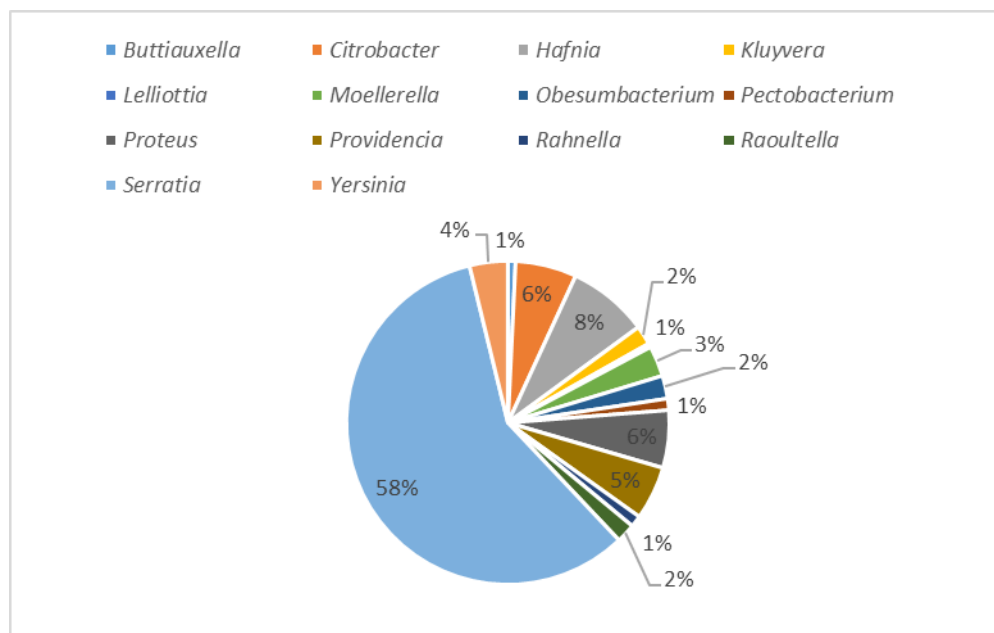


Abbildung 18 Übersicht der Identifizierungen von Enterobakterien (VRBD Platten) auf Gattungsebene aus dem 1 Dummylauf in allen Betrieben; (261 Sequenzierungen);

Auf Abbildung 16 zeigt sich ein anderes Bild. Die Anzahl der Isolationen ist deutlich höher im Vergleich zum ersten Dummylauf, da die Platten eine bessere Wiederfindungsrate aufwiesen. Das wird vor allem an der Aufarbeitung der Platten zeitnah nach der Probenahme liegen. In Summe wurden 18 Spezies identifiziert, erneut an der Spitze *Serratia* spp. gefolgt von *Citrobacter* spp., *Yersinia* spp. und *Hafnia* spp.

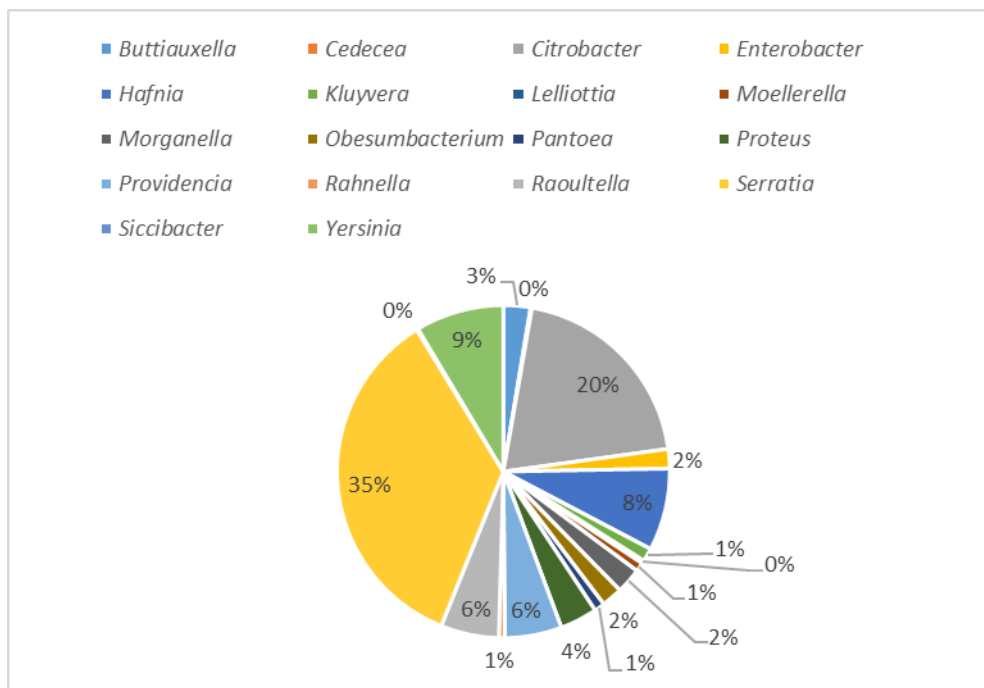


Abbildung 19 Übersicht der Identifizierungen von Enterobakterien (VRBD Platten) auf Gattungsebene aus dem 1 Dummylauf in allen Betrieben. (638 Sequenzierungen);

5 Abbildungsverzeichnis

Nummer	Titel	Quelle / Verfasser	Datum	Seite
Abbildung 1	Zusammenspiel der unterschiedlichen Kontaminationsfaktoren	Fraunhofer – Institut für Verfahrenstechnik und Verpackung, Hennlich	12/2001	3
Abbildung 2	Darstellung des Prozessablaufs inklusive des Keimdrucks bei Testlauf 1	Hygienicum GmbH, Harald Kleber	10/2016	7
Abbildung 3	Darstellung des Prozessablaufs inklusive des Keimdrucks bei Testlauf 2	Hygienicum GmbH, Harald Kleber	10/2016	9
Abbildung 4	Evaluierte Förderbandoberflächen	OFI Technologie & Innovation GmbH, DI Christopher Hartl	03/2017	19
Abbildung 5	Versuch zur relativen Anhaftung von <i>Listeria monocytogenes</i> an der Oberfläche von Förderbändern, beim Abspülen mit Wasser	OFI Technologie & Innovation GmbH, DI Christopher Hartl	06/2017	22
Abbildung 6	Listeriennachweis nach Betrieben und Dummylauf sortiert	BOKU Universität für Bodenkultur Wien, DI Dr. Marija Zunabovic	06/2017	30
Abbildung 7	Listerienprävalenz nach Prozess und Dummylauf sortiert	BOKU Universität für Bodenkultur Wien, DI Dr. Marija Zunabovic	06/2017	30
Abbildung 8	Dummylauf 1 Clusteranalysen nach <i>Listerienspezies</i> (<i>L. innocua</i> , <i>L. monocytogenes</i> , <i>L. welshimeri</i>)	BOKU Universität für Bodenkultur Wien, DI Dr. Marija Zunabovic	06/2017	31
Abbildung 9	Dummylauf 2 Clusteranalysen nach <i>Listerienspezies</i> (<i>L. innocua</i> , <i>L. monocytogenes</i> , <i>L. welshimeri</i>)	BOKU Universität für Bodenkultur Wien, DI Dr. Marija Zunabovic	06/2017	32
Abbildung 10	Ergebnisse der Serotypisierung von <i>Listeria monocytogenes</i> (n=24) nach Prozessen und Betrieben	BOKU Universität für Bodenkultur Wien, DI Dr. Marija Zunabovic	06/2017	33
Abbildung 11	Wiederfindungsrate nach Dummylauf und Betrieb dargestellt.	BOKU Universität für Bodenkultur Wien, DI Dr. Marija Zunabovic	06/2017	33
Abbildung 12	Tortendiagramm nach Dummylauf und Familienebene identifizierter Milchsäurebakterienisolate	BOKU Universität für Bodenkultur Wien, DI Dr. Marija Zunabovic	06/2017	34
Abbildung 13	Tortendiagramm nach Dummylauf und Familienebene identifizierter Milchsäurebakterienisolate	BOKU Universität für Bodenkultur Wien, DI Dr. Marija Zunabovic	06/2017	34
Abbildung 14	Dendrogramm <i>Lactobacillen</i> über alle Dummyläufe	BOKU Universität für Bodenkultur Wien, DI Dr. Marija Zunabovic	06/2017	35

Abbildung 15	Enterococcus spp. Verbreitung im Bereich der Ausformung	BOKU Universität für Bodenkultur Wien, DI Dr. Marija Zunabovic	06/2017	35
Abbildung 16	Wiederfindungsrate von Enterobakterien im ersten Dummylauf nach Betrieb sortiert	BOKU Universität für Bodenkultur Wien, DI Dr. Marija Zunabovic	06/2017	36
Abbildung 17	Wiederfindungsrate von Enterobakterien im zweiten Dummylauf nach Betrieb sortiert	BOKU Universität für Bodenkultur Wien, DI Dr. Marija Zunabovic	06/2017	37
Abbildung 18	Übersicht der Identifizierungen von Enterobakterien (VRBD Platten) auf Gattungsebene aus dem 1 Dummylauf in allen Betrieben; (261 Sequenzierungen);	BOKU Universität für Bodenkultur Wien, DI Dr. Marija Zunabovic	06/2017	37
Abbildung 19	Übersicht der Identifizierungen von Enterobakterien (VRBD Platten) auf Gattungsebene aus dem 1 Dummylauf in allen Betrieben. (638 Sequenzierungen);	BOKU Universität für Bodenkultur Wien, DI Dr. Marija Zunabovic	06/2017	38

6 Tabellenverzeichnis

Nummer	Titel	Quelle / Verfasser	Datum	Seite
Tabelle 1	Evaluierung der Materialverträglichkeit von vier routinemäßig eingesetzten Reinigungs- und Desinfektionsmittel auf die fünf in Abbildung 1 dargestellten Förderbandmaterialien	OFI Technologie & Innovation GmbH, DI Christopher Hartl	06/2017	20
Tabelle 2	Reduktionsfaktoren bei der Entkeimung von mit Bakterienisolaten beimpften Förderbandoberflächen mit unterschiedlichen Versuchsaufbaute	OFI Technologie & Innovation GmbH, DI Christopher Hartl	06/2017	21
Tabelle 3	Vergleich sämtlicher Isolate auf Familienebene	BOKU Universität für Bodenkultur Wien, DI Dr. Marija Zunabovic	06/2017	35

7 Autoren für die GLi

BOKU Universität für Bodenkultur Wien: DI Dr. Marija Zunabovic

Hygienicum GmbH: Ing. Egon Singer, Harald Kleber

OFI Technologie & Innovation GmbH: DI Christopher Hartl