

EU-konforme Untersuchung von Fleisch

Referenz- und Alternativmethoden zur Prüfung von Fleischerzeugnissen

Die EU fordert von Schlacht- und Fleischverarbeitungsbetrieben regelmäßige Prüfungen ihrer Ware. Dabei beschreibt sie in Verordnungen gesetzlich zugelassene Methoden, die in der Regel auf mikrobiologischen Prüfungen basieren. Da diese nicht immer mit vertretbarem Aufwand durchführbar sind, erlaubt sie gleichwertige Alternativmethoden. Einige wurden bereits von Behörden anerkannt. Auch die FreshDetect Technologie dürfte bald zu diesem Kreis gehören.

Gemäß dem Lebensmittelhygienerecht der EU müssen Unternehmen mikrobiologische Untersuchungen von Fleischprodukten durchführen, um die Unbedenklichkeit der Ware nachzuweisen. Die Eigenkontrolle ist dabei auf allen Stufen der Lebensmittelkette erforderlich, um die ständig steigenden Ansprüche an die Lebensmittelsicherheit und -hygiene zu erfüllen. Die entsprechenden rechtlichen Grundlagen dafür sind in den Verordnungen (EG) 852/2004ⁱ und (EG) 2073/2005ⁱⁱ, geändert durch VO (EG) 1441/2007ⁱⁱⁱ, festgelegt.

Die VO (EG) 2073/2005 gibt dabei mikrobiologische Grenzwerte für bestimmte Lebensmittel vor. Zudem beschreibt sie die erlaubten Untersuchungsmethoden, die Methodik der Probenahme, die Probenvorbereitung und Analyse sowie Maßnahmen bei Nichteinhaltung des Grenzwertes. Sie unterscheidet zwischen „Lebensmittelsicherheitskriterien“ für das am Markt befindliche Lebensmittel und „Prozesshygienekriterien“ in Bezug auf das Ende des Herstellungsvorganges. Lebensmittelunternehmen müssen die Kriterien für beide Bereiche erfüllen.

Referenzmethoden

Die vorgesehenen Referenzmethoden sind im Anhang der VO (EG) 2073/2005 und 1441/2007 beschrieben. Dazu zählen:

- Gesamtkeimzahl: ISO 4833^{iv}
- Enterobacteriaceae: ISO 21528-1/-2^v
- Untersuchung von Geräteoberflächen und ähnlichem: ISO 18593^{vi}
- Untersuchung von Schlachtkörpern: ISO 17604^{vii}

Die hier beschriebenen Methoden bestehen in der Regel aus einer mikrobiologischen Untersuchung mit folgenden Schritten:

- Probenahme
- eventuelle Homogenisierung
- Verdünnungsreihe
- Beimpfung des Kulturmediums
- Bebrütung
- Auswertung
- eventuelle Bestätigung
- endgültiges Ergebnis

Die gezogenen Proben sind bis zur Analyse bei 0 bis 5°C – bei tiefgefrorenen Produkten bei unter -18°C – zu lagern. Dabei werden Teilmengen mit definiertem Volumen oder Gewicht unter sterilen Bedingungen entnommen und eventuell vorzerkleinert.

Die Bestimmung der Keimzahl erfolgt dann per Spatelverfahren, Gusskultur oder Tropfplattenverfahren. Zur Auswertung werden nach Ende der Bebrütungszeit alle „typischen“ Kolonie bildenden Einheiten (kbE) ausgezählt sowie das gewichtete arithmetische Mittel errechnet.

Anerkannte Alternativmethoden

In vielen Fällen lassen sich die beschriebenen Referenzmethoden jedoch nur eingeschränkt nutzen. Denn in der Regel liegen erst nach mehreren Tagen die Analyseergebnisse vor. Zudem ist der Aufwand dieser Methoden recht hoch und erfordert ausgebildete Spezialisten. Daher bietet Artikel 5 der VO (EG) 2073/2005 eine gewisse Flexibilität hinsichtlich der Analyseverfahren, um die Schnelligkeit bis zum Ergebnis oder auch die Durchführung zu vereinfachen. Diese Alternativverfahren zur mikrobiologischen Untersuchung müssen jedoch die gleiche Genauigkeit aufweisen, also gegen die Referenzverfahren der VO (EG) 2073/2005 validiert worden sein, und die Genehmigung der zuständigen Behörde besitzen. Dabei ist nur für Prozesshygienekriterien die Untersuchung auf andere als in der VO (EG) 2073/2005 angegebene Mikroorganismen möglich.

EU-konforme Untersuchung von Fleisch

Referenz- und Alternativmethoden zur Prüfung von Fleischerzeugnissen

Die im Folgenden kurz dargestellten Methoden können als Alternative eingesetzt werden^{viii}:

- 1. Direkte Bestimmung der Keimzahl**

Die Auszählung der Keime erfolgt hier in Zählkammern mit einem Phasenkontrastmikroskop. Stark bewegliche Mikroorganismen werden zuvor per Formalin immobilisiert.
- 2. Trübungsmessung**

Die Keimzahlbestimmung geschieht über die Trübung einer Probensuspension. Die optische Dichte der Lösung wird dabei mit einem Photometer oder einem Trübungsmessgerät ermittelt.
- 3. Membranfiltration**

Über Membranfilter lassen sich bestimmte Keime von einer Probelösung trennen. Nach der Bebrütung auf einem Nährmedium wird die Keimzahl bestimmt.
- 4. Spiralplattenmethode**

Hier wird eine definierte Menge an Probelösung mit einem Präzisionsdispenser auf einer sich drehenden Agarplatte vom Rand bis zur Mitte spiralförmig verteilt. Die Bestimmung der Keimzahl erfolgt im Anschluss per Bildanalyse, Schablone oder Laser-Counter.
- 5. DEFT (Direkte Epifluoreszenz Filtertechnik)**

Bei dieser Methode wird die Untersuchungsprobe filtriert. Anschließend werden die Keime mit einem Fluoreszenzfarbstoff gefärbt und im Fluoreszenzmikroskop per Bildanalysegerät gezählt.
- 6. Tauchverfahren**

Bei dieser Methode werden Kunststoffträger, die auf einer oder beiden Seiten mit Kulturmedium beschichtet sind, in die Probelösung getaucht. Nach Bebrütung im Röhrchen lässt sich die Keimdichte durch einen Vergleich mit Vorlagen bestimmen.
- 7. MPN (Most Probable Number) – Verfahren**

Bei diesem Verfahren werden aus jeder Einwaage oder hergestellten Verdünnung mehrere mit Flüssignährboden befüllte Röhrchen mit der Analytlösung versehen. Anhand der nach Bebrütung bewachsenen Röhrchen lässt sich eine Stichzahl ermitteln, aus der sich über entsprechende MPN-Tabellen die wahrscheinliche Keimzahl ergibt.
- 8. Petrifilmverfahren**

Das gebrauchsfertige System besteht aus einer Deck- und Unterfolie, die das getrocknete Medium und ein wasserlösliches Guar enthalten. Über einen Indikatorfarbstoff werden die Kolonien sichtbar.
- 9. Bakterien-Limulus-Test**

Dieser Test beruht darauf, dass das Blut von Pfeilschwanzkrebse in Form von Lysaten beim Kontakt mit Lipopolysacchariden gramnegativer Bakterien gerinnt. Dabei entsteht ein Gel. Durch die lineare Korrelation zwischen der Gelbildung und dem Endotoxingehalt lässt sich auf die Keimzahl gramnegativer Bakterien schließen.
- 10. Impedanzmethode**

Durch den Anstieg der Stoffwechselprodukte beim Bakterienwachstum ändert sich in einem entsprechenden Kulturmedium die elektrische Leitfähigkeit oder der Widerstand. Je mehr Keime am Anfang vorhanden sind, desto schneller lässt sich eine Widerstandsänderung erkennen.
- 11. Bio- und Immunosensoren**

Bio- oder Immunosensoren sind Messfühler mit sensitiven biologischen Elementen wie Enzymen, Antikörpern oder DNA. Diese sind wiederum an Empfänger gekoppelt, die zum Nachweis dienen.
- 12. Immunologische Verfahren**

Immunologische Analyseverfahren basieren auf einer Antigen-Antikörperreaktion. Die Bindung zwischen Antigen und Antikörper ist sehr spezifisch und lässt sich mit verschiedenen Methoden detektieren.

EU-konforme Untersuchung von Fleisch

Referenz- und Alternativmethoden zur Prüfung von Fleischerzeugnissen

13. Gensonden (Hybridisierungstechnik)

Gensonden bestehen aus einsträngigen DNA-Molekülen, die sich spezifisch an komplementäre DNA-Stränge binden. Der dadurch gebildete Doppelstrang wird Hybrid genannt. Mit Hilfe einer Markierung der Sonden durch Fluoreszenzfarbstoffe, Enzyme oder andere Methoden lassen sich bestimmte Gene molekularbiologisch nachweisen.

14. Automatische DNA-Analyse

Hier werden Keime durch Hitze inaktiviert und deren DNA extrahiert. Anschließend erfolgt eine Trennung der DNA mit Hilfe einer Gelelektrophorese und eine Hybridisierung mit einer markierten Sonde.

15. PCR (Polymerase-Kettenreaktion)

Diese Methode vervielfacht in vitro bestimmte DNA-Abschnitte. Dadurch lassen sich auch ursprünglich geringe DNA-Mengen mit verschiedenen Nachweismethoden erkennen.

16. Biolumineszenz (ATP-Messung)

Da jede lebende Zelle Adenosintriphosphat (ATP) in relativ konstanter Menge enthält, lässt sich über den ATP-Gehalt indirekt die Anzahl lebender Zellen bestimmen. Der Nachweis von Mikroorganismen erfolgt innerhalb weniger Minuten durch die Luciferin-Luciferase-Reaktion. Hier werden Lichtquanten freigesetzt, deren Energiegehalt proportional zur ATP-Konzentration ist.

17. Durchflusszytometrie

Bei der Durchflusszytometrie werden Keime angefärbt und durch eine Messzelle mit Fluoreszenzanregung geschickt. Die Auswertung der entstehenden Emissionsimpulse erfolgt mit einem Photodetektor.

18. Kolorimetrische Verfahren

Diese Methode basiert auf einer pH-Wert-Änderung, die durch Bildung von Kohlendioxid und organischen Säuren entsteht. Das System enthält einen Sensor, der sich verfärbt, wenn Mikroorganismen Säuren oder CO₂ bilden. Alternativ werden die entstehenden Farbumschläge photometrisch gemessen.

19. FT-IR (Fourier-Transform-Infrarot)-Spektroskopie

Atome von Molekülen werden durch infrarotes Licht angeregt. Durch den Vergleich der entsprechenden Spektren mit Datenbanken erfolgt die Zuordnung von Mikroorganismen.

Die aufgeführten Methoden erfordern, wie bereits erwähnt, für die sichere Anwendung geschultes und erfahrenes Fachpersonal und stützen sich grundsätzlich auf invasive Verfahren zur Probennahme. Laboratorien, die entsprechend der Akkreditierung nach ISO/IEC 17025^x und ähnlichen Systemen arbeiten, müssen ihre Messunsicherheit für die von ihnen verwendeten Methoden und durchgeführten Analysen nach der ISO/TS 19036^x abschätzen und diese aufzeichnen. Dies ist durch vorherige und regelmäßig begleitende Vergleichsuntersuchungen gegenüber dem Referenzverfahren nachzuweisen (Verifizierung) und zu dokumentieren. Notwendige Aufwände und Zeitvorteile müssen deshalb sorgfältig gegeneinander abgewogen werden. Für den Anwender in der Fleischindustrie stellt neben den zeitlichen Verzögerungen bis zum Vorliegen von Ergebnissen die invasive Probennahme aufgrund ihres Aufwandes ein weiteres Problem dar.

Neue Alternativmethode

Seit kurzem steht als Lösung die laserinduzierte Fluoreszenzspektroskopie als Schnellmethode zur Verfügung. Hier werden die Stoffwechsel-Endprodukte von Bakterien mit UV-Licht angeregt und fluoreszieren. Das Fluoreszenzlicht wird spektroskopisch gemessen und mit einem Algorithmus aus den aufgenommenen Spektren die Gesamtkeimzahl errechnet. Diese nicht-invasiven Messungen der Keimbelastung wurden in verschiedenen Forschungsprojekten sowie mit unabhängigen Laboren bereits wissenschaftlich belastbar durchgeführt und dokumentiert. Die Fluoreszenzspektroskopie kann deshalb bei der Entwicklung von schnellen und nicht-invasiven analytischen Methoden nicht ignoriert werden. Sie ist einer der empfindlichsten spektroskopischen Ansätze zur Identifizierung, Klassifizierung, Authentifizierung, Quantifizierung und Optimierung verschiedener Parameter während der Handhabung, Verarbeitung und Lagerung von Lebensmitteln^{xii}.

Aufgrund der geringen Kosten und hohen Zuverlässigkeit des entsprechenden Handmessgeräts freshdetect BFD-100 eignet sich diese Methode für Schlacht- und Fleischverarbeitungsbetriebe, um in allen Prozessschritten die strengen Hygienevorschriften und Anforderungen zur Qualitätssicherung zu erfüllen. Zudem können Überwachungsbehörden das Verfahren vor Ort einsetzen, um die Gesamtzahl der Proben zu erhöhen und gleichzeitig die Anzahl der Laboruntersuchungen in einem vertretbaren Rahmen zu halten.

-
- ⁱ VERORDNUNG (EG) Nr. 852/2004 DES EUROPÄISCHEN PARLAMENTS UND DES RATES vom 29. April 2004 über Lebensmittelhygiene
<http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2004:139:0001:0054:de:PDF>
 - ⁱⁱ EG Nr. 2073/2005 Verordnung (EG) Nr. 2073/2005 der Kommission vom 15. November 2005 über mikrobiologische Kriterien für Lebensmittel
[2005http://eurlex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2005:338:0001:0026:DE:PDF](http://eurlex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2005:338:0001:0026:DE:PDF)
 - ⁱⁱⁱ VERORDNUNG (EG) Nr. 1441/2007 DER KOMMISSION vom 5. Dezember 2007 zur Änderung der Verordnung (EG) Nr. 2073/2005 über mikrobiologische Kriterien für Lebensmittel
<http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2007:322:0012:0029:DE:PDF>
 - ^{iv} DIN EN ISO 4833-2:2014-05
Mikrobiologie der Lebensmittelkette - Horizontales Verfahren für die Zählung von Mikroorganismen - Teil 2: Koloniezählung bei 30 °C mittels Oberflächenverfahren (ISO 4833-2:2013 + Cor. 1:2014); Deutsche Fassung EN ISO 4833-2:2013 + AC:2014
 - ^v DIN EN ISO 21528-1:2017-09
Mikrobiologie der Lebensmittelkette - Horizontales Verfahren für den Nachweis und die Zählung von Enterobacteriaceae - Teil 1: Nachweis von Enterobacteriaceae (ISO 21528-1:2017); Deutsche Fassung EN ISO 21528-1:2017
 - ^{vi} DIN ISO 18593:2009-12
Mikrobiologie von Lebensmitteln und Futtermitteln - Horizontales Verfahren für Probenahmetechniken von Oberflächen mittels Abtuschplatten und Tupfer (ISO 18593:2004)
 - ^{vii} DIN EN ISO 17604:2015-12
Mikrobiologie der Lebensmittelkette - Probenahme von Schlachtierkörpern zur mikrobiologischen Untersuchung (ISO 17604:2015); Deutsche Fassung EN ISO 17604:2015
 - ^{viii} Mifek, Sabine (2009): Methoden zur EU-konformen mikrobiologischen Untersuchung von Fleisch und Fleischerzeugnissen, Diplomarbeit, Universität Wien
 - ^{ix} DIN EN ISO/IEC 17025:2017-02 - Entwurf
Allgemeine Anforderungen an die Kompetenz von Prüf- und Kalibrierlaboratorien (ISO/IEC DIS 17025:2016); Deutsche und Englische Fassung prEN ISO/IEC 17025:2016
 - ^x DIN ISO/TS 19036:2012-01; DIN SPEC 10125:2012-01
Mikrobiologie von Lebensmitteln und Futtermitteln - Anleitung zur Feststellung von Messunsicherheiten bei quantitativen Bestimmungen (ISO/TS 19036:2006 + Amd.1:2009)
 - ^{xi} Grimmer, Christina, Tamara Kuhfuß, Matthias Heiden, et al. (2017): Noninvasive assessment of the bioburden of minced pork using a handheld fluorescence device. *tm Technisches Messen*. 0(0): Retrieved 1 Feb. 2018, from doi:10.1515/teme20170092
 - ^{xii} Ahmad MH, Sahar, Hitzmann (2017): Fluorescence Spectroscopy for the Monitoring of Food Processes. *Adv Biochem Eng Biotechnol*. 2017;161:121-151, doi: 10.1007/10_2017_11.
https://link.springer.com/chapter/10.1007%2F10_2017_11



FreshDetect GmbH

Kirchplatz 1 • 82049 Pullach im Isartal
T +49 89 324939-210 • F +49 89 324939-211
info@freshdetect.com • www.freshdetect.com