

Aus dem Department für Lebensmittelkrobiologie  
der Veterinärmedizinischen Universität Wien

Institut für Lebensmittelsicherheit, Lebensmitteltechnologie und  
öffentliche Gesundheitswesen in der Veterinärmedizin  
(Leiter: Dipl. ECVPH Univ.-Prof. Dr.med.vet. Martin Wagner)

**Untersuchung der mikrobiologischen Belastung von Fleischproben und  
Oberflächenkontaminationen im Laufe der Fleischverarbeitung**

Bachelorarbeit

Veterinärmedizinische Universität Wien

vorgelegt von

Aleksandar Kuzmic

Wien, im Dezember 2023

Betreuer: Dr.med.vet. Beatrix Stessl

Institut für Lebensmittelsicherheit, Lebensmitteltechnologie und öffentliches  
Gesundheitswesen der veterinärmedizinischen Universität Wien

Abteilung für Lebensmittelkrobiologie

Begutachter: Priv.-Doz.Dr.med.vet. Igor Loncaric

Institut für Mikrobiologie der veterinärmedizinischen Universität Wien

Abteilung für klinische Mikrobiologie und Diagnostik

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

<b>Abkürzung</b>	<b>Begriff</b>
<i>B.</i>	<i>Bacillus</i>
BLA	BrillianceTM <i>Listeria</i> Agar
bp	Basenpaare
BPW	Buffered Peptone water
CFU/KbE	Colony Forming Unit / Koloniebildende Einheit
<i>E.</i>	<i>Escherichia</i>
EB	<i>Enterobacteriaceae</i>
EG	Europäische Gemeinschaft
GKZ	Gesamtkeimzahl
HACCP	Hazzard Analysis and Critical Control Points
H2O2	Hydrogen Peroxid
HCl	Hydrogen Chlorid
HF	Halb Fraser
ISO	Internationale Organisation für Normung
KOH	Kalium Hydroxid
<i>L.</i>	<i>Listeria</i>
MKTnT	Muller-Kauffmann Tetrathionate-Novobiocin Broth
<i>n. a.</i>	Nicht angegeben
<i>P.</i>	<i>Pseudomonas</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
qPCR	quantitative polymerase chain reaction (Real time PCR)
RVS	Rappaport-Vassiliadis Soya Peptone broth
<i>S.</i>	<i>Staphylococcus/Salmonella/Streptococcus</i>
SLB	Sample loading buffer / Probenladepuffer
STEC	Shigatoxin bildende <i>Escherichia coli</i>
TAE	TRIS-Acetat-EDTA-Puffer
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminometane
TIFF	Tagged Image File Format
TSA	Trypto-Casein-Soya Agar
VF	Voll Fraser
VO	Verordnung
VRBD	Kristallviolett Galle Glukose Agar

# Inhalt

<b>1. Einleitung .....</b>	6
<b>1.1. Mikroorganismen in Lebensmitteln.....</b>	6
<b>1.2. Lebensmittelqualität.....</b>	6
<b>1.3. Untersuchte Mikroorganismen.....</b>	7
<b>1.3.1. <i>Enterobacteriaceae</i> .....</b>	7
<b>1.3.2. <i>Pseudomonas</i>.....</b>	7
<b>1.3.3. <i>Listeria</i>.....</b>	8
<b>1.3.4. <i>Salmonella</i>.....</b>	9
<b>1.4. Rechtliche Grundlagen .....</b>	9
<b>1.5. Grundlagen der Prozesshygiene.....</b>	12
<b>1.6. Schlachtprozess und Hygienepraktiken .....</b>	13
<b>1.7. Kontaminationsquellen.....</b>	14
<b>1.8. Ziel der Untersuchung .....</b>	14
<b>2. Material und Methoden .....</b>	15
<b>2.1. Beschreibung der Methoden .....</b>	15
<b>2.1.1. Bestimmung der Gesamtkeimzahl.....</b>	16
<b>2.1.2. Nachweis von Enterobakterien.....</b>	17
<b>2.1.3. Nachweis von Salmonellen.....</b>	17
<b>2.1.4. Nachweis von Listerien .....</b>	18
<b>2.1.5. Fraktionierter Ausstrich.....</b>	18
<b>2.2. Kryokultur.....</b>	19
<b>2.3. Differenzierungsmethoden .....</b>	19
<b>2.3.1. Morphologische Differenzierung.....</b>	19
<b>2.3.2. Bestätigungstests .....</b>	19
<b>2.4. Molekularbiologische Methoden .....</b>	20
<b>2.4.1. DNA Extraktion mit Chelex® 100 Resin.....</b>	21
<b>2.4.2. <i>Listeria</i> spp. Multiplex PCR .....</b>	21
<b>2.4.3. <i>Salmonella</i> PCR .....</b>	23
<b>2.4.4. Gelelektrophorese.....</b>	24
<b>3. Ergebnisse .....</b>	26
<b>3.1. Ergebnisse Wischproben vor und nach Reinigung .....</b>	26
<b>3.2. Ergebnisse longitudinale Beprobung Schlachtung und Zerlegung .....</b>	31

<b>4.</b>	<b>Diskussion</b>	35
<b>5.</b>	<b>Summary</b>	38
<b>6.</b>	<b>Zusammenfassung</b>	39
<b>7.</b>	<b>Abbildungsverzeichnis</b>	40
<b>8.</b>	<b>Tabellenverzeichnis</b>	40
<b>9.</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	42
<b>10.</b>	<b>Materialliste</b>	47
<b>11.</b>	<b>Danksagung</b>	49

## 1. Einleitung

### 1.1. Mikroorganismen in Lebensmitteln

Mikroorganismen manifestieren sich häufig in oder auf Lebensmitteln und können dabei sowohl förderliche als auch schädliche Auswirkungen auf den menschlichen Organismus haben. Zahlreiche Mikroorganismen erweisen sich als essenziell für unsere Ernährung und werden gezielt im Prozess der Lebensmittelherstellung und Lebensmittelveredelung eingesetzt. Gleichzeitig existieren jedoch Mikroorganismen, die nachteilige Effekte auf Lebensmittel und die menschliche Gesundheit auslösen können, indem sie beispielsweise den Verderb von Nahrung bewirken oder Lebensmittelvergiftungen und -infektionen hervorrufen (DOYLE et al., 2020).

Die Kontamination tierischer Lebensmittel, insbesondere von Fleisch, mit Keimen während des Schlachtvorgangs bleibt oft unbemerkt und kann auf vielfältige Weisen, wie durch Luft, Wasser, Oberflächen oder direkten Kontakt, entstehen (KEWELOH, 2019).

Die Fleischverarbeitung in einem Schlachthausbetrieb umfasst diverse Schritte, darunter das Schlachten von Tieren, die Bearbeitung der Karkassen, das Kühlen und das Zerlegen der Karkassen. Dabei werden grundlegende Verfahren wie Betäubung und Blutaustreten im Betrieb durchgeführt (SOFOS, 2005)

Es wird angenommen, dass enterische Pathogene, die im Fleisch nachgewiesen werden, ihren Ursprung größtenteils in Faeces von infizierten Tieren haben. Insbesondere die Tierhaut und Gastrointestinaltrakt sind häufig betroffen. Durch Kreuzkontamination können sich Pathogene über direkten Kontakt oder Berührung von Oberflächen von Karkassen, Geräten, Händen des Personals, Messern und sogar über Wände und Böden verbreiten (DAS et al., 2019; FORSYTHE, 2020).

### 1.2. Lebensmittelqualität

Ein Nahrungsmittel mit hoher mikrobiologischer Qualität weist eine minimale Menge an Verderbnis erregenden Keimen auf und ist frei von schädlichen Mikroorganismen sowie ihren giftigen Stoffwechselprodukten. Die Sicherstellung dieser Qualität erfolgt nicht nur durch sporadische Endproduktkontrollen, sondern vielmehr durch die Einhaltung guter Herstellungspraktiken (GMP, Good manufacturing practice), die eine umfassende Palette präventiver, betriebshygienischer und mikrobiologischer Maßnahmen vereint. Hierzu zählen auch eine gute Hygienepraxis (GHP) (KRÄMER und PRANGE, 2017).

Durch geeignete und regelmäßige Reinigungs- und Desinfektionsmaßnahmen lassen sich mögliche gefährliche Verunreinigungen im Fleisch während verschiedener Phasen des Schlachtplatzes kontrollieren. In den meisten fortgeschrittenen Ländern wurden HACCP-Systeme in Betrieben der Lebensmittelverarbeitung eingeführt, um die Überwachung von mikrobiologischen und anderen potenziell riskanten Verunreinigungen im Fleisch sicherzustellen (SOFOS, 2005).

Die Bestimmung der mikrobiologischen Qualität von Lebensmitteln, erfolgt durch verschiedene Methoden. Eine bedeutende Rolle spielt dabei die quantitative Erfassung von Hygieneindikatoren (EG 2073, 2015). Bei einigen pathogenen Keimen, wie beispielsweise *Salmonella* spp. reicht der rein quantitative Nachweis nicht aus, da die Prävalenz von *Salmonella* sehr niedrig ist. Der Nachweis gelingt erst nach einem 2-stufigen Anreicherungsverfahren. Sowohl für die quantitative als auch qualitative Bestimmung werden in der Regel ISO Referenzverfahren verwendet, bei denen die Mikroorganismen auf festen und/oder flüssigen Nährmedien quantitativ und qualitativ nachgewiesen und anschließend differenziert werden. Zusätzlich kommen in Routineuntersuchungen häufig immunchemische und molekularbiologische Methoden zum Einsatz (EG 2073, 2005; MÄRTLBAUER, 2016).

### **1.3. Untersuchte Mikroorganismen**

#### **1.3.1. Enterobacteriaceae**

Die *Enterobacteriaceae*-Familie besteht aus gramnegativen, fakultativ anaeroben Stäbchenbakterien, die einen Durchmesser von 0,5 bis 1,5 µm und eine Länge von 2 bis 4 µm aufweisen. Diese Bakterien können beweglich oder unbeweglich sein, bilden jedoch keine Sporen. Aufgrund unterschiedlicher Antigenstrukturen und biochemischer Eigenschaften werden die *Enterobacteriaceae* in Gruppen, Gattungen, Arten und Typen unterteilt. Neben den obligat pathogenen Gattungen und Arten wie *Salmonella*, *Shigella* und *Cronobacter* gibt es eine Vielzahl von fakultativ pathogenen Gattungen wie *Escherichia*, *Klebsiella*, *Citrobacter*, *Enterobacter* oder *Leclercia* (JANDA & ABOTT, 2021; <https://bacdive.dsmz.de/> eingesehen am: 28.12.2023).

#### **1.3.2. Pseudomonas**

Zur Gattung *Pseudomonas* gehören Bakterien, die obligat aerob sind, gramnegativ und die Form von Stäbchen haben. Ihr Durchmesser beträgt 0,5 bis 0,1 µm, und sie haben eine Länge von 1,5 bis 4,0 µm. Diese Bakterien besitzen eine polare Begeißelung und bilden keine Sporen. Besonders relevant für die Humanmedizin ist die Art *Pseudomonas aeruginosa*. Pseudomonaden sind auch in Lebensmittelbetrieben bekannt für ihre hohe

Widerstandsfähigkeit gegenüber Umweltbedingungen. Ein spezielles Problem stellt die Anhaftung und Vermehrung von Pseudomonaden auf Oberflächen wie Wänden, Fußböden, Geräten, Dichtungen und den Innenseiten von Rohrleitungen dar. Sie können zur Bildung von Biofilmen beitragen, in denen auch andere Mikroorganismen wie *Listeria monocytogenes* wachsen können. Eine erhöhte Menge an Pseudomonaden in Lebensmitteln deutet oft auf die potenziell gefährliche Entwicklung von Biofilmen hin. Diese Biofilm-Bildung kann durch Ablagerungen von Kalk, Korrosion, Schmutz oder anderen Mikroorganismen begünstigt werden und weist auf eine unzureichende Reinigung und Desinfektion hin (LALUCAT et al., 2020; RAPOSO et al., 2016).

### 1.3.3. *Listeria*

Listerien sind kurze, grampositive Stäbchenbakterien, die dazu neigen, kokkoide Formen anzunehmen und Ketten zu bilden. Sie wachsen fakultativ anaerob, bilden keine Sporen und sind durch eine peritrichie Begeißelung beweglich. *L. monocytogenes* ist psychotroph, was bedeutet, dass es bereits bei Kühlenschranktemperaturen ab 0 °C wachsen kann. Die optimale Wachstumstemperatur liegt jedoch zwischen 30 °C und 37 °C. *L. monocytogenes* kann in einem breiten pH-Bereich zwischen pH 4,5 und pH 9 gedeihen. Abgesehen von primären Infektionsquellen wie Erdboden, Kot und rohen Lebensmitteln ist das betriebliche Umfeld während der Lebensmittelproduktion die häufigste sekundäre Infektionsquelle. Listerien können in solchen Bereichen und auf Geräten des Betriebs dauerhaft überleben, darunter Abwassersysteme mit Gullys sowie Dichtungen von Geräten und Maschinen. In diesen besiedelten Bereichen können sich schwer zu beseitigenden, oft schleimigen Biofilmen bilden, in denen auch andere Mikroorganismen gedeihen können. Rohes Fleisch ist oft mit *L. monocytogenes* kontaminiert, da die Erreger von den Tieren mit dem Kot ausgeschieden werden. Während des Schlachtprozesses kann es durch den Kot zur Kontamination der Schlachttiere und des Fleisches kommen (KRÄMER und PRANGE, 2017). Von den 30 bisher bekannten Arten, die zur Gattung *Listeria* gehören, ist *L. monocytogenes* als Erreger der Listeriose beschrieben (<https://lpsn.dsmz.de/genus/listeria>; eingesehen am: 28.12.2023; ORSI et al., 2023).

Es gibt mindestens 13 Serotypen von *L. monocytogenes* wobei die meisten menschlichen Erkrankungen von den Serotypen 4b, 1/2a und 1/2b verursacht werden (DOUMITH et al., 2004). Die Übertragung von *L. monocytogenes* auf den Menschen erfolgt größtenteils durch den Verzehr von tierischen Lebensmitteln und Fertiggerichten. Dies liegt daran, dass sich die

Erreger während der gekühlten Lagerung weiter vermehren und anreichern können (CHAN & WIEDMANN, 2008).

#### **1.3.4. *Salmonella***

Salmonellen haben die Fähigkeit sowohl aerob als auch anaerob zu wachsen. Morphologisch ähneln sie stark anderen Bakterien der Familie *Enterobacteriaceae*, können jedoch anhand ihrer biochemischen und serologischen Eigenschaften unterschieden werden. Die optimale Wachstumstemperatur für Salmonellen beträgt 37 °C, das Maximum liegt bei 48 °C, und das Minimum liegt zwischen 7 und 10 °C. Das pH-Optimum für ihr Wachstum liegt im Bereich von pH 6,5 bis 7,5 (KRÄMER und PRANGE, 2017).

### **1.4. Rechtliche Grundlagen**

Es gibt zahlreiche nationale und europäische Bestimmungen, welche die hygienische Produktion und Verarbeitung von Fleisch und Fleischprodukten regulieren (KRAMER & PRÄNGE, 2017, S.286).

Zu den relevanten Vorschriften der Europäischen Union, die in diesem Kontext wichtig sind, gehören die Verordnung (EG) 853/2004 mit spezifischen Hygienevorschriften für Lebensmittel tierischen Ursprungs sowie die Verordnung (EG) 2073/2005 über mikrobiologische Kriterien für Lebensmittel.

Die Internationale Organisation für Standardisierung (ISO) entwickelt weltweit gültige Empfehlungen für verschiedene Bereiche, darunter mikrobiologische Untersuchungsverfahren, Richtlinien für die hygienisch sichere Lebensmittelherstellung und allgemeine Qualitätsmanagement-Standards (<https://www.iso.org/ics/07.100.30/x/>; eingesehen am: 28.12.2023).

Gemäß der Verordnung (EG) 2073/2005 stellen mikrobiologische Gefahren in Lebensmitteln eine Hauptquelle lebensmittelbedingter Krankheiten für den Menschen dar. Es wird betont, dass Lebensmittel keine Mikroorganismen, Toxine oder Metaboliten in Mengen enthalten sollten, die ein unannehmbares Risiko für die menschliche Gesundheit darstellen können. Die Verordnung legt Sicherheitskriterien fest, um die Akzeptanz von Lebensmitteln hinsichtlich bestimmter Pathogener zu bewerten. Im Rahmen von HACCP-basierten Verfahren sollen mikrobiologische Kriterien definiert werden, wobei präventive Maßnahmen wie die Umsetzung guter Hygienepraktiken zur Lebensmittelsicherheit beitragen sollen. Es wird daher empfohlen, mikrobiologische Kriterien festzulegen, um die Akzeptanz der Verfahren und der Prozesshygiene zu bewerten. Diese Kriterien dienen auch der Sicherung der

Lebensmittelsicherheit, wobei eine Überschreitung festgelegter Grenzwerte darauf hinweist, dass ein Lebensmittel als inakzeptabel kontaminiert gilt.

Prozesshygienekriterien sollen als Richtwert für die ordnungsgemäße Funktionsweise eines Herstellungsprozesses dienen. Eine Überschreitung dieses Richtwerts erfordert Korrekturmaßnahmen, um die Prozesshygiene gemäß den geltenden Lebensmittelvorschriften zu gewährleisten. Die Auswertung der Testergebnisse eines Herstellungsprozesses kann als befriedigend gelten, wenn der tagesdurchschnittliche Log-Wert  $< m$  ist, akzeptabel bei einem Log-Wert zwischen  $m$  und  $M$  liegt oder unbefriedigend ist, wenn der tagesdurchschnittliche Log-Wert  $> M$  ist (gemäß VO EG 2073/2005).

Obwohl mikrobiologische Untersuchungen von Oberflächen nicht explizit vorgeschrieben sind, stellen sie ein wichtiges Instrument dar, um im Rahmen des Eigenkontrollsystems den Erfolg von Reinigungs- und Desinfektionsmaßnahmen anhand der Gesamtkeimzahl (GKZ) und/oder der Anzahl der *Enterobacteriaceae* zu überprüfen. In der Regel wird das Abklatschverfahren zur Probenentnahme verwendet. Falls Produkte auf das Vorhandensein von *L. monocytogenes* überprüft werden müssen, müssen auch die Oberflächen, wie beispielsweise Messer oder Förderbänder, nach Reinigung und Desinfektion auf *L. monocytogenes* untersucht werden. (<https://www.lebensmittelbuch.at/>; eingesehen am: 28.12.2023; LL Schlachtung und Zerlegung von div. Fleischerzeugnissen).

**TABELLE 1: Grenzwerte für Mikroorganismen gemäß der EG Verordnung 2073/2005.**

GRENZWERTE		BEURTEILUNG
<b>Oberflächen von Schlachtkörpern (Rinder, Schafe, Ziegen und Pferde)</b>		
<b>GKZ</b>	$m = 3,5 \log \text{KBE}/\text{cm}^2$	befriedigend, wenn der tagesdurchschnittliche log-Wert nicht größer als m ist; akzeptabel, wenn der tagesdurchschnittliche log-Wert zwischen m und M liegt; unbefriedigend, wenn der tagedurchschnittliche log-Wert größer als M ist.
	tagesdurchschnittlicher log-Wert	
	$M = 5,0 \log \text{KBE}/\text{cm}^2$	
	tagesdurchschnittlicher log-Wert	
<b>EB</b>	$m = 1,5 \log \text{KBE}/\text{cm}^2$	
	tagesdurchschnittlicher log-Wert	
	$M = 2,5 \log \text{KBE}/\text{cm}^2$	
	tagesdurchschnittlicher log-Wert	
<b>Salmonellen</b>	In jedem beprobtem Schlachtkörper nicht nachweisbar.	befriedigen, wenn Salmonellen in höchstens 2 von 50 Proben nachweisbar sind; unbefriedigend, wenn Salmonellen in mehr als 2 von 50 Proben nachgewiesen sind.
<b>Oberflächen von Schlachtkörpern (Schweine)</b>		
<b>GKZ</b>	$m = 4,0 \log \text{KBE}/\text{cm}^2$	befriedigend, wenn der tagesdurchschnittliche log-Wert nicht größer als m ist; akzeptabel, wenn der tagesdurchschnittliche log-Wert zwischen m und M liegt; unbefriedigend, wenn der tagedurchschnittliche log-Wert größer als M ist.
	tagesdurchschnittlicher log-Wert	
	$M = 5,0 \log \text{KBE}/\text{cm}^2$	
	tagesdurchschnittlicher log-Wert	
<b>EB</b>	$m = 2,0 \log \text{KBE}/\text{cm}^2$	
	tagesdurchschnittlicher log-Wert	
	$M = 3,0 \log \text{KBE}/\text{cm}^2$	
	tagesdurchschnittlicher log-Wert	
<b>Salmonellen</b>	In jedem der beprobten Schlachtkörper nicht nachweisbar.	befriedigend, wenn Salmonellen in höchstens 5 von 50 Proben nachweisbar sind; unbefriedigend, wenn Salmonellen in mehr als 5 von 50 Proben nachgewiesen werden.

## 1.5. Grundlagen der Prozesshygiene

Während der Überprüfung und Bestätigung der korrekten Umsetzung von HACCP-Prinzipien ist es entscheidend, sich auf mikrobiologische Analysen zu konzentrieren. In den letzten zwei Jahrzehnten wurde viel Arbeit in die Probenahme und Prüfung von Schlachtkörpern hinsichtlich Hygienekriterien investiert. Dies umfasst auch die frühzeitige Verwendung von Indikatormikroorganismen, um Rückschlüsse auf die allgemeine Hygiene in Schlachtprozessen zu ziehen. Mikrobiologische Ergebnisse, die nur am Ende des Schlachtprozesses gesammelt werden, liefern keine Informationen über die Ursachen von Problemen oder Kontaminationen. Daher ist es wichtig, "prozessbasierte" Kriterien zu messen, die verschiedene Stadien des Schlachtprozesses, einschließlich der "finalen Karkasse", einschließen. Die mikrobiologische Ausbeute mag zwar geringer sein, steht jedoch im Verhältnis zur Entnahme und daher sind nicht destruktive Techniken wie das Abklatschen mit Schwamm-Tupfern eine praktische Methode zur Abschätzung von Indikatoren im Schlachtprozess und zur Bewertung des Hygienestatus. Die strikte Einhaltung von GHP (Good Hygiene Practice) im Schlachtprozess ist entscheidend für die öffentliche Gesundheit und Qualitätssicherung (NASTASIEVIC et al., 2023). Auf der anderen Seite basiert die mikrobiologische Untersuchung auf zufälligen Stichproben und bezieht sich nicht auf die gesamte Oberfläche einer Karkasse. Daher kann sie die Möglichkeit nicht ausschließen, vorhandene pathogene Kontaminationen zu übersehen. Aus diesem Grund werden auch Indikatororganismen betrachtet, die auf eine mögliche Verbreitung von pathogenen Mikroorganismen hinweisen. Obwohl keine nachgewiesene Beziehung zwischen Indikatoren und Pathogenen besteht, wird angenommen, dass eine Reduktion der Indikatorzahl auch zu einer Reduktion der Pathogene führen sollte. Es wird auch empfohlen, mehrere Indikatoren zu verwenden. Mikrobiologische Parameter, die als Indikatoren in Schlachthäusern verwendet werden, umfassen die aerobe mesophile Gesamtkeimzahl (GKZ), die Gesamtzahl der Coliformen, *Enterobacteriaceae*, *E. coli*, fäkale Streptokokken und Aeromonaden. Die Verwendung von *Listeria* sp., Enterokokken und Bifidobakterien wird ebenfalls empfohlen. Nicht zu vernachlässigen sind auch Pathogene, die in der Vergangenheit mit Lebensmittelvergiftungen oder -erkrankungen in Verbindung gebracht wurden, wie Salmonellen, *E. coli* O157:H7, nicht O157 STEC *E. coli*, Listerien, *Campylobacter*, *Clostridium perfringens* und *Yersinia* (BLAGOJEVIC & ANTIC. 2014). Besonders wichtig in diesem Zusammenhang sind *E. coli* O157:H7, nicht O157 STEC *E. coli* und Salmonellen, die häufig bei Wiederkäuern vorkommen. Ein 3-Klassen System klassifiziert die mikrobiologischen

Ergebnisse von Karkassen in Befriedigend, Akzeptabel und Unbefriedigend und wird benutzt, um die Hygiene Performance vom Operator zu bestimmen (ALVSEIKE et al., 2019).

### **1.6. Schlachtprozess und Hygienepraktiken**

Die Fleischproduktion in Schlachthäusern umfasst das Schlachten der Tiere, das Vorbereiten und Abziehen der Karkassen sowie das Zerlegen und Kühlen. Es wird angenommen, dass enterische Pathogene, die im Fleisch gefunden werden, größtenteils auf fäkalen Materie von infizierten Tieren zurückzuführen sind. Solche Verunreinigungen mit fäkalen Materie können auf der Haut infizierter Tiere oder auch auf benachbarten Tieren gefunden werden. Karkassen von nicht infizierten Tieren können durch Kontakt mit kontaminierten Oberflächen, dem Personal, den Gerätschaften oder durch direkten Kontakt mit anderen Karkassen kontaminiert werden, was als Kreuzkontamination bezeichnet wird (RETA et al., 2023; SOFOS, 2005).

Im Verlauf des Schlachtprozesses werden verschiedene Behandlungsprozesse durchgeführt, um die Dekontamination zu gewährleisten. Hierbei kommen Waschschritte mit heißem Wasser, Milchsäure, Hochdruck und Dampf zum Einsatz. Auch das Kühlen der Karkassen stellt einen wichtigen Schritt für die endgültige Fleischqualität dar (BARCO et al., 2015).

Um den gesetzlichen Anforderungen gerecht zu werden und letztendlich sichere Produkte für die Verbraucher zu gewährleisten, setzen Schlachtbetriebe eine Vielzahl von Methoden ein, die darauf abzielen, Kontaminationen zu reduzieren. Zu diesen Methoden gehören beispielsweise das Waschen oder Reinigen der Karkassen, chemische Enthaarung im Schlachtprozess, Trimmen, Dampfen, Vakuum, Kühlen, Säurebehandlungen, um nur einige zu nennen. Trotz dieser vielfältigen Behandlungsmethoden haben die Einhaltung der GMP, der Hygienerichtlinien und der Aufbau des Schlachthauses einen entscheidenden Einfluss auf das fertige Produkt (SOFOS, 2005).

Der Erfolg der Desinfektion lässt sich am einfachsten durch regelmäßige Überprüfung der Keimbelaustung der gereinigten und desinfizierten Flächen, Geräte oder Maschinen kontrollieren. Im Abklatsch- oder Kontaktverfahren erfolgt die direkte Entnahme von Keimen von glatten Oberflächen wie Maschinen, Fußböden, Wänden oder Regalen durch Andrücken eines mit Nähragar beschichteten Trägers oder speziellen Nähragarplatten. Nach der Inkubation der Nähragarplatten gibt die Anzahl der gewachsenen Kolonien einen groben Hinweis auf die Anzahl der Mikroorganismen auf der untersuchten Fläche. Beim Abstrich- oder Tupfer-Verfahren werden definierte Flächen innerhalb einer Schablone mit einem angefeuchteten sterilen Tupfer abgestrichen. Die Tupfer werden entweder direkt auf eine

Nähragarplatte ausgestrichen oder in einer bestimmten Menge Puffer suspendiert, von dem nach Anlegen einer Verdünnungsreihe die Keimzahl bestimmt wird (HOLAH et al., 2016; KRÄMER & PRANGE, 2017).

### **1.7. Kontaminationsquellen**

Verantwortlich für den Großteil der Kontaminationen sind in erster Linie der Rohstoff selbst, insbesondere der Intestinaltrakt, die Haut- und Darmflora der Tiere sowie der Mensch und die Umgebung (wie Arbeitsflächen, Kontaktflächen, Luft, etc.). Der Mensch agiert dabei als Überträger zwischen dem Rohstoff und der Umgebung, während die Umgebung als Überträger für die Kontamination zwischen dem Rohstoff und der humanen Flora fungiert (BAUER & SMULDERS, 2015).

Die Hauptquellen der Kontamination entlang der Schlachlinie sind ausgelaufene intestinale Inhalte und die Kreuzkontamination mit verschmutzten Häuten von geschlachteten Tieren. In beiden Fällen haben die Verunreinigungen einen fäkalen Ursprung. Daher ist es sinnvoll, *E. coli* und *Enterobacteriaceae* als Indikatoren für den Hygienestatus zu verwenden. Die gesammelten Daten können dazu genutzt werden, Prozesse zu implementieren, bevor die Tiere in die Schlachthäuser gelangen, und entlang der gesamten Produktionskette, um das Kontaminationsniveau am Ende des Schlachtprozesses zu reduzieren (BARCO et al., 2005).

Als kritische Kontrollpunkte (CCP - Critical Control Points) werden Stellen oder Abschnitte eines Verfahrens, Arbeitsvorgangs oder von Rohmaterialien in der Lebensmittelproduktion bezeichnet, an denen es möglich und notwendig ist, durch die Einhaltung von Hygienemaßnahmen das Kontaminationsrisiko vollständig oder teilweise zu beherrschen (BAUER & SMULDERS, 2015).

### **1.8. Ziel der Untersuchung**

Die folgende Arbeit befasst sich mit der Untersuchung der mikrobiologischen Belastung von Karkassen sowie der Analyse von der Oberflächenhygiene zweier Schlachtbetriebe. Es wird ein theoretischer Überblick über die Möglichkeiten von Kontaminationen im Laufe der Fleischverarbeitung, sowie Einblicke in konventionelle Analysemethoden in der Lebensmittelmikrobiologie gegeben. Des Weiteren wird der Reinigungseffekt als Aspekt der Betriebshygiene anhand von untersuchten Wischproben von verschiedenen Oberflächen der Schlachträume behandelt werden. Die gesammelten Daten werden mit den aktuellen gesetzlichen Anforderungen verglichen. Zum Abschluss werden über die Gewährleistung einer guten Produkthygiene und verbesserter Lebensmittelsicherheit diskutiert.

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Beschreibung der Methoden

Für die meisten quantitativen Analysemethoden ist die Homogenisierung der Probe der erste Schritt. Die Mikroorganismen sollen dabei aus den Lebensmitteln oder Abklastschproben in die hinzugefügte Lösung übergehen. Mikroorganismen in Lebensmitteln kommen oft nur in geringen Mengen vor, hier bedarf es bei einer qualitativen Analyse zuallererst einer Homogenisierung der Probe und anschließenden Anreicherung, um den Nachweis bzw. die Detektion zu erleichtern.

Je nach dem welches Ziel die Analyse hat werden daher als erster Schritt eine Erstverdünnung mit anschließender 1:10 Verdünnungsreihe in Ringer Lösung oder eine Selektivanreicherung gewählt (ISO 6887-1:2017). Beispielsweise bei der Untersuchung von Oberflächen, die mit Lebensmitteln in Kontakt kommen wird mit einem 5x5 cm Schwamm eine vordefinierte Oberfläche abgestrichen (meist 10 x10 cm<sup>2</sup>). Der Schwamm wird in einen sterilen Beutel gepackt und gekühlt transportiert zur Analyse (VARGOVÁ et al., 2023). Je nach Ziel der Untersuchung ob Pathogen-Nachweis oder GKZ-Bestimmung wird mit BPW oder einem Selektivanreicherungsmedium homogenisiert (100 ml).

Zur Bestimmung der aeroben mesophilen Gesamtkeimzahl werden nicht-selektive Agar verwendet wie TSAY. Zum spezifischen Nachweis von Pathogenen werden selektive Anreicherungsmethoden und Agarplatten verwendet (YOUSEF et al. 2022).

Zur Berechnung der GKZ und Enterobakterien Zahl wird die folgende Formel verwendet:

$$N = \frac{C}{V \times [n1 + (0,1 \times n2)] \times d}$$

N = Anzahl der koloniebildenden Einheiten pro Gramm Probe (KBE/g)

C = Summe aller Kolonien der Keimzählplatten von zwei aufeinander folgenden Verdünnungen

V = Volumen der auf die Keimzählplatten pipettierten Verdünnungen in ml

n1 = Anzahl der Keimzählplatten der niedrigeren Verdünnung

n2 = Anzahl der Keimzählplatten der höheren Verdünnung

d = Verdünnungsfaktor der niedrigeren Verdünnung

In diesem Versuch verwendete selektive Medien werden in folgender Tabelle aufgelistet:

**TABELLE 2: Verwendete selektive Medien**

Medium	Zielorganismus	Begleitflora	Inkubation
VRBD	<i>Enterobacteriaceae</i> (rosa, violett)	Pseudomonaden blass, Gram-positive Bakterien inhibiert	24h, 37 °C
Brilliance <i>Listeria</i> Agar	<i>L. monocytogenes</i> blau mit Hof, <i>Listeria</i> spp. blau ohne Hof	Gram-negative Bakterien, <i>Enterococcus</i> , <i>Bacillus</i> , <i>Staphylococcus</i> inhibitiert	24-48h, 37 °C
Chromagar™ <i>Enterobacteriaceae</i>	<i>E. coli</i> (blau), <i>Enterobacteriaceae</i> (rot, rosa)	Gram-positive Bakterien inhibiert	24h, 37 °C
Chromagar™ <i>Salmonella</i>	<i>Salmonella</i> (mauve), Coliforme (blau)	Gram-positive Bakterien inhibiert	24h, 37 °C
Chromagar™ STEC	STEC (mauve), <i>E. coli</i> blau, <i>Enterobacteriaceae</i> (blau, farblos)	Gram-positive Bakterien inhibiert	24h, 37 °C
RAPID L.mono	<i>L. monocytogenes</i> (blau), <i>Listeria</i> spp. (weiß bis gelb, mit oder ohne gelben Hof), <i>L. ivanovii</i> (blau-grün, mit gelbem Hof)	Gram-negative Bakterien, <i>Enterococcus</i> , <i>Bacillus</i> , <i>Staphylococcus</i> inhibitiert	24-48h, 37 °C

### 2.1.1. Bestimmung der Gesamtkeimzahl

Für die Vorbereitung der Proben wurden 25 g der Probe (bei Lebensmittelproben) oder der vorgelegte Abklatschschwamm in einem sterilen Beutel\*, mit BPW versetzt und homogenisiert (1:10; bei Abklatsch 100 ml). Von der homogenisierten Probe wurde 1 ml entnommen zur Erstellung einer seriellen Verdünnungsreihe. Dazu wurde für jede Verdünnungsstufe ein Röhrchen mit 9 ml Ringerlösung angefertigt und nach dem folgenden Schema pipettiert.

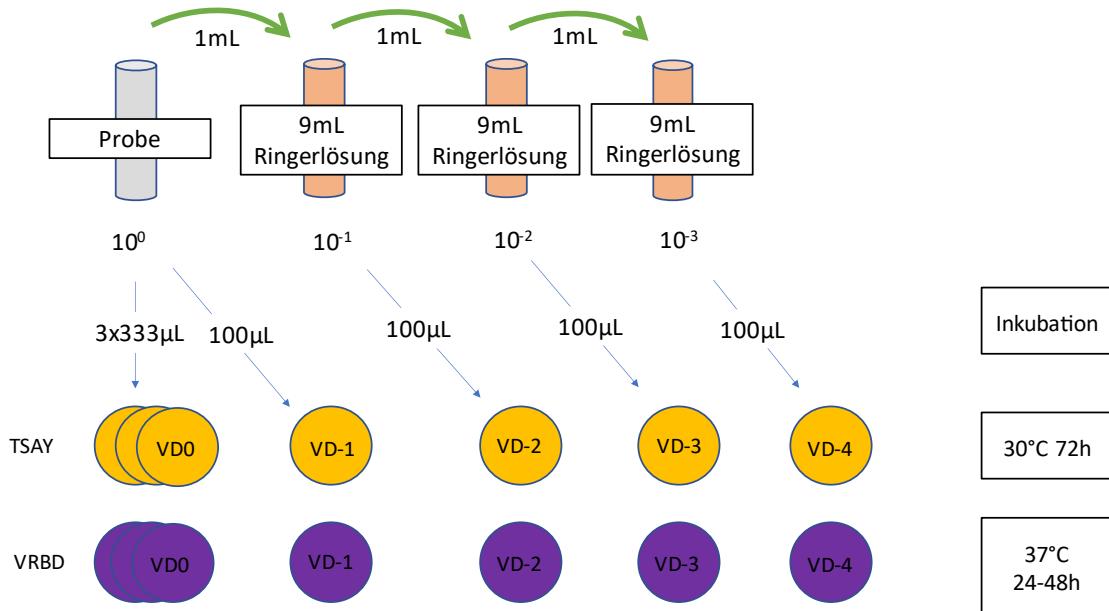


ABBILDUNG 1: Erstellung der Verdünnungsreihe

### 2.1.2. Nachweis von Enterobakterien

Für den Nachweis von *Enterobacteriaceae* wurden nach Bewertung der VRBD-Platten, verdächtige Kulturen auf Chromagar™ EB Platten (CHROMAgar, Paris, Frankreich) isoliert und für 24h bei  $37^\circ\text{C}$  kultiviert. Bei der Auswertung der Isolate sollten *E. coli* Kolonien blau und EB Kolonien rosa erscheinen.

Für den Nachweis von STEC wurden die zuvor im BPW angereicherten Proben auf Chromagar™ STEC überimpft und nach der Inkubation von 24 h und  $37^\circ\text{C}$  ausgewertet. *E. coli* Kolonien erscheinen hier grün-blau, STEC Kolonien erscheinen mauve.

### 2.1.3. Nachweis von Salmonellen

Für den Nachweis von *Salmonella* werden zuvor in BPW für 18h bei  $37^\circ\text{C}$  angereicherten Proben in MKTTn und RVS überimpft und bei  $37^\circ\text{C}$  für 24h inkubiert. Im Anschluss erfolgt ein Ausstrich auf Chromagar™ Salmonella Platten. Nach der Inkubation von 18-24h bei  $37^\circ\text{C}$  werden die Platten bewertet, wobei *Salmonella* rosa bis rötlich erscheint und die Begleitflora wie Enterobakterien und *E. coli* grün bis blau erscheint.

### **2.1.4. Nachweis von Listerien**

Die Anreicherung für Listerien wird mit Halbfraser und Vollfraser durchgeführt. Die Anreicherung erfolgt in zwei Ansätzen. Im ersten Ansatz werden die Wischprobenbeutel /Proben (25g) in der Nähe eines Bunsenbrenners vorsichtig geöffnet und mit 100 ml oder 225 ml HF versetzt (1:10 Konzentration), sodass das Probenschwämmchen vollständig mit HF überschichtet ist. Der Beutel wird wieder verschlossen und das Probenschwämmchen gut durchgeknetet. Anschließend werden die Wischprobenbeutel bei 30°C für 24h inkubiert.

Im zweiten Ansatz werden die zuvor im HF angereicherten Wischprobenbeutel in je ein 9,9 ml Röhrchen pro Wischprobe überimpft. Hier werden 100 µl aus dem Probenbeutel in die VF-Röhrchen vorsichtig pipettiert. Die nun beimpften VF-Röhrchen werden verschlossen, mit einem Vortexer gemischt und bei 37°C für 48h inkubiert.

Nach 24h werden die im HF angereicherten Proben auf ein Selektivmedium wie Brillance Listeria Agar und RAPID L Mono Agar ausgestrichen. Hierbei werden mit dem Verdünnungsausstrich oder 3-Ösenausstrich, 10 µl Impföse flach in den Probenbeutel eingetaucht und auf die Platte ausgestrichen. Sobald die Flüssigkeit vollständig in den Agar übergegangen ist, werden die Platten zur Vermeidung von Kondenswasserbildung mit dem Deckel nach unten bei 37°C für 48h inkubiert. Nach der Inkubationszeit von 48h werden die Platten beurteilt. Reinkulturen werden auf TSA-Agar subkultiviert bei 37°C für 24h, worauf die DNA-Extraktion und Kryokonservierung erfolgen kann.

### **2.1.5. Fraktionierter Ausstrich**

Eine Reinkultur besteht ausschließlich aus Zellen eines einzigen Stamms und hat idealerweise als Ausgangspunkt eine einzeln isolierte Zelle, also einen Klon. Es gibt verschiedene Methoden zur Isolierung, die als gemeinsame Grundlage einen Verdünnungsausstrich verwenden, bei dem Zellen auf einem festen Nährmedium verteilt werden.

Ausgehend von einer Kultur auf festem Medium wird eine geringe Menge der gemischten Ausgangskultur mit einer sterilen Impföse aufgenommen und in einem Bereich einer Petrischale auf dem Nährboden mittels fraktionierten Ösenausstrich ausgestrichen. Dann wird die Impföse in der Gasflamme sterilisiert und mehrmals über die Platte gezogen, diesmal im rechten Winkel zu den ersten Strichen. Dieser Vorgang wird ein drittes Mal wiederholt.

Ausgehend von einer Flüssigkultur wird eines von zwei verschiedenen Verfahren angewendet. Es wird entweder eine Verdünnungsreihe von einer Kultur erstellt, und jeweils ein Tropfen wird in die Mitte einer Petrischale mit Nährboden gegeben. Mit einem Drigalski-Spatel, einem

gebogenen Glasstab, wird die Flüssigkeit gleichmäßig verteilt. Oder es wird ein Tropfen der Ausgangskultur in eine Petrischale gegeben und verteilt. Dann wird derselbe Drigalski-Spatel ohne neues Material über eine zweite und eine dritte Agarplatte gezogen

Nach der Inkubation erscheinen Kolonien, die aus einzelnen Zellen hervorgegangen sind. Um eine Reinkultur zu erhalten, wird steriles frisches Nährmedium mit den Zellen einer isolierten Kolonie angeimpft (FRITSCHE, Mikrobiologie, S. 317).

## **2.2. Kryokultur**

Für die Kryokonservierung wird eine aufgereinigte Subkultur vorliegen, die zuvor 24h auf einem nichtselektiven Agar (TSA) vermehrt wurde. Die Kryomischung zu der die Subkultur hinzugefügt wird besteht aus 37,5 ml BHI und 12,5 ml 60%igem Glycerol. Zu je 1 ml Kryomischung wird dann mit einer 10 µl Öse die Subkultur hinzugefügt und homogenisiert. Die Lagerung findet bei -80°C statt.

## **2.3. Differenzierungsmethoden**

### **2.3.1. Morphologische Differenzierung**

Nach erfolgreicher Inkubation werden die Kolonien auf den Platten erstmal morphologisch differenziert und anschließend grobdifferenziert.

### **2.3.2. Bestätigungsstests**

#### **- KOH Test**

In einer sterilen Petrischale wurden einige Tropfen (30-50 µl) 3%ige Kaliumhydroxid Lösung mit ausreichend Abstand zueinander pipettiert. Mit einer sterilen Öse wird eine Kolonie von der nicht-selektiven Agarplatte entnommen und mit einem Tropfen KOH verrührt. Das KOH löst die dünne Lipopolysaccharidmembran von Gramnegativen Bakterien auf und lässt den Zellinhalt samt DNA frei. Dies macht sich beim Verrühren mit der Öse nach kurzer Einwirkzeit bemerkbar in einer Bildung von Fäden aus der Mischung beim Anheben der Öse. (<https://www.vetbact.org/index.php?displayextinfo=117>, eingesehen am: 10.10.2023).

### - Oxidase-Test

Oxidasen spielen in der Elektronentransportkette der aeroben Atmung eine wichtige Rolle. Cytochromoxidase katalysiert die Oxidation reduzierten Cytochroms mit Sauerstoff und ist bei aeroben und fakultativ anaeroben Bakterien mit Ausnahme der Enterobakterien vorhanden. Der Oxidase Test ermöglicht die Unterscheidung zwischen Oxidase-positiven Pseudomonaden und Oxidase-negativen Enterobakterien.

Hierbei wird etwas bakterielle Kultur mit einer Öse entnommen und auf die Reaktionsfläche des Teststreifens aufgetragen, bei positiver Reaktion färbt sich der Streifen in wenigen Minuten dunkel. Keine - bis wenig rosarote Färbung deutet auf eine negative Reaktion an. ([http://www.vetbact.org/index.php?displayextinfo=33#:~:text=The%20oxidase%20test%20is%20used,genus%20Plesiomonas%20\(oxidase%20positive\)](http://www.vetbact.org/index.php?displayextinfo=33#:~:text=The%20oxidase%20test%20is%20used,genus%20Plesiomonas%20(oxidase%20positive)), eingesehen am: 10.10.2023).

### - Katalase-Test

Sauerstoff ist der terminale Elektronenakzeptor der aeroben Atmung. Bei aerobem Wachstum werden von aeroben, fakultativ anaeroben und mikroaerophilen Organismen reaktive Sauerstoffverbindungen gebildet, vor allem Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ). Solche Verbindungen sind toxisch. Mit Sauerstoff in Kontakt kommende Mikroorganismen verfügen deshalb oft über enzymatische Mechanismen zur Inaktivierung reaktiver Sauerstoffverbindungen. Das wichtigste Enzym für solche Entgiftungsreaktionen ist die Katalase, die  $H_2O_2$  zu Wasser und Sauerstoff umsetzt. Zum Nachweis der Katalase wird die Kultur mit  $H_2O_2$  in Kontakt gebracht. Die Freisetzung von Sauerstoffgas durch die Katalase erfolgt so effektiv, dass sie mit bloßem Auge als Bläschenbildung erkennbar ist. Ein kleiner Tropfen 3%ige  $H_2O_2$ -Lösung auf einen Objekträger. Mit einem sterilen Zahnstocher oder Wattestäbchen, oder Impföse wird eine kleine Menge der zu untersuchenden Kultur in das Tröpfchen suspendiert. Nach einigen Sekunden sieht man bei positiver Reaktion eine Bläschenbildung. (<http://www.vetbact.org/index.php?displayextinfo=30&vbsearchstring=catalase>, eingesehen am: 10.10.2023).

## 2.4. Molekularbiologische Methoden

Jede beobachtbare Eigenschaft eines Mikroorganismus wird durch eine spezifische Nukleotidsequenz in seiner DNA kodiert. Dies gilt auch für gattungs-, art- und typspezifische Merkmale wie die Fähigkeit zur Toxinproduktion oder die Entwicklung von

Pathogenitätseigenschaften. Mithilfe molekularbiologischer Methoden können diese spezifischen DNA-Sequenzen bei Mikroorganismen identifiziert werden. Der Zweck des Einsatzes solcher Methoden kann beispielsweise der spezifische und schnelle Nachweis von pathogenen Bakterien, Viren oder Schimmelpilzen in Lebensmitteln sein. Die erforderliche Anzahl an Kopien der Ziel-DNA für die Analyse kann durch kulturelle Anreicherung der Mikroorganismen oder mittels PCR erreicht werden. Hierbei ist die Freisetzung der DNA durch Lyse der mikrobiellen Zellen erforderlich. Die Multiplex-real-time-PCR basiert auf der gleichzeitigen Durchführung mehrerer PCR-Reaktionen mit verschiedenen Primerpaaren in einem einzigen Ansatz. Nach herkömmlichen Verfahren erfolgt nach der PCR eine elektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte (KRÄMER & PRANGE, 2017, S. 357-S. 361).

#### **2.4.1. DNA Extraktion mit Chelex® 100 Resin**

Für die DNA-Extraktion wurden Isolate von einem nicht-selektiven TSA-Agar verwendet. Mit einer sterilen Öse wurden etwa 1 µl von der Platte in 100 µl 0,01 M Tris HCl (Tris Hydrochlorid Puffer) suspendiert und im Anschluss gevortexed. Danach wurden 400 µl Chelex 100 Resin hinzu pipettiert und noch einmal gevortexed. Beim Pipettieren von der Chelex-Lösung war besonders zu beachten, die Lösung vor jeder Verwendung mit der Pipette gut zu mischen. Im nächsten Schritt wurden die Tubes für 10 Minuten bei 100 °C am Thermoblock erwärmt. Danach wurden die Tubes für 5 Sekunden bei 15000g zentrifugiert. Im letzten Schritt wurden 100 µl vom Überstand in Maximum Recovery Tubes abpipettiert und bei -20 °C bis zur Verwendung gelagert (WALSH et al., 1991).

#### **2.4.2. *Listeria* spp. Multiplex PCR**

Die Differenzierung von Listerien wurde mittels Multiplex PCR (invasions-assoziiertes Protein-*iap* Gen) nach Bubert et al., 1999 durchgeführt.

Zur Identifizierung der verschiedenen *Listeria*-Spezies wurde eine Multiplex-PCR eingesetzt, die *L. grayi*, *L. innocua*, *L. ivanovii*, *L. monocytogenes*, *L. seeligeri* und *L. welshimeri* differenziert. Diese Spezies können mit Hilfe der Spezies spezifischen Längenunterschiede im Invasion-assoziierten Proteins p60 (*iap*-Gen) nachgewiesen werden (BUBERT et al., 1999). Die *iap*-spezifischen Primer sind in Tabelle 3 aufgeführt.

Die Zusammensetzung des Mastermixes ist in Tabelle 4 dargestellt. Die erforderlichen PCR-Bedingungen sind in Tabelle 5 angegeben.

**TABELLE 3: Invasion assoziiertes Protein (*iap* Gen) PCR zur *Listeria* Spezies Differenzierung.**

PRIMER	SEQUENZ	SPEZIES	AMPLIKON
<i>Siwi2</i>	TAACTGAGGTAGCGAGCGAA	<i>L. welshimeri</i> / <i>ivanovii</i> / <i>seeligeri</i>	1200 bp
<i>Ino2</i>	ACTAGCACTCCAGTTGTTAAC	<i>L. innocua</i>	870 bp
<i>MonoA</i>	CAAAC TGCTAACACAGCTACT	<i>L. monocytogenes</i>	660 bp
<i>Mogra 1</i>	CCAGCAGTTCTAACACCTGCT	<i>L. grayi</i>	480 bp
<i>Lis1B</i>	TTATACGCGACCGAAGCCAAC	Reversprimer für alle Spezies	n. a.

Die Größe der PCR-Produkte liegt zwischen einer Basenpaarlänge von 480 bp für *L. grayi* und 1200 bp für *L. welshimeri*/*L. seeligeri*/*L. ivanovii*. Bei *L. innocua* beträgt die Basenpaarlänge 870 bp, während *L. monocytogenes* eine Amplikongröße von 660 bp aufweist. Aufgrund der identischen PCR-Produktgröße von *L. welshimeri*, *L. ivanovii* und *L. seeligeri* können diese mit Hilfe der Gelelektrophorese nicht unterschieden werden. Im Mastermix wurden für jede Probe 23 µl des Mastermixes und 2 µl des DNA-Templates in ein 25 µl Reaktionsgefäß gegeben (Tabelle 4).

**TABELLE 4: Mastermixzusammensetzung für die Multiplex-PCR zur Listerien-Speziesidentifizierung (*iap* Gen).**

MASTERMIX	ENDKONZENTRATION	STOCKKONZENTRATION	PRO REAKTION (µl)
DEPC treated water			8,45
10x buffer	1x		2,5
MgCl <sub>2</sub>	1,5 mM	50 nM	0,75
<i>Siwi1</i>	128 nM	1600 nM	2
<i>Ino2</i>	128 nM	1600 nM	2
<i>MonoA</i>	128 nM	1600 nM	2
<i>Mogra1</i>	128 nM	1600 nM	2
<i>Lis1B</i>	128 nM	1600nM	2
dNTP' s	200 µM	5000 µM	1
Taq pol (Plat.)	1,5 U	5 U/ul	0,3
Mastermix			23
Template			2
Reaktionsvolumen			25

Quelle: BUBERT at al. (1999).

Als Positivkontrollen wurden DNA-Proben von Referenzstämmen verwendet (WALSH et al., 1991), darunter: *L. seeligeri* (ATCC 35967) /*L. ivanovii* (ATCC 19119) /*L. welshimeri* (ATCC 35897), *L. innocua* (ATCC 33090), *L. grayi* (ATCC 19120) und von *L. monocytogenes* (ATCC 35152). Als Negativkontrolle wurde DNA aus der DNA-Extraktion (WALSH et al., 1991) verwendet. Als Negativkontrolle für den PCR-Mastermix („non-template control“, NTC) wurde Diethyldicarbonat-Wasser (DEPC) (Thermo Fisher Scientific Inc.) zugesetzt. Der genaue Ablauf der 30 PCR-Zyklen im Thermocycler VWR Doppio (VWR, Wien, Österreich), die die Denaturierung, Anlagerung und Verlängerung der DNA umfassen, ist in Tab. 5 beschrieben.

**TABELLE 5: PCR-Thermocycler Einstellung für die Multiplex-PCR zur Listerien-Speziesidentifizierung (*iap* Gen).**

PCR ABLAUF	ZEIT	TEMPERATUR
Start Denaturierung	2 Minuten	94 °C
Denaturierung	0,5 Minuten *	94 °C
Anlagerung	0,5 Minuten *	56 °C
Verlängerung	0,5 Minuten *	72 °C
Abschließende Verlängerung	5 Minuten	72 °C
Aufbewahrung		4 °C

Quelle: BUBERT at al. (1999); 30 PCR-Zyklen.

#### 2.4.3. *Salmonella* PCR

Zum Nachweis von *Salmonella* spp. wurde eine PCR mit dem Zielgen *invA*, dass für das Invasionsprotein der Pathogenitätsinsel 1 kodiert, durchgeführt (RAHN et al., 1992 und MALORNEY et al., 2003). Diese Methode zielt auf das. Mit den spezifischen *invA* Primern: Forward 5'-GTG AAA TTA TCG CCA CGT TCG GGC AA-3' und Reverse 5'-TCA TCG CAC CGT CAA AGG AAC C-3' erzielt man eine Amplikonlänge von 284 bp.

*Salmonella enterica* DSM 554 diente als Positivkontrolle. Die Negativkontrolle basierte auf der DNA-Extraktion der Proben (WALSH et al., 1991). Als Negativkontrolle für den PCR-Mastermix wurde DEPC-Wasser (Thermo Fischer Scientific Inc., Massachusetts, USA) beigefügt.

Der Mastermix bestand aus DEPC-Wasser (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA), PCR-Puffer, MgCl<sub>2</sub>, den spezifischen Primern sowie dNTP's und Taq-Polymerase. Die genauen Mengenangaben des Mastermixes sind in Tab.6 detailliert beschrieben. Für jede Reaktion wurden 20 µl Mastermix und 5 µl Template in die Reaktionswanne hinzugefügt.

**TABELLE 6: Mastermixzusammensetzung für die *Salmonella invA* PCR**

MASTERMIX	ENDKONZENTRATION	STOCKKONZENTARTION	PRO REAKTION ( $\mu$ l)
DEPC treated water			11,6
10x PCR buffer	1x		2,5
MgCl <sub>2</sub>	1.5 mM	50 mM	0,75
S139	400 nM	5000 nM	2
S141	400 nM	5000 nM	2
dNTP's	200 $\mu$ M	5000 nM	1
Taq pol (Plat.)	0,75 U	5 U/ $\mu$ l	0,15
Gesamt			20
Template			5
Reaktionsvolumen			25

Quelle: RAHN et al. (1992).

Der genaue Ablauf der 30 PCR-Zyklen mit Denaturierung, Anlagerung und Verlängerung der DNA im Thermocycler VWR Doppio (VWR, Wien, Österreich) ist in Tab. 7 dargestellt. Die PCR-Produkte wurden abschließend verlängert und bei 4 °C gelagert.

**TABELLE 7: PCR-Thermocycler Einstellung für die *Salmonella invA* PCR**

PCR ABLAUF	ZEIT	TEMPERATUR
Start Denaturierung	1 Minute	95 °C
Denaturierung	1 Minute *	95 °C
Anlagerung	0.5 Minute *	64 °C
Verlängerung	0.5 Minute *	72 °C
Abschließende Verlängerung	7 Minuten	72 °C
Aufbewahrung		4 °C

Quelle: RAHN et al. (1992) und MALORNEY et al. (2003); 30 Zyklen.

#### 2.4.4. Gelelektrophorese

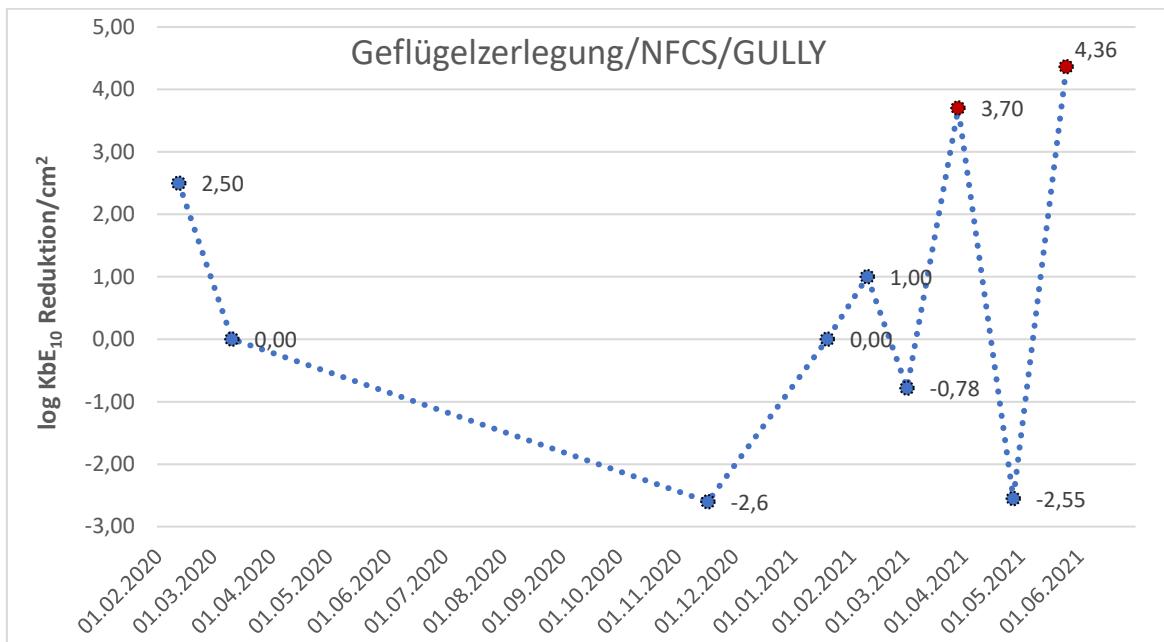
Die PCR-Produkte wurden durch Gelelektrophorese nach Größe aufgetrennt. Ein 1,5 %iges Agarosegel wurde durch Schmelzen von 100 ml 10x Tris-Azetat-Ethyldiamintetraessigsäure (EDTA)-Puffer (TAE) (Carl Roth GmbH) mit 1,5 g Agarose (PeqLab,) für 3 Minuten in der Mikrowelle hergestellt. Anschließend wurden 3,5  $\mu$ l PeqGREEN zu der flüssigen Agarose zugefügt. Die flüssige Agarose wurde in eine Gelkammer mit zwei Gelkämmen mit je 20 Vertiefungen gegeben. Nach 30 Minuten wurde das Gel in die Elektrophoresekammer (Bio-Rad Laboratories Inc.) überführt, die zuvor mit 10 x TAE-Puffer gefüllt worden war. Die Gelelektrophorese wurde bei einer Spannung von 120 V für 30 Minuten durchgeführt. In die

erste und letzte Tasche des Gels wurden jeweils 5 µl einer 100 bp-Leiter (Gene Ruler, Thermo Fisher Scientific Inc.) gegeben. Alle anderen Taschen enhielten 10 µl der PCR-Proben, die zuvor mit 1-2 µl Probenladepuffer (Thermo Fisher Scientific Inc.) versetzt worden waren. Nach der Elektrophorese wurde das Gel in eine GelDoc 2000-Photostation (Bio-Rad Laboratories Inc.) überführt, um die PCR-Produkte unter UV-Licht sichtbar zu machen. Die Dokumentation erfolgte im TIFF-Format.

### 3. Ergebnisse

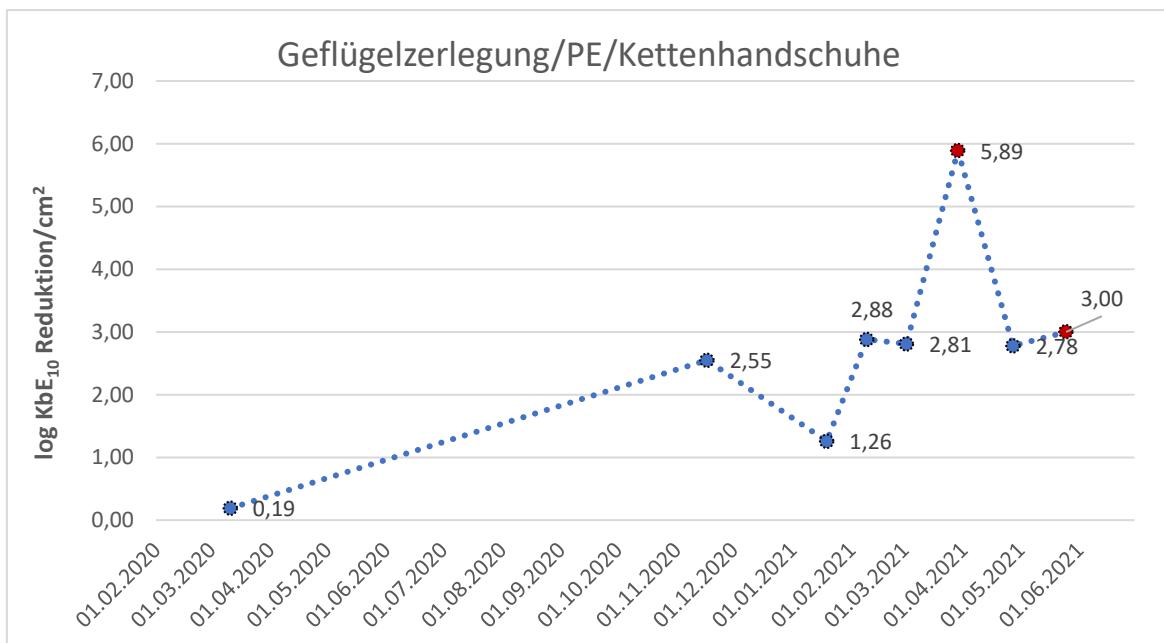
#### 3.1. Ergebnisse Wischproben vor und nach Reinigung

Die Auswertung zeigt die Daten von 118 Einzeluntersuchungen, vor und nach Reinigung (je 59 Proben) mit Produkten der Firma Ecolab und Schülke (<https://de-at.ecolab.com/>; <https://www.schuelke.com/de-de/>). Das Reinigungsprogramm umfasste die Anwendung eines Biozids (Zitronensäure, Isopropanol, Tridecyl Alkohol, quaternäre Ammoniumverbindung, Schülke) und alternierend einen alkalischen Schaumreiniger auf Basis von Natriumhypochlorid (Ecolab) und eine abschließende Desinfektion (quaternäre Ammoniumverbindung; Benzalkoniumchlorid, Ecolab). Die Reduktion der gemessenen GKZ wird in den Abb. 2-7 als log Reduktion/cm<sup>2</sup> dargestellt. Ziel war es mit der Reinigung und Desinfektion zumindest eine 3 log Reduktion zu erzielen. Nach Desinfektion wäre eigentlich eine 5 log erforderlich, was in Fleisch verarbeitenden Betrieben kaum zu erzielen ist. Die beprobten Oberflächen weisen an einigen Stellen eine Reduktion (log Werte) an anderen einen Anstieg der GKZ (l-og Werte) pro cm<sup>2</sup> auf. Die folgenden Tabellen dienen zum Vergleich der logarithmischen Reduktion der Keimzahl pro Fläche, von Lebensmittel-Kontaktflächen auch „food contact surfaces“ (FCS), Lebensmittel-Nicht Kontaktflächen „non-food contact surfaces“ (NFCS) und Personal (PE). Zusätzlich wurden die Reinigungsergebnisse aus dem Bereich der Geflügelzerlegung und der Rinder- und Schweinzerlegung dargestellt. Positive Werte weisen auf eine Reduktion der Gesamtkeimzahl nach der Reinigung hin. Im Gegensatz dazu, stellen negative Werte einen Anstieg der Gesamtkeimzahl auf der beprobten Oberfläche dar. Die gesammelten Daten wurden von Dr. med. vet. Beatrix Stessl bereitgestellt.



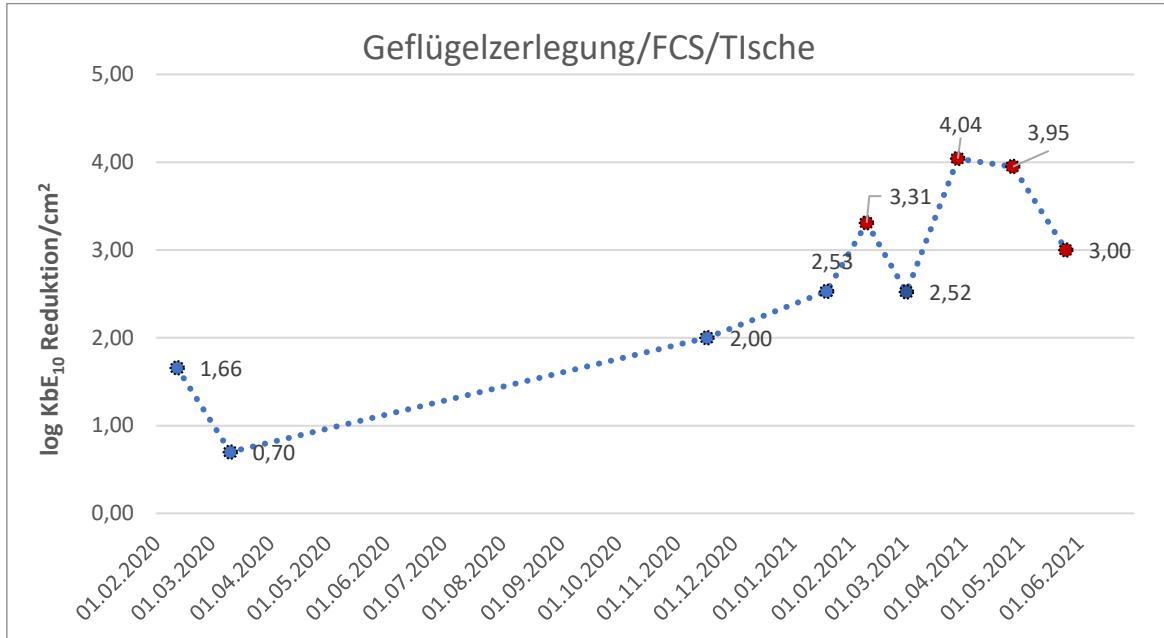
**ABBILDUNG 2:  $\log_{10}$  Reduktion/cm<sup>2</sup> Geflügelzerlegung /NFCS/Gully**

Die Abb.2 zeigt die Reduktion der Gesamtkeimzahl ( $\log_{10}$  KbE) nach Reinigung im Gully im Bereich der Geflügelzerlegung. Der  $\log_{10}$  KbE wird als Maß für die Anzahl von Keimen pro cm<sup>2</sup> Fläche verwendet. Zwei von neun Messungen weisen eine  $\geq 3 \log_{10}$  KbE Reduktion an der Probenahmestelle Gully auf (22,2%).



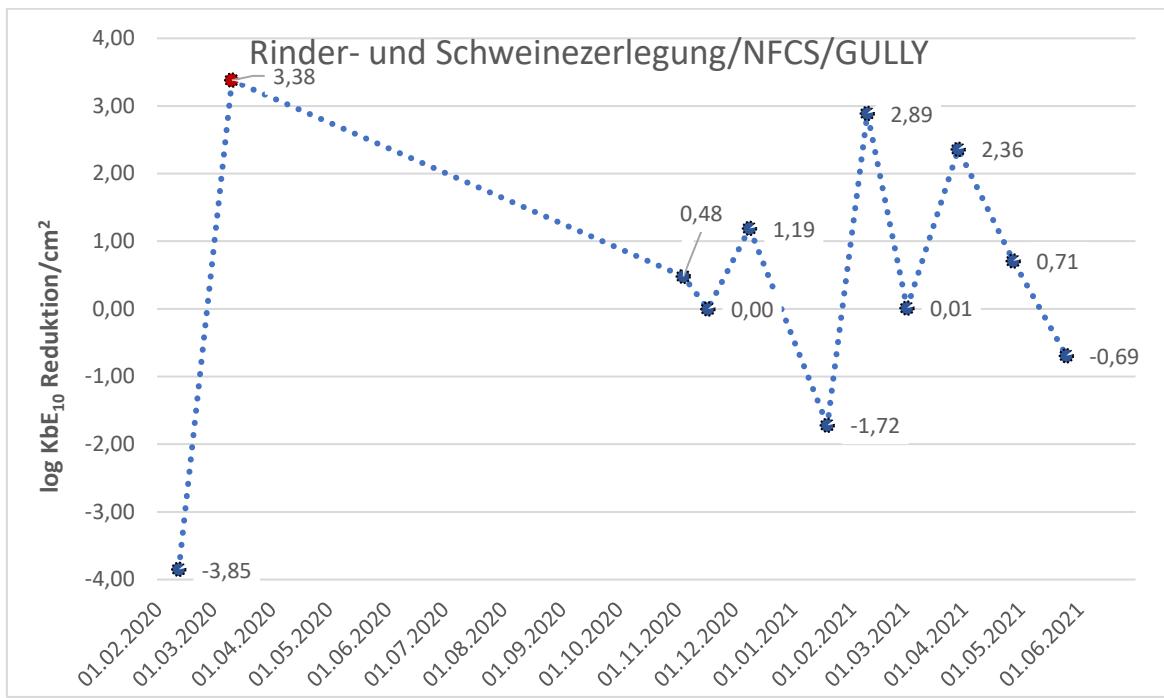
**ABBILDUNG 3:  $\log_{10}$  Reduktion/cm<sup>2</sup> Geflügelzerlegung/PE/Kettenhandschuhe**

Die Abb.3 zeigt die Reduktion des logarithmischen Keimgehalts ( $\log_{10}$  KbE) nach der Reinigung auf Kettenhandschuhen im Bereich der Geflügelzerlegung. Zwei von neun Messungen weisen eine  $\geq 3 \log_{10}$  KbE Reduktion nach Reinigung der Kettenhandschuhe auf (22,2%).



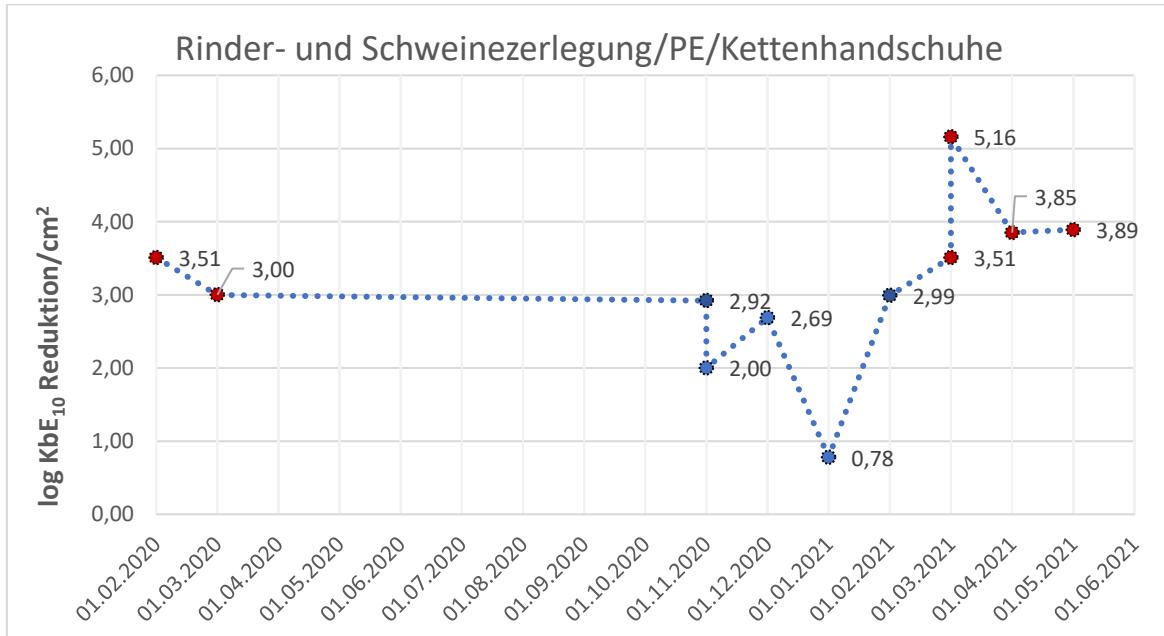
**ABBILDUNG 4:  $\log_{10}$  Reduktion/cm<sup>2</sup> Geflügelzerlegung/FCS/Tische**

Die Abb.4 zeigt die Reduktion des logarithmischen Keimgehalts ( $\log_{10}$  KbE) auf der Oberfläche der Tische nach Reinigung bei der Geflügelzerlegung. Vier von neun Messungen weisen eine  $\geq 3 \log_{10}$  KbE Reduktion an der Probenahmestelle Tische auf (44,4%).



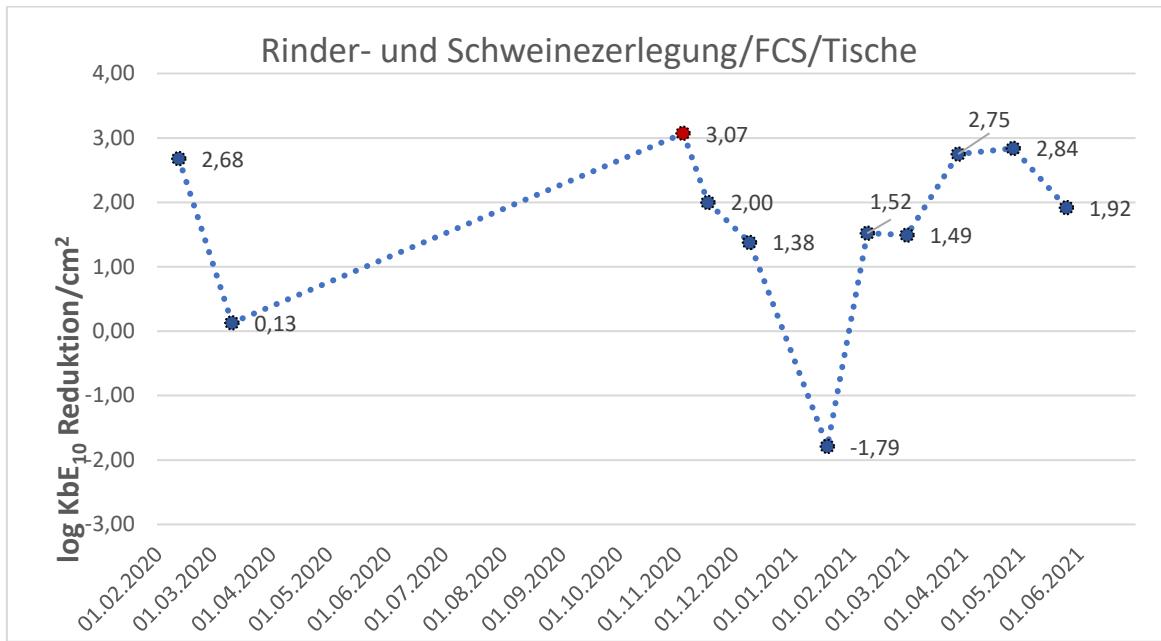
**ABBILDUNG 5: Log<sub>10</sub> Reduktion/cm<sup>2</sup> Rinder- und Schweinezerlegung/NFCS/Gully**

Die Abb.5 zeigt die Reduktion des logarithmischen Keimgehalts ( $\log_{10}$  KbE) an der Probenahmestelle Gully nach Reinigung im Bereich dar Rind- und Schweinzerlegung. Die Grafik zeigt die  $\geq 3 \log_{10}$  KbE Reduktion pro cm<sup>2</sup> bei einer von 11 Proben (9,1%).



**ABBILDUNG 6: Log<sub>10</sub> Reduktion/cm<sup>2</sup> Rinder- und Schweinezerlegung /PE/Kettenhandschuhe**

Die Abb.6 zeigt die Reduktion des logarithmischen Keimgehalts ( $\log_{10}$  KbE) auf der Oberfläche der Kettenhandschuhe nach Reinigung im Bereich der Rind- und Schweinzerlegung. Die Grafik zeigt einen positiven Reinigungserfolg ( $\geq 3 \log_{10}$  KbE Reduktion pro  $\text{cm}^2$ ) bei sechs von 11 Proben (54,5%).



**ABBILDUNG 7:  $\log_{10}$  Reduktion/ $\text{cm}^2$  Rinder- und Schweinezerlegung/FCS/Tische**

Die Abb.7 zeigt die Reduktion des logarithmischen Keimgehalts ( $\log_{10}$  KbE) auf der Tisch Oberfläche nach Reinigung im Bereich der Rinder- und Schweinzerlegung. Die Grafik zeigt einen positiven Reinigungseffekt bei einer von 11 Proben (9.1%).

Die zusammenfassenden Ergebnisse zur Reinigung und Desinfektion sind in Tabelle 8 ersichtlich. Bei 59 Ergebnissen aus der log Reduktion vor und nach Reinigung wiesen nur 16 (27,1%) Beprobungen einen Reinigungserfolg ( $\geq 3 \log_{10}$  KbE Reduktion pro  $\text{cm}^2$ ) auf.

**TABELLE 8: Zusammenfassung der Reinigungsergebnisse**

PROBEN	KATEGORIE	STELLE	$\geq 3$ KBE $\log_{10}$ REDUKTION	GEFLÜGEL ZERLEGUNG	RIND / SSCHWEIN ZERLEGUNG
20	NFCS	Gully	3 (5,1%)	2	1
19	PE	Kettenhandschuhe	8 (13,6%)	2	6
20	FCS	Tisch	5 (8,5%)	4	1
Total					
59			16 (27,1%)	8	8

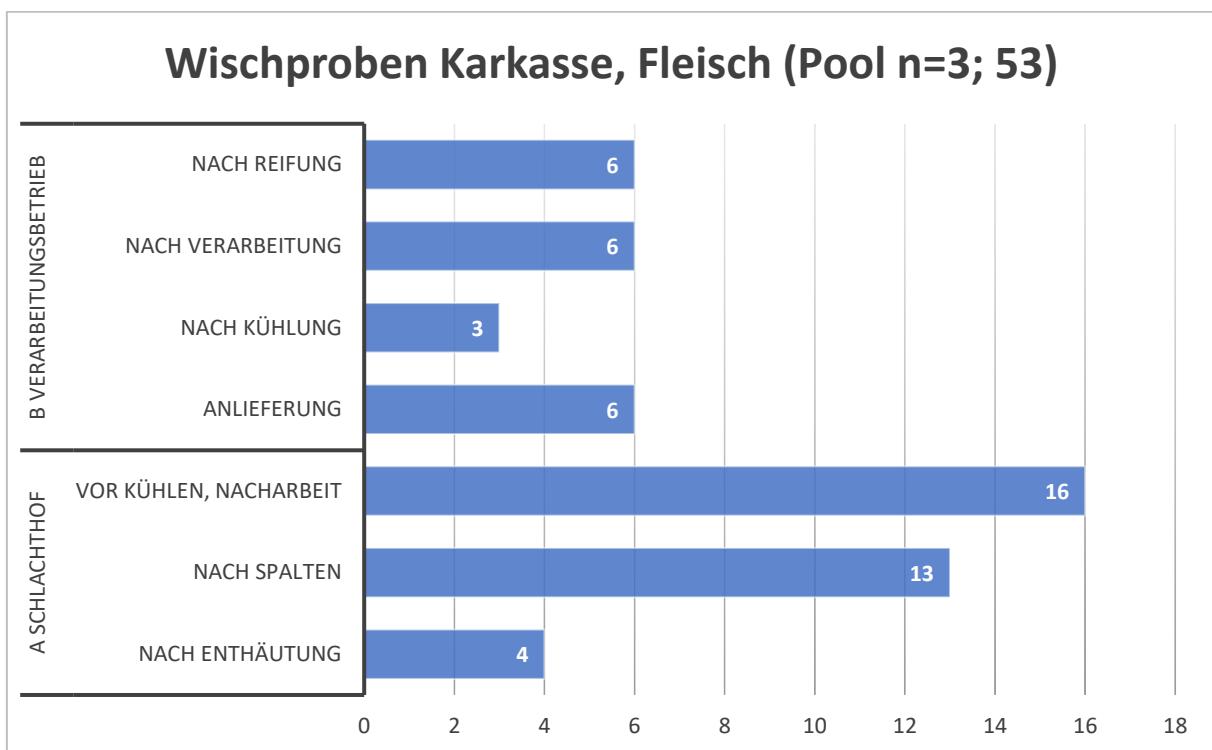
- Eine Nische für Kreuzkontaminationen in der Zerlegung sind schlecht gereinigte Gullys (hier 85%; n=17/20) als NFCS.
- Da Kettenhandschuhe zur persönlichen Ausstattung der in den fleischverarbeitenden Betrieben angestellten Mitarbeiter:innen gehören, stellen diese ein besonderes Risiko für vektorbasierte Kreuzkontaminationen dar (hier 57,9% nicht gut gereinigt; n=11/19).
- Schlecht gereinigte Tischoberflächen (hier 75,0%; n=15/20) mit direkter Kontaktfläche zu Lebensmitteln (FCS) stellen ein Risiko für mikrobielle Kontamination dar.
- Die Wirksamkeit der Reinigungs- und Desinfektionsmittel ist zu überprüfen, dabei ist der Verschmutzungsgrad der Oberfläche, die Raumtemperatur, die Konzentration und Einwirkzeit der eingesetzten Produkte und der Härtegrad des Wassers zu berücksichtigen (Sinnerscher Kreis).

### **3.2. Ergebnisse longitudinale Beprobung Schlachtung und Zerlegung**

Insgesamt wurden 53 Proben aus dem Bereich Schlachtung und Fleischverarbeitung in zwei Betrieben (A und B) auf die mikrobiologischen Kriterien Prozesshygiene (GKZ und Enterobakterien) und Sicherheit (*L. monocytogenes* und Salmonellen) longitudinal untersucht (EG VO 2073/2005). Die longitudinale Untersuchung umfasste die Schlachtkörper von vier Rinder Lieferanten, wobei drei Wischproben pro Karkasse/Frischfleisch gepoolt wurden (nicht destruktive Methode).

33 gepoolte Wischproben stammen von Rinderkarkassen des Schlachtbetriebs A. Nach der Grobzerlegung und Fleischreifung wurden die Teilstücke an Betrieb B (Verarbeitungsbetrieb) geliefert. Betrieb B führte die Feinzerlegung durch und nahm 8 gepoolte Wischproben von angelieferten Rinder Schlachtkörpern und 12 von Fleischproben (Beiried, Tafelspitz, Weißscherzl) während der Reifung (n=20 gesamt) (Abbildung 8).

Die Bestimmung der aeroben mesophilen Gesamtkeimzahl (GKZ) ergab, dass von den insgesamt 53 Proben 15 eine GKZ von über  $5,0 \log_{10}/\text{cm}^2$  (M) aufwiesen (28,3%) (Kapitel 1.5). Besonders auffällig war, dass von den 15 Proben, die den Grenzwert von  $5,0 \log_{10}/\text{cm}^2$  überschritten, alle aus Betrieb B stammten. Hier wiesen 100 % der Proben bereits bei der Karkassen Anlieferung (n=8/8), nach der Kühlung (100%, n=2/2), 2 von 6 Proben (33,3%) nach der Verarbeitung und 5 von 6 Proben (83,3%) nach der Reifung eine erhöhte Keimbelaastung auf.



**ABILDUNG 8: Wischproben zur longitudinalen Untersuchung der Karkassen und Fleischproben**

Die Belastung mit *Enterobacteriaceae* lag bei 11 von 53 Proben über  $2,5 \log_{10}/\text{cm}^2$  (M) (20,8 %). Betroffen waren Wischproben aus beiden Betrieben aus den Bereichen nach dem Spalten (n=1/13; 7,7%), vor dem Kühlen (n=2/16; 12,5%; Betrieb A), bei der Anlieferung (n=2/6; 33,3%) und nach der Verarbeitung (n=4/6; 66,7%).

Salmonellen waren in keiner der 53 Proben gemäß ISO 6579 Anreicherungsverfahren nachweisbar (25 g Probenvolumen).

Der qualitative Nachweis von Listerien wie im Kap. 2.4.2. und Kap. 2.1.4. beschrieben, zeigte das Vorhandensein von *L. monocytogenes* in fünf von 53 Proben (9,4%). Jeweils eine Karkassen Probe nach Spalten und vor dem Kühlen waren in Schlachthof A *L. monocytogenes* positiv. Im Verarbeitungsbetrieb B wurden drei Proben bei Anlieferung *L. monocytogenes* positiv getestet. Auch andere apathogene Listerien (*L. innocua*, *L. welshimeri*, *L. seeligeri*) konnten sowohl in Schlachtbetrieb A also auch Verarbeitungsbetrieb B nachgewiesen werden, welche als Hygiene-Indikatoren dienen (n=5/53; 9,4%). Teilweise wurden in einer Probe *L. monocytogenes* und apathogenen Listerien zugleich nachgewiesen (n=2/53; 3,8%) Insgesamt wurden in acht Proben Listerien nachgewiesen (n=8/53; 15,4%) (Tabelle 9).

**TABELLE 9: *Listeria* und *L. monocytogenes* Nachweis gemäß ISO 11290-1 in Karkassen und Frischfleisch (longitudinal)-**

Betrieb	Wischprobe	Station	Details	HF ISO11290-1	VF ISO11290-1	Anzahl (n)
<b>A</b>	Karkasse	1	nach Enthäutung	NEG	NEG	4/4
		2	nach Spalten	NEG	NEG	12/13
		2	nach Spalten	MONO	MONO	1/13
		3	vor Kühlen, Nacharbeit	NEG	NEG	13/16
		3	vor Kühlen, Nacharbeit	WE/SE	NEG	1/16
		3	vor Kühlen, Nacharbeit	MONO	MONO	1/16
		3	vor Kühlen, Nacharbeit	IN	IN	1/16
<b>B</b>	Karkasse	7	Anlieferung	WE/SE	MONO	1/6
		7	Anlieferung	MONO	WE/SE	1/6
		7	Anlieferung	NEG	NEG	2/6
		7	Anlieferung	MONO	NEG	1/6
		7	Anlieferung	WE/SE	NEG	1/6
		8	nach Kühlung	NEG	NEG	2/2
		9	nach Verarbeitung	NEG	NEG	6/6
	Fleisch	10	nach Reifung	NEG	NEG	6/6

Legende: HF, Halbfraser; VF, Vollfraser; MONO, *L. monocytogenes*; WE/SE, *L. welshimeri* oder *L. seeligeri*; ; IN, *L. innocua*. *L. ivanovii* wurde durch die Bewertung der Koloniemorphologie mittels Rapid I mono Agar ausgeschlossen.

Im Rahmen der Karkassen/Frischfleisch Beprobung wurden auch Umfeldproben von Oberflächen gezogen (n=3 Pool; n=19 gesamt). Im Betrieb A war bei 5/11 *Listeria* spp. und *L. monocytogenes* (45,5%) nachweisbar. *L. monocytogenes* wurde auf den Kettenhandschuhen und auf Überschuhen, die eine Bodenkontamination vorhersagen, im Schlachtbetrieb A nachgewiesen. Außerdem waren Schürze und das Zerlegeband am Anfang und Ende *Listeria* positiv. Im Zerlegebetrieb B wurde nur auf einer Probe *L. innocua* nachgewiesen (n=1/8; 12,5%).

**TABELLE 10: *Listeria* und *L. monocytogenes* Nachweis gemäß ISO 11290-1 auf Oberflächen in Betrieb A und B (longitudinal)-**

Betrieb	Wischprobe	Station	Details	HF ISO11290-1	VF ISO11290-1
<b>A</b>	OF	assoc.1-3	Messer	NEG	NEG
			Schürze	WE/SE	WE/SE
			Spaltsäge	NEG	NEG
			Messer	NEG	NEG
			Schürze	NEG	NEG
			Kettenhandschuhe	MONO	MONO
			Hygieneschleuse	NEG	NEG
			Zerlegeband Anfang	NEG	WE/SE
			Zerlegeband Ende	NEG	WE/SE
			E2-Kiste	NEG	NEG
<b>B</b>	OF	asscoc.7, 8	Handschihe Schieber Kühlraum	NEG	NEG
			Messer	NEG	NEG
			Schürze	IN	IN
			Kettenhandschuhe	NEG	NEG
			Hygieneschleuse	NEG	NEG
			Zerlegung-Tische	NEG	NEG
			E2-Kiste	NEG	NEG
			Überschuhe	NEG	NEG

Legende: OF, Oberfläche; HF, Halbfraser; VF, Vollfraser; MONO, *L. monocytogenes*; WE/SE, *L. welshimeri* oder *L. seeligeri*; IN, *L. innocua*.

*L. ivanovii* wurde durch die Bewertung der Koloniemorphologie mittels Rapid I mono Agar ausgeschlossen.

## 4. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde die mikrobiologische Kontamination während verschiedener Prozessstufen in einem Schlachthof (A) und einem Zerlegebetrieb (B) an Karkassen und Frischfleisch vom Rind longitudinal untersucht und die Ergebnisse im Hinblick auf Grenzwertüberschreitungen (EG 2073/2005) bewertet. Die Gesamtkeimzahl, ein wichtiger Indikator für die Prozesshygiene wurde an den einzelnen Verarbeitungsstufen bestimmt und entsprach größtenteils, jedoch nicht vollständig, den festgelegten Grenzwerten. Da bei 28,03 % der untersuchten Wischproben von den Rinderkarkassen eine Überschreitung der gesetzlich festgelegten Grenzwerte ( $>5 \log_{10} \text{KbE/cm}^2$ ) festgestellt wurde, ist eine genauere Überwachung der Produkte, aber auch der Produktionsanlage erforderlich. Besonders auffällig war die Überschreitung der Gesamtkeimzahl von  $5,0 \log_{10}/\text{cm}^2$  bei sechs Proben aus Betrieb B, die bei der Anlieferung beprobzt wurden. Diese Ergebnisse könnten auf eine nicht korrekt eingehaltene Kühlkette hindeuten, verursacht durch eine zu enge Lagerung der Schlachtkörper im Kühlraum des Schlachthofes oder während des Transportes (SULIEMAN et al., 2023).

Ein kritischer Punkt bei der Rinderschlachtung ist sicherlich die Enthäutungsstation, da es hier durch Verschmutzungen der Haut zu einer mikrobiellen Kreuzkontamination des Schlachtkörpers kommen kann. Daher ist die visuelle Inspektion der lebenden Tiere und die Feststellung des Verschmutzungsgrades sicherlich hilfreich, um die mikrobielle Keimbelaistung zu minimieren (SERRAINO et al., 2012;). Eine gute hygienische Abtrennung des Schlacht-, Entblutens- und Zerlege-Bereichs ist unabdingbar, da es keine wirksamen Hilfsmaßnahmen gibt, die wesentlich zur Verbesserung der Schlachthygiene beitragen (WAMBUI et al., 2018). Einige Methoden wurden getestet, wie z. B. die Vakuum-Dampfabsaugung oder die Behandlung des Schlachtkörpers mit Milchsäure, zeigten jedoch keine signifikante Verbesserung (DIXON et al., 2019).

Es muss betont werden, dass die Einhaltung der Grenzwerte für die Gesamtkeimzahl allein nicht ausreicht, um das Risiko einer pathogenen Kontamination vollständig zu kontrollieren. Daher ist das von VARGAS et al. (2022) veröffentlichte „Biomapping-Konzept“ zur Darstellung von mikrobiellen Indikatorkeimen in einem statistischen Verfahren sicherlich hilfreich.

Eine Überschreitung der festgelegten Grenzwerte für *Enterobacteriaceae* ( $>2.5 \log_{10} \text{KbE/cm}^2$ ) wurde in 20,8 % der Proben nachgewiesen, was auf ein potenzielles Risiko für die Produktqualität und nicht zuletzt Lebensmittelsicherheit hindeuten könnte.

Das Ende der Haltbarkeit von Rindfleisch wird durch *Enterobacteriaceae* bestimmt, was auf die potenzielle Bedeutung von nicht dominanten Mikroorganismen neben Milchsäurebakterien für den Produktverderb hinweist (RODRIGUEZ-CATURLA et al., 2023).

Interessant ist sicherlich, neben den konventionellen Methoden auch alternative sequenzbasierte „next generation sequencing“-Methoden im Bereich der Schlachtung und Verarbeitung zur Erstellung einer „mikrobiellen Transmissionskarte“ einzusetzen. Hier ist der Vorteil der Methode, dass nicht einfach kultivierbare Mikroorganismen nachgewiesen werden können. Der Nachteil ist, dass sie in der Probe in hoher Abundanz vorhanden sein müssen, da sie sonst nicht nachgewiesen werden können. Die Methode ist sicherlich aus Sicht der bioinformatischen Analyse anspruchsvoll und derzeit keine schnelle Methode, wenn man auf die Qualität der Sequenzreads Wert legt (ESTEVES et al., 2021; ZWIRZITZ et al., 2020).

Obwohl keine der auf Salmonellen untersuchten Proben positiv war, kann dieser Erreger als Gefahr nicht ausgeschlossen werden. Eine größere Anzahl von Proben könnte hier weitere Erkenntnisse bringen.

Salmonellose ist die zweithäufigste gemeldete lebensmittelbedingte Magen-Darm-Infektion beim Menschen in der Europäischen Union. Der Gesamtprozentsatz *Salmonella*-positiver Rinderschlachtkörper, die im Schlachthof vor der Kühlung durch die Behörde beprobzt wurden, betrug im europäischen Vergleich 0,69 % gegenüber 0,26 % bei den Eigenkontrollen der Betriebe (EFSA und ECDC, 2022).

Demgegenüber steht der positive Nachweis von *L. monocytogenes* in 9,4 % der Karkassen Proben. Ein wichtiger Faktor für die Zunahme von Listerien in Wischproben außerhalb der GHP in der Fleischverarbeitung ist die Umgebung, in unserem Fall die Zerlege Hygiene im Schlachthof, die nach dem Spalten und vor dem Kühlen abnimmt. Es kam zu einer Anhäufung von Listerien bei der Anlieferung der Schlachtkörper im Verarbeitungsbetrieb, wodurch die Produktsicherheit gefährdet wurde. Ähnliche Ergebnisse wurden von LONCARIC et al. (2009) beobachtet. Interessant ist sicherlich auch die Betrachtung der Listerien Prävalenz im Zusammenhang mit der Koexistenz anderer Mikroben (ZWIRZITZ et al., 2021). Als wesentliche Vektoren für Listerien im Zerlege Bereich haben sich Kettenhandschuhe, Schürzen und das Zerlegeband herauskristallisiert, zudem ist auf eine Kontamination des Bodens zu achten (MUHTEREM-UYAR et al., 2015).

Die Auswertung der Reinigungsergebnisse weist auf mögliche Probleme im Reinigungsprozess hin. Bezuglich der Reduktion der Gesamtkeimzahl nach der Reinigung wurde in den meisten Fällen keine ausreichende  $3 \log_{10}$  KbE/cm<sup>2</sup>-Reduktion festgestellt, was auf einen Anstieg der Gesamtkeimzahl auf den beprobten Oberflächen hindeutet. Für diese Ergebnisse gibt es mehrere mögliche Ursachen:

- Die Reinigungsmethode war nicht effektiv genug, um die Keime von den Oberflächen zu entfernen.
- Die Oberflächen waren bereits vor der Reinigung stark kontaminiert.
- Die Keime auf den Oberflächen waren gegen das verwendete Desinfektionsmittel resistent.
- Die Einwirkzeiten der Reinigungsmittel wurden nicht eingehalten.
- Möglicherweise wurden andere Reinigungsmittel verwendet.

Insgesamt zeigt diese Untersuchung, dass trotz einer überwiegend akzeptablen hygienischen Qualität von Fleischoberflächen während der Fleischproduktion spezifische Maßnahmen erforderlich sind, um potenzielle Risiken wie Listerien, Salmonellen und STEC zu minimieren.

Um die Ursache unerwünschter Ergebnisse zu ermitteln, sollten die Reinigungsmethoden und die Oberflächen vor der Reinigung untersucht werden. Außerdem sollte die Wirksamkeit des Desinfektionsmittels gegen die Keime auf den Oberflächen getestet werden.

Zukünftige Forschung könnte sich darauf konzentrieren, detaillierte Analysen durchzuführen, um die Ursachen der Kontamination zu identifizieren und effektivere Präventionsstrategien zu entwickeln.

Die gesammelten Ergebnisse zeigen, dass die Reinigung von Oberflächen in der Fleischproduktion nicht immer zu einer Verringerung der mikrobiellen Kontamination führt. Wenn die Reduktion des  $\log_{10}$  KbE/cm<sup>2</sup> unter 3 liegt, ist dies ein unerwünschtes Ergebnis, das untersucht werden sollte.

## 5. Summary

Beef is a high-quality foodstuff whose demand will continue to rise as the world's population grows (9 billion people in 2050). Beef production is resource-intensive, which is why it is important to think about sustainability as well as increasing production. Product losses can only be avoided at producer level through good production and hygiene practices in food production.

In this study, product and surface hygiene along a beef production chain was analyzed. The critical points in the slaughter process are skinning, splitting, rough cutting and subsequently storage in the cold room and cooling during transportation. It is hypothesized that surface hygiene in the cutting area makes a decisive contribution to subsequent meat quality. The initially high microbial diversity should be reduced to the microbes adapted to the respective type of packaging while maintaining high quality standards. For this purpose, wipe samples were taken from surfaces (product and production environment) and examined microbiologically for indicators of process hygiene (aerobic mesophilic count - AMC, *Enterobacteriaceae*) and safety criteria (*Listeria monocytogenes*, *Salmonella*). The production environment is compared in terms of product-contacting surfaces, vectors, personnel, and process environment during the production process and after cleaning. The aim was to achieve a reduction of at least 3 log colony forming units (CFU) on surfaces after cleaning in order to ensure good subsequent product hygiene. The tests were carried out using culture-based, ISO-standardized methods and the pathogenic organisms were characterized using target-specific PCR methods. The results of the carcass and fresh meat examinations showed an increase in the AMC ( $<5 \log_{10} \text{CFU/cm}^2$ ) in the processing plant upon delivery, which clearly indicates insufficient cooling during transportation. Deviations of *Enterobacteriaceae* were already present in the slaughter area before chilling and could also be observed in the processing plant along (20.8%) of the samples. *Salmonella* was not detectable, whereas *L. monocytogenes* was detectable in 9.4% of the carcass samples. Here too, an increase was observed during further processing at the slaughterhouse. Surface samples tested for *Listeria* spp. showed niches in the process environment such as chain gloves, aprons, cutting belt and floor contamination. The assessment of surface hygiene before and after cleaning showed a reduction in the AMC of  $\geq 3 \log_{10}$  CFU per  $\text{cm}^2$  at only 27.1% of sampling points.

The awareness of quality managers should be raised through more intensive sampling. Only an increase in the number of samples, the use of wipe samples instead of swab samples and an exact confirmation of potentially pathogenic microorganisms will lead to sufficient food

safety. The idea of extending meat maturation can only be pursued if food producers focus on production hygiene.

## 6. Zusammenfassung

Rindfleisch ist ein hochwertiges Nahrungsmittel, dessen Nachfrage mit dem Wachstum der Weltbevölkerung (9 Milliarden Menschen im Jahr 2050) weiter steigen wird. Die Rindfleischerzeugung ist ressourcenintensiv, daher ist es ein wesentliches Ziel, neben der Produktionssteigerung auch an die Nachhaltigkeit zu denken. Produktverluste können auf Erzeugerebene nur durch eine gute Produktions- und Hygienepraxis bei der Lebensmittelherstellung vermieden werden.

In dieser Studie wurde die Produkt- und Oberflächenhygiene entlang einer Rindfleischproduktionskette analysiert. Die kritischen Punkte im Schlachtprozess sind das Enthäuten, das Spalten, die Grobzerlegung und in weiterer Folge die Lagerung im Kühlraum und die Kühlung während des Transports. Es wird die Hypothese aufgestellt, dass die Oberflächenhygiene im Zerlege Bereich einen entscheidenden Beitrag zur späteren Fleischqualität leistet. Die anfänglich hohe mikrobielle Diversität sollte unter Einhaltung hoher Qualitätsstandards auf die an die jeweilige Verpackungsart angepassten Mikroben reduziert werden. Dazu wurden Wischproben von Oberflächen (Produkt und Produktionsumgebung) genommen und mikrobiologisch auf Indikatoren der Prozesshygiene (aerobe mesophile Gesamtkeimzahl - GKZ, *Enterobacteriaceae*) und Sicherheitskriterien (*Listeria monocytogenes*, Salmonellen) untersucht. Die Produktionsumgebung wird in Bezug auf produktberührende Oberflächen, Vektoren, Personal und Prozessumgebung während des Herstellungsprozesses und nach der Reinigung verglichen. Das Ziel war eine Reduktion von mindestens 3 log koloniebildenden Einheiten (KBE) auf Oberflächen nach der Reinigung, um eine gute Produkthygiene in der Folge zu gewährleisten. Die Untersuchungen wurden mit kulturbasierten, ISO-standardisierten Methoden durchgeführt und die pathogenen Organismen wurden mit zielspezifischen PCR-Methoden charakterisiert. Die Ergebnisse der Schlachtkörper- und Frischfleischuntersuchungen zeigten einen Anstieg der GKZ (<5 log KbE/cm<sup>2</sup>) im Verarbeitungsbetrieb bei Anlieferung, was eindeutig auf eine unzureichende Kühlung während des Transportes hinweist. Abweichungen der *Enterobacteriaceae* waren bereits im Schlachtbereich vor der Kühlung vorhanden und konnten auch im Verarbeitungsbetrieb längs (20,8%) der Proben beobachtet werden. Salmonellen waren nicht nachweisbar, wohingegen *L. monocytogenes* in 9,4% der Schlachtkörperproben nachweisbar war. Auch hier wurde eine Zunahme bei der Weiterverarbeitung im Schlachtbetrieb

beobachtet. Oberflächenproben, die auf *Listeria* spp. untersucht wurden, zeigten Nischen in der Prozessumgebung wie Kettenhandschuhe, Schürzen, Zerlegeband und Bodenkontamination. Die Bewertung der Oberflächenhygiene vor und nach der Reinigung zeigte eine Reduktion der Gesamtkeimzahl um  $\geq 3 \log_{10}$  KbE pro cm<sup>2</sup> bei nur 27,1% der Entnahmestellen.

Das Bewusstsein der Qualitätsmanager:innen sollte durch eine intensivere Probenahme geschärft werden. Nur eine Erhöhung der Probenanzahl, die Verwendung von Wischproben anstelle von Abklatschproben und eine exakte Bestätigung potenziell pathogener Mikroorganismen führen zu einer ausreichenden Lebensmittelsicherheit. Die Idee einer Verlängerung der Fleischreifung kann nur verfolgt werden, wenn die Produktionshygiene im Fokus der Lebensmittelhersteller steht.

## 7. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Erstellung der Verdünnungsreihe .....	17
Abbildung 2: $\log_{10}$ Reduktion/cm <sup>2</sup> Geflügelzerlegung /NFCS/Gully.....	27
Abbildung 3: $\log_{10}$ Reduktion/cm <sup>2</sup> Geflügelzerlegung/PE/Kettenhandschuhe .....	27
Abbildung 4: $\log_{10}$ Reduktion/cm <sup>2</sup> Geflügelzerlegung/FCS/Tische .....	28
Abbildung 5: Log <sub>10</sub> Reduktion/cm <sup>2</sup> Rinder- und Schweinezerlegung/NFCS/Gully .....	29
Abbildung 6: Log <sub>10</sub> Reduktion/cm <sup>2</sup> Rinder- und Schweinezerlegung /PE/Kettenhandschuhe	29
Abbildung 7: Log <sub>10</sub> Reduktion/cm <sup>2</sup> Rinder- und Schweinezerlegung/FCS/Tische .....	30
Abbildung 8: Wischproben zur longitudinalen Untersuchung der Karkassen und Fleischproben.....	32

## 8. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Grenzwerte für Mikroorganismen gemäß der EG Verordnung 2073/2005.....	11
Tabelle 2: Verwendete selektive Medien.....	16
Tabelle 3: Invasion assoziiertes Protein ( <i>iap</i> Gen) PCR zur <i>Listeria</i> Spezies Differenzierung. .....	22
Tabelle 4: Mastermixzusammensetzung für die Multiplex-PCR zur Listerien-Speziesidentifizierung ( <i>iap</i> Gen). ....	22
Tabelle 5: PCR-Thermocycler Einstellung für die Multiplex-PCR zur Listerien-Speziesidentifizierung ( <i>iap</i> Gen). ....	23
Tabelle 6: Mastermixzusammensetzung für die <i>Salmonella invA</i> PCR.....	24

Tabelle 7: PCR-Thermocycler Einstellung für die <i>Salmonella invA</i> PCR .....	24
Tabelle 8: Zusammenfassung der Reinigungsergebnisse.....	30
Tabelle 9: <i>Listeria</i> und <i>L. monocytogenes</i> Nachweis gemäß ISO 11290-1 in Karkassen und Frischfleisch (longitudinal)- .....	33
Tabelle 10: <i>Listeria</i> und <i>L. monocytogenes</i> Nachweis gemäß ISO 11290-1 auf Oberflächen in Betrieb A und B (longitudinal)- .....	34

## 9. Literaturverzeichnis

### PUBLIKATIONEN

- ALVSEIKE, O., RØSSVOLL, E., RØTTERUD, O. J., NESBAKKEN, T., SKJERVE, E., PRIETO, M., ... & HAUGE, S. J. (2019). Slaughter hygiene in European cattle and sheep abattoirs assessed by microbiological testing and Hygiene Performance Rating. *Food Control*, 101, 233-240. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2019.01.033>
- BARCO, L., BELLUCO, S., ROCCATO, A., & RICCI, A. (2015). A systematic review of studies on *Escherichia coli* and *Enterobacteriaceae* on beef carcasses at the slaughterhouse. *International Journal of Food Microbiology*, 207, 30-39. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.04.027>
- BLAGOJEVIC, B., & ANTIC, D. (2014). Assessment of potential contribution of official meat inspection and abattoir process hygiene to biological safety assurance of final beef and pork carcasses. *Food Control*, 36(1), 174-182. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.08.018>.
- BUBERT, A., HEIN, I., RAUCH, M., LEHNER, A., YOON, B., GOEBEL, W., & WAGNER, M. (1999). Detection and differentiation of *Listeria* spp. by a single reaction based on multiplex PCR. *Applied and environmental microbiology*, 65(10), 4688-4692. <https://doi.org/10.1128/AEM.65.10.4688-4692.1999>.
- CAMARGO, A. C., COSSI, M. V. C., SILVA, W. P. D., BERSOT, L. D. S., LANDGRAF, M., BARANYI, J., ... & LUÍS AUGUSTO, N. (2019). Microbiological testing for the proper assessment of the hygiene status of beef carcasses. *Microorganisms*, 7(3), 86. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7030086>.
- CHAN, Y. C., & WIEDMANN, M. (2008). Physiology and genetics of *Listeria monocytogenes* survival and growth at cold temperatures. *Critical reviews in food science and nutrition*, 49(3), 237-253. <https://doi.org/10.1080/10408390701856272>
- DE BOECK, E., JACXSENS, L., BOLLAERTS, M., UYTENDAELE, M., & VLERICK, P. (2016). Interplay between food safety climate, food safety management system and microbiological hygiene in farm butcheries and affiliated butcher shops. *Food control*, 65, 78-91. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.01.014>
- DIXON, E., RABANSER, I., DZIECIOL, M., ZWIRZITZ, B., WAGNER, M., MANN, E., ... & WETZELS, S. U. (2019). Reduction potential of steam vacuum and high-pressure water treatment on microbes during beef meat processing. *Food Control*, 106, 106728. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2019.106728>
- DOUMITH, M., BUCHRIESER, C., GLASER, P., JACQUET, C., & MARTIN, P. (2004). Differentiation of the major *Listeria monocytogenes* serovars by multiplex PCR. *Journal of clinical microbiology*, 42(8), 3819-3822. <https://doi.org/10.1128/JCM.42.8.3819-3822.2004>

ESTEVES, E., WHYTE, P., MILLS, J., BRIGHTWELL, G., GUPTA, T. B., & BOLTON, D. (2021). An investigation into the anaerobic spoilage microbiota of beef carcass and rump steak cuts using high-throughput sequencing. *FEMS Microbiology Letters*, 368(17), fnab109. <https://doi.org/10.1093/femsle/fnab109>

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY (EFSA), & EUROPEAN CENTRE FOR DISEASE PREVENTION AND CONTROL (ECDC) (2023). The European Union One Health 2022 Zoonoses Report. *EFSA Journal*, 21(12), e8442. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2023.8442>

JANDA, J. M., & ABBOTT, S. L. (2021). The changing face of the family *Enterobacteriaceae* (Order: "Enterobacterales"): New members, taxonomic issues, geographic expansion, and new diseases and disease syndromes. *Clinical microbiology reviews*, 34(2), 10-1128. <https://doi.org/10.1128/cmr.00174-20>

JEFFER, S. B., KASSEM, I. I., KHARROUBI, S. A., & ABEBE, G. K. (2021). Analysis of food safety management systems in the beef meat processing and distribution chain in Uganda. *Foods*, 10(10), 2244. <https://doi.org/10.3390/foods10102244>

LALUCAT, J., MULET, M., GOMILA, M., & GARCÍA-VALDÉS, E. (2020). Genomics in bacterial taxonomy: impact on the genus *Pseudomonas*. *Genes*, 11(2), 139. <https://doi.org/10.3390/genes11020139>

LONCARIC, O., PAULSEN, P., TICHY, A., SMULDERS, F. J. M., & UPMANN, M. (2009). The microbiological effects of poor slaughter and processing hygiene in mutton production as determined by various marker organisms. *Wien Tierärztl Mschr-Vet Med Austria*, 96, 135-144.

MILIOS, K. T., DROSINOS, E. H., & ZOIOPoulos, P. E. (2014). Food Safety Management System validation and verification in meat industry: Carcass sampling methods for microbiological hygiene criteria—A review. *Food Control*, 43, 74-81. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.02.041>

MUHTEREM-UYAR, M., DALMASSO, M., BOLOCAN, A. S., HERNANDEZ, M., KAPETANAKOU, A. E., KUCHTA, T., ... & WAGNER, M. (2015). Environmental sampling for *Listeria monocytogenes* control in food processing facilities reveals three contamination scenarios. *Food Control*, 51, 94-107. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.10.042>

NJISANE, Y. Z., & MUCHENJE, V. (2017). Farm to abattoir conditions, animal factors and their subsequent effects on cattle behavioural responses and beef quality—A review. *Asian-Australasian journal of animal sciences*, 30(6), 755. doi: 10.5713/ajas.16.0037.

ORSI, R. H., LIAO, J., CARLIN, C. R., & WIEDMANN, M. (2023). Taxonomy, ecology, and relevance to food safety of the genus *Listeria* with a particular consideration of new *Listeria* species described between 2010 and 2022. *Mbio*, e00938-23.

- RETA, G. G., LOPES, S. M., DE AQUINO, N. S. M., & TONDO, E. C. (2023). Quantification of *Salmonella* transfer in cross-contamination scenarios found in chicken slaughterhouses. *Food Microbiology*, 116, 104347. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2023.104347>
- RAPOSO, A., PÉREZ, E., DE FARIA, C. T., FERRÚS, M. A., & CARRASCOSA, C. (2016). Food spoilage by *Pseudomonas* spp.—An overview. *Foodborne pathogens and antibiotic resistance*, 41-71. <https://doi.org/10.1002/9781119139188.ch3>
- RIZOU, M., GALANAKIS, I. M., ALDAWoud, T. M., & GALANAKIS, C. M. (2020). Safety of foods, food supply chain and environment within the COVID-19 pandemic. *Trends in food science & technology*, 102, 293-299. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.06.008>.
- RODRIGUEZ-CATURLA, M. Y., GARRE, A., CASTILLO, C. J. C., ZWIETERING, M. H., DEN BESTEN, H. M., & SANT'ANA, A. S. (2023). Shelf life estimation of refrigerated vacuum packed beef accounting for uncertainty. *International Journal of Food Microbiology*, 405, 110345. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2023.110345>
- SERRAINO, A., BARDASI, L., RIU, R., PIZZAMIGLIO, V., LIUZZO, G., GALLETTI, G., ... & MERIALDI, G. (2012). Visual evaluation of cattle cleanliness and correlation to carcass microbial contamination during slaughtering. *Meat science*, 90(2), 502-506. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2011.08.001>
- VARGAS, D. A., RODRÍGUEZ, K. M., BETANCOURT-BARSZCZ, G. K., AJCET-REYES, M. I., DOGAN, O. B., RANDAZZO, E., ... & MILLER, M. F. (2022). Bio-Mapping of Microbial Indicators to Establish Statistical Process Control Parameters in a Commercial Beef Processing Facility. *Foods*, 11(8), 1133. <https://doi.org/10.3390/foods11081133>
- VARGOVÁ, M., LAKTIČOVÁ, K. V., ZIGO, F., & REHAN, I. F. (2023). Assessment of the hygienic condition of the slaughterhouse based on the evaluation of microbiological swabs. *Journal of microbiology, biotechnology and food sciences*, e9469-e9469. <https://doi.org/10.1007/s13294-023-02089-1>
- WALSH, P. S., METZGER, D. A., & HIGUCHI, R. (1991). Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *Biotechniques*, 10(4), 506-513.
- WAMBUI, J., LAMUKA, P., KARURI, E., MATOFARI, J., & NJAGE, P. M. K. (2018). Microbial contamination level profiles attributed to contamination of beef carcasses, personnel, and equipment: Case of small and medium enterprise slaughterhouses. *Journal of food protection*, 81(4), 684-691. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-17-402>
- ZWIRZITZ, B., WETZELS, S. U., DIXON, E. D., STESSL, B., ZAISER, A., RABANSER, I., ... & SELBERHERR, E. (2020). The sources and transmission routes of microbial populations throughout a meat processing facility. *npj Biofilms and Microbiomes*, 6(1), 26.

ZWIRZITZ, B., WETZELS, S. U., DIXON, E. D., FLEISCHMANN, S., SELBERHERR, E., THALGUTER, S., ... & STESSL, B. (2021). Co-occurrence of *Listeria* spp. and spoilage associated microbiota during meat processing due to cross-contamination events. *Frontiers in Microbiology*, 12, 632935.

<https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.632935>

## RICHTLINIEN UND VERORDNUNGEN

EG Nr. 853/2004 Verordnung des Europäischen Parlaments und des Rates vom 29. April 2004 mit spezifischen Hygienevorschriften für Lebensmittel tierischen Ursprungs OJ L 139, 30.4.2004, p. 55–205. ELI: <http://data.europa.eu/eli/reg/2004/853/oj>

EG Nr. 2073/2005 Verordnung der Kommission vom 15. November 2005 über mikrobiologische Kriterien für Lebensmittel (Text von Bedeutung für den EWR) OJ L 338, 22.12.2005, p. 1–26. ELI: <http://data.europa.eu/eli/reg/2005/2073/oj>

Leitlinie für eine gute Hygienepraxis und die Anwendung der Grundsätze des HACCP bei der Schlachtung und Zerlegung von Rindern, Schweinen, Schafen, Ziegen und Einhufern sowie bei der Herstellung von Fleischerzeugnissen. BMG-75210/0002-II/B/13/2014 vom 25.2.2014

ISO, E. 4833-2 (2013). Mikrobiologie der Lebensmittelkette – Horizontales Verfahren für die Zählung von Mikroorganismen – Teil 2: Koloniezählung bei 30°C mittels Oberflächenverfahren.

ISO 6887-1 (2017) Microbiology of the food chain — Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination — Part 1: General rules for the preparation of the initial suspension and decimal dilutions.

ISO, E. 11290-1 (2017). Mikrobiologie der Lebensmittelkette – Horizontales Verfahren für den Nachweis und die Zählung von *Listeria monocytogenes* und von *Listeria* spp. – Teil 1: Nachweisverfahren.

ISO, E. 6579-1 (2017). Mikrobiologie der Lebensmittelkette – Horizontales Verfahren zum Nachweis, zur Zählung und zur Serotypisierung von *Salmonellen* – Teil 1: Nachweis von *Salmonella* spp.

ISO, E. 21528-2 (2019). Mikrobiologie der Lebensmittelkette – Horizontales Verfahren für den Nachweis und die Zählung von *Enterobacteriaceae* – Teil 2: Koloniezählverfahren.

## BÜCHER

BAUER, A., SMULDERS, F.J.M., (2015): Tierproduktion und veterinärmedizinische Lebensmittelhygiene – ein synoptisches Lehrbuch, 2.Auflage, Wageningen Academic Publishers, Wageningen, Niederlande

BAUMGART J., (1999): Mikrobiologische Untersuchungen von Lebensmitteln.

4. Auflage, Behr's Verlag, Hamburg
- DAS, A. K., NANDA, P. K., DAS, A., & BISWAS, S. (2019). Hazards and safety issues of meat and meat products. In *Food safety and human health* (pp. 145-168). Academic Press.
- DOYLE, M. P., DIEZ-GONZALEZ, F., & HILL, C. (Eds.). (2020). *Food microbiology: fundamentals and frontiers*. John Wiley & Sons.
- FORSYTHE, S. J. (2020). *The microbiology of safe food*. John Wiley & Sons.
- FRITSCHE, O., (2016): *Mikrobiologie*, Springer Verlag, Berlin.
- GOLDINE, H. CHEN, H., (2007): *Listeria Monocytogenes. Pathogenesis and Host response*. Springer Verlag. New York, USA.
- HOLAH, J., LELIEVELD, H. L. M., & GABRIC, D. (Eds.). (2016). *Handbook of hygiene control in the food industry*. Woodhead Publishing.
- KEWELOH, H., (2019): *Mikroorganismen in Lebensmitteln. Theorie und Praxis der Lebensmittelhygiene*, 7. Auflage, Fachbuchverlag Pfanneberg GmbH & Co. KG, Haan-Gruiten
- KRÄMER, J., & PRANGE, A., (2017): *Lebensmittel-Mikrobiologie*, 7. Auflage, Eugen Ulmer Verlag, Stuttgart.
- MÄRTLBAUER, E., BECKER, H., (2016): *Milchkunde und Milchhygiene*, Eugen Ulmer Verlag, Stuttgart.
- NASTASIJEVIC, I., BOSKOVIC, M., & GLISIC, M. (2023). Abattoir hygiene. In *Present Knowledge in Food Safety* (pp. 412-438). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-819470-6.00002-0>
- NOLLET, L.M.L., TOLDRA, F., (2006): *Advanced technologies for meat processing*. Taylor & Francis Group.
- SCHLEGEL, G.H., EITINGER, T., (2007): *Allgemeine Mikrobiologie*, 8.Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, Deutschland
- SOFOS, J.N., (2005): *Improving the safety of fresh meat*, Woodhead Publishing Limidet, Cambridge
- YOUSEF, A. E., WAITE-CUSIC, J. G., PERRY, J.J., (2022): *Analytical food microbiology. A laboratory manual*. Wiley Verlag, USA
- SULIEMAN, A. M. E., AHMED OSMAN, O., SALEH, Z. A., & OSMAN, O. A. (2023). Impact of Fluctuating Storage Temperatures on the Sensory and Microbiological Quality of Halal Beef Products. In *Halal and Kosher Food: Integration of Quality and Safety for Global Market Trends* (pp. 233-246). Cham: Springer International Publishing.

## 10. Materialliste

Beschreibung	Hersteller
<b>Geräte</b>	
Bunsen Brenner	Schuett-biotec GmbH, Göttingen, Deutschland
E count™ Koloniezähler	Heathrow Scientific, LLC., Illinois, USA
Gel Doc Dokumentationssystem	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, California
Heizblock	Kleinfeld Labortechnik GmbH., Gehrden, Deutschland
Inkubator 30°C	Ehret GmbH, Mahlberg, Deutschland
Inkubator 37°C	MMM Münchner Medizin Mechanik GmbH, Stadlern, Deutschland
Inkubator 42°C	Sanyo Electric Co., Ltd., Osaka, Japan
Merck Millipore Milli-Q™ Reference Ultrapure Water Purification System	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Mikrowelle	Silva Schneider GmbH, Salzburg, Salzburg
Pipetus	Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG, Eberstadt, Deutschland
Power pac 1000 (Gelelektrophorese)	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, California
Thermocycler T100	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, California
Tiefkühlschrank -20°C	Liebherr-International AG, Bulle, Switzerland
Tiefkühlschrank -80°C	Sanyo Electric Co., Ltd., Osaka, Japan
Waage	Tanita Corporation, Tokyo, Japan
Waage (für Gelelektrophorese)	Santorius AG, Göttingen, Deutschland
Zentrifuge 5424	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
<b>Verbrauchsmaterialien</b>	
10x PCR Rxn Puffer	Thermo Fisher Scientific Inc., Massachusetts, USA
50 mM MgCL2	Thermo Fisher Scientific Inc., Massachusetts, USA
Agarose	VWR International, Radnor, USA
Chelex Resin®	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, California
Deoxynucleoside triphosphate (dnTP) mix	Thermo Fisher Scientific Inc., Massachusetts, USA
EZ Reach™ Split-Sampler	Worldbioproducts, Biolng, s.r.o., Tschechien
Filterbag	VWR International, Radnor, USA
Glass Pasteurpipetten	Brand GmbH & Co. KG, Wertheim, Deutschland
Halbfraiser	Biokar, Solabia Group, PANTIN Cedex, Frankreich
Impfösen 1 µl, 10 µl	Sarstedt AG & Co. KG, Nürnbrecht, Deutschland
Kolbenhubpipetten 1-1000 µl	Thermo Fisher Scientific Inc., Massachusetts, USA
Kryoröhrchen 2 ml	Biologix Group Ltd., Shandong, China
Latex Handschuhe	Semperit Technische Produkte GmbH, Wien, Austria
Maximum recovery tubes	Axygen Inc., California, USA
Millipore Wasser	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Nitril Handschuhe	Paul Hartmann GmbH, Wiener Neudorf, Österreich
Ösen 1 ml, 10 ml	Sarstedt AG & Co. KG, Nürnbrecht, Deutschland
PCR tubes 0,2 ml	NeoLab Migge GmbH, Heidelberg, Deutschland
PEQ Green	VWR International, Radnor, USA
Platinum Taq Polymerase	Thermo Fisher Scientific Inc., Massachusetts, USA

Primer	Microsynth Austria GmbH, Wien, Austria
Ringerlösung	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Röhrchen	Sarstedt AG & Co. KG, Nürnbrecht, Deutschland
Safe-lock tubes 1,5 ml, 2 ml, 5 ml	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Sample loading Puffer (SLB)	Thermo Fisher Scientific Inc., Massachusetts, USA
Serologische Pipette 10 ml, 25 ml	Sarstedt AG & Co. KG, Nürnbrecht, Deutschland
Sterile Filter Spitzen 10 µl, 100 µl, 1250 µl	Greiner-Bio One, Kremsmünster, Austria
Stomacher	VWR International, Radnor, USA
Thermo Scientific™ GeneRuler™ 1kb DNA-Leiter	Thermo Fisher Scientific Inc., Massachusetts, USA
Trisaminomethane (Tris) HCL	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Trisaminomethane-acetate-Ethylenediaminetetraacetic acid (TAE) puffer	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Vollfraser	Biokar, Solabia Group, PANTIN Cedex, Frankreich
<b>Medien und Platten</b>	
Brilliance™ Listeria Agar	Thermo Fisher Scientific Inc., Massachusetts, USA
Gehirn-Herz-Infusion (BHI)	Biokar Diagnostics, Allonne, Frankreich
Gepuffertes Peptonwasser (BPW)	Biokar Diagnostics, Allonne, Frankreich
Glycerol	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Kristallviolett-Galle-Glucose-Agar (VRBD)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Müller-Kaufmann Tetrathionate Novobiocin (MKTn) Buillon	Biokar Diagnostics, Allonne, Frankreich
RAPID'L.mono Agar	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, California
Rappaport-Vassiliadis Soy Peptone Broth (RVS)	Thermo Fisher Scientific Inc., Massachusetts, USA
Trypto-Casein-Soja-Agar mit Hefe (TSAY)	Biokar Diagnostics, Allonne, Frankreich

## 11. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich herzlich bei allen Personen bedanken, ohne deren Unterstützung diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre. Insbesondere meiner Betreuerin Dr.med.vet. Beatrix Stessl herzlichen Dank für die unermüdliche Unterstützung und Expertise die mir im Laufe dieser Arbeit entgegengebracht wurde.

Ebenso herzlichen Dank an Dr.med.vet. Igor Loncaric für das Korrekturlesen der Arbeit. Den allzeit hilfsbereiten Mitarbeiter:innen des Instituts für Lebensmittelsicherheit, Lebensmitteltechnologie und öffentliches Gesundheitswesen der veterinärmedizinischen Universität Wien, welche mich bei der praktischen Arbeit tatkräftig unterstützt haben.

Zuletzt danke ich auch meiner Familie und meiner Freundin die mir mit motivierenden Worten immer zur Seite standen.

Diese Arbeit wurde im Rahmen eines Forschungsprojektes des Österreichischen Kompetenzzentrums für Futter- und Lebensmittelqualität, -sicherheit und -innovation (FFoQSI) erstellt. Das COMET-K1 Kompetenzzentrum FFoQSI wird vom Bundesministerium für Verkehr, Innovation und Technologie (BMVIT), dem Bundesministerium für Wirtschaft und Technologie (BMDW) und den Bundesländern Niederösterreich, Oberösterreich und Wien im Rahmen von COMET - Competence Centers for Excellent Technologies gefördert. Die Leitung des COMET-Programms liegt bei der FFG.