



Leitfaden zum zweckmässigen Vorgehen beim präanalytischen Teil von mikrobiologischen Untersuchungen im Bereich der Lebensmittelproduktion

Dokument Nr. 333.dw

Ausgabe Februar 2013, Rev. 01

Autoren (in alphabetischer Reihenfolge):

A. Baumgartner¹, T. Bischofsberger², M. Dalla Torre³, H. Emch⁴, J.-L. Gafner⁵, J. Hummerjohann⁵, R. Meyer⁶, Ch. Müller⁷, P. Scheffeldt⁴, U. Spahr¹, R. Stephan⁸, U. Wäspi⁹

¹Bundesamt für Gesundheit, 3003 Bern

²UFAG Laboratorien AG, 6310 Sursee

³Säli rain 32, 4500 Solothurn

⁴SAS, 3003 Bern

⁵Agroscope Liebefeld-Posieux, 1725 Posieux

⁶NESTEC SA., 1350 Orbe

⁷Amt für Verbraucherschutz, 5000 Aarau

⁸Institut für Lebensmittelsicherheit und -hygiene, 8057 Zürich

⁹COOP Zentrallabor, 4133 Pratteln

INHALTSVERZEICHNIS

Vorwort	3
1. Einleitung	4
2. Probenahme	4
2.1.1 Rechtliche Aspekte	4
2.1.2 Technische Aspekte	5
2.1.2.1 Allgemeines	5
2.1.2.2 Klassenpläne	5
2.1.2.2.1 2-Klassenplan	5
2.1.2.2.2 3-Klassenplan	6
2.1.2.3 Kenngrößen der Klassenpläne (7)	6
2.1.2.4 Festlegen eines Probenahmeplans	6
2.1.2.5 Beispiele für Probenahmepläne	6
2.1.2.5.1 Genussfertige Lebensmittel, welche die Vermehrung von <i>Listeria monocytogenes</i> erlauben	6
2.1.2.5.2 <i>Enterobacter sakazakii</i> in Kindernährmitteln	7
2.1.2.5.3 Koagulase positive Staphylokokken in Rohmilchkäsen	7
2.1.2.6 Abweichen von Probenahmeplänen	7
2.3.1 Zielsetzung der Bemusterung	7
2.3.2 Einzelne Probenahmetechniken	8
2.3.3 Probenahmemengen	8
2.3.4 Probenstabilisierung	8
2.3.5 Kennzeichnung und Probenahme-Rapport	9
3. Transport, Versand, Empfang und Lagerung von Proben	9
3.3.1 Allgemeine Anforderungen	10
3.3.2 Anforderungen an die Ausrüstung von Fahrzeugen zum Probetransport	10
4. Vorbereitung zur Analyse	12
5. Literatur	13
6. Änderungen in der aktuellen Ausgabe	14

Vorwort

Der Text dieser Richtlinie wurde von Mitgliedern einer Expertengruppe des Bundes, des Kantonalen Vollzugs und der Privatwirtschaft unter der Leitung der SAS erarbeitet und im Organ Mitteilungen aus Lebensmitteluntersuchung und Hygiene (Mitt. Lebensm. Hyg. 97, 2006) bereits veröffentlicht.

Der Geltungsbereich umfasst den präanalytischen Teil von folgenden Proben:

Lebensmittel, Futtermittel, Umweltproben im Bereich der Produktion und des Umgangs mit Lebensmitteln, Umweltproben im Bereich der Primärproduktion sowie Fäces tierischen Ursprungs.

Dass die zur Probenerhebung eingesetzte Person entsprechend geschult sein und die Abläufe sowie die kritischen Punkte ihrer Tätigkeit kennen muss, wird als Voraussetzung angesehen und ist nicht Bestandteil dieser Richtlinie.

Gewisse Hinweise zu präanalytischen Fragen werden in einem "Guidance Document" der EU vermittelt (1). Der vorliegende Leitfaden gibt zu dieser Thematik jedoch einen umfassenderen Überblick und berücksichtigt auch Aspekte nationaler Prägung.

Das Dokument richtet sich vor allem an leitende Begutachter und Fachexperten als Hilfe bei der Überwachung von Prüfstellen sowie an die betroffenen Laboratorien selbst.

1. Einleitung

Die Validierung und die Abschätzung der Messunsicherheit mikrobiologischer Untersuchungsmethoden wurde in den letzten Jahren stark vorangetrieben. In diesem Kontext entstand im Jahre 2005 ein entsprechender Leitfaden im Bereich Lebensmittel- und Umweltmikrobiologie, allerdings ohne Berücksichtigung des präanalytischen Teils. Zusammen mit einem immer grösser werdenden Angebot an Proficiency Testings (Laborvergleichsstudien) und Referenzmaterialien sollte dies zu einer vertrauenswürdigen, rückführbaren Analytik führen.

Trotzdem sind immer wieder grosse Unterschiede zwischen den Resultaten verschiedener Laboratorien oder Abweichungen von Sollwerten von Referenzmaterialien festzustellen. Ein Schwachpunkt bildet der präanalytische Teil. Die grösste, und meist unterschätzte Fehlerquelle ist dabei der Probenahmeprozess. Die oft sehr komplexen Vorgänge der Probenahme vor Ort bis zur Entnahme des Untersuchungsgutes im Labor werden dem Labor nicht ausreichend bekannt gegeben, oder es fehlen die nötigen Kenntnisse der Faktoren und deren Einfluss auf die Probe und die zu untersuchenden Merkmale. Auch fehlt weitgehend eine Normalisierung. Es ist unabdingbar, dass die Proben, welche zur Untersuchung gelangen, so erhoben, transportiert und zur Analyse vorbereitet wurden, dass sie nach wie vor repräsentativ für die Gesamtheit des zu untersuchenden Materials (Warenlos) sind.

Die Art der Probenahme, insbesondere die Probenmenge, ist wesentlich beeinflusst durch die Ziele der Untersuchung. Je nachdem, ob es sich um amtliche Untersuchungen nach einem Stichprobenplan, um epidemiologische Untersuchungen oder um ein Monitoring handelt, können sich unterschiedliche Vorgehensweisen aufdrängen.

Der präanalytische Teil der Analyse kann in folgende 3 Schritte unterteilt werden.

- Probenahme
- Transport und Lagerung
- Vorbereitung zur Analyse

2. Probenahme

Grundsätzlich ist so vorzugehen, dass die Proben bezüglich ihres mikrobiellen Status möglichst unverändert bleiben. Proben für mikrobiologische Untersuchungen sollten nur durch entsprechend instruierte Personen erhoben werden.

2.1 Probenahmepläne

2.1.1 Rechtliche Aspekte

Die Anforderungen an die Probenerhebung durch die kantonalen Behörden der Lebensmittelkontrolle (Kantonale Laboratorien) sind in der Verordnung des EDI über den Vollzug der Lebensmittelgesetzgebung geregelt (2). Viele der dort festgelegten Vorgehensweisen beschreiben eine "Gute Probenahmepraxis", die auch für Institutionen, die der Verordnung nicht unterworfen sind, fachlich richtungsweisend sind. In Artikel 78 "Probenahme" wird festgelegt, dass in der Regel Einzelproben entnommen werden. Artikel 79 "Stichprobenpläne" räumt den Kontrollbehörden jedoch die Möglichkeit ein, aus einem Warenlos mehrere Proben nach einem Stichprobenplan zu erheben. Dieser Weg kann beschränkt werden, wenn der Verdacht besteht, dass ein Warenlos den Anforderungen der Lebensmittelgesetzgebung nicht oder nur teilweise entspricht oder wenn das Untersuchungsziel

mit Einzelproben nicht erreicht werden kann. Der im Kontext von Stichprobenplänen sehr wichtige Begriff des "Warenloses" ist in der Verordnung des EDI über die Kennzeichnung und Anpreisung von Lebensmitteln (LKV) definiert (3). Demgemäss gilt ein Warenlos als eine Gesamtheit von Produktions- oder Verkaufseinheiten eines Lebensmittels, das unter praktisch gleichen Umständen erzeugt, hergestellt oder verpackt wurde. Praktisch hilfreich, und darum an dieser Stelle erwähnt, ist auch die Umschreibung des Begriffes "Warenlos" in der zwischenzeitlich ausser Kraft gesetzten Probenerhebungsverordnung (PEV) (4). Gemäss der ehemaligen PEV sind Warenlose bestimmbare und abgrenzbare Gesamtheiten von Produkten (z.B. Importlose, Fabrikationschargen, Lagerbestände), die aufgrund ihrer Kennzeichnung (Chargennummer, Fabrikationsdatum usw.), ihrer Herkunft, ihrer Rohstoffe oder des Zeitpunktes und der Art des Inverkehrbringens zusammengehören.

In der Vergangenheit haben die Kantonalen Laboratorien bei mikrobiologischen Untersuchungen fast ausschliesslich mit Einzelstichproben gearbeitet. Dieses Vorgehen beruhte auf der Überlegung, mit den verfügbaren Mitteln ein Maximum von Warenlosen überprüfen zu können. Dies machte auch darum Sinn, weil die Kontrolltätigkeit zu einem grossen Teil in den Bereichen Gastronomie und Detailhandel erfolgt. Kamen Probenahmepläne zum Einsatz, so haben die Kantonalen Laboratorien diese ohne Zutun der Bundesbehörden festgelegt. In grossen Unternehmungen der Lebensmittelbranche, insbesondere in solchen, die im internationalen Handel tätig sind, kommen Probenahmepläne im Rahmen der Selbstkontrolle häufiger zur Anwendung.

Das Bestreben der Schweizerischen Bundesbehörden, im Handel mit Lebensmitteln tierischer Herkunft mit der Europäischen Union (EU) Äquivalenz zu erlangen, hatte zur Folge, dass die nationale Gesetzgebung angepasst werden musste. Unter anderem wurden in die Hygieneverordnung in grösserem Umfang mikrobiologische Kriterien der EU übernommen und damit eigene Grenz- und Toleranzwerte eliminiert, ersetzt oder modifiziert. Ein Teil dieser Kriterien ist nun zwingend an Probenahmepläne gekoppelt (5).

2.1.2 Technische Aspekte

2.1.2.1 Allgemeines

Um eine ausreichende hygienische Qualität von Lebensmitteln zu erreichen, genügt das Befolgen einer guten Herstellungspraxis (GHP) und das Durchführen sporadischer, mikrobiologischer Untersuchungen nicht. Vielmehr sind produktionsspezifische Gefahren zu identifizieren, daraus erwachsende Risiken abzuschätzen und Massnahmen zu deren Beherrschung festzulegen. In der Regel geschieht dies mit dem sogenannten Hazard Analysis Critical Control Point (HACCP) System. Die mikrobiologische Analytik nimmt im Gesamtkontext dieses Sicherheitssystems einen wichtigen Platz ein, sei es bei der Qualitätsüberprüfung von Rohstoffen oder bei Endproduktkontrollen (Verifikation). Es liegt auf der Hand, dass die Aussagekraft einer Analytik in Bezug auf eine Charge von der Anzahl untersuchter Proben abhängt. Je mehr Proben pro Einheit analysiert werden, desto höher die Wahrscheinlichkeit, dass ein allfällig vorhandener unerwünschter Keim entdeckt wird. Wie viele Proben sinnvollerweise analysiert werden sollten, hängt z. B. vom Umfang eines zu erprobenden Warenloses, seiner Homogenität und der Häufigkeit der nachzuweisenden Parameter ab. Die entsprechend eingesetzten Untersuchungsschemata werden als Probenahmepläne bezeichnet. Wegweisend auf diesem Gebiet sind die Arbeiten und Empfehlungen der "International Commission on Microbiological Specifications for Foods (ICMSF)" (6).

2.1.2.2 Klassenpläne

2.1.2.2.1 2-Klassenplan

Im 2-Klassenplan kommen meistens Anwesenheits-/Abwesenheitstest zur Anwendung.

Sie werden bei Untersuchungen auf pathogene Erreger, wie z.B. Salmonellen, eingesetzt.

2.1.2.2.2 3-Klassenplan

Bei 3-Klassenplänen gelangen auch quantitative Methoden zum Einsatz, wobei eine erlaubte und eine höchstzulässige Keimzahl pro Gramm oder Milliliter zugrunde gelegt wird. Dabei darf nur eine bestimmte Anzahl Proben die höchstzulässige Keimzahl erreichen, nicht aber überschreiten.

2.1.2.3 Kenngrössen der Klassenpläne (7)

- k: Klasse
- n: Zahl der zu bemusternden und zu untersuchenden Proben pro Warenlos, oder gemäss Hygieneverordnung des Eidgenössischen Departements des Innern (5) die Anzahl Probeinheiten der Stichprobe
- m: erlaubte Keimzahl pro Gramm oder Milliliter
- M: höchstzulässige Keimzahl pro Gramm oder Milliliter
- c: (2-Klassenplan): höchste Zahl an Proben, bei denen "m" überschritten sein darf.
(3-Klassenplan): höchste Zahl an Proben, bei denen "m", nicht jedoch "M" überschritten sein darf
- m: erlaubte Keimzahl pro Gramm oder Milliliter
- M: höchstzulässige Keimzahl pro Gramm oder Milliliter

Probenahmepläne können sich auch auf andere Probenmengen als 1 g oder 1 ml beziehen (z. B. auf 25 g). Im Vergleich zu der in der Schweiz rechtsgültigen Hygieneverordnung (5) entspricht "m" dem "Toleranzwert" und "M" dem "Grenzwert". Grenzwerte sind sogenannte Lebensmittelsicherheitskriterien, Toleranzwerte können mikrobiologische Hygienekriterien für genussfertige Endprodukte oder für Herstellungsprozesse sein.

2.1.2.4 Festlegen eines Probenahmeplans

Der Festlegung eines Probenahmeplans gehen mikrobiologische, epidemiologische, medizinische und statistische Überlegungen voraus. So wird berücksichtigt, welche Gefährdung von einem zu kontrollierenden Lebensmittel ausgeht und wie sich die Zielgruppe der Konsumenten zusammensetzt. Ein zu beachtender Faktor ist auch die Gefährlichkeit eines auszuschliessenden Mikroorganismus. Je nach Risikostufe sind 5, 10, 15, 20, 30 oder 60 Parallelanalysen zu untersuchen. Auf weiterführende Erläuterungen zu diesem Punkt wird an dieser Stelle verzichtet und auf die umfangreiche Spezialliteratur verwiesen, insbesondere auf ein entsprechendes Standardwerk der ICMSF (6).

2.1.2.5 Beispiele für Probenahmepläne

Die nachfolgenden Pläne sind von der EU vorgeschrieben und ins schweizerische Recht übernommen worden (5). Für Untersuchungen im Rahmen der amtlichen Lebensmittelkontrolle können die 3 nachfolgenden Beispiele auch als Einzelstichproben angewendet werden, sofern bei negativem Ergebnis einer Einzeluntersuchung keine Rückschlüsse auf das ganze Warenlos gezogen werden. Bei dem Beispiel unter 2.1.2.5.3 kann dabei eine Überschreitung von "m" nicht beanstandet werden, gibt aber einen Hinweis, dass Probleme bestehen könnten.

2.1.2.5.1 Genussfertige Lebensmittel, welche die Vermehrung von *Listeria monocytogenes* erlauben

$k = 2 / n = 5 / c = 0 / m = M = 100$ KBE pro Gramm

Bei entsprechenden Untersuchungen sind pro Warenlos 5 Proben zu berücksichtigen. Weil nur "M" festgesetzt wurde und "c" Null ist, darf keine dieser Proben grössere Werte als 100 KBE *L. monocytogenes* pro Gramm aufweisen. Bei diesem Beispiel handelt es sich um einen 2-Klassenplan mit quantitativem Nachweisverfahren.

2.1.2.5.2 Enterobacter sakazakii in Kindernährmitteln

$k = 2 / n = 30 / c = 0 / m = M =$ nicht nachweisbar in 10 Gramm

Bei entsprechenden Untersuchungen sind pro Warenlos 30 Proben zu berücksichtigen. Weil nur "M" festgesetzt wurde und "c" Null ist, darf in keiner der 30 Proben E. sakazakii nachweisbar sein. In diesem Fall handelt es sich um einen 2-Klassenplan, kombiniert mit einem Anwesenheits-/Abwesenheitstest. Die hohe Probenzahl von 30 ("n") hängt damit zusammen, dass hochempfindliche Personen (Säuglinge) geschützt werden sollen.

2.1.2.5.3 Koagulase positive Staphylokokken in Rohmilchkäsen

$k = 3 / n = 5 / c = 2 / m = 10'000$ KBE pro Gramm / $M = 100'000$ KBE pro Gramm

Bei entsprechenden Untersuchungen sind pro Warenlos 5 Proben zu berücksichtigen. Zwei davon dürfen 10'000 KBE pro Gramm ("m") überschreiten, keine jedoch 100'000 KBE pro Gramm ("M"). Hier handelt es sich um einen 3-Klassenplan mit einem quantitativen Testverfahren.

2.1.2.6 Abweichen von Probenahmeplänen

Untersuchungen nach Probenahmeplänen können sich sehr aufwendig gestalten, vor allem wenn die Anzahl zu untersuchender Proben ("n") hoch ist. Artikel 60 der Hygieneverordnung sieht darum vor, dass unter gewissen Bedingungen von den rechtlichen Anforderungen abgewichen werden darf (5). Unter anderem kann der Umfang der zu tätigenen Analysen reduziert werden, wenn sich mittels einer Dokumentation belegen lässt, dass die Produktesicherheit durch das HACCP-System gewährleistet ist. Weiter dürfen alternative Untersuchungskonzepte zur Anwendung gelangen, wenn diese nachweislich eine vergleichbare Wirkung erzielen, wie die in der Verordnung vorgeschriebenen Probenahmepläne.

2.2 Geräte und Hilfsmittel

Geräte und Hilfsmittel werden eingesetzt, um eine korrekte Probenahme zu ermöglichen oder zu erleichtern. Entnahmegeräte wie Löffel, Schöpfkellen, Sonden, Stecher, Bohrer, Pipetten, Messer, Scheren, Pinzetten, Schaber, Rührer usw. müssen sauber, steril und trocken sein. Sie sind in steriler, keimdichter Verpackung mitzuführen (8). Tupfer, Wattestäbchen und Ähnliches können, falls notwendig, mit definierter Menge steriler Flüssigkeit angefeuchtet werden.

Probenbehälter aus Glas, Kunststoff oder Metall müssen steril und frei von Substanzen sein, welche einen hemmenden Einfluss auf den Analyten haben oder zu ungewollter Verdünnung führen können. Sie müssen derart verschlossen werden können, dass keine Kontaminationen und Verlust von Probenmaterial auftreten.

2.3 Probenahmetechnik

Der mikrobielle Status eines Lebensmittels ändert sich bei Herstellung, Lagerung, Verpackung, Transport und Abgabe an den Konsumenten. Proben sind derart zu erheben und gegebenenfalls aufzubewahren, dass der mikrobielle Status nicht verfälscht werden kann (9).

Aus diesem wichtigen Grundsatz folgen die einzelnen Empfehlungen zur Probenahmetechnik, die in diesem Kapitel beschrieben sind.

2.3.1 Zielsetzung der Bemusterung

Die Auswahl des Probenmaterials und des Zeitpunktes der Bemusterung ist also wesentlich von der Zielsetzung der Untersuchung abhängig: Geht es um die amtliche Lebensmit-

telkontrolle, um die privatwirtschaftliche Betriebsüberwachung im Rahmen der Selbstkontrolle, um ein Monitoring oder um die Aufklärung von Erkrankungsfällen? Daraus können unterschiedliche Probenahmepläne folgen (siehe Kap. 2.1).

2.3.2 Einzelne Probenahmetechniken

In der Regel ist eine aseptische Probenahme vorzusehen, bei zum direkten Verkauf bestimmter Ware kann es aber notwendig sein, betriebseigenes Besteck zu verwenden (z.B. Glacéportionierer), wenn man wissen will „wie der Konsument das Lebensmittel erhält“.

An dieser Stelle kann nicht auf sämtliche Probenahmetechniken eingegangen werden. Neben Abschnitt 4 von Kapitel 56 des „alten“ SLMB (8) und einschlägiger Fachliteratur (z. B. 10) wird besonders die Konsultation internationaler Normen empfohlen [z.B. ISO 17604:2003 (11), ISO 18593:2004 (12) und ISO/DIS 707 I IDF 50 (13)]. In diesen Normen sind Probenahme-Instrumente und ihre Verwendung (z.B. Käsebohrer), destruktive und nichtdestruktive Probenahmeverfahren sowie die Auswahl der Probenahmestellen (z. B. am Schlachtkörper) genau beschrieben.

Wichtige Grundprinzipien sind:

Die mikrobiologische Probenahme erfolgt stets vor derjenigen für chemische oder andere Untersuchungen.

Aseptische Probenahme: Probenkontaminationen durch defekte Packungen, unsachgemässe Öffnung, kontaminierte Probenahmewerkzeuge und Probenbehälter, durch die Hände oder aerogen bedingte Kontaminationen sind zu vermeiden.

Während der Probenahme darf die vorhandene Keimzahl auch nicht verringert werden, z. B. durch unvollständiges verdunsten lassen des Ethanols oder unvollständiges erkalten lassen des Probenahmewerkzeuges nach dem Abflammen.

Bei invasiven Methoden kann es je nach Fragestellung nötig sein, vor der eigentlichen Probenahme die Oberflächenschicht aseptisch zu entfernen.

2.3.3 Probenahmemengen

Die Probenmenge richtet sich nach dem Untersuchungsziel, sie sollte aber in der Regel mindestens 100 g betragen. Die Menge einer Oberflächenprobe (z.B. Käserinde) kann geringer als 100 g sein (13). In allen Fällen ist aber ein besonderes Augenmerk auf die Homogenität der Probe zu richten und entsprechend zu bemustern. Vorverpackte Ware sollte möglichst in Originalverpackung erhoben werden, aus loser Ware soll eine Mischprobe aus mehreren Portionen von jeweils 10 - 50 g hergestellt werden.

Bei nichtdestruktiven Verfahren ist in der Regel eine Probefläche von mindestens 100 cm² abzudecken.

Inhomogene Proben sind, wenn möglich, als Ganzes zu erheben (z. B. Cremeschnitte).

2.3.4 Probenstabilisierung

Proben sind derart zu erheben und gegebenenfalls aufzubewahren, dass der mikrobielle Status nicht verfälscht werden kann.

In der Regel dürfen Proben für mikrobiologische Untersuchungszwecke keine Konservierungsstoffe zugesetzt werden. Werden diese trotzdem eingesetzt (z. B. vom Prüflabor verlangt), so muss sichergestellt sein, dass ihre Eigenschaften die nachfolgende Analyse nicht stören. Einsatz und Menge des Konservierungsstoffs müssen im Probenahme-Rapport notiert werden.

So sind z. B. bei Trinkwasser allfällige inhibitorische Mengen Chlor durch einen Zusatz

von Natriumthiosulfat zu inaktivieren. Zu diesem Zweck wird den Probeflaschen vor dem sterilisieren 0.1 ml Natriumthiosulfatlösung pro 100 ml Probenvolumen zugesetzt (9). Das Einfrieren von Probenmaterial bis zur Analyse ist nur dann zulässig, wenn durch vorausgehende repräsentative Untersuchungen gezeigt werden konnte, dass keine signifikante Veränderung der nachzuweisenden Parameter stattfindet.

2.3.5 Kennzeichnung und Probenahme-Rapport

Jede Probe ist sofort nach ihrer Erhebung eindeutig und unverwechselbar zu kennzeichnen.

Der Probenahme-Rapport sollte folgende Einzelheiten enthalten:

- Ort, Datum und, falls relevant, Zeit der Probenahme
- Probeninhaber
- Grund der Probenahme
- Name der probenehmenden Person und ggf. von Zeugen
- Genaue Probenbeschreibung (z. B. Eigenschaften, Verpackung, Identifizierungscode des Warenloses, Produzent, Datum der Herstellung, angegebene Haltbarkeit und Aufbewahrungsbedingungen, Kerntemperatur eines Vergleichsproduktes, erhobene Menge/Stückzahl)
- Insgesamt vorhandene Menge
- Anlässlich der Probenahme allfällig zugegebene Hilfsmittel wie Konservierungsstoffe, Puffer, Nährmedien
- Relevante Anmerkungen zu den Probenahmeumständen (Temperatur, Feuchtigkeit, sensorischer Zustand des Untersuchungsgutes, präzise Angabe der Probenahme-technik, aufgetauchte Probleme)
- Adresse, wohin die Proben überbracht oder gesendet werden sollen

3. Transport, Versand, Empfang und Lagerung von Proben

Das Ziel ist, die Proben so zu transportieren und zu lagern, dass das Untersuchungsergebnis möglichst nicht verfälscht wird. Sie sollen so rasch als möglich zur Untersuchung gebracht werden. Ausnahmen sind Haltbarkeitsbestimmungen, aufgrund derer die Proben bis zur Analyse nach fixierten Zeitspannen unter definierten Bedingungen gelagert werden.

3.1 Rechtliche Aspekte

Die Verordnung des EDI über den Vollzug der Lebensmittelgesetzgebung hält in Artikel 85 "Transport" fest, dass Proben, zusammen mit dem Probenahmerapport, so aufbewahrt und transportiert werden müssen, dass das Untersuchungsergebnis nicht verfälscht wird (2).

3.2 Bestehende technische Leitlinien

Die Vollzugsverordnung legt lediglich die Grundanforderungen an den Transport von Proben fest. Einen Schritt weiter geht die Ausgabe 1985 von Kapitel 56 "Mikrobiologie" des Schweizerischen Lebensmittelbuches, wo zusätzlich folgende Anweisung gegeben wird (8):

"Leichtverderbliche und gekühlte Lebensmittel sind nicht bei über +5 °C zu transportieren; sie dürfen nicht gefrieren."

In der Ausgabe 2000 von Kapitel 56 "Mikrobiologie" wird der Transport nicht mehr direkt angesprochen und lediglich folgende Aussage gemacht:

"Proben sind derart zu erheben und gegebenenfalls aufzubewahren, dass der mikrobiologische Status nicht verfälscht werden kann" (9).

In der ISO-Norm 7218:1996 werden ebenfalls Anforderungen zu Transport, Empfangnahme und Lagerung von Proben festgehalten (14).

3.3 Probentransport

3.3.1 Allgemeine Anforderungen

Gewisse Prüfstellen, zum Beispiel betriebsinterne Laboratorien, erheben eigenständig Proben. Es sind auch Dienstleistungslaboratorien tätig, welche im Auftrag von Kunden integrale Aufträge von der Erhebung von Proben, über die Untersuchung bis hin zur Interpretation von Prüfergebnissen abwickeln. Beim Transport der Proben an den Ort der Untersuchung muss beachtet werden, dass der mikrobielle Status nicht verfälscht wird. Verfälschungen können sich durch Absterben oder Vermehrung von Keimen ergeben. Es liegt in der Eigenverantwortung der Proben erhebenden Prüfstelle zu beurteilen, ob für den Transport Massnahmen wie Tiefkühlung oder Kühlung zu treffen sind. Beachtet werden müssen die Art der zu transportierenden Proben (Verderblichkeit), die Umgebungstemperatur sowie die Transportzeit. Ebenfalls zu beachten sind die in der Hygieneverordnung für gewisse Lebensmittelkategorien vorgeschriebenen Kühltemperaturen. So muss Hackfleisch beispielsweise bei 2 °C und pasteurisierte Milch bei 5 °C gelagert werden (5). Abweichungen von diesen rechtlichen Vorgaben sind nur zulässig, wenn auf Grund einer Risikobeurteilung gezeigt wird, dass eine Verfälschung des mikrobiologischen Status ausgeschlossen werden kann.

3.3.2 Anforderungen an die Ausrüstung von Fahrzeugen zum Probetransport

Unter Umständen müssen Proben in weiterer Umgebung erhoben werden, so dass der Einsatz eines Fahrzeuges nötig ist. Dieses muss nötigenfalls mit Kühleinrichtungen ausgerüstet sein, so dass die unter 3.3.1 festgehaltenen allgemeinen Anforderungen erfüllt sind. Ist ein solches Fahrzeug mit einem Kühlschrank ausgerüstet, so sollte die Kühlung auch gewährleistet sein, wenn das Fahrzeug stillsteht. Bevor die erste Probe in den Kühlschrank überführt wird, ist zu überprüfen, dass die benötigte Betriebstemperatur (in der Regel ≤ 5 °C) erreicht ist. Werden an mehreren Standorten Proben erhoben, so ist die Temperatur der Kühleinrichtung jedes Mal zu messen und festzuhalten. Es muss eine zur Temperaturmessung geeignete und kalibrierte Einrichtung (z. B. Infrarotthermometer, Temperaturlogger) eingesetzt werden.

Im Fahrzeug müssen die zur Probenahme geeigneten und sterilen Behältnisse und Instrumente wie auch die zur eindeutigen Kennzeichnung von Proben benötigten Utensilien vorhanden sein.

Für den Fall, dass ein im Fahrzeug installierter Kühlschrank den Dienst versagt oder die benötigte Kühlleistung nicht erbringt, muss das entsprechende Vorgehen verbindlich geregelt sein.

In Fällen, wo nicht sicher beurteilt werden kann, ob in einer ungekühlten Probe eine Keimvermehrung erfolgen kann, sind vorsorglich alle zum bakteriologischen Untersuchungen erhobenen Proben bei ≤ 5 °C zu kühlen.

Wird Gefriergut erhoben, ist sicherzustellen, dass dieses bis zum Eintreffen im Prüflabor gefroren bleibt. Dies kann beispielsweise durch eine im Fahrzeug eingebaute Tiefkühleinrichtung oder Mitführen ausreichender Mengen Trockeneis bewerkstelligt werden.

3.4 Probenversand

Häufig erhalten Laboratorien Proben von Kunden zugestellt, sei es durch Kurier oder per Post. Falls Mängel festgestellt werden, sollte dies den Kunden mitgeteilt werden. Proben sind derart zu versenden, dass der mikrobielle Status nicht verändert werden kann. Konkret heisst dies, dass Kontaminationen aus der Umwelt durch Verwendung entsprechender Probebehälter und geeignetem Verpackungsmaterial ausgeschlossen werden müssen. Falls nötig, ist durch Massnahmen wie Kühllhaltung zu verhindern, dass während des Versandes ein Keimwachstum in Proben stattfinden kann.

3.5 Probeneingang und erste Beurteilung

Bei von der Prüfstelle in Empfang genommenen Proben ist, falls relevant, die Temperatur zu messen und zu protokollieren. Weiter ist festzuhalten, ob die Probenmenge ausreichend ist, die Probebehälter intakt sind und Kontaminationen durch die Umwelt ausgeschlossen werden können. Falls hinsichtlich dieser Punkte Abweichungen festgestellt werden, ist Rücksprache mit dem Auftraggeber zu nehmen, das Ausführen der Analyse zu verweigern und neues Probenmaterial zu verlangen (15). Falls dies nicht möglich ist und trotzdem eine Analyse vorgenommen werden muss, darf der Prüfbericht nur unter Vorbehalt und Vermerk der beim Probeneingang festgestellten Mängel abgegeben werden (15).

Beim Eingang der Proben werden diese mit einer eindeutigen, laboreigenen Bezeichnung versehen. Das verwendete System muss so ausgelegt sein, dass jederzeit die Rückführbarkeit auf die ursprüngliche Bezeichnung der Probe durch den Auftraggeber oder Kunden gewährleistet ist. Die Bezeichnung muss auch sicherstellen, dass in den folgenden Untersuchungsschritten jegliche Verwechslung ausgeschlossen ist. Ebenso ist das Eingangsdatum und, falls relevant, die Eingangszeit zu protokollieren.

3.6 Probenlagerung

In Räumlichkeiten, wo Proben entgegengenommen, gelagert und weiterverteilt werden, sollten die Platzverhältnisse so ausgelegt sein, dass die zum Ausschluss von Verwechslungen benötigte Übersichtlichkeit gewährleistet ist. Die Innenluft darf (z. B. durch Lüftungen, Ventilatoren, Klimaanlage, anderes gelagertes Material) nicht derart beeinträchtigt werden, dass relevante Kontaminationen von Proben möglich sind oder ein anderer, verfälschender Einfluss auf die Analyse besteht. Dies gilt insbesondere für Proben aus dem Bereich der Primärproduktion. Unter Umständen ist eine Risikobeurteilung unter Einbezug von Keimzahlbestimmungen in der Innenluft vorzunehmen.

Proben sind bis zur Untersuchung sachgerecht zu lagern. Bei mikrobiell verderblicher Ware darf die Kühlkette nur so lange unterbrochen werden, als es für die Eingangskontrolle und Kodierung durch die Prüfstelle nötig ist.

Werden Proben aufgeteilt (beispielsweise für mikrobiologische und chemische Untersuchungen), so darf dabei der mikrobiologische Status nicht verändert werden (siehe 4.1).

Proben, in denen die Vermehrung von Bakterien erwartet werden muss, sollten möglichst innerhalb von 24 Stunden nach Eintreffen in der Prüfstelle untersucht werden. Bei längerer Lagerung unter Kühlung besteht die Gefahr, dass sich psychrotrophe Mikroorganismen vermehren oder gewisse Keimarten absterben.

Für den Fall einer Wiederhol- oder Zweitanalyse sind Proben so zu lagern, dass sie nicht

durch andere Proben kontaminiert werden können und sich der mikrobielle Status nicht verändert. Dabei ist zu bedenken, dass sich manche Keime wie z.B. Listerien auch bei Kühlschranktemperaturen vermehren können.

4. Vorbereitung zur Analyse

Vielfach beginnt erst hier die „eigentliche Laborarbeit“. Für die Beschreibung der einzelnen Schritte (Probensplitting, Entnahme des Untersuchungsgutes und Herstellung der Ausgangssuspension) gibt es viele Beispiele in der Literatur. An dieser Stelle werden in erster Linie folgende internationale Normen als Referenz verwendet: ISO 7218 (15), ISO 6887-1,-2,-3 & -4 (16), ISO 8261 (17).

4.1 Probensplitting

Werden von einer Probe mikrobiologische und chemische Analysen verlangt, so muss das notwendige Probensplitting zwingend unter aseptischen Bedingungen erfolgen, d. h. die Entnahme des Untersuchungsgutes für die mikrobiologische Analyse findet zuerst statt. Bis zum Splitting muss die Probe so gelagert werden, dass der mikrobielle Status nicht verfälscht wird. Entsprechendes gilt für Rückstellmuster.

Dabei ist zu beachten, dass die chemischen Analyten nicht verändert werden (z. B. Analyse auf flüchtige Verbindungen oder Malachitgrün).

4.2 Entnahme des Untersuchungsgutes

Von der Probe [„laboratory sample“, ISO 7002 (18)], die ins Labor gesendet wird, wird in der Regel ein Teil in der Analyse eingesetzt. Dies wird im Folgenden „Untersuchungsgut“ genannt [„test portion“, ISO 7002 (18)].

Grundsätzlich werden aseptische Techniken verwendet.

Sofern keine speziellen anderen Anforderungen bestehen, werden tiefgekühlte Proben bei max. 37 °C so schnell wie möglich aufgetaut und untersucht (9).

Bei inhomogenen Proben sollte das Untersuchungsgut derart entnommen werden, dass die unterschiedlichen Komponenten wenn möglich entsprechend ihren Anteilen berücksichtigt werden (z. B. Weichkäse mit genussfertiger Rinde: 10 % Rinde und 90 % Teig). Es sind aber auch andere Anteilszusammensetzungen möglich, je nach Zielsetzung der Untersuchung. Daher muss grundsätzlich zwischen dem Auftraggeber und dem Labor eine Vereinbarung bestehen, welche Anteile der Probe untersucht werden sollen.

Manchmal ist es üblich, dass Proben gepoolt werden. So werden z. B. bei der bakteriologischen Untersuchung von Schlachtkörpern vor der Analyse die von den verschiedenen Stellen entnommenen Proben des zu erprobenden Schlachtkörpers entsprechend gepoolt und eine einzige Analyse durchgeführt (11).

Die Analyse von Poolproben kann allerdings problematisch werden, falls das Vorgehen nicht festgelegt ist oder keine Absprache mit dem Auftraggeber besteht. Für die Interpretation des Resultates ist es wichtig, dass ein genauer Beschrieb der Probenzusammensetzung vorliegt.

Von inhomogenen Proben werden nach Möglichkeit mindestens 40 g entnommen, von homogenen Proben mindestens 10 g oder 10 ml (je nach Angaben des spezifischen Probenvorbereitungs-Standards).

Werden qualitative Methoden verwendet, sollten in der Regel mindestens 25 g entnommen werden (5, 19).

4.3 Herstellung der Ausgangssuspension

Zur Herstellung der Ausgangssuspension ist in der Regel ein Homogenisierungsschritt (Ausnahme: homogene Flüssigkeiten) mit dem entnommenen Untersuchungsgut und ein Verdünnungsschritt mit einer Verdünnungslösung notwendig. Die daraus resultierende Ausgangssuspension ist meistens eine 1:10 Verdünnung (in der Regel 10 g oder ml homogenes Untersuchungsgut + 90 g oder ml Verdünnungslösung).

Die Ausgangssuspension wird entweder als Erstanreicherungsmedium verwendet (qualitative Verfahren), oder es werden aus ihr weitere dezimale Verdünnungen hergestellt (quantitative Verfahren).

Hinsichtlich Homogenisation und Verdünnung sind ebenfalls die relevanten Normen zu konsultieren (v.a. 15, 16, 17). Dabei ist besonders zu beachten, dass je nach Matrix und Untersuchungskeim unterschiedlich verfahren werden kann oder sogar muss. Beispiele sind das Schmelzen von Butter (17), die Verwendung von Natriumcitrat bei der Verdünnung von Käse (17) oder die Verwendung spezieller Erstanreicherungsmedien beim Salmonellennachweis von Kakao und kakaohaltigen Produkten sowie sauren oder säuernden Produkten (20). Werden Lebensmittelzusätze untersucht, die inhibitorische Substanzen (z.B. Zwiebelpulver, Knoblauch, Oregano, Pfeffer, bestimmte Teesorten und Kaffee) enthalten, so müssen grössere Verdünnungen (z. B. 1/100 für Zimt und Oregano, 1/100 für Gewürznelken) verwendet werden oder K₂SO₄ zum gepufferten Peptonwasser zu einer Endkonzentration von 0.5 % zugegeben werden (16, part 4).

Key words

Microbiology; pre-analytic; sampling; food-control; guideline

5. Literatur

- 1: Europäische Union: Guidance Document on official controls, under Regulation (EC) No 882/2004, concerning microbiological sampling and testing of foodstuffs, 2006
- 2: Das Eidgenössische Departement des Innern: Verordnung des EDI über den Vollzug der Lebensmittelgesetzgebung vom 23. November 2005 (SR 817.025.21). Bundesamt für Bauten und Logistik, 3003 Bern.
- 3: Das Eidgenössische Departement des Innern: Verordnung des EDI über die Kennzeichnung und Anpreisung von Lebensmitteln vom 23. November 2005 (LKV, SR 817.022.21). Bundesamt für Bauten und Logistik, 3003 Bern.
- 4: Der Schweizerische Bundesrat: Verordnung über die Probenerhebung von Lebensmitteln und Gebrauchsgegenständen vom 4. Juni 1984, Stand am 1. Juli 1995 (Probenerhebungsverordnung; PEV; SR 817.94; ausser Kraft gesetzt). Bundesamt für Bauten und Logistik, 3003 Bern.
- 5: Das Eidgenössische Departement des Innern: Hygieneverordnung des EDI vom 23. November 2005 (HyV; SR 817.024.1). Bundesamt für Bauten und Logistik, 3003 Bern.
- 6: International Commission on Microbiological Specifications for Foods (ICMSF): Microorganisms in Foods 2 - Sampling for microbiological analysis: Principles and specific applications. Second edition, 1986. University of Toronto Press, Toronto, Canada

- 7: Pichhardt, K: Lebensmittelmikrobiologische Grundlagen für die Praxis. Kapitel 4, Stichprobenpläne - Produktklassifizierung, Seiten 235 bis 256. Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York, 1998 (ISBN: 3-540-63380-4).
- 8: Bundesamt für Gesundheit: Schweizerisches Lebensmittelbuch, Kapitel 56 "Mikrobiologie", Ausgabe 1985. Bundesamt für Logistik und Bauten.
- 9: Bundesamt für Gesundheit: Kapitel 56 "Mikrobiologie", Neuausgabe 2000, Überarbeitung 2004. In: Schweizerisches Lebensmittelbuch 2005. Bundesamt für Bauten und Logistik, 3003 Bern (http://www.bag-anw.admin.ch/SLMB_Online_PDF/Start.pdf).
- 10: Baumgart, J. & B. Becker: Mikrobiologische Untersuchung von Lebensmitteln. Behr's Verlag, Hamburg, Deutschland, Loseblatt-Ausgabe (1994, laufende Aktualisierungen).
- 11: ISO 17604:2003: Microbiology of food and animal feeding stuffs - Carcass sampling for microbiological analysis.
- 12: ISO 18593:2004: Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal methods for sampling techniques from surfaces using contact plates and swabs.
- 13: ISO 707 | IDF 50:2008: Milk and milk products - Guidance on sampling.
- 14: ISO 7218:1996: Microbiology of food and animal feeding stuffs - General rules for microbiological examinations.
- 15: ISO 7218:2007: Microbiology of food and animal feeding stuffs - General requirements and guidance for microbiological examinations.
- 16: ISO 6887-1,-2,-3 -4 : Microbiology of food and animal feeding stuffs: Preparation of test samples, initial suspensions and decimal dilutions for microbiological examination.
Part 1: General rules for the preparation of the initial suspension and decimal dilution (1999).
Part 2: Specific rules for the preparation of meat and meat products (2003).
Part 3: Specific rules for the preparation of fish and fishery products (2003).
Part 4: Specific rules for the preparation of products other than milk and milk products, meat and meat products, and fish and fishery products (2003).
- 17: ISO 8261:2001: Milk and milk products: General guidance for the preparation of test samples, initial suspensions and decimal dilutions for microbiological examination.
- 18: ISO 7002:1986: Agricultural food products - layout for a standard method of sampling from a lot.
- 19: Europäische Union: Verordnung (EG) Nr. 2073/2005 der Kommission vom 15. November 2005 über mikrobiologische Kriterien für Lebensmittel.
- 20: ISO 6579:2002: Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the detection of *Salmonella* spp.

6. Änderungen in der aktuellen Ausgabe

Departementsbezeichnung EVD durch WBF ersetzt.