Nahrungsmittelmaschinen
und Verpackungsmaschinen

VDMA Fachverbandsschrift
Nahrungsmittelmaschinen und Verpackungsmaschinen

Leitfaden zur Identifikation positiver sowie zum Ausschluss falsch positiver und falsch negativer Befunde bei mikrobiologischen Auswertungsverfahren

Nr. 17 / 1. Auflage 2020

VDMA e.V.
Lyoner Str. 18
60528 Frankfurt am Main, Germany
Telefon +49 69 6603-1432
E-Mail nuv@vdma.org
Internet nuv.vdma.org
Vereinsregister AG Frankfurt/Main, Nr. VR4278

Nahrungsmittelmaschinen
und Verpackungsmaschinen
Vorsitzender:
Christian Traumann
Geschäftsführer:
Richard Clemens

Inhalt

Einleitung 3

1 Begriffe und Definitionen 3

2 Allgemeine Hinweise zu Labor und Personal 3

3 Hinweise zur Vorinkubation und Probenahme 4

4 Hinweise zur Vorbereitung der Platten für Ausstrich- und Gussplattenverfahren sowie zur Inkubation der Proben 4

5 Hinweise zur Auswertung 7

5.1 Beurteilung komplett bewachsener Ausstriche 7

5.2 Beurteilung wenig bewachsener Ausstriche 7

5.3 Hinweise zur Ergebnisbeurteilung und Eingrenzung von Kontaminationsursachen 8

Literatur: 8

Anhang I (informativ) Beispiele Ursachen falsch positiver Befunde 9

Diese Publikation wurde vom Arbeitskreis "Schnittstellenproblematik bei Aseptikanlagen" der VDMA-Fachabteilung Verpackungsmaschinen erarbeitet. Diese und weitere vom gleichen Arbeitskreis herausgegebene Fachverbandsschriften sind als kostenloser Download erhältlich unter https://www.vdma.org/publikationen - Branche "Nahrungsmittelmaschinen und Verpackungsmaschinen". Eine Übersicht aller Veröffentlichungen des Arbeitskreises wird unter https://nuv.vdma.org/technik in der Rubrik "Aseptik" zum Download angeboten.

Anregungen und Ergänzungsvorschläge können an nachstehende Adresse gerichtet werden: VDMA Fachverband Nahrungsmittelmaschinen und Verpackungsmaschinen, Lyoner Straße 18, 60528 Frankfurt/M., Fax: 069/6603-1211, nuv@vdma.org

© Fachverband Nahrungsmittelmaschinen und Verpackungsmaschinen, Lyoner Strasse 18, 60528 Frankfurt, 2020

Einleitung

Diese Fachverbandsschrift gibt Hinweise zur Durchführung und Auswertung mikrobiologischer Auswertungsverfahren, die z.B. bei Steril- und Standtests im Zuge der Inbetriebnahme von hygienischen Abfüllmaschinen der VDMA-Hygieneklassen IV und V zur Anwendung kommen.

1 Begriffe und Definitionen

Begriff	Definition	Erläuterung
Growth Promotion Test	Test performed to demonstrate that media will support microbial growth (PIC/S PI 007-6 2011)	Test zum Nachweis, dass Nährmedien im Falle einer mikrobiologischen Kontamination am Ende der Inkubationszeit ein ausreichendes Wachstum ermöglichen, um die Kontamination nachweisen zu können (Vermeidung falsch negativer Resultate) Growth Promotion Tests werden z.B. in Pharmacopeias gefordert. In der PIC/S PI 007-6 (2011) werden z.B. als Anforderung des Growth Promotion Tests der Nachweis einer geringen Selektivität bzgl. des zu erwartenden Keimspektrums und der Nachweis von Kontaminationen mit geringen Ausgangsverkeimungen (z.B. 10-100 KbE oder weniger) gefordert.
Kommerziell steriles Füllgut	Füllgut frei von lebensfähigen Krankheitskeimen und frei von Mikroorganismen, die sich im Füllgut unter normalen, nicht gekühlten Lager- und Vertriebsbedingungen vermehren können.	

2 Allgemeine Hinweise zu Labor und Personal

- Vorbereitung der Agarplatten, Probenahme und Ausstrich der Proben sollte ausschließlich durch geschultes Personal erfolgen.

  Anmerkung: Geschultes Personal sollte gängigen schriftlichen Anweisungen zur korrekten Probenentnahme folgen, z.B. ISO 707:2008 (IDF 50:2008) Milk & milk products –Guidance on sampling, siehe ggf. auch DIN CEN ISO/TS 17728:2015-11 (D) Mikrobiologie der Lebensmittelkette - Probenahmetechniken für die mikrobiologische Untersuchung von Lebensmittel-und Futtermittelproben (ISO/TS 17728:2015) und DIN EN ISO 19458 Wasserbeschaffenheit – Probenahme für mikrobiologische Untersuchungen
- Probenentnahme und Testung sollten vorzugsweise in Laminar Flow Bench oder Biosafety Cabinet im Labor erfolgen
- Good laboratory practice (GLP) z.B. in Bezug auf Desinfektion, Ordnung am Arbeitsplatz und Personalhygiene sollte Folge geleistet werden
- Allgemeine Auffälligkeiten wie Packungs- und Produktveränderungen sind zu beachten und zu dokumentieren.
- Vorsterilisierte Einwegmaterialien sind Mehrwegmaterialien vorzuziehen, um Kontaminationen durch unzureichende Sterilisation der Mehrwegmaterialien auszuschließen.

© Fachverband Nahrungsmittelmaschinen und Verpackungsmaschinen,
Lyoner Strasse 18, 60528 Frankfurt, 2020

3 Hinweise zur Vorinkubation und Probenahme

- Eine ausreichende Vorinkubation des zu testenden Produktes ist sicherzustellen, um eine Anreicherung von potentiell 1 KbE pro Behälter auf ein mit dem eingesetzten Nachweisverfahren detektierbares Anwachsen erreichen zu können.

  Anmerkung: Vorinkubationsbedingungen sind produktabhängig und unterscheiden sich z.B. zwischen high-acid und low-acid-Produkten)

  Anmerkung: Die erforderliche Vorinkubationszeit sollte auf den kältesten Punkt des zu inkubierenden Gebindes (Palette, Tray etc.) ausgerichtet sein.
- Sekundärverpackungen sollten außerhalb des Probenentnahme- bzw. Laborraumes entfernt werden.
- Es sollten Sedimentationsplatten unmittelbar neben der Probenentnahmestelle und dem Ausstreichen der Platten als Kontrolle aufgestellt werden. (30 Minuten geöffnete Platte)

  Anmerkung: Die Sedimentationsplatten werden ggf. zum Ausschluss falsch positiver Befunde benötigt
- Die Oberfläche der zu öffnenden Verpackungen, besonders um die zu öffnende Stelle herum, sollte ausreichend (ggf. sporizid) dekontaminiert werden

  Anmerkung: Hierdurch wird das Kontaminationsrisiko durch auf der Oberfläche befindliche Mikroorganismen und deren Dauerformen reduziert
- Die Entnahme des Produktes sollte nicht unmittelbar an der Oberfläche um die geöffnete Stelle herum erfolgen, um falsch positiver Befunde durch evtl. während der Öffnung der Verpackung eingetragenen Kontaminanten zu vermeiden.
- Für die Probenentnahme werden die Packungen mit sterilem Werkzeug (z.B. Skalpell, Schere, Lötkolben) geöffnet. Die Öffnung sollte nicht in der Nähe von Siegelnähten oder Öffnungshilfen erfolgen, um ggf. nachträglich die Packungsintegrität überprüfen zu können.
- **Anmerkung:** Bei der Öffnung über bereits existierende Öffnungen der Verpackungen (z.B. Deckel) ist eine nachträgliche Überprüfung der Packungsintegrität nicht mehr möglich.Die Probenentnahme muss mit einem sterilen Gegenstand (z.B. Impföse, Pipette) erfolgen.

4 Hinweise zur Vorbereitung der Platten für Ausstrich- und Gussplattenverfahren sowie zur Inkubation der Proben

- Die zu benutzenden Agarplatten sollten trocken (frei von Kondensat, Tropfen im Deckel und Plattenrand) und steril sein. Um Agarplatten zu trocknen und gleichzeitig auf Sterilität zu testen, sollten diese 12-24 Stunden vor dem Test bei Raumtemperatur gelagert werden (oder besser vorgelagerte 100%-Kontrolle der Nährböden). Diese Lagerung sollte bevorzugt unter einem Laminar Flow Bench und Bio-Safety-Cabinet (< 200 KbE/m^3 gemäß EU GMP Grade D) erfolgen.

  Anmerkung: Kondensat und Tropfen können zu falsch positiven Befunden führen
- Geringe Selektivität: Inkubationsbedingungen und Nährmedien der Agarplatte sollten eine geringe Selektivität aufweisen, um das gesamte zu prüfende Keimspektrum abzudecken. Abhängig vom Anwendungsfall ist auch eine anaerobe Bebrütung (z.B. bei Prüfung auf mikroaerophile Milchsäurebakterien) in Betracht zu ziehen.
- Ausreichende Sensitivität: Inkubationsbedingungen und Nährmedien der Agarplatte sollten eine ausreichende Sensitivität gewährleisten, so dass z.B. auch vorgeschädigte Keime ein ausreichendes Wachstum zeigen. Ggf. ist ein Growth Promotion Test durchzuführen.
- Bei **Ausstrichverfahren** mit Impfösen sollten nicht mehr als 4 parallele Ausstriche pro Agarplatte erfolgen. Die Ausstriche sollten entweder in gerader Linie oder in Schleifen in entsprechenden Quadranten mit mindestens 1 cm Abstand zum Plattenrand erfolgen (siehe Abb. 1).

© Fachverband Nahrungsmittelmaschinen und Verpackungsmaschinen,
Lyoner Strasse 18, 60528 Frankfurt, 2020

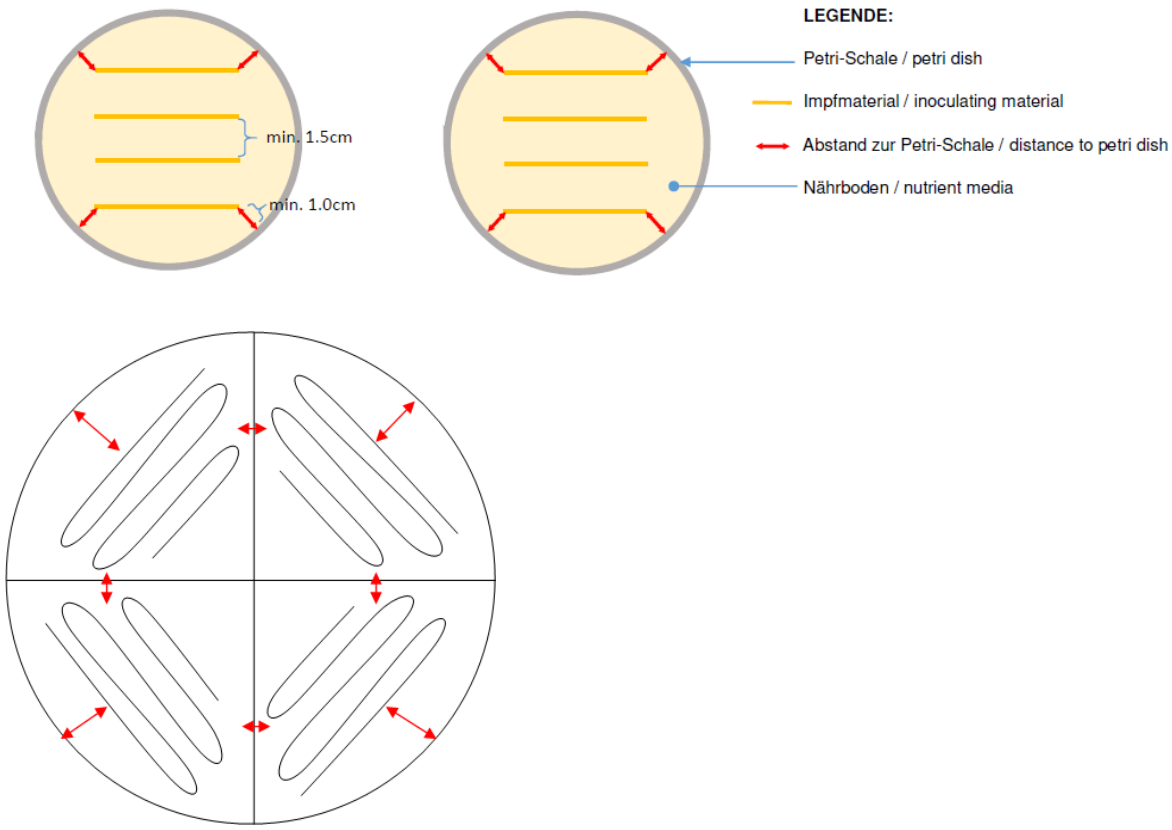


Abb. 1: Empfohlene Ausstreichmuster
Quelle: VDMA Nahrungsmittelmaschinen und Verpackungsmaschinen

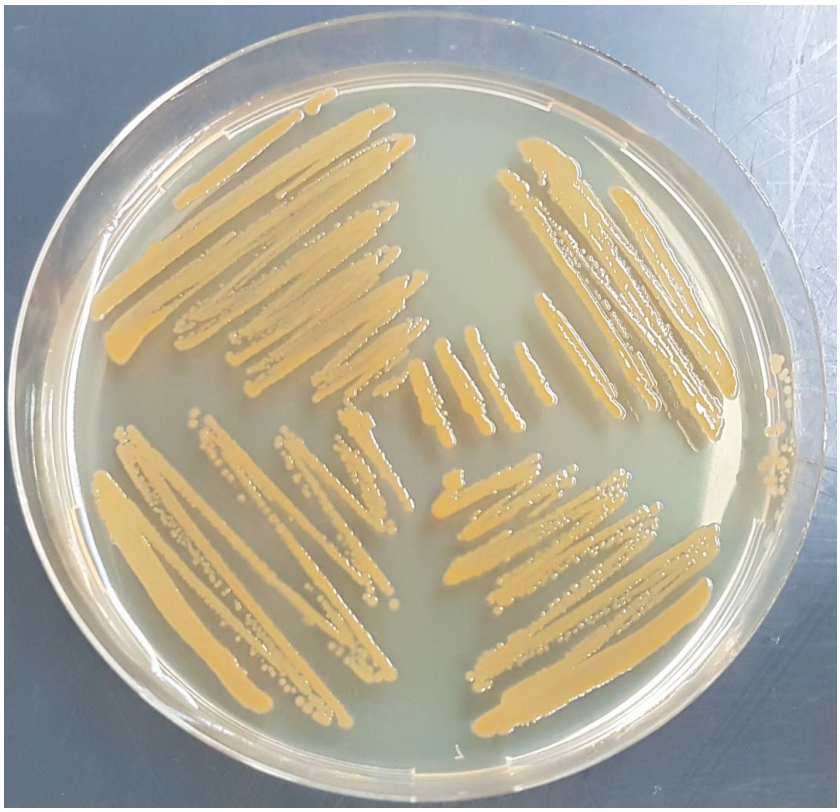


Abb. 2: Beispiel für zu geringe Abstände zwischen den Ausstrichen
Quelle: VDMA Nahrungsmittelmaschinen und Verpackungsmaschinen

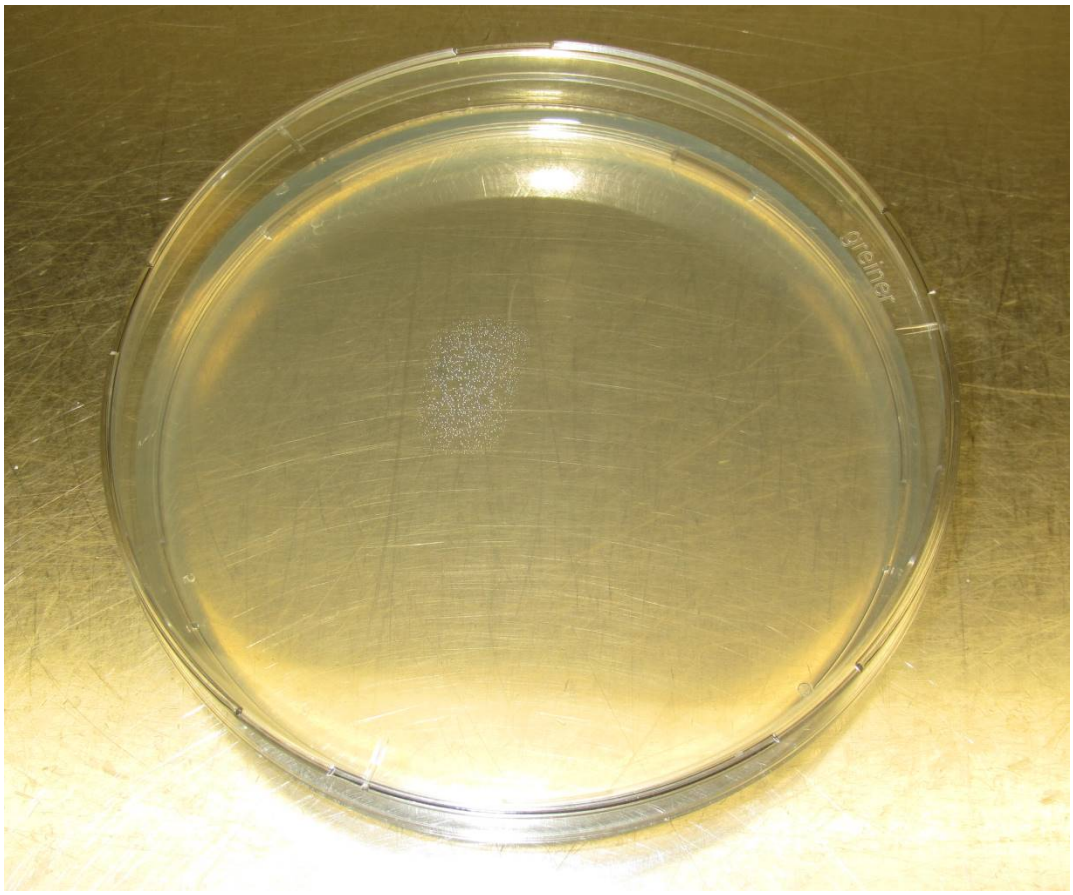
© Fachverband Nahrungsmittelmaschinen und Verpackungsmaschinen,
Lyoner Strasse 18, 60528 Frankfurt, 2020

- Bei **Gussplatten-Verfahren** wird der zu untersuchenden Probe 1 ml mittels einer Pipette entnommen und in die sterile, leere Petrischale gegeben (abweichend davon werden bei Milch und Milchprodukten oder anderen trüben Proben nicht mehr als 0,1 ml der Probe in die Petrischale gegeben, um eine zu starke Eintrübung des Nährmediums zu vermeiden und eine visuelle Auswertung des Keimwachstums zu ermöglichen). Anschließend wird die Petrischale mit ca. 12-15 ml Nährmedium befüllt.

  Anmerkung: Die Temperatur des Nährmediums darf beim Gießen maximal 50 °C betragen; bei Temperaturen über 50 °C könnte eine temperaturbedinge, keimreduzierende Wirkung das Untersuchungsergebnis verfälschen

  Nach Zugabe des Nährmediums wird die Petrischale sofort wieder verschlossen und die Probe mit dem Nährmedium durch mehrmaliges, vorsichtiges Schwenken der Petrischale auf der Unterlage homogen miteinander vermischt.

  Anmerkung: Es ist darauf zu achten, dass der Nährboden den Schalenrand und Deckel nicht benetzt.



© Fachverband Nahrungsmittelmaschinen und Verpackungsmaschinen,
Lyoner Strasse 18, 60528 Frankfurt, 2020

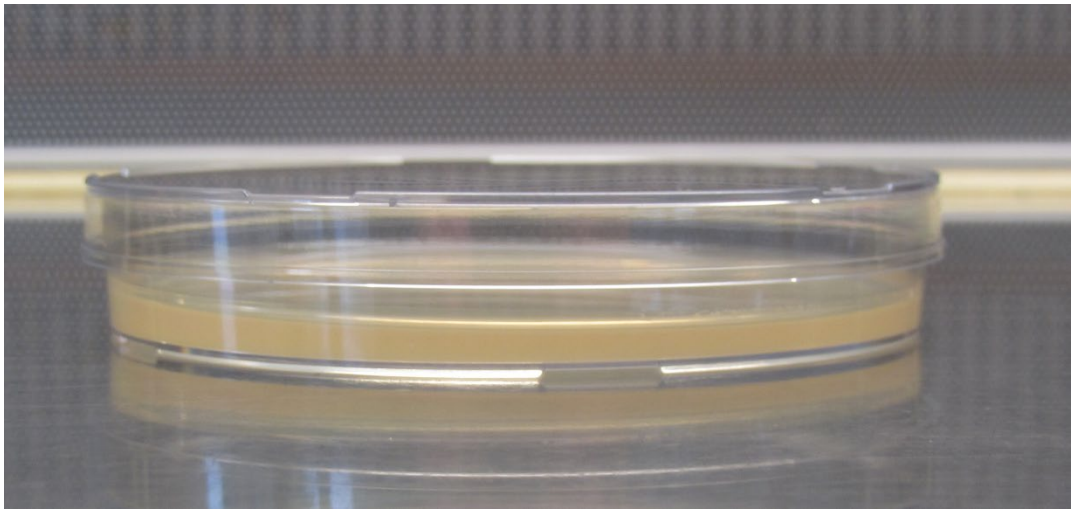


Abb. 3: Korrekte Gussplatte

Quelle: VDMA Nahrungsmittelmaschinen und Verpackungsmaschinen

Nach Erstarren des Nährmediums werden die Gussplatten über Kopf im Brutschank gemäß den Vorgaben bebrütet und nach Ablauf der vorgegebenen Inkubationszeit ausgewertet.

Im Falle von quantitativen Auswertungen ist eine Auszählung nur dann möglich, wenn der Besatz des Nährbodens mit Kolonien nicht zu dicht ist. Allgemein werden Gussplatten ausgezählt, wenn die Koloniezahlen (KbE) zwischen 20 und 300 Kolonien pro Platte liegt.

5 Hinweise zur Auswertung

5.1 Beurteilung komplett bewachsener Ausstriche

- Ein komplett bewachsener Ausstrich (Mono- oder gemischte Flora) ist ein sicherer Anhalt für ein echt positives Ergebnis.
- Einzeln auftretende Kolonien eines unterschiedlichen Kolonie-Morphologie-Typs neben dem Ausstrich oder verteilt über die Platte sind ein starkes Indiz für eine Sekundärkontamination (Vergleich mit Sedimentationsplatten, Spezies-Identifikation kann weitere Aufschlüsse zur Ursache der Sekundärkontamination bringen).

5.2 Beurteilung wenig bewachsener Ausstriche

- Wenig bewachsene Ausstriche (wenige Kolonien) ohne weitere Kolonien außerhalb des Ausstriches:
    - Hinweis auf unzureichende Vorinkubation bzw. ein sehr langsames/geringes Wachstum des Kontaminationskeimes (Re-Inokulationstest zur Testung der Wachstumsgeschwindigkeit ratsam) oder
    - Hinweis auf zu hohe Selektivität des Nährmediums (z.B. geringes Wachstum von produktschädigenden, acidophilen Mikroorganismen bei Verwendung von Agarplatten mit neutralem pH) (Anpassung des Nährbodens ratsam).
    - Wenn nötig auch anaerobe Bebrütung (z.B. mikroaerophile Michsäurebakterien) in Betracht ziehen.
- Wenige Kolonien auch außerhalb des wenig bewachsenen Ausstrichs:
    - Testen, ob es sich um die gleichen oder um unterschiedliche Kolonien (Spezies) handelt: Gleiche Kolonien indizieren die gleiche Quelle, unterschiedliche Kolonien indizieren unterschiedliche Quellen (Vergleich mit Sedimentationsplatten).
    - Mikrobiologischer Kontaminationsdruck aus dem Umfeld (z.B. stark belastete Packungsaußenseite) ist zu beachten und wenn möglich abzustellen.
    - Anpassung der Inkubationszeit und –temperatur auf das zu prüfende Keimspektrum.

© Fachverband Nahrungsmittelmaschinen und Verpackungsmaschinen,
Lyoner Strasse 18, 60528 Frankfurt, 2020

5.3 Hinweise zur Ergebnisbeurteilung und Eingrenzung von Kontaminationsursachen

Kommerziell sterile Produkte können Keime enthalten, die sich im Füllgut unter normalen, nicht gekühlten Lager- und Vertriebsbedingungen nicht vermehren können. So können etwa kommerziell sterile Getränke mit einem niedrigen pH-Wert Keime enthalten, die im anaeroben Milieu und bei im Füllgut enthaltenen Hemmstoffen (z.B. Hopfen oder Zitrusöle) inaktiv bleiben und keine organoleptische Veränderung des Produkts verursachen. Diese Keime können aber auf Nährböden wachsen und zu falsch positiven Laborbefunden führen, da Nährböden einen pH-Wert > 4,2 aufweisen (darunter wird der Agar nicht mehr fest), keine Hemmstoffe enthalten und üblicherweise aerob bebrütet werden.

Um derartige falsche Befunde auszuschließen, ist es ratsam, eine sterile Probe des Produktes durch Zurückimpfen der Kolonien vom Nährboden gezielt zu kontaminieren. Zeigt sich nach den vorgegebenen Inkubationsbedingungen Wachstum im Produkt (Trübung, Gasbildung, sensorische Veränderungen, Koagulation, erkennbares Wachstum durch sonstige Veränderungen), kann davon ausgegangen werden, dass der positive Befund durch eine Kontamination des Produktes mit dem Schadkeim erfolgte und es sich tatsächlich um einen positiven Befund handelt.

Literatur:

PIC/S Validation of Aseptic Processes PI007-6, 2011
Downloadable from www.picscheme.org

FDA (2014) Pharmaceutical Microbiology Manual
Downloadable from: https://www.fda.gov/downloads/

© Fachverband Nahrungsmittelmaschinen und Verpackungsmaschinen,
Lyoner Strasse 18, 60528 Frankfurt, 2020

Anhang I (informativ)
Beispiele Ursachen falsch positiver Befunde

Abb. 4: Kondensat im Deckel
Quelle: VDMA Nahrungsmittelmaschinen und Verpackungsmaschinen

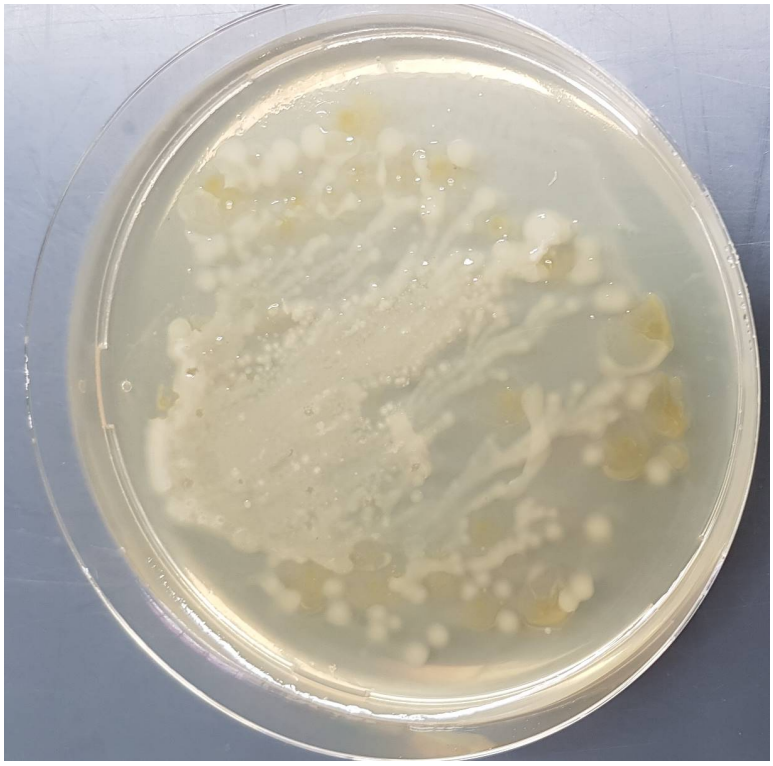


Abb. 5: Durch Kondensat hervorgerufene Sekundärkontamination
Quelle: VDMA Nahrungsmittelmaschinen und Verpackungsmaschinen

© Fachverband Nahrungsmittelmaschinen und Verpackungsmaschinen,
Lyoner Strasse 18, 60528 Frankfurt, 2020

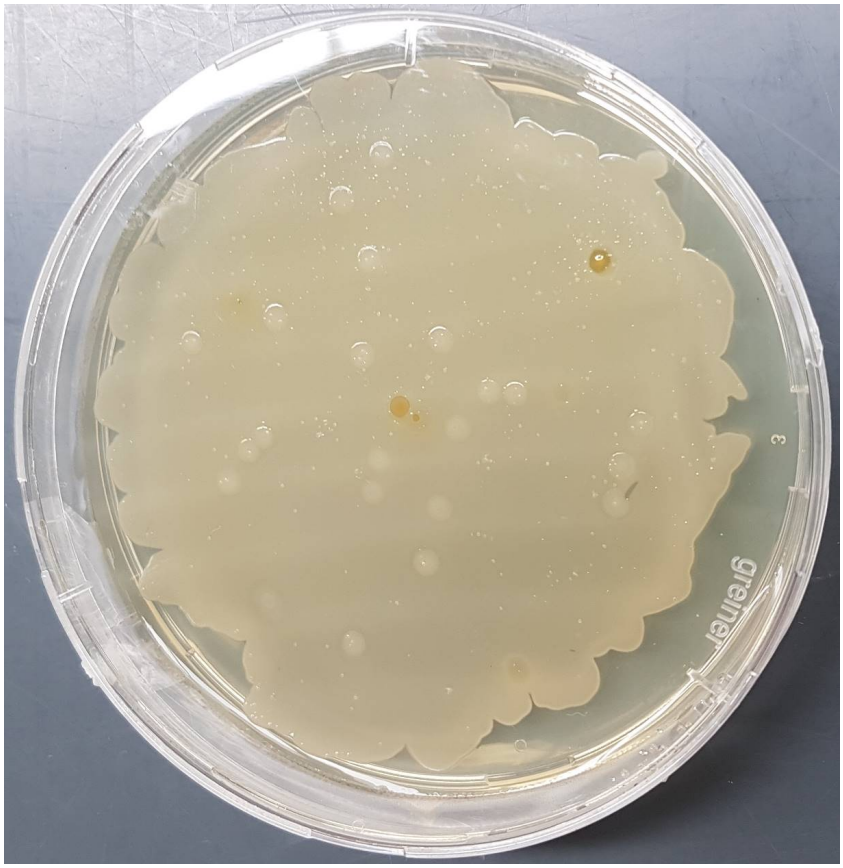


Abb. 6: Feuchtigkeitsbedingte Sekundärkontamination; Platte nicht auswertbar
Quelle: VDMA Nahrungsmittelmaschinen und Verpackungsmaschinen

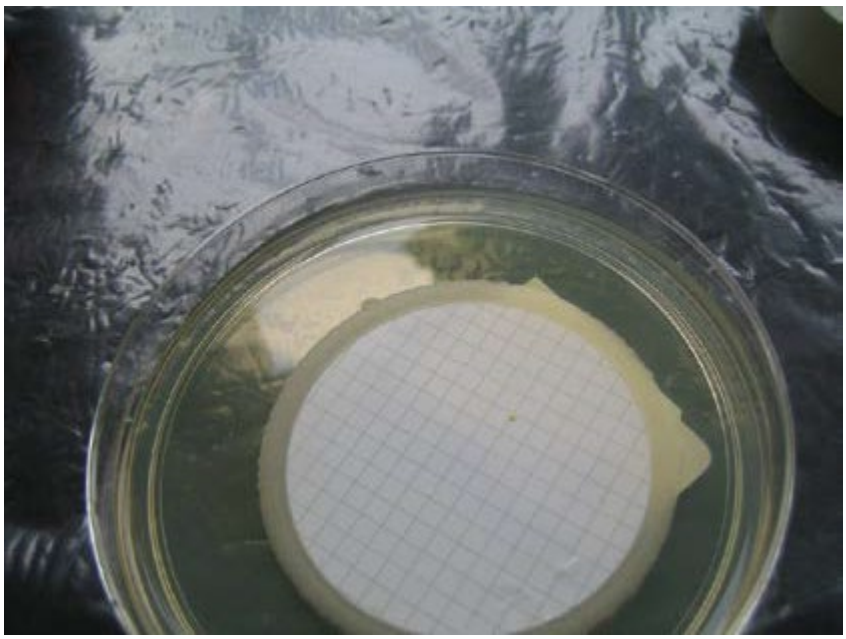


Abb. 7: Wachstum am Rand des Filters bei Membranfiltration: Verwendung von Mehrwegmaterial mit unzureichender Sterilisation
Quelle: VDMA Nahrungsmittelmaschinen und Verpackungsmaschinen

© Fachverband Nahrungsmittelmaschinen und Verpackungsmaschinen,
Lyoner Strasse 18, 60528 Frankfurt, 2020

Beispiel-Bilder zu Gussplatten

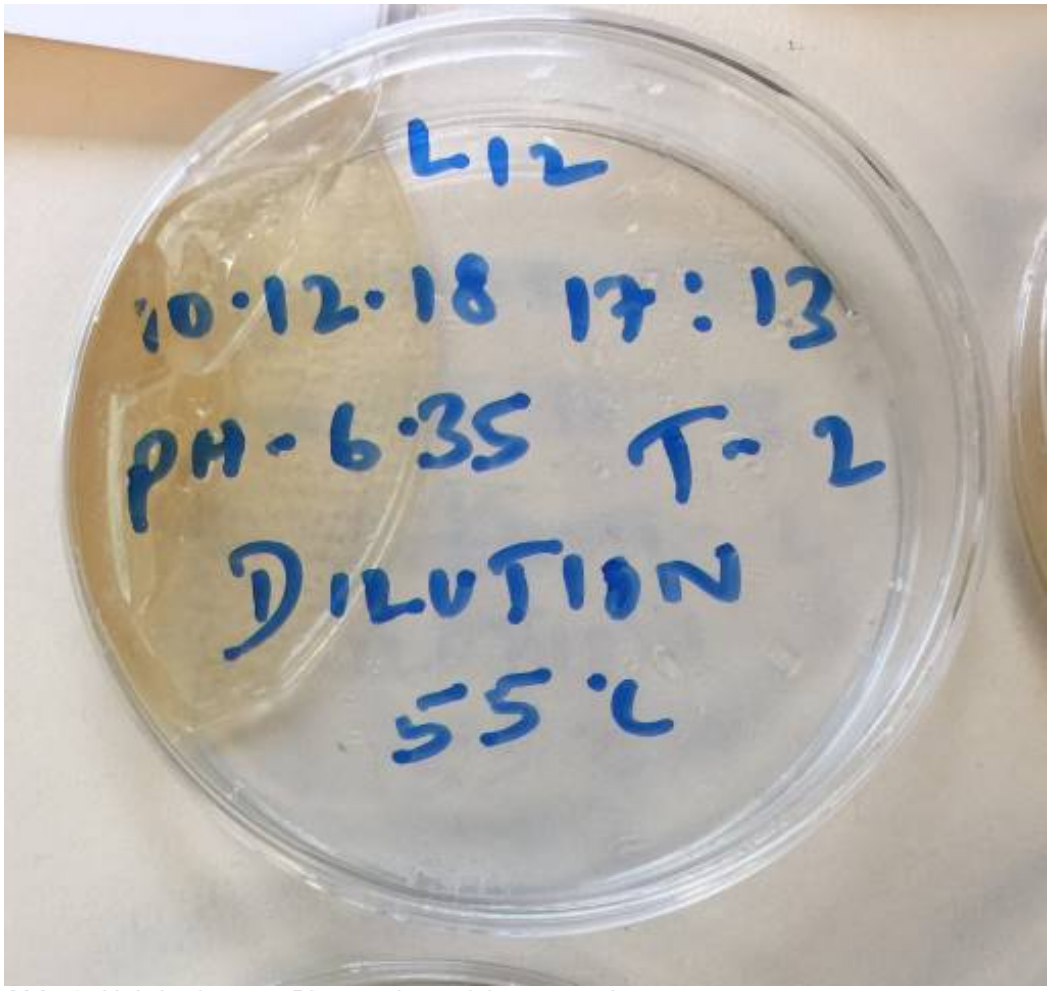
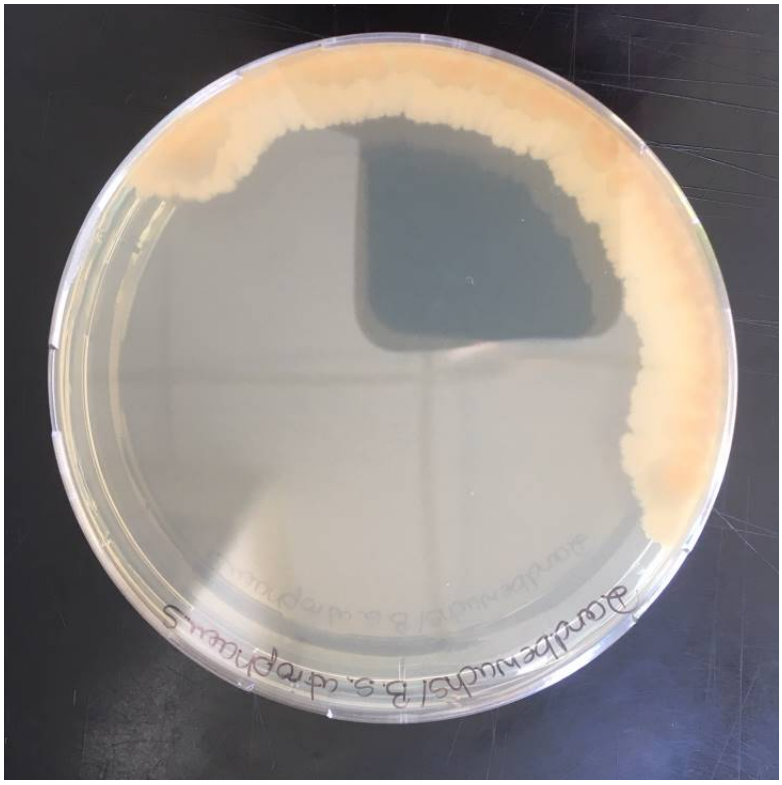


Abb. 8: Nährboden von Platte gelöst; nicht auswertbar
Quelle: VDMA Nahrungsmittelmaschinen und Verpackungsmaschinen

© Fachverband Nahrungsmittelmaschinen und Verpackungsmaschinen,
Lyoner Strasse 18, 60528 Frankfurt, 2020



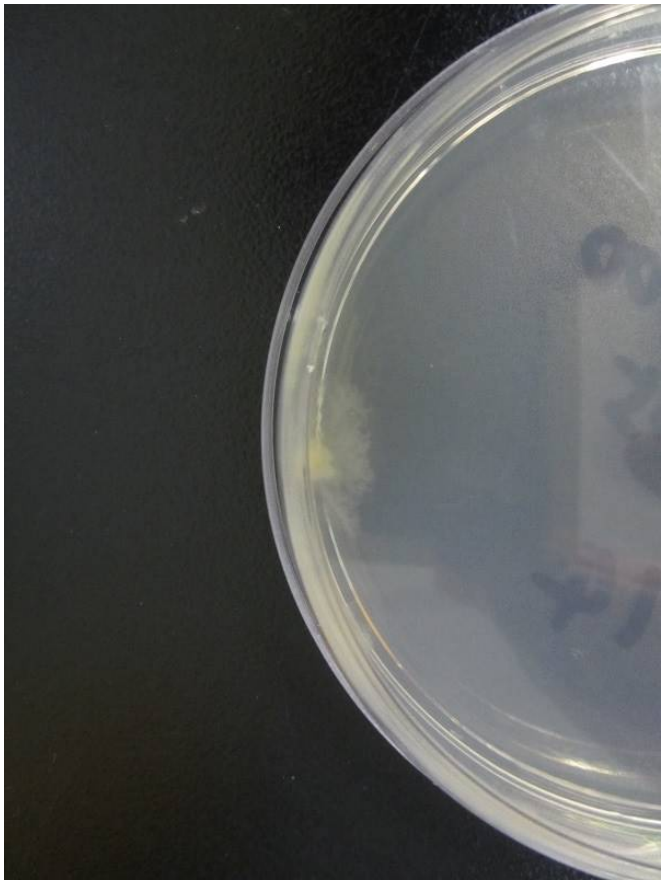


Abb. 9: Randbewuchs bei Gussplatten
Quelle: VDMA Nahrungsmittelmaschinen und Verpackungsmaschinen

© Fachverband Nahrungsmittelmaschinen und Verpackungsmaschinen,
Lyoner Strasse 18, 60528 Frankfurt, 2020

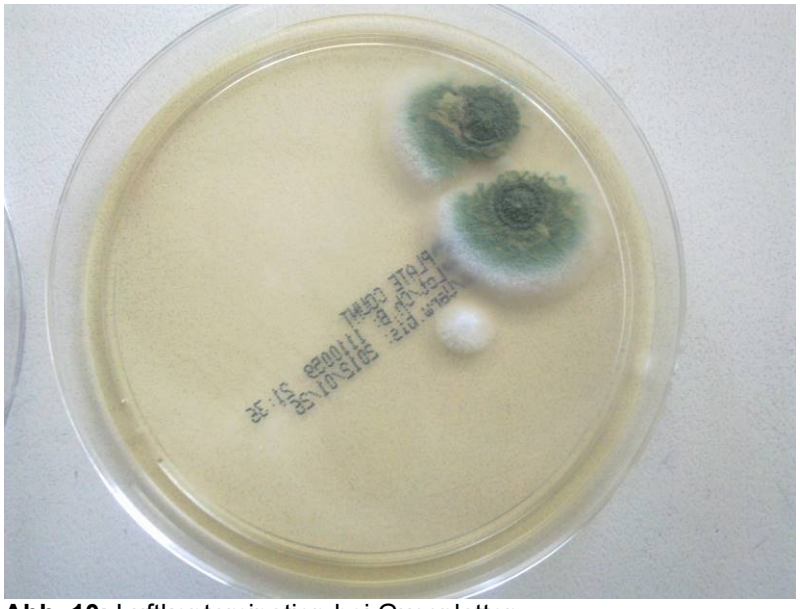
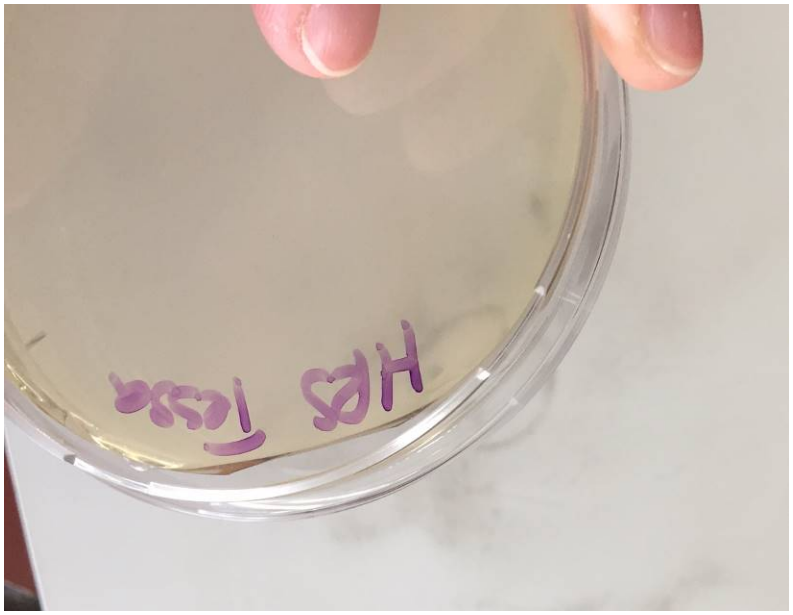


Abb. 10: Luftkontamination bei Gussplatten
Quelle: VDMA Nahrungsmittelmaschinen und Verpackungsmaschinen



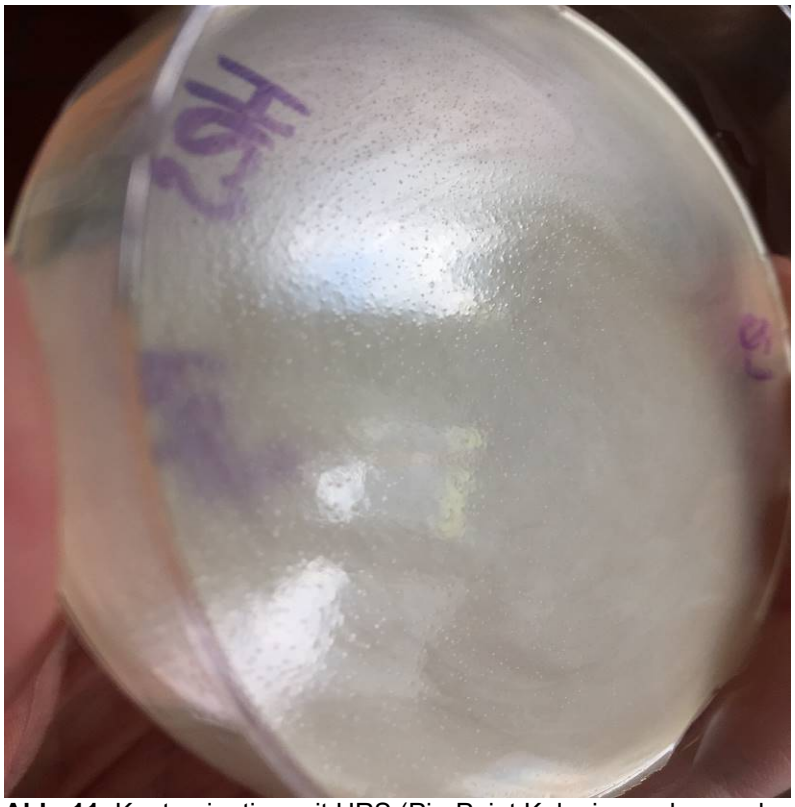


Abb. 11: Kontamination mit HRS (Pin-Point Kolonien, schwer erkennbar)
Quelle: VDMA Nahrungsmittelmaschinen und Verpackungsmaschinen

© Fachverband Nahrungsmittelmaschinen und Verpackungsmaschinen,
Lyoner Strasse 18, 60528 Frankfurt, 2020

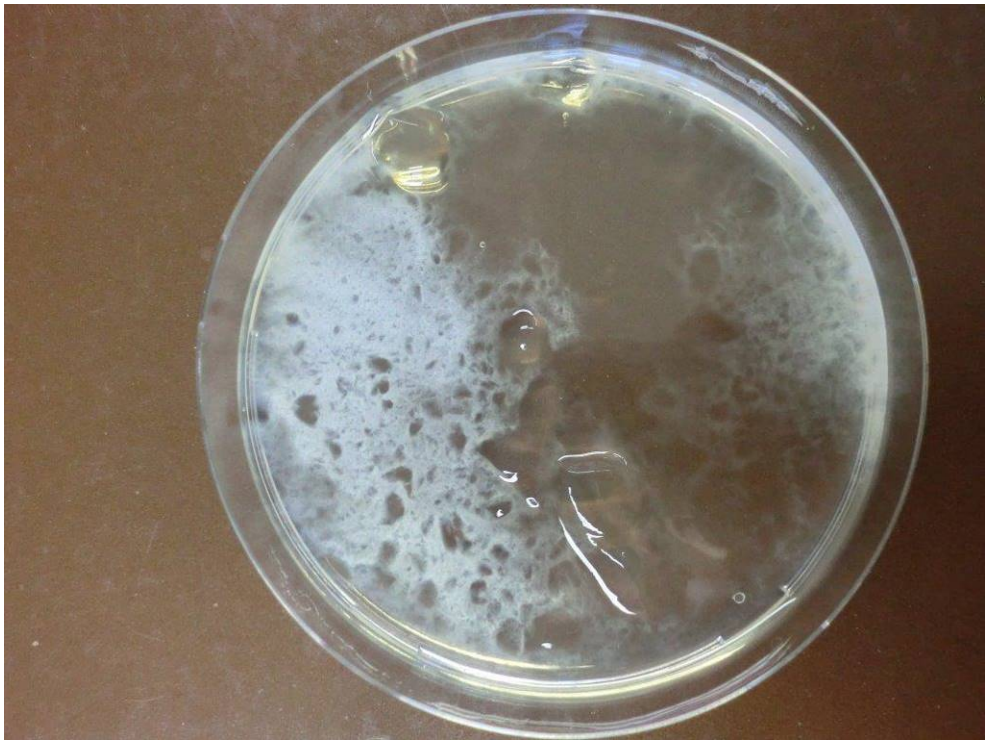


Abb. 12: Agar-Klumpen beim Gießen, inhomogene Verteilung, visuelle Auswertung erschwert
Quelle: VDMA Nahrungsmittelmaschinen und Verpackungsmaschinen

© Fachverband Nahrungsmittelmaschinen und Verpackungsmaschinen,
Lyoner Strasse 18, 60528 Frankfurt, 2020