

Im Folgenden erhalten Sie einen Auszug aus dem am 26. Januar 2012 fertiggestellten

## Gutachten

### über vergleichende Untersuchungen zur Erfassung einer vorschriftsmäßigen Reinigung in Lebensmittelbetrieben mittels der Orion Clean Card® PRO und der ATP- Biolumineszenzmessung mittels HY-LITE® 2 - System

von Univ.-Prof. Dr. med. vet. Michael Bülte,  
Dipl. ECVPH  
Fachtierarzt (FTA) für Mikrobiologie  
FTA für Lebensmittelhygiene  
FTA für Fleischhygiene und Schlachthofwesen  
FTA für Milchhygiene

sowie einen Auszug aus der Publikation in der RFL - Rundschau für Fleischhygiene und Lebensmittelüberwachung - Ausgabe 1/2013

### Kontrolle der ordnungsgemäßen und rückstandslosen Reinigung in Lebensmittelunternehmen mit der Orion Clean Card® PRO

von Sonja Schmidt, Michael Bülte, Kim Nguyen  
Institut für Tierärztliche Nahrungsmittelkunde der Justus-Liebig-Universität Gießen  
Frankfurter Straße 92, 35392 Gießen

Wollen Sie das komplette Gutachten und mehr erfahren, so nehmen Sie bitte mit uns direkt Kontakt auf.  
Senden Sie uns bitte eine email oder rufen Sie uns an.

## GUTACHTEN

---

über vergleichende Untersuchungen zur Erfassung einer vorschriftsmäßigen Reinigung in Lebensmittelbetrieben mittels der Orion Clean Card<sup>®</sup> PRO und der ATP - Biolumineszenzmessung mittels HY-LiTE<sup>®</sup> 2 - System

Vorgelegt von

**Univ.-Prof. Dr. med. vet. Michael Bülte,**

**Dipl. ECVPH**

Fachtierarzt (FTA) für Mikrobiologie

FTA für Lebensmittelhygiene

FTA für Fleischhygiene und Schlachthofwesen

FTA für Milchhygiene

Unter Mitarbeit von

**Tierärztin Sonja Schmidt**

26. Januar 2012

Gießen

## Inhaltsverzeichnis

<b>1. Zusammenfassung</b> .....	<b>1</b>
<b>2. Einleitung</b> .....	<b>3</b>
<b>3. Material und Methoden</b> .....	<b>5</b>
3.1. Probenahmetechnik .....	5
3.1.1. Orion Clean Card® PRO .....	5
3.1.2. HY-LiTE® 2-System .....	7
3.2. Funktionstests .....	9
3.3. Voruntersuchungen.....	10
3.3.1. Flächen.....	10
3.3.2. Kontaminationssubstanzen .....	11
3.3.3. Herstellung der Substanzen .....	11
3.3.4. Durchführung der Vorversuche.....	12
3.4. Weitere Laboruntersuchungen .....	12
3.4.1. Untersuchungen zur Proteinmengenzuordnung .....	12
3.4.2. Untersuchungen zu Rückständen von Reinigungsmitteln .....	13
3.5. Feldversuche .....	15
3.5.1. Betriebe .....	15
3.5.2. Probeentnahmestellen.....	16
3.5.3. Zeitpunkt der Probeentnahme .....	16
3.6. Statistische Auswertung.....	16
<b>4. Ergebnisse</b> .....	<b>18</b>
4.1. Ergebnisse der Vorversuche .....	18
4.1.1. Orion Clean Card® PRO .....	18
4.1.2. HY-LiTE® 2-System .....	22
4.2. Ergebnisse der weiteren Laboruntersuchungen.....	22
4.2.1. Ergebnisse der Versuche zur Proteinmengenzuordnung .....	22
4.2.2. Ergebnisse der Versuche zu Rückständen von Reinigungsmitteln.....	23
4.3. Ergebnisse der Feldversuche .....	26
4.4. Statistische Auswertung.....	28
4.4.1. Vorversuche .....	28
4.4.2. Proteinmengenzuordnung .....	30
4.4.3. Feldversuche .....	30
<b>5. Diskussion</b> .....	<b>34</b>
5.1. Ergebnisse der Vorversuche .....	34
5.2. Ergebnisse der weiteren Laboruntersuchungen.....	34

5.2.1. Ergebnisse der Versuche zur Proteinmengenzuordnung .....	34
5.2.2. Ergebnisse der Versuche zu Rückständen von Reinigungsmitteln.....	35
5.3. Ergebnisse der Feldversuche .....	35
5.4. Praktische Anwendbarkeit.....	36
5.5. Abschließende Empfehlung .....	37
<b>6. Literatur .....</b>	<b>38</b>

**Anhang I:** Ergebnistabelle der vergleichenden Untersuchungen zur Erfassung einer ordnungsgemäßen Reinigung im Rahmen von Feldversuchen

**Anhang II:** Ausgewählte Abbildungen abweichender Farbreaktionen der Orion Clean Card® PRO

# 1. Zusammenfassung

Im Zuge des neuen EU-Lebensmittelhygienerechts ergibt sich für die Lebensmittelunternehmer die Verpflichtung zu betrieblichen Eigenkontrollen, und auch zum Nachweis einer ordnungsgemäßen Reinigung. Dazu sind schnelle, kostengünstige Verfahren wünschenswert. Dieses ergibt sich insbesondere vor dem Erfordernis einer möglicherweise erforderlichen Nachreinigung.

Eine Möglichkeit zur Kontrolle der ordnungsgemäßen Reinigung liegt im Nachweis von Proteinrückständen mit der Orion Clean Card<sup>®</sup> Pro. In eigenen Untersuchungen zur Evaluierung dieses Systems wurden Untersuchungsserien durchgeführt.

In ersten Voruntersuchungsansätzen zeigte sich, dass artifiziell aufgebraachte Verschmutzungen sowie deren ordnungsgemäße Beseitigung (= Reinigung) verlässlich und unabhängig von der Beschaffenheit der jeweiligen Oberflächen mit der Orion Clean Card<sup>®</sup> Pro nachzuweisen waren. Diese Zuverlässigkeit des Proteinnachweises wird u. a. durch die im Rahmen der Vorversuche statistisch ermittelte Sensitivität von 91,1 – 99,9 % bestätigt. Die Vergleichbarkeit mit dem etablierten System der Biolumineszenzmessung mittels HY-LiTE<sup>®</sup> 2-System wurde im Rahmen von Feldversuche erfolgreich nachgewiesen. Die Anzahl der durchgeführten Untersuchungen beläuft sich auf n= 361, welche sich auf neun verschiedene Lebensmittelbetriebe wie folgt verteilen: Betrieb A (Käserei 1): n=50; Betrieb B (Käserei 2): n=30 ; Betrieb C (Großküche 1): n=5 ; Betrieb D (Zerlegebetrieb): n=38; Betrieb E (Dönerspießherstellung): n=10; Betrieb F (Großküche 2): n=48; Betrieb G (Metzgerei 1): n=52; Betrieb H (Metzgerei 2): n=47; Betrieb I (Backstube): n=30. Anhand der Ergebnisse der Feldversuche konnte unter Bezugnahme auf das HY-LiTE<sup>®</sup> 2-System eine **Sensitivität von 79,6% bis 90,5%** und eine **Spezifität von 72,5% bis 85,1%**.für die Orion Clean Card<sup>®</sup> PRO errechnet werden.

Die Orion Clean Card® PRO ist anwenderfreundlich und zeichnet sich durch schnelle Durchführung und Auswertung aus. Das Ergebnis ist bereits nach etwa 30 Sekunden ablesbar und anhand der mitgelieferten Referenzskala einfach zu interpretieren. Dabei sind gelegentlich auftretende Farbabweichungen, verursacht durch Rückstände von Reinigungsmitteln, zu berücksichtigen, da diese nicht den regulären Auswertemodalitäten entsprechen (siehe Anhang II).

Das ebenfalls auf der Referenzskala Skala enthaltene Zentimetermaß (10 cm) ermöglicht eine definierte Begrenzung der Probenahme­fläche, falls dieses erforderlich sein sollte. Das Testsystem ist kostengünstig, da neben dem Aufwand für die Verbrauchsmaterialien keine weiteren Ausgaben anfallen.

**Insgesamt erwies sich somit das Orion Clean Card® Pro-System als sehr gut für die Kontrolle einer ordnungsgemäßen Reinigung geeignet.**

## 2. Einleitung

Mit der Neuordnung des EU-Hygienerichts wurde die Verantwortung für die Sicherheit der Lebensmittel den Lebensmittelunternehmern übertragen (VO EG Nr. 178/2002 Art. 17 (1) und VO EG Nr. 852/2004 Kap. I Art. 1 (1)a)). Diese Sicherheit soll nicht nur im Rahmen von Endproduktkontrollen, sondern vor allem auch durch Eigenkontrollen im Bereich der Prozesshygiene während der Verarbeitung von Lebensmitteln gewährleistet werden.

Der Reinigung (und gegebenenfalls Desinfektion) sowie deren Kontrolle kommt dabei eine wesentliche Bedeutung zu. Wichtig ist ein schnell verfügbares Ergebnis, da die Lebensmittelproduktion häufig direkt im Anschluss an den Reinigungsprozess oder am nächsten Tag wieder aufgenommen wird. Hier liegt der Vorteil der Schnellnachweisverfahren gegenüber der aufwendigeren mikrobiologischen Untersuchung, bei welcher das Ergebnis erst nach 1-3 Tagen vorliegt (DIN 10113-1, DIN 10113-2 und DIN 10113-3).

Zurzeit sind mehrere Schnelltestsysteme zur Kontrolle der Sauberkeit von Oberflächen verfügbar. Diese Schnelltests liefern keinen direkten Nachweis von Mikroorganismen, sondern sie zeigen die Anwesenheit von Verschmutzungen in Form von Produktrückständen an, welche eine Nährstoffgrundlage für das Wachstum von Mikroorganismen darstellen. Solche Rückstände können auch auf makroskopisch sauber erscheinenden Flächen vorhanden sein. Im Falle eines positiven Testergebnisses kann eine sofortige Nachreinigung der betroffenen Flächen erfolgen.

Die Schnelltests basieren auf dem Nachweis von Lebensmittelrückständen, zum Beispiel in Form von Zellbestandteilen. Eine solche etablierte Methode ist das Biolumineszenzverfahren, mit dem Adenosintriphosphat (ATP) nachgewiesen wird. Dies ist ein Stoffwechselprodukt sowohl somatischer als auch mikrobieller Zellen. Die ATP-Biolumineszenzmessung basiert auf der Oxidation des Leuchtkäfer-Luciferins zu Oxyluciferin. Diese Reaktion wird durch das Enzym Luciferase ermöglicht und ist ATP-abhängig. Die dabei auftretende Lichtemission kann in einem Luminometer gemessen werden. Auf diese Weise kann sowohl intra- als auch extracellulär gelegenes ATP quantitativ nachgewiesen werden (KIRCHNER et al., 1996). Auf diesem Prinzip beruht u.a. das HY-LiTE® 2 System (Merck), das in en eigenen Untersuchungen vergleichend mitgeführt werden sollte. Es besteht aus einem

Probenahmetupfer, einem „Sampling Pen“ mit Spüllösung und einer Reagenzkammer für das ATP-umsetzende Luciferin/Luciferase-Enzym-Substrat-Gemisch und einem Luminometer. Die bei dieser Reaktion emittierte Lichtmenge wird über einen Photomultiplier (= Luminometer) in Relativen Lichteinheiten (Relative Light Units, RLU) angegeben.

Eine weitere, alternative Methode besteht im Nachweis von Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid (-Phosphat) (NAD(P)/NAD(P)H), welches ebenfalls und ähnlich dem ATP ein Bestandteil lebender Zellen ist (GOLL et al., 2003).

Eine andere Möglichkeit zur Detektion von Verschmutzungen im Lebensmittelbereich ist der Nachweis von Proteinrückständen. Darauf beruht das Nachweisprinzip der zu evaluierenden Orion Clean Card® PRO. Das Testergebnis zeigt sich in einem Farbumschlag, dessen Intensität eine semiquantitative Bestimmung von Proteinrückständen ab ca. 50 µg auf der untersuchten Fläche erlaubt. Dazu wird der perforierte Teil der Orion Clean Card® PRO über die zuvor angefeuchtete Probenfläche von 10 cm x 10 cm gewischt. Das Ergebnis ist nach etwa 30 Sekunden ablesbar. Die Auswertung erfolgt anhand einer mitgelieferten Referenzskala.

In den eigenen Untersuchungen sollte die Orion Clean Card® PRO mit dem HY-LiTE® 2-System vergleichend eingesetzt werden. Dazu wurden entsprechende Voruntersuchungsserien an artifizeill kontaminierten, für den Lebensmittelbereich typischen Oberflächen durchgeführt. In anschließenden Feldversuchen wurden unterschiedliche Lebensmittelbetriebe einbezogen.

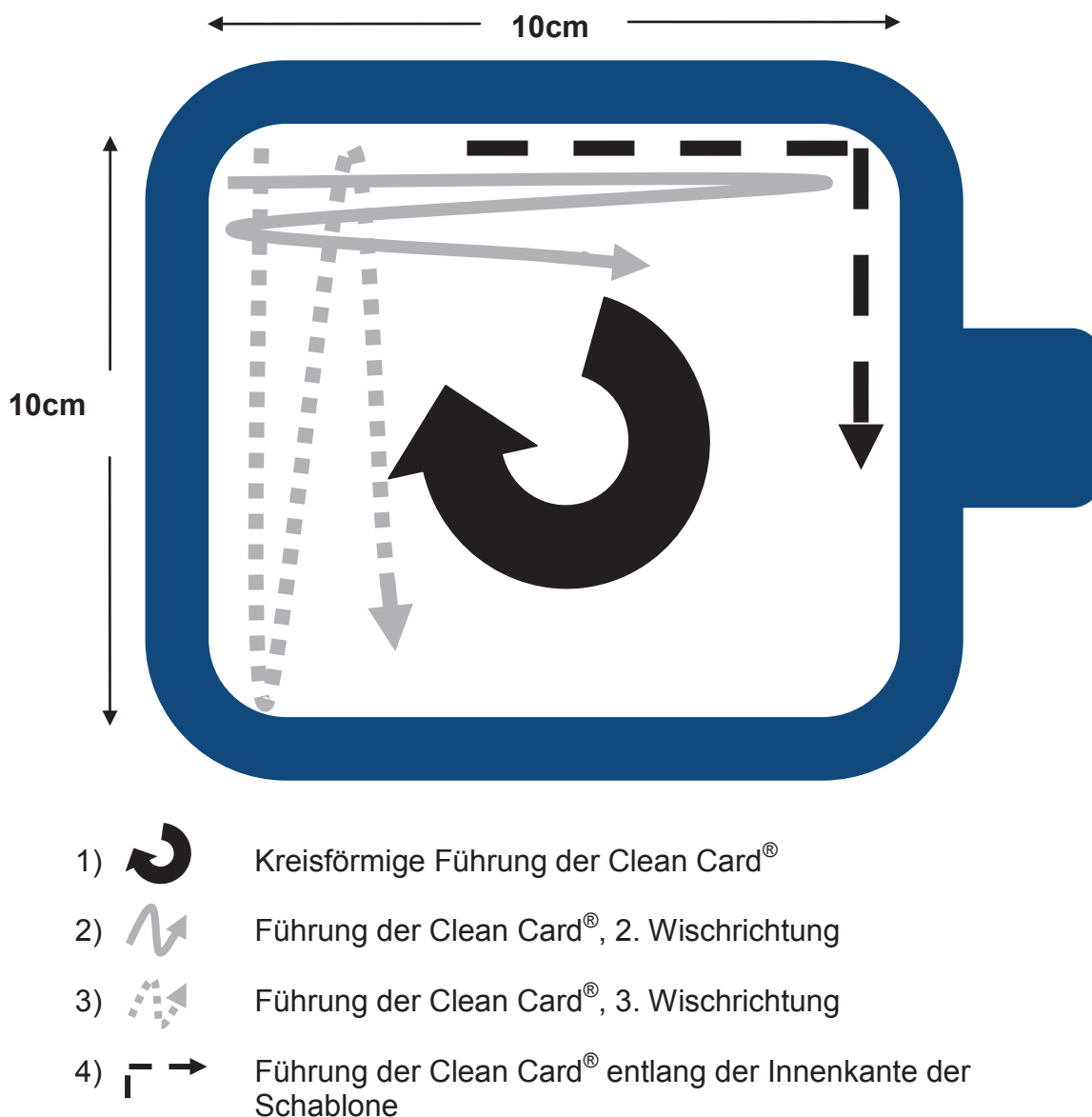


### 3. Material und Methoden

#### 3.1. Probenahmetechnik

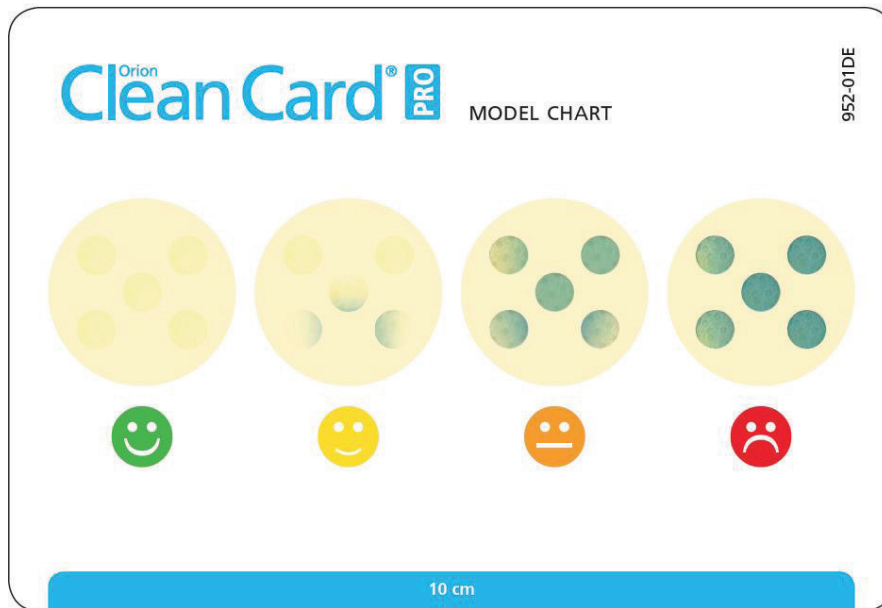
##### 3.1.1. Orion Clean Card® PRO

Die Clean Card® wurde, nachdem die Beprobungsfläche mit zwei Sprühstößen Wasser aus der mitgelieferten Sprühflasche befeuchtet wurde, zunächst zehnmal unter festem Druck kreisförmig über die Probenfläche gewischt. Danach wurde sie mäanderförmig fünfmal von oben nach unten und fünfmal von links nach rechts, sowie abschließend einmal entlang der Innenkanten der Schablone geführt (siehe Abbildung 1).



**Abbildung 1: Schematische Darstellung der Probenahme mit der Orion Clean Card® PRO**

Die **Auswertung** erfolgt direkt im Anschluss an die Probenahme, da der Farbwechsel nach ca. 30 Sekunden eintritt. Die Bewertung der Farbreaktion erfolgte anhand der Abbildungen auf der mitgelieferten Referenzskala (siehe Abbildung 2) Die dort angegebenen Smileys zeigen eine semiquantitative Abstufung von negativ bis hin zu dreifach positiv, die durch Farbgebung im Sinne einer Ampel von grün zu rot unterlegt ist. Für die Angabe der eigenen Ergebnisse wurde die Abstufung in “-“ , “+“ , “++“ und “+++“ zugrunde gelegt. (siehe Tabelle 1)



**Abbildung 2: Referenzskala der Orion Clean Card® PRO**

**Tabelle 1: Bewertung des Farbwechsels der Orion Clean Card® PRO**

Bewertung	Farbe der Testfläche	Einstufung laut Model Chart	Auswertung
-	Gelb, kein Farbwechsel	Grün	sauber
+	Hellblau bis blau, Farbwechsel nur an wenigen Stellen der Testfläche	Gelb	„grenzwertig“
++	Blau bis Blaugrün, Farbwechsel auf dem größten Teil der Testfläche	Orange	} nicht sauber
+++	Blau bis Blaugrün, Farbwechsel auf der gesamten Testfläche	Rot	

Als negativ zu bewerten ist die Untersuchung, wenn sich die Testfläche der Clean Card® nicht verfärbt und somit gelb bleibt. Auf der Oberfläche war in diesem Fall kein Protein nachweisbar, und sie gilt somit als sauber. Verfärbt sich die Testfläche geringgradig blau, so ist Protein in geringen Mengen auf der Oberfläche vorhanden

und wird als einfach positiv (“+“) bewertet. In diesem Fall liegt es im Ermessen des Untersuchers, ob die Fläche nachgereinigt werden sollte oder nicht. Verfärbt sich ein größerer Teil der Testfläche tiefblau bis dunkelblau oder grünblau, so ist der Test je nach Farbintensität und Ausbreitung des Farbwechsels auf der Testfläche als zweifach positiv (“++“) oder als dreifach positiv (“+++“) zu bewerten.

Bei einigen Untersuchungen entstanden Farbwechsel nach himmelblau, helltürkis oder hellgrün. Dieses kann geschehen, wenn auf der Oberfläche **Rückstände des Reinigungsmittels** verbleiben. Dieser Farbwechsel unterscheidet sich in der Intensität von denjenigen Farbreaktionen, die aufgrund eines Proteinnachweises erkennbar sind. Nach 2 bis 5 Minuten kam es bei dem durch Rückstände von Reinigungsmitteln hervorgerufenen Farbreaktionen zu einer Aufhellung, teilweise entfärbte sich das Testfeld wieder. Im Gegensatz dazu waren die Farbreaktionen, die durch Protein entstanden, nach dieser Zeit noch in ihrer vollen Intensität sichtbar. Diese himmelblau, helltürkis oder hellgrün verfärbten Tests wurden daher als negativ bewertet.

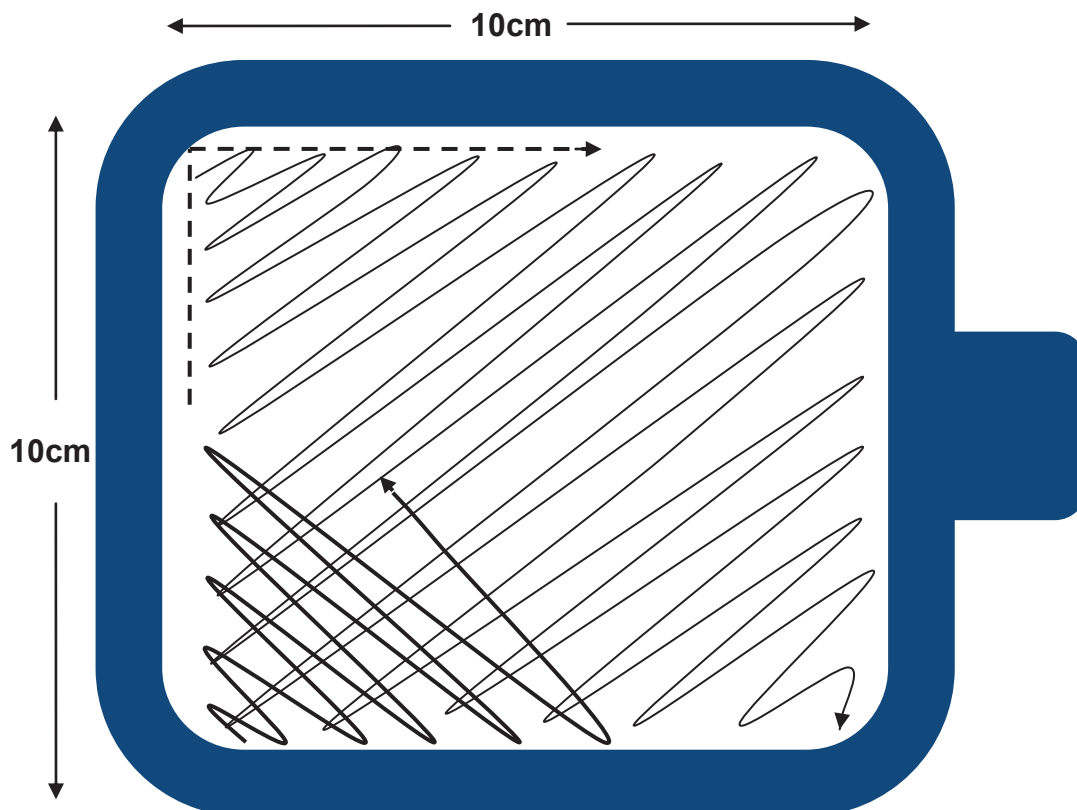
Ursprünglich war für alle Oberflächen eine einheitliche Beprobungstechnik vorgesehen. Aufgrund der während der Voruntersuchungen gewonnenen Erfahrungen wurde die Vorgehensweise für Aluminiumflächen modifiziert, da auf dieser bei starker Reibung durch Aluminiumabrieb eine Schwarzfärbung der Clean Card<sup>®</sup>-Testfläche entstehen konnte. Auf diesen Flächen wurden die kreisförmigen Wischbewegungen unter geringerem Druck ausgeführt und anstelle der mäanderförmigen Wischtechnik wurde die Clean Card<sup>®</sup> mäanderförmig aufgetupft.




### **3.1.2. HY-LiTE<sup>®</sup> 2-System**

Das HY-LiTE<sup>®</sup> 2-System besteht aus einem ATP-freien Tupfer, einem „Sampling-Pen“ und dem Luminometer-Gerät. Der „Sampling-Pen“ enthält Spüllösung, Probenstift und eine Reagenzkammer mit dem Luciferin/Luciferase-Gemisch.

Der Tupfer wurde durch Eintauchen in die Spülflüssigkeit angefeuchtet und unter ständiger Rotation und gleichmäßigem Druck mäanderförmig und diametral versetzt jeweils fünfzehnmal über die gesamte, von der Schablone begrenzte Fläche geführt (siehe Abbildung 3). Anschließend wurde der Tupfer 10 Sekunden lang in der Spülflüssigkeit unter rotierenden Bewegungen ausgewaschen. Zur Aufnahme einer definierten Flüssigkeitsmenge wurde der Probenstift eine Sekunde lang so tief in die Spülflüssigkeit getaucht, dass die Rillen des Stiftes vollständig benetzt wurden.

Danach wurde der Stift durch Aufsetzen auf eine feste waagerechte Oberfläche in die Küvettenkammer hineingedrückt. Das Oberteil des Pens wurde unter Druck im Uhrzeigersinn bis zum Anschlag gegen das Unterteil gedreht und die Küvettenflüssigkeit mit dem Reagenzgemisch durch zehnmaliges kräftiges Schütteln bis zur Schaumbildung vermischt. Sofort im Anschluss erfolgte die Messung im Luminometer.



- 1)  Führung des HY-LiTE<sup>®</sup> - Tupfers, 1. Ausstrichrichtung
- 2)  Führung des HY-LiTE<sup>®</sup> - Tupfers, 2. Ausstrichrichtung
- 3)  Führung des HY-LiTE<sup>®</sup> - Tupfers entlang der Innenkante der Schablone

**Abbildung 3: Schematische Darstellung der HY-LiTE<sup>®</sup> - Tupferführung**

Das Luminometer zeigt Werte zwischen 0 und 99.000 RLU an. Stärkere Lichtemissionen werden als nicht messbar gemeldet. Die Interpretation der Werte gestaltet sich schwierig, da der Hersteller keine absoluten Grenzwerte vorgibt, um die RLU-Ergebnisse zu klassifizieren. Er spricht lediglich Empfehlungen für Richtwerte

aus, die jedoch in Abhängigkeit der einzubeziehenden Beprobungsflächen (-objekte) anzupassen sind.

Für einen Methodenvergleich bei dieser Studie erschien die Einführung eines Grenzwertes mit der eindeutigen Zuordnung "sauber" oder "nicht sauber" zweckmäßig. Aufgrund der eigenen Erfahrungen in vorangegangenen Untersuchungen wurde der Grenzwert für die Vorversuche, bei denen die Flächen unter Laborbedingungen einen vergleichsweise geringen Gehalt an artifizieller Verschmutzung aufwiesen, bei 100 RLU festgesetzt, während unter Feldbedingungen die Grenze bei 500 RLU gesetzt wurde.

### **3.2. Funktionstests**

Im Vorfeld der Versuche wurde mit dem HY-LiTE<sup>®</sup> 2 System ein Funktionstest durchgeführt. Dazu wurde aus einer ATP-Lösung (1 ng/ml, Merck) mit sterilem destillierten Wasser eine dekadische Verdünnungsreihe hergestellt. Die unterschiedlichen ATP-Konzentrationen (1,0 ng/ml; 0,1 ng/ml; 0,01 ng/ml und 0,001 ng/ml), sowie steriles destilliertes Wasser als Negativkontrolle wurden im Doppelansatz untersucht, um die Funktionsfähigkeit des Gerätes sowie die Wiederholbarkeit der Messwerte zu bestätigen.

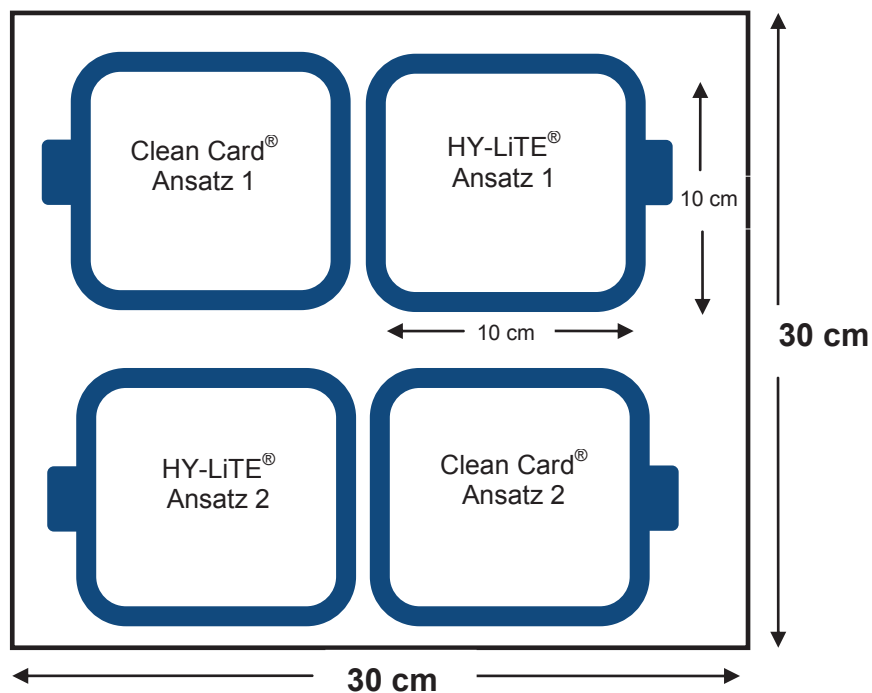
Mit der Orion Clean Card<sup>®</sup> PRO wurde ein Versuch zur Bestätigung der Nachweisgrenze durchgeführt. Zu diesem Zweck wurde eine Verdünnungsreihe von Bovinem Serumalbumin (Albumin Fraktion V, Fa. Carl Roth) in sterilem destillierten Wasser hergestellt. Der Versuch wurde auf einer Edelstahloberfläche durchgeführt, welche zuvor, wie in [3.3.4.](#) beschrieben, gereinigt wurde. Die Begrenzung der Beprobungsfläche von 100 cm<sup>2</sup> wurde durch die in [3.3.1.](#) beschriebenen Kunststoffschablonen gewährleistet. Die erste Untersuchung erfolgte auf der gereinigten Oberfläche und diente als Blindwert. Die jeweilige Albuminlösung wurde nun auf zwei benachbarte Flächen ausgebracht. Die erste Fläche wurde sofort im Anschluss an das Ausbringen der Kontamination untersucht, auf der zweiten Fläche wurde erst nach 24-stündiger Trocknungszeit getestet. Der Versuch wurde im Einfachansatz durchgeführt, er stellt eine Orientierung dar und sollte der besseren Einschätzung der Ergebnisse in der Vorversuchsreihe dienen. Die Nachweisgrenze von 50 µg Protein könnte hiermit bestätigt werden.

### **3.3. Voruntersuchungen**

Die Kontaminationsversuche wurden im Technologiebereich des Instituts für Tierärztliche Nahrungsmittelkunde auf den im Folgenden beschriebenen Oberflächen durchgeführt. Für jeden Ansatz wurden zwei Beprobungsflächen à 100 cm<sup>2</sup> vorgesehen. Auf der ersten Fläche wurde der Orion Clean Card® PRO Test durchgeführt, für die zweite das HY-LiTE® 2 System eingesetzt.

#### **3.3.1. Flächen**

Als Beprobungsoberflächen für die Voruntersuchungen dienten ein Edeltahltisch, ein Aluminiumtisch und ein Schneidbrett aus Polyethylen. Das Schneidbrett wies geringgradige Gebrauchsspuren in Form von Einschnitten und Kratzern auf und hatte eine raue Oberfläche. Auf den verschiedenen Oberflächen wurden quadratische Flächen von 900 cm<sup>2</sup> mit einer Innenkantenlänge von 30 x 30 cm markiert. Innerhalb dieser Flächen konnten je zwei Ansätze parallel durchgeführt werden. In jedem Ansatz wurde zuerst die Clean Card® und danach das HY-LiTE® 2 System eingesetzt. Diese beiden Untersuchungen erfolgten auf benachbarten Flächen von je 100 cm<sup>2</sup>. Um eine definierte Beprobungsfläche für die Tests zu gewährleisten, wurden sterile Kunststoffschablonen (Transia 86015-T) verwendet. Diese weisen eine Innenkantenlänge von 10 x 10 cm auf und begrenzen somit die benötigte Fläche von 100 cm<sup>2</sup>. Die Position der Clean Card® (linkes oder rechtes Testfeld) wurde zu Beginn jedes Ansatzes ausgelost.



**Abbildung 4: Fläche zur Probenahme für zwei Ansätze**

### 3.3.2. Kontaminationssubstanzen

Zur Kontamination wurde zum einen **Fleischsaft** in einer Verdünnung von 1:100 eingesetzt, was dem Anwendungsbereich des Orion Clean Card<sup>®</sup> PRO Tests entspricht, mit dem proteinhaltige Produktrückstände auf Oberflächen nachgewiesen werden sollen. Zum anderen wurde **Bovines Serumalbumin** (Albumin Fraktion V, Fa. Carl Roth) in 1%iger Konzentration verwendet, u.a. als Proteinstandard und somit als Positivkontrolle für die Clean Card<sup>®</sup>. Als dritte Substanz wurde **steriles destilliertes Wasser** eingesetzt; dieses diente als Leerwert bzw. als Negativkontrolle.

### 3.3.3. Herstellung der Substanzen

Für die Herstellung des 1:100 verdünnten Fleischsaftes wurde 1 g Hackfleisch (55% Schweinefleisch, 45% Rindfleisch) in einen sterilen Probenbeutel mit Filtereinsatz eingewogen, mit 99 ml Leitungswasser verdünnt und mithilfe eines Walkmischgerätes homogenisiert.

Für die Herstellung des Bovinen Serumalbumins in der Konzentration 1g/100ml wurde 1 g Albumin Fraktion V in ein steriles Becherglas eingewogen und mit 99 ml sterilem destillierten Wasser gelöst. Anschließend wurde die Lösung sterilfiltriert und in 10 ml Portionen bis zur Verwendung bei -18°C tiefgefroren.

### **3.3.4. Durchführung der Vorversuche**

Die markierten Flächen mit der Innenkantenlänge 30 x 30 cm wurden mit Reiniger (Clean and Clever ECO 11, Igefa) und Leitungswasser gereinigt und mehrmals mit Leitungswasser nachgespült.

Die erste Beprobung (Probe A) erfolgte nach dieser Reinigung sowie der sich anschließenden Trocknungszeit von 30 Minuten nach der unter 3.2. beschriebenen Vorgehensweise. Diese Probe stellt den Ausgangswert dar.

Anschließend wurden die oben genannten Substanzen auf die markierten Flächen ausgebracht. Es wurden 4,5 ml der jeweiligen Substanz mit sterilen Glaspipetten auf die Flächen aufgetragen. Dieses Volumen wurde gewählt, um nach der Verteilung auf der 900 cm<sup>2</sup> großen Fläche eine ausreichende Menge, nämlich 0,5 ml auf 100 cm<sup>2</sup> für die Untersuchung zu erhalten. Die ausgebrachte Flüssigkeit wurde mit einem sterilen Metallspatel sofort auf der gesamten Fläche gleichmäßig verteilt.

Die zweite Beprobung (Probe B) erfolgte nach 24-stündiger Trocknungszeit der kontaminierten Flächen nach der unter 3.2. beschriebenen Vorgehensweise. Im Anschluss an diese Untersuchungen wurden alle Flächen erneut mit Reiniger (Clean and Clever ECO 11, Igefa) und Leitungswasser gereinigt und mehrmals mit klarem Wasser nachgespült. Die dritte Beprobung (Probe C) wurde nach der erfolgten Reinigung und einer Trocknungszeit von 30 Minuten durchgeführt.

Insgesamt wurden auf jeder der drei Oberflächen 90 Beprobungen in zehn Ansätzen durchgeführt, somit beläuft sich der Gesamtumfang der Voruntersuchungen auf 270 Untersuchungen.

## **3.4. Weitere Laboruntersuchungen**

### **3.4.1. Untersuchungen zur Proteinmengenzuordnung**

Ziel war es, die farblich graduierten Ergebnisse auf der Orion Clean Card<sup>®</sup> PRO einer bestimmten Menge an Protein auf der getesteten Oberfläche zuzuordnen. Zu diesem Zweck wurde, ähnlich wie für den bereits beschriebenen Funktionstest, eine Verdünnungsreihe mit Bovinem Serumalbumin als Proteinstandard hergestellt. Die Herstellung der Stammlösung erfolgte wie in 3.2.3.2. beschrieben. Als Konzentrationsstufen wurden 25 µg/ml, 50 µg/ml, 75 µg/ml, 100 µg/ml, 250 µg/ml, 500 µg/ml und 1000 µg/ml Proteingehalt einbezogen.

Der Versuch wurde auf einer Edelstahloberfläche durchgeführt. Die Fläche wurde zuvor mit Reiniger (Clean and Clever ECO 11, Igefa) und Leitungswasser gereinigt



und mehrmals mit Leitungswasser nachgespült. Nach ca. 30 Minuten Trocknungszeit wurde die Sauberkeit der Fläche mit der Orion Clean Card<sup>®</sup> PRO überprüft.

Je ein Milliliter der jeweiligen Verdünnungsstufe wurde auf eine Fläche von 100 cm<sup>2</sup>, begrenzt durch Kunststoffschablonen (Transia 86015-T), aufgebracht und mit einem sterilen Metallspatel verteilt. Nach 24 Stunden Trocknungszeit wurden die Flächen mit der Orion Clean Card<sup>®</sup> PRO untersucht. Zusätzlich diente eine nicht kontaminierte Fläche als Negativkontrolle. Der Versuch fand im Dreifachansatz statt und wurde sechsmal wiederholt. Insgesamt wurden somit 144 Einzeluntersuchungen durchgeführt. Da ein Vergleich mit dem HY-LiTE<sup>®</sup> 2- System für diesen Versuch nicht relevant war, wurde ausschließlich mit der Orion Clean Card<sup>®</sup> PRO untersucht.

### **3.4.2. Untersuchungen zu Rückständen von Reinigungsmitteln**

Bei diesem Versuch wurde die Reaktion der Orion Clean Card<sup>®</sup> PRO auf Rückstände von Reinigungsmitteln bzw. deren Inhaltsstoffe genutzt, um diese gezielt nachzuweisen. Dies sollte zeigen, auf welche Art die angewandte Nachspülmethode nach der Reinigung das Verbleiben von Reinigungsmittelrückständen auf der gereinigten Oberfläche beeinflussen kann. Der Versuch wurde ebenfalls auf einer Edelstahlfläche durchgeführt, da Edelstahl zu den meistgenutzten Materialien in der Lebensmittelindustrie gehört. Für den Versuch wurden drei verschiedene, für die Anwendung im lebensmittelverarbeitenden Bereich geeignete Reinigungsmittel ausgewählt: „Schaumreiniger sauer“ (Ernst GmbH), „Clean and Clever ECO 11“ (Igefa) und „Pulsar Gastro Speed“ (Tana). Deren Inhaltsstoffe, soweit sie in den jeweiligen Sicherheitsdatenblättern angegeben werden, sind in Tabelle 2 aufgeführt.



## 5.4. Praktische Anwendbarkeit

Die Orion Clean Card<sup>®</sup> PRO ist einfach anzuwenden und zeichnet sich durch eine schnelle Durchführung und Auswertung aus. Das Ergebnis ist bereits nach etwa 30 Sekunden ablesbar und anhand der mitgelieferten Referenzskala einfach zu interpretieren. Im Falle von gelegentlich auftretenden Farbabweichungen durch Rückstände von Reinigungsmitteln kann die Auswertung von den regulären Auswertemodalitäten abweichen (s. u.)

Das ebenfalls auf dieser Referenzskala abgebildete Zentimetermaß (10 cm) ermöglicht die Begrenzung der Probenahme­fläche von 100 cm<sup>2</sup>. Dadurch können die Beprobungen von den Anwendern auch ohne die hier verwendeten sterilen Kunststoffschablonen durchgeführt werden. Das Testsystem ist überdies kostengünstig, da neben den Kosten für die Verbrauchsmaterialien (ca. 2€ pro Test) keine weiteren Ausgaben anfallen. Dies ist besonders für kleinere Unternehmen ein wichtiger Gesichtspunkt.

Wie sich im Laufe dieser Untersuchung herausstellte, reagiert die Orion Clean Card<sup>®</sup> PRO zusätzlich auch auf Rückstände von Reinigungsmitteln. Diese stellen laut der deutschen Lebensmittelhygiene-Verordnung (LMHV) § 2 Abs. 1 Nr. 1 eine nachteilige Beeinflussung des Lebensmittels dar und ein solches nachteilig beeinflusstes Lebensmittel darf laut § 3 dieser Verordnung nicht in den Verkehr gebracht werden. Diese Reaktionen der Orion Clean Card<sup>®</sup> PRO sind in Abhängigkeit von den verwendeten Reinigungsmitteln in der Regel von einem positiven Proteinnachweis unterscheidbar und könnten dazu genutzt werden, die Sicherheit von Oberflächen, die mit Lebensmitteln in Berührung kommen, auch in Bezug auf Reinigungsmittelrückstände im Rahmen von Eigenkontrollen zu überprüfen. Für eine derartige Nutzung der Orion Clean Card<sup>®</sup> PRO sind abweichende Auswertemodalitäten zu beachten, da z.B. die für einige Reinigungsmittelreaktionen typische Aufhellung der verfärbten Testfläche erst nach ca. einer Minute deutlich sichtbar und somit von einer Reaktion durch Proteinverschmutzungen differenzierbar ist.

Wie bereits zuvor erwähnt, ist die Orion Clean Card<sup>®</sup> PRO auch zu Schulungszwecken gut geeignet, und dient hierbei sowohl zur Veranschaulichung von Verschmutzungen als auch von Reinigungsmittelrückständen.

Insgesamt ist daher die Orion Clean Card<sup>®</sup> PRO für die Anwendung in Lebensmittelbetrieben zur betriebseigenen Überprüfung des Reinigungserfolges sehr gut geeignet.

### **5.5. Abschließende Empfehlung**

Ziel der Untersuchungen war es, die Zuverlässigkeit des Proteinnachweises mit der Orion Clean Card<sup>®</sup> PRO zu überprüfen. Diese wird unter Laborbedingungen durch eine Sensitivität von 91,1% bis 99,9% im Rahmen der Vorversuchsreihe bestätigt (Berechnung anhand des 95%igen Konfidenzintervalles für die Nachweisrate der Orion Clean Card<sup>®</sup> PRO). Die Vergleichbarkeit mit der Biolumineszenzmessung wurde darüber hinaus in den anschließenden Feldversuchen bestätigt. Hierbei ergab sich eine Sensitivität von 79,6% bis 90,5% in Bezug auf das Biolumineszenzmessungsverfahren.

**Basierend auf den Ergebnissen dieser Untersuchungen ist die Orion Clean Card<sup>®</sup> PRO zur Anwendung in der betriebseigenen Hygienekontrolle sehr gut geeignet.**



# Kontrolle der ordnungsgemäßen und rückstandslosen Reinigung in Lebensmittelunternehmen mit der Orion Clean Card® PRO

Sonja Schmidt, Michael Bülte, Kim Nguyen

## Einleitung

Mit der Neuordnung des EU-Lebensmittelhygienerechts wurde die Verantwortung für die Sicherheit der Lebensmittel den Lebensmittelunternehmern übertragen (VO (EG) Nr. 178/2002, Art. 17 (1) und VO (EG) Nr. 852/2004, Kap. I, Art. 1 (1a)). Eine der unerlässlichen Voraussetzungen dafür ist die Gewährleistung einer lückenlosen Prozesshygiene. In diesem Zusammenhang kommt der Kontrolle einer ordnungsgemäßen Reinigung und erforderlichenfalls Desinfektion eine grundsätzliche Bedeutung zu. Alle Arbeitsflächen sind nach erfolgter Reinigung mit Wasser von Trinkwasserqualität nachzuspülen, bevor es erneut zu einem Kontakt mit dem Lebensmittel kommt. Eine gegebenenfalls sich anschließende Desinfektion ist nur unter diesen Voraussetzungen erfolgreich (Wildbrett, 2006). Umso wichtiger ist ein schnell verfügbares Ergebnis der Reinigungskontrolle, insbesondere wenn die Lebensmittelproduktion anschließend wieder aufgenommen werden soll. Hier liegt der Vorteil von Schnellnachweisverfahren gegenüber den mikrobiologischen Untersuchungen, bei denen das Ergebnis erst nach maximal drei Tagen vorliegt (DIN 113 – 1, DIN 113 – 2 sowie DIN 113 – 3).

Es sind unterschiedliche Schnelltestsysteme zur Kontrolle der Sauberkeit von Oberflächen verfügbar (Becker et al., 2004; Goll et al., 2003; Kirchner et al., 1996; Moore and Griffith, 2002), die keinen direkten Nachweis von Mikroorganismen, sondern die Anwesenheit von Verschmutzungen in Form von Produktrückständen anzeigen. Diese können als Nährstoffgrundlage für das Wachstum von Mikroorganismen dienen. Derartige „Verschmutzungen“ können auch auf makroskopisch sauber erscheinenden Flächen vorhanden sein. Eine Möglichkeit eröffnet der Nachweis von Proteinrückständen. In den eigenen Untersuchungen sollte ein neu entwickeltes Testverfahren, das Orion Clean Card® PRO-System, auf unterschiedlichen Oberflächen geprüft werden.

## Material und Methoden

Die eigenen Studien gliederten sich in zwei Untersuchungsphasen. Zu Beginn wurden umfangreiche Versuchsserien unter Laborbedingungen durchgeführt; anschließend wurde in Feldversuchen die Praxistauglichkeit des neuen Schnelltests überprüft.

Zunächst wurde die Nachweisgrenze der Orion Clean Card® PRO (Vertrieb: amfora health care, GmbH, Freystadt) mit Hilfe eines Proteinstandards (bovines Serumalbumin) ermittelt. Gleichzeitig erfolgte eine Zuordnung zu den semiquantitativen Auswertungsabstufungen des Orion Clean Card® PRO-Systems der unterschiedlich konzentrierten, auf die Oberflächen verbrachten Proteinmengen. Weiterhin wurde die Orion Clean Card® PRO im Vergleich zum HY-LiTE® 2-System (Fa. Merck, Darmstadt) auf ebenfalls künstlich kontaminierten und anschließend gereinigten Flächen eingesetzt. Dieses diente zur Ermittlung der Sensitivität der Orion Clean Card® PRO unter Laborbedingungen und einer ersten Einschätzung der Vergleichbarkeit mit der Biolumineszenzmethode. Als Oberflächen dienten Edelstahl, Kunststoff- und Aluminiumflächen. Zur Kontamination wurden dabei Fleischsaftverdünnungen, bestehend aus Rind- und Schweinefleisch sowie bovines

Serumalbumin eingesetzt. Als Negativkontrolle diente steriles destilliertes Wasser. Weiterhin wurden die Einflüsse von Reinigungsmittelrückständen auf die Farbreaktionen des Orion Clean Card® PRO-Systems erfasst.

Beide Testsysteme wurden anschließend unter Praxisbedingungen in neun verschiedenen Lebensmittelbetrieben eingesetzt, und zwar in zwei Käsereien (n = 80 Proben), drei Metzgereien (n = 150 Proben), einer Backstube (n = 30 Proben), einem Schlachthof angegliederten Zerlegebetrieb (n = 38 Proben), einem Dönerspießerstellungsbetrieb (n = 10 Proben) sowie zwei Großküchen (n = 53 Proben). Die Probenahmen erfolgten ausnahmslos nach der jeweils betriebsspezifischen Reinigung auf makroskopisch sauber erscheinenden Flächen. Alle Betriebe wurden an mindestens zwei unterschiedlichen Tagen beprobt.

Um eine optimale Vergleichbarkeit zu gewährleisten, wurde die Probenfläche durch quadratische Kunststoffschablonen mit einer Kantenlänge von 10 cm standardisiert. Die Durchführung der Schnelltests erfolgte jeweils nach Herstellerangaben und ist schematisch in Abbildung 1 dargestellt. Die Orion Clean Card® PRO wurde, nachdem die Probenfläche mit zwei Sprühstößen Wasser befeuchtet worden war, zunächst

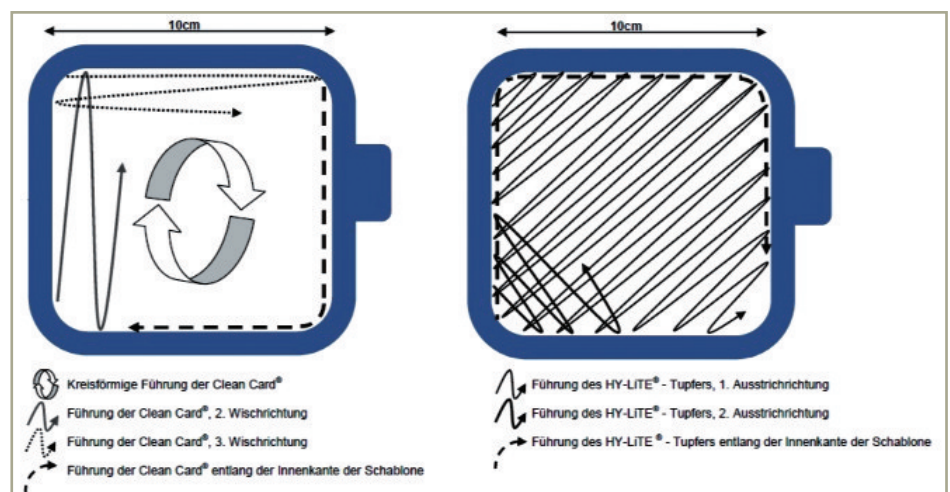


Abb. 1: Prinzip der beiden Ausstrichverfahren zur Erfassung der Oberflächenbelastung.

Fotos/Grafiken: Verfasser