

**Aus dem  
Institut für Lebensmittelsicherheit und -hygiene  
des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Freien Universität Berlin**

**Eignung der Agarkontakt-Methode zur Bestimmung  
des mikrobiologischen Status von  
Schlachtschwein- und Schlachttierkörperoberflächen  
im Schweineschlachtprozess vom Wartestall bis zur Kühlung**

**Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Grades eines  
Doktors der Veterinärmedizin  
an der  
Freien Universität Berlin**

**vorgelegt von  
Roland Fürstenberg  
Tierarzt aus Oranienburg**

**Berlin 2024  
Journal-Nr.: 4467**







Aus dem

**Institut für Lebensmittelsicherheit und -hygiene**

des Fachbereichs Veterinärmedizin

der Freien Universität Berlin

**Eignung der Agarkontakt-Methode zur Bestimmung des mikrobiologischen Status von  
Schlachtschwein- und Schlachtierkörperoberflächen im Schweineschlachtprozess  
vom Wartestall bis zur Kühlung**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Veterinärmedizin

an der

Freien Universität Berlin

vorgelegt von

**Roland Fürstenberg**

Tierarzt aus Oranienburg

Berlin 2024

Journal-Nr.: 4467

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Freien Universität Berlin

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Uwe Rösler  
Erster Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Diana Meemken  
Zweiter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Stefan Schwarz  
Dritter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Jürgen Zentek

*Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):*

pigs, slaughtering, longitudinal studies, sampling, *Salmonella*, pathogens, zoonoses, carcasses, abattoirs, contaminations, food safety, meat hygiene, germany

Tag der Promotion: 21.06.2024

Bibliografische Information der *Deutschen Nationalbibliothek*

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.ddb.de> abrufbar.

ISBN: 978-3-96729-251-0

**Zugl.: Berlin, Freie Univ., Diss., 2024**

Dissertation, Freie Universität Berlin

**D188**

Dieses Werk ist urheberrechtlich geschützt.

Alle Rechte, auch die der Übersetzung, des Nachdruckes und der Vervielfältigung des Buches, oder Teilen daraus, vorbehalten. Kein Teil des Werkes darf ohne schriftliche Genehmigung des Verlages in irgendeiner Form reproduziert oder unter Verwendung elektronischer Systeme verarbeitet, vervielfältigt oder verbreitet werden.

Die Wiedergabe von Gebrauchsnamen, Warenbezeichnungen, usw. in diesem Werk berechtigt auch ohne besondere Kennzeichnung nicht zu der Annahme, dass solche Namen im Sinne der Warenzeichen- und Markenschutz-Gesetzgebung als frei zu betrachten wären und daher von jedermann benutzt werden dürfen.

This document is protected by copyright law.

No part of this document may be reproduced in any form by any means without prior written authorization of the publisher.

alle Rechte vorbehalten | all rights reserved

© Mensch und Buch Verlag 2024 Choriner Str. 85 - 10119 Berlin

verlag@menschundbuch.de – www.menschundbuch.de

*In Dankbarkeit,  
meinen Eltern*





# INHALTSVERZEICHNIS

|   |            |
|---|------------|
| <b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b> .....  | <b>III</b> |
| <b>ABBILDUNGSVERZEICHNIS</b> .....  | <b>V</b>   |
| <b>TABELLENVERZEICHNIS</b> .....  | <b>VI</b>  |
| <b>1. EINLEITUNG</b> .....  | <b>1</b>   |
| <b>2. LITERATURÜBERSICHT</b> .....  | <b>3</b>   |
| <b>2.1. Schweineschlachtprozess in industriellen, mittelständischen Schlachtbetrieben</b> ..... | <b>3</b>   |
| <b>2.2. Sicherheit des Lebensmittels Schweinefleisch</b> .....                                  | <b>3</b>   |
| <b>2.3. Gefahren ausgehend vom Schweinefleisch</b> .....  | <b>4</b>   |
| <b>2.4. Kritische Prozessstufen in der Schweineschlachtung</b> .....                            | <b>5</b>   |
| 2.4.1. Berieselung der Schlachtschweine im Wartestall.....                                      | 5          |
| 2.4.2. Betäubung und Entbluten .....  | 6          |
| 2.4.3. Brühen und Entborsten.....   | 6          |
| 2.4.4. Abflammen und Polieren .....   | 6          |
| 2.4.5. Eviszeration und Herrichten .....  | 7          |
| <b>2.5. Rechtliche Vorschriften</b> .....   | <b>7</b>   |
| 2.5.1. Mikrobiologisches Monitoring an verschiedenen Prozessstufen.....                         | 8          |
| <b>2.6. Methoden zur Bestimmung der Oberflächenkeimzahl auf Schlachttierkörpern</b> .....       | <b>9</b>   |
| 2.6.1. Destruktive Methoden.....  | 10         |
| 2.6.2. Nicht-destruktive Methoden.....  | 10         |
| 2.6.2.1. Nass-Trocken-Tupfverfahren.....  | 11         |
| 2.6.2.2. Agarkontakt-Methode .....  | 11         |
| 2.6.3. Methodenvergleich auf Schlachttierkörperoberflächen .....                                | 13         |
| <b>3. PUBLIKATION I</b> .....   | <b>15</b>  |
| <b>4. PUBLIKATION II</b> .....  | <b>24</b>  |
| <b>5. DISKUSSION</b> .....  | <b>40</b>  |
| <b>5.1. Bewertung der Nutzung der Agarkontakt-Methode</b> .....                                 | <b>40</b>  |
| <b>5.2. Anwendung der Agarkontakt-Methode</b> .....   | <b>41</b>  |
| <b>5.3. Einfluss der Schlachttierkontamination</b> .....  | <b>43</b>  |
| <b>5.4. Beprobung lebender Schlachtschweine im Wartestall</b> .....                             | <b>44</b>  |
| <b>5.5. Prozessstufe nach dem Betäuben und Entbluten als Risikopunkt</b> .....                  | <b>45</b>  |
| <b>5.6. Oberflächenkeimzahlen an den Prozessstufen</b> .....                                    | <b>45</b>  |
| <b>5.7. Limitationen</b> .....  | <b>46</b>  |
| 5.7.1. Publikation I .....  | 46         |
| 5.7.2. Publikation II .....   | 47         |
| <b>6. ZUSAMMENFASSUNG</b> .....   | <b>48</b>  |

|  |           |
|--|-----------|
| <b>7. SUMMARY .....</b>                  | <b>50</b> |
| <b>8. LITERATURVERZEICHNIS .....</b>     | <b>52</b> |
| <b>PUBLIKATIONSVERZEICHNIS .....</b>     | <b>69</b> |
| <b>DANKSAGUNG .....</b>                  | <b>73</b> |
| <b>FINANZIERUNGSQUELLEN .....</b>        | <b>75</b> |
| <b>INTERESSENKONFLIKTE .....</b>         | <b>75</b> |
| <b>SELBSTSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG .....</b> | <b>76</b> |

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

|     |              |
|-----|--------------|
| ° C | Grad Celsius |
| µL  | Mikroliter   |

### A

|     |                     |
|-----|---------------------|
| ACM | Agar Contact Method |
|-----|---------------------|

### B

|      |   |
|------|---|
| BPW  | Buffered Peptone Water                          |
| BPLS | Brilliant-Green Phenol-Red Lactose Sucrose Agar |

### C

|                 |                     |
|-----------------|---------------------|
| cfu             | Colony-Forming Unit |
| cm <sup>2</sup> | Quadratzenimeter    |

### E

|      |  |
|------|--|
| EFSA | European Food Safety Authority                     |
| ECDC | European Centre for Disease Prevention and Control |
| EU   | Europäische Union                                  |
| EG   | Europäische Gemeinschaft                           |

### G

|     |                                 |
|-----|---------------------------------|
| GKZ | Aerobe mesophile Gesamtkeimzahl |
|-----|---------------------------------|

### H

|   |        |
|---|--------|
| h | Stunde |
|---|--------|

### K

|     |                           |
|-----|---------------------------|
| KbE | Koloniebildende Einheiten |
|-----|---------------------------|

### L

|     |                            |
|-----|----------------------------|
| log | Logarithmus zur Basis Zehn |
|-----|----------------------------|

**M**

|     |                                       |
|-----|---------------------------------------|
| mL  | Milliliter                            |
| MM  | Miller and Mallison ChromoSelect Agar |
| min | Minuten                               |

**N**

|   |              |
|---|--------------|
| n | Probenanzahl |
|---|--------------|

**P**

|     |                           |
|-----|---------------------------|
| PCR | Polymerase Chain Reaction |
| PCA | Plate Count Agar          |
| $p$ | Signifikanzwert           |

**R**

|       |  |
|-------|--|
| RODAC | Replicate Organism Direct Agar Contact |
|-------|--|

**S**

|      |                   |
|------|-------------------|
| S.   | <i>Salmonella</i> |
| spp. | Subspezies        |

**T**

|     |                    |
|-----|--------------------|
| TVC | Total Viable Count |
|-----|--------------------|

**W**

|      |                                |
|------|--------------------------------|
| WDSM | Wet-Dry Double Swabbing Method |
|------|--------------------------------|

# ABBILDUNGSVERZEICHNIS

## PUBLIKATION I

### ***Comparison of the agar contact method and the wet-dry double swabbing method for determining the total viable bacterial count on pig carcass surfaces***

**Figure 1.** Boxplots of total viable count (TVC) (log cfu/cm<sup>2</sup>) on pig skin contaminated in the laboratory with low- and high-level numbers of bacteria and on carcass surfaces (field trial) by using the agar contact method (ACM) and wet-dry double swabbing method (WDSM), N = number of samples respectively for ACM and WDSM..... 19

**Figure 2.** Similarity of total viable counts (log cfu/cm<sup>2</sup>) in all trials; a pig skin with low-level contamination, b pig skin with high-level contamination, c field trial ..... 20

## PUBLIKATION II

### ***Agar Contact Method as a Valuable Tool to Identify Slaughter Hygiene Deficiencies along the Slaughter Process by Longitudinally Sampling Pig Skin Surfaces***

**Figure 1.** Schematic diagram of the sampling areas in the perianal region with the view of the sample taker from behind the standing live slaughter pig and the pig carcass; a = anatomical localization/position of the anus; b = anatomical direction..... 28

**Figure 2.** Boxplots of the mean logarithmic total viable counts (TVC log cfu/cm<sup>2</sup>) of all pig batches at seven process stages: 1 lairage before showering; 2 lairage after showering; 3 after stunning; 4 after scalding/dehairing; 5 after singeing/flaming; 6 after evisceration; 7 before chilling..... 30

**Figure 3.** Trend curves of the mean logarithmic total viable count (TVC log cfu/cm<sup>2</sup>) for each of the ten pig batches at seven process stages: 1 lairage before showering; 2 lairage after showering; 3 after stunning; 4 after scalding/dehairing; 5 after singeing/flaming; 6 after evisceration; 7 before chilling; Batch = number of pig batch..... 31

**Figure 4.** Trend curves along the slaughter line of the five pigs with the highest and five pigs with the lowest initial total viable counts (TVC log cfu/cm<sup>2</sup>) in the lairage before showering; Pig ID = number of the individual pig ..... 32

# TABELLENVERZEICHNIS

## PUBLIKATION I

### ***Comparison of the agar contact method and the wet-dry double swabbing method for determining the total viable bacterial count on pig carcass surfaces***

- Table 1.** Descriptive statistical measures of TVC in log cfu/cm<sup>2</sup> measured on pig skin pieces with low- and high-level contamination and on carcass surfaces (field trial) by using agar contact method (ACM) and wet-dry double swabbing method (WDSM) ..... 19
- Table 2.** Results of equivalence tests at 0.025 significance level and 0.05 equivalence level for comparison of total viable counts of colonies by using agar contact method (ACM) and wet-dry double swabbing method (WDSM) in the trials..... 20
- Table 3.** Results of linear regression models for explaining total viable counts with agar contact method and wet-dry double swabbing method in log cfu/cm<sup>2</sup> intercept forced through zero ..... 20

## PUBLIKATION II

### ***Agar Contact Method as a Valuable Tool to Identify Slaughter Hygiene Deficiencies along the Slaughter Process by Longitudinally Sampling Pig Skin Surfaces***

- Table 1.** Results of the total viable count (TVC log cfu/cm<sup>2</sup>) at the seven process stages..... 30
- Table 2.** Mean differences of total viable count (TVC) values from one process stage to the following, and *p*-values of the mixed model with the process stage as a fixed effect, batch as a random effect and individual pigs as repeated measurements ..... 32
- Table 3.** Detection of *Salmonella* spp. along the slaughter line at seven process stages by depicting isolates of each pig batch and individual pig ..... 33
- Table 4.** Antimicrobial susceptibility test results for the 12 *Salmonella* spp. isolates, with breakpoints following Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) ..... 33

# 1. EINLEITUNG

Von besonderer Bedeutung bei der Fleischgewinnung ist die strikte Einhaltung der Schlachthygiene, welche als eine Maßnahme zur Verhinderung einer Oberflächenkontamination der Schlachttierkörper im Sinne der Lebensmittelsicherheit fungiert (Zweifel und Stephan 2003a). Im Zuge des Schlachtprozesses kann es zu einer mikrobiologischen Kontamination der Schlachttierkörper und des Fleisches mit eingetragenen Pathogenen kommen (BVL 2022). Darüber hinaus können Kreuzkontaminationen und Rekontaminationen auf den Schlachttierkörpern in verschiedenen Stufen des Schlachtprozesses auftreten, somit kann das Lebensmittel Fleisch einen Risikofaktor für die Gesundheit des Verbrauchers darstellen (Moura-Alves et al. 2022). Der hygienische Zustand der Schlachttierkörperoberfläche ist daher eine maßgebliche Voraussetzung für die hygienische Qualität des Fleisches am Ende der Schlachtkette (Giske und Klemm 1963).

Schweinefleisch wird immer wieder mit Krankheitsausbrüchen beim Menschen in Verbindung gebracht, die hauptsächlich auf das Vorhandensein von *Salmonella* im Produkt, z.B. durch eine mikrobiologische Kontamination, zurückzuführen sind (Arguello et al. 2013; Hernandez et al. 2013; Evangelopoulou et al. 2014). Daher müssen in der Europäischen Union (EU) die Lebensmittelunternehmer durch Eigenkontrollen sicherstellen, dass ihre Produkte den mikrobiologischen Kriterien für Lebensmittel und die Prozesshygiene gemäß der Verordnung (EG) Nr. 2073/2005 entsprechen (Europäische Kommission 2005; Gallina et al. 2015).

Die in der Verordnung (EG) Nr. 2073/2005 (Europäische Kommission 2005) definierten mikrobiologischen Kriterien für Lebensmittel sind dazu geeignet, die Sicherheit des Lebensmittels am Ende der Schlachtkette zu prüfen, woraus sich eine ordnungsgemäße Funktionsweise der Produktionskette ableiten lässt (EFSA 2007). Die mikrobiologischen Kriterien sind im Rahmen des Schweineschlachtprozesses für die aerobe mesophile Gesamtkeimzahl (GKZ), *Enterobacteriaceae* und Salmonellen an der Prozessstufe nach dem Zurichten und vor der Kühlung festgelegt (Europäische Kommission 2005).

Die Schweineschlachtbetriebe sind verpflichtet, wöchentliche Schlachttierkörperbeprobungen zur mikrobiologischen Untersuchung in Form von Eigenkontrollen durchzuführen (Europäische Kommission 2005). Diese Daten bieten eine Grundlage für die Validierung und Verifikation eines Hazard Analysis Critical Control Points (HACCP) Systems und anderer Hygienekontrollprozesse, welche in der Schweineschlachtindustrie etabliert sind (Di Ciccio et al. 2016). Da eine Kontamination an verschiedenen Stufen des Schlachtprozesses erfolgen kann, könnte eine Beprobung an mehreren Prozessstufen die Bewertung des Kontaminationsniveaus von weiteren als den gesetzlich vorgeschriebenen

Beprobungspunkten innerhalb des Prozesses ermöglichen (Wheatley et al. 2014). Bei abweichenden Ergebnissen sind Interventionen beginnend im Wartestall bis zur Kühlung von entscheidender Bedeutung für die Reduktion von Kontaminationen auf Schlachttierkörpern (Zdolec et al. 2022).

Im Rahmen dieser kumulativen Dissertation wurde die Eignung der Agarkontakt-Methode untersucht, welche entlang der gesamten Schlachtkette vom lebenden Schlachtschwein im Wartestall bis zur Kühlung angewendet werden kann und gleichzeitig den Arbeitsfluss des Schlachtprozesses nicht unterbricht.

Dazu wurden die Ergebnisse der Agarkontakt-Methode mit dem Nass-Trocken-Tupfverfahren, welches eine nach der Verordnung (EG) Nr. 2073/2005 (Europäische Kommission 2005) in Verbindung mit der DIN EN ISO 17604:2015-12 (2015) zugelassene Beprobungstechnik für Schlachttierkörper ist, hinsichtlich der Oberflächenkeimzahlbestimmung auf Schweineschlachttierkörperoberflächen verglichen (Publikation I, Fürstenberg et al. 2024).

Des Weiteren sollte die Nutzbarkeit der Agarkontakt-Methode im Rahmen einer longitudinalen Studie (Publikation II, Fürstenberg et al. 2023) über den gesamten, im Arbeitsfluss nicht unterbrochenen Schweineschlachtprozess, beginnend im Wartestall, untersucht werden. Zudem wurden die Oberflächenkeimzahlen der Schlachtschweinoberflächen an den einzelnen Prozesstufen zur Identifizierung von Prozesstufen mit einem möglichen Kontaminationsrisiko vergleichend betrachtet.



## **2. LITERATURÜBERSICHT**

### **2.1. Schweineschlachtprozess in industriellen, mittelständischen Schlachtbetrieben**

Die Schlachtschweine werden nach der Anlieferung in den Schlachtbetrieb auf die jeweiligen Buchten des Wartestalls aufgeteilt. Innerhalb der Betriebe kann im Wartestall eine Berieselungsanlage installiert sein, mit der die angelieferten Schlachttiere bei Bedarf mit Wasser berieselt werden können. Diese Berieselung dient dazu, die Schlachttiere nach dem Transport zu kühlen und zu beruhigen, außerdem wirkt sie sich im Allgemeinen positiv auf das Wohlbefinden der Tiere aus (Warriss 2003). Nach einer Ruhezeit im Wartestall werden die Tiere zur Prozessstufe der Betäubung geführt. Regulär können die Schlachtschweine nach Tierschutz-Schlachtverordnung mit Hilfe einer Kohlendioxidbetäubungsanlage oder unter der Verwendung einer Elektrobetäubung betäubt werden (Tierschutz-Schlachtverordnung 2012). Der darauffolgende Blutentzug kann im Liegen oder in hängender Position mittels Entblutungsschnitt oder durch ein Hohlmesser mit angeschlossener Blutabsaugvorrichtung, beispielsweise in einem rotierenden Karussell, erfolgen, um das Blut als Lebensmittel zu gewinnen. Nach der Entblutung folgt das Brühen der Schlachttierkörper bei 62 bis 64 °C, was in einem Brühkessel oder in einer Kondensationsbrühtunnelanlage erfolgen kann.

Anschließend läuft die Entborstung der Schlachttierkörper maschinell in einer Anlage mit rotierenden Gummipeitschen ab. Das Sengen bzw. das Abflammen wird mit Hilfe von Seng-/Flammöfen durchgeführt und daran anschließend erfolgt das sogenannte Polieren der Schlachttierkörper. Nach dem Rektumschnitt mittels Rektumbohrer und nach dem Ausweiden werden die Schlachttierkörper mit einer manuell oder maschinell geführten Spaltsäge in Hälften gespalten und anschließend hergerichtet. Abschließend erfolgt die amtliche Fleischuntersuchung, bevor die genusstauglichen Schlachttierkörper in den Kühlbereich transportiert werden.

### **2.2. Sicherheit des Lebensmittels Schweinefleisch**

Die mikrobiologische Qualität von rohem Fleisch ist unter anderem abhängig vom physiologischen Zustand des Schlachttieres bei der Schlachtung, dem Vorhandensein von möglichen Kontaminationen während des Schlachtprozesses und der Schlachttierkörperverarbeitung bzw. -herrichtung (Nychas et al. 2008). Schlachttiere, welche mit einer hohen Hautoberflächenkeimzahl am Schlachtbetrieb angeliefert werden, können eine mögliche Quelle für den Eintrag einer bakteriellen Kontamination sein und somit ein

potenzielles Risiko für die Lebensmittelqualität darstellen (Bolton et al. 2002). Die Verwertung von Fleischbestandteilen durch Bakterien und die daraus resultierenden Stoffwechselprodukte können zum Verderb des Fleisches führen (Casaburi et al. 2015). Das Potenzial zur Bildung von Verderbnisprozessen hängt zum einen davon ab, welche Mikroorganismen die Fleischmatrix dominieren und zum anderen von ihrer Fähigkeit, verderblich-wirkende Verbindungen, wie Ester, Ketone, Aldehyde, Schwefelverbindungen, Amine und flüchtige Fettsäuren, zu bilden (Dainty et al. 1985; Lambert et al. 1991; Kakouri und Nychas 1994). Der durch die Bakterien resultierende Verderb von Fleisch ist ein komplexer Vorgang aus einer Reihe von biologischen und chemischen Prozessen, der das Produkt für den menschlichen Verzehr ungeeignet macht (Gram et al. 2002). Darüber hinaus können Fleisch und Produkte vom Fleisch auch als mögliche Quelle von zoonotischen Infektionen beim Menschen fungieren (Nørrung und Buncic 2008).

### **2.3. Gefahren ausgehend vom Schweinefleisch**

In der EU ist die risikoorientierte Fleischuntersuchung von Hausschweinen in der Durchführungsverordnung (EU) 2019/627 (Europäische Kommission 2019) und Verordnung (EU) 2017/625 (Europäisches Parlament, Rat der Europäischen Union 2017) geregelt. Die Fleischuntersuchung von Schweineschlachtierkörpern und deren Nebenprodukten umfasst eine visuelle Untersuchung mit möglichen ergänzenden Untersuchungen, wie z.B. Inzision und Palpation bei begründeten Fällen (Europäische Kommission 2019; Laukkanen-Ninios et al. 2022). Somit folgt die risikoorientierte Fleischuntersuchung von Hausschweinen dem Grundprinzip zur Reduzierung einer möglichen Kreuzkontamination und zur Optimierung des Verhältnisses von Kosten und Nutzen. Das risikobasierte Grundprinzip bei der Fleischuntersuchung konzentriert sich ebenfalls auf die spezifischen Gefahren und zielt darauf ab, die Sicherheit von Fleisch entlang der gesamten Lebensmittelkette zu verbessern (Blagojevic et al. 2021). Zu diesen spezifischen Gefahren, die vom Schwein und deren Lebensmitteln ausgehen können, zählen Cysticercose, Trichinen, Tuberkulose (potentiell), Brucellose und Salmonellen (Europäische Kommission 2019).

Hinsichtlich der oben aufgeführten zoonotischen Infektionen ist die Salmonellose als die zweitwichtigste Zoonose in der EU im Jahr 2022 im Speziellen zu betrachten (EFSA und ECDC 2023). Die Salmonellose war ebenfalls nach der Campylobakteriose die am zweithäufigsten gemeldete lebensmittelbedingte Magen-Darm-Infektion beim Menschen und eine der Hauptursachen für lebensmittelbedingte Krankheitsausbrüche in den EU-Mitgliedstaaten und in Nicht-Mitgliedstaaten (EFSA und ECDC 2022).

Der an die Primärproduktion anschließende Schlachtprozess ist von besonderer Bedeutung für die Verhinderung der Kontamination von Schweineschlachttierkörpern und Teilstücken mit Salmonellen (Alban und Stärk 2005; De Busser et al. 2013). Insbesondere die fäkale Kontamination von Schlachttierkörpern im Schlachtbetrieb wird als Quelle von Salmonellen auf Schweinefleisch angesehen (Nauta et al. 2013). Aus dem Vergleich der Kontaminationsrate von Schweineschlachttierkörpern mit *Salmonella*, welche im Zoonose-Monitoring im Jahr 2021 bei 3,2 % lag, mit den Werten der Vorjahre (2020: 4,0 %, 2019: 3,4 %, 2018: 5,1 %, 2017: 2,9 %, 2015: 4,5 %) (BVL 2020; BVL 2021) lässt sich für diesen Zeitraum kein Trend erkennen, vielmehr variieren die Werte zwischen ca. 3 und 5 % positiver Proben (BVL 2020).

Schweine können *Salmonella* in den Schlachtbetrieb eintragen und die Umgebung im Schlachtbetrieb sowie Schlachtschweine aus anderen Partien kontaminieren (González Santamarina 2019). Die Interpretation des Zusammenhangs zwischen dem Salmonellenstatus eines Schweins im Mastbetrieb und der Wahrscheinlichkeit, dass es das Bakterium bei der Schlachtung ausscheidet, ist komplex und hängt von mehreren Faktoren ab (Casanova-Higes et al. 2017). Zum einen ist die Wahrscheinlichkeit der Ausscheidung hoch, wenn das Schwein bereits im Mastbetrieb infiziert war, zum anderen kann auch ein im Mastbetrieb nicht infiziertes Tier durch den Kontakt mit Verunreinigungen in Transportfahrzeugen und Wartestallungen zum Salmonellenausscheider werden und *Salmonella* während der Schlachtung verbreiten (Casanova-Higes et al. 2017).

## **2.4. Kritische Prozessstufen in der Schweineschlachtung**

Das Auftreten mikrobieller Kreuzkontaminationen innerhalb des Schlachtbetriebs wird stark durch die Struktur des Schlachtprozesses, die Geschwindigkeit des Schlachtbands, die manuellen Arbeitsschritte der Schlachtung, das Schlachthofpersonal und durch den Grad der Sauberkeit der Tiere zu Beginn der Schlachtung beeinflusst (Bacon et al. 2000; Blagojevic und Antic 2014; Sui et al. 2023).

### **2.4.1. Berieselung der Schlachtschweine im Wartestall**

Die Berieselung von Schlachttieren mit Wasser kann Tierwohldefiziten während des Aufenthalts im Wartestall vorbeugen oder als Korrekturmaßnahme, z.B. bei aufkommendem Hitzestress der Schlachttiere im Warteabteil, dienen (EFSA 2020). Die Vermeidung von Auseinandersetzungen zwischen den Schlachttieren durch die Beschäftigung mit Hilfe der Berieselung ist ein weiterer positiver Effekt und zusätzlich kann durch die Berieselung auch

eine Reinigung der Tiere erfolgen (Van Putten et al. 1983; Weeding et al. 1993). Weitere Autoren ermittelten in Untersuchungen zum Besprühen der Schweine mit Wasser, eine visuelle Sauberkeit der Schlachttiere bei annähernd unveränderten GKZ-Werten (Bolton et al. 2002).

Eine Studie zeigte widersprüchliche Resultate anhand eines statistisch signifikanten Anstiegs des Gehalts an *Enterobacteriaceae* auf der Hautoberfläche von Schlachtschweinen nach einer kontinuierlichen 30-minütigen Besprühung mit Wasser (Walia et al. 2017).

#### **2.4.2. Betäubung und Entbluten**

In zahlreichen Schlachtprozessanalysen wurden die höchsten GKZ-Werte auf Schlachttierkörperoberflächen nach dem Betäuben und Entbluten der Schlachtschweine ermittelt (Bolton et al. 2002; Schertenleib et al. 2011; Nastasijevic et al. 2018; Van Ba et al. 2019). Durch die Betäubung kommt es zur Erschlaffung der Sphinktermuskulatur des Anus, was zu einem Herausfließen von Kot aus dem Rektum führen (Swart et al. 2016) und somit ein mögliches Risiko für eine Kontamination des Schlachttierkörpers darstellen kann.

#### **2.4.3. Brühen und Entborsten**

Wie in verschiedenen Untersuchungen des Schweineschlachtprozesses festgestellt wurde, reduziert das Brühen der Schlachttierkörper die Oberflächenkeimzahl maßgeblich (Spescha et al. 2006; Zweifel et al. 2007; Wheatley et al. 2014; Mrdovic et al. 2017; Cê et al. 2023).

Im Gegensatz dazu, kann das Brühen in Bezug auf den Schweineschlachtprozess eine mögliche Quelle für die Kontamination bzw. Rekontamination der Schlachttierkörper sein, da verunreinigtes Brühwasser die Tierkörper rekontaminieren kann (Simonsen et al. 1987).

Weitere Autoren stellten in Untersuchungen einen relevanten Anstieg der Bakterienanzahl auf der Schlachttierkörperoberfläche durch die separat untersuchte Prozessstufe des maschinellen Entborstens fest (Bryant et al. 2003; Pearce et al. 2004; Spescha et al. 2006).

#### **2.4.4. Abflammen und Polieren**

Es wurde bereits vielfach übereinstimmend nachgewiesen, dass das Abflammen der Schlachttierkörper die Anzahl der Bakterien auf der Tierkörperoberfläche deutlich reduziert (Bolton et al. 2002; Pearce et al. 2004; Zweifel et al. 2008; Wheatley et al. 2014; Mrdovic et al. 2017). Jedoch kann das anschließende Polieren der Schlachttierkörper eine mögliche Ursache für eine Rekontamination sein (Simonsen et al. 1987; Yu et al. 1999). Aus diesem Grund

integrieren einzelne Schweineschlachtbetriebe nach dem Polieren einen weiteren Abflammprozess in die Schlachtkette.

#### **2.4.5. Eviszeration und Herrichten**

Innerhalb des Schweineschlachtprozesses gilt die Eviszeration als kritische Stufe, welche häufig zu einer Kontamination des Schlachttierkörpers führt (Yu et al. 1999; Rivas et al. 2000; Wheatley et al. 2014; Biasino et al. 2018). Das Muskelgewebe der Schlachttiere ist generell steril, wobei diese Fleischoberfläche im Rahmen des Eviszerationsprozesses mit gastrointestinalen Erregern, beispielsweise durch kontaminiertes Equipment oder durch mangelnde Personalhygiene des Schlachtpersonals oder durch den Kontakt mit kontaminierten Schlachttierkörpern, (kreuz-)kontaminiert werden kann (Bacon et al. 2000; Das et al. 2019; Sui et al. 2023). Außerdem können schlechte Hygienepraktiken bei der Eviszeration neben einer möglichen Kreuzkontamination von Schweineschlachttierkörpern auch zu einer Erhöhung der Wahrscheinlichkeit der Übertragung von Krankheitserregern auf das Fleisch beitragen (Petruzzelli et al. 2016). Weiterhin wurde auch das Trimmen als kritischer Kontrollpunkt und als ein entscheidender Faktor für Kreuzkontaminationen identifiziert (Sui et al. 2023).

#### **2.5. Rechtliche Vorschriften**

Die allgemeinen Anforderungen an die Lebensmittelsicherheit sind in der Verordnung (EG) Nr. 178/2002 festgelegt und beschäftigen sich unter anderem mit der Fragestellung, ob ein Lebensmittel möglicherweise durch Kontamination, Verderb, Fäulnis und Zersetzung für den Verzehr durch den Verbraucher inakzeptabel ist (Europäisches Parlament, Rat der Europäischen Union 2002). Darauf aufbauend sind für Schlachtbetriebe spezifische Hygienemaßnahmen in der Verordnung (EG) Nr. 852/2004 (Europäisches Parlament, Rat der Europäischen Union 2004a) und in der Verordnung (EG) Nr. 853/2004 (Europäisches Parlament, Rat der Europäischen Union 2004b) festgelegt. Die regelmäßige Eigenkontrolle der allgemeinen Hygienebedingungen soll vom Lebensmittelunternehmer umgesetzt werden und auf einem HACCP System basieren (Europäisches Parlament, Rat der Europäischen Union 2004a). Es handelt sich dabei um produkt- und produktionsspezifische Maßnahmen zur Vermeidung spezifischer Gesundheitsgefahren für den Konsumenten (Otten 2005).

Die Verordnung (EG) Nr. 2073/2005 (Europäische Kommission 2005) schreibt für Schlachtbetriebe einzuhaltende mikrobiologische Kriterien für Schweineschlachttierkörper vor. Es werden Grenzwerte für die GKZ, den Gehalt an *Enterobacteriaceae* und *Salmonella* im

Rahmen von Eigenkontrollen hinsichtlich einer wöchentlichen Schlachttierkörperbeprobung zur mikrobiologischen Untersuchung aufgeführt (Europäische Kommission 2005). Jedoch geben mikrobiologische Ergebnisse, die erst am Ende des Schlachtprozesses gewonnen werden, keinen Aufschluss über die Ursache des Keimeintrags (Milios et al. 2014). Daher sollten prozessspezifische mikrobiologische Kriterien verwendet werden, die auf Messungen beruhen, welche in verschiedenen Stufen des Schlachtprozesses, einschließlich der Oberflächenkeimzahlen der Schlachttierkörper am Ende der Schlachtkette, erhoben wurden (Milios et al. 2014). Eine Bewertung und Trendanalysen der mikrobiologischen Ergebnisse dienen der Identifizierung von abweichenden Ergebnissen und negativen Trends, auf deren Grundlage Korrekturmaßnahmen durchgeführt werden (Anonymous 2023).

In Deutschland regelt national die „Allgemeine Verwaltungsvorschrift über die Durchführung der amtlichen Überwachung der Einhaltung von Hygienevorschriften für Lebensmittel und zum Verfahren zur Prüfung von Leitlinien für eine gute Verfahrenspraxis“ (AVV LmH) unter anderem, ob im Rahmen eines HACCP-Systems Verfahren etabliert sind, welche sicherstellen, dass alle am Schlachtbetrieb ankommenden Tiere sauber sind (Anonymous 2009). So kann der Eintrag durch das Tier zu Beginn der Schlachtung einen Einfluss auf den Effekt des Schlachtprozesses haben (Zweifel et al. 2007). Die Forderung, dass nur saubere Tiere geschlachtet werden dürfen (Europäisches Parlament, Rat der Europäischen Union 2004b; Anonymous 2009), kann also als Maßnahme betrachtet werden, dass der Eintrag von Keimen in den Schlachtbetrieb auf ein Mindestmaß begrenzt wird.

Die Verpflichtungen des Lebensmittelunternehmers, für hygienische Produktionsabläufe Sorge zu tragen, werden durch die amtliche Überwachung kontrolliert (Europäisches Parlament, Rat der Europäischen Union 2017). Aber auch die Untersuchungsabläufe des amtlichen Personals selbst können mit dem Risiko einer Kreuzkontamination einhergehen. Im Rahmen der risikoorientierten Fleischuntersuchung beim Schwein steht die visuelle Untersuchung der Schlachttierkörper und Nebenprodukte im Vordergrund (Europäische Kommission 2019). Lediglich in Einzelfällen, in denen ein Risiko erkannt wurde, werden weitere Untersuchungsschritte, wie die Palpation oder Inzision, angewandt (Europäische Kommission 2019; Laukkanen-Ninios et al. 2022). Das Grundprinzip der risikobasierten Fleischuntersuchung zielt darauf ab, die Sicherheit von Fleisch entlang der gesamten Lebensmittelkette zu verbessern (Blagojevic et al. 2021).

### **2.5.1. Mikrobiologisches Monitoring an verschiedenen Prozessstufen**

Eigenkontrollverfahren werden von der Lebensmittelindustrie eingesetzt, um die Qualität und Sicherheit der Endprodukte unter Berücksichtigung von Hygiene- und Verarbeitungskriterien zu gewährleisten (Dias et al. 2017). Trotz etablierter Verfahren wird weiterhin nach einem

idealen System zur Kontrolle der mikrobiologischen Kontamination während der Verarbeitung von Lebensmitteln gesucht (Dias et al. 2017).

Die mikrobiologische Analyse, die Gefahrenanalyse und Identifizierung von kritischen Kontrollpunkten als Elemente des HACCP Systems sind wichtige Instrumente zur Überwachung der mikrobiologischen Qualitätsindikatoren (Cê et al. 2023). Wie bereits ausgeführt, geben die Ergebnisse, welche am Ende des Schlachtprozesses erhoben werden, keine präzise Auskunft über die Ursache möglicher Defizite, daher sind prozessbasierte mikrobiologische Kriterien für Schlachttierkörper, die auf Erhebungen an verschiedenen Prozessstufen entlang der Schlachtkette beruhen, sinnvoll (Miliot et al. 2014). Die Ermittlung der mikrobiologischen Oberflächenkeimzahl von Schweineschlachttierkörpern an verschiedenen Schlachtprozessstufen, welche zu einer Reduktion oder Zunahme der Oberflächenkeimzahl führen können, dienen der Identifizierung, der Überwachung sowie gegebenenfalls der Korrektur von erkannten Defiziten (Zweifel et al. 2007). Erhebungen dieser Art im Sinne einer kontinuierlichen Prozesskontrolle bieten in Verbindung mit der Bewertung möglicher Gesundheitsrisiken für den Verbraucher die Grundlage zur Umsetzung eines geeigneten und betriebsspezifischen Überwachungssystems (Zweifel et al. 2007).

## **2.6. Methoden zur Bestimmung der Oberflächenkeimzahl auf Schlachttierkörpern**

Mehrere Faktoren, wie z.B. die Art und die Beschaffenheit der zu beprobenden Oberfläche und der zu erwartende Grad der Kontamination, müssen bei der Auswahl einer geeigneten mikrobiologischen Beprobungsmethode berücksichtigt werden (Fliss et al. 1991).

Zur mikrobiologischen Untersuchung von Schweineschlachttierkörpern auf den Gehalt an *Enterobacteriaceae* und der GKZ kann im Rahmen der Eigenkontrollen gemäß Verordnung (EG) Nr. 2073/2005 (Europäische Kommission 2005) in Verbindung mit dem Standardprotokoll DIN EN ISO 17604:2015-12 (2015) sowohl aus destruktiven als auch aus nicht-destruktiven Probenahmeverfahren gewählt werden. Nach Verordnung (EG) Nr. 2073/2005 (Europäische Kommission 2005) können ebenfalls Probenahmeverfahren genutzt werden, welche nicht in der DIN EN ISO 17604:2015-12 (2015) gelistet sind. Diese alternativen Verfahren müssen jedoch vor der Nutzung im Vergleich mit destruktiver Probenentnahme gleichwertige mikrobiologische Ergebnisse aufweisen und nach entsprechenden Standardprotokollen von Dritten zertifiziert sein (Europäische Kommission 2005).

### **2.6.1. Destruktive Methoden**

Destruktive Methoden beruhen auf dem sterilen Ausschneiden oder Ausstanzen einer definierten Größe eines Gewebestücks der Schlachttierkörperoberfläche, anschließend muss die gewonnene Gewebeprobe zur Bestimmung der GKZ homogenisiert werden (Otten 2005). Die Gewebeexzision mit einem runden Stanzmesser ist die präferierte destruktive Methode und Studien haben gezeigt, dass bei der Exzision im Vergleich zu nicht-destruktiven Methoden eine höhere Anzahl von Bakterien zur Bestimmung des mikrobiologischen Status nachgewiesen werden kann (Gill et al. 2001; Pearce und Bolton 2005). Die Methode wird für die Prozesshygienekontrolle von Schweineschlachttierkörpern am Beprobungsort vor der Kühlung von den Schlachtbetrieben bevorzugt (Bolton 2003).

Jedoch sind das invasive und gewebezerstörende Verfahren, der hohe Zeitaufwand und das erforderliche Fachwissen für die Beprobungsdurchführung mögliche Limitationen der Exzision für die Nutzung durch fleischverarbeitende Betriebe in der EU (Capita et al. 2004; Gallina et al. 2015).

Die Exzision bei einer Untersuchung mit wiederholten Probenentnahmen entlang der Schlachtkette führt allerdings zu einem erheblichen Verlust der Schlachttierkörperoberfläche (Tenhagen et al. 2011).

### **2.6.2. Nicht-destruktive Methoden**

Um ein angemessenes Überwachungssystem einzuführen, können nicht-destruktive Beprobungsmethoden zur Probenahme von Schlachttierkörpern anstelle von Gewebestanzproben verwendet werden (Miliotis et al. 2014). Die mikrobiologische Wiederfindungsrate ist grundsätzlich bei nicht-destruktiven Methoden geringer, aber proportional zur Wiederfindungsrate der Exzision und daher können nicht-destruktive Methoden als praktikable Probenahmeverfahren für die Bewertung von Indikatoren während des Schlachtvorgangs und der Hygiene angesehen werden (Miliotis et al. 2014). Nach Verordnung (EG) Nr. 2073/2005 (Europäische Kommission 2005) in Verbindung mit der DIN EN ISO 17604:2015-12 (2015) kann für die mikrobiologische Schlachttierkörperuntersuchung, je nach zu beprobender Schlachttierkörperoberfläche, zwischen folgenden zugelassenen nicht-destruktiven Beprobungsmethoden unterschieden werden:

- Abwischverfahren mit Schwamm, Tampontupfer oder kleinem Tuch
- Tupferverfahren, speziell das Nass-Trocken-Tupferverfahren



Zusätzlich wurden in Studien verschiedene Abklatsch- bzw. Kontaktverfahren (Baumgart und Kussmann 1975; Cordray und Huffman 1985; Kleiner und Hilgert 2004a) zur Beprobung von Schweineschlachttierkörpern angewendet, jedoch sind diese nicht-destruktiven Verfahren für die Beprobung von Schlachttierkörperoberflächen nicht zugelassen.

### **2.6.2.1. Nass-Trocken-Tupfverfahren**

Tupfverfahren im Allgemeinen basieren auf der Aufnahme von Probenmaterial und werden nach DIN EN ISO 17604:2015-12, je nach Größe und Beschaffenheit der zu untersuchenden Oberfläche in Verfahren mit Tupfern oder Verfahren mit Tampons, Schwämmen, Tüchern und Gaze für die Beprobung von Schlachttierkörpern unterteilt (ISO 17604:2015-12 2015). Louwers und Klein (1994) unterteilten die Tupfertechniken generell in die Einzel-Tupfmethode und das Nass-Trocken-Tupfverfahren.

Zur Durchführung des Nass-Trocken-Tupfverfahrens gemäß DIN EN ISO 17604:2015-12 (2015) wird eine z.B. durch eine Schablone abgegrenzte Oberfläche zuerst mittels eines mit Verdünnungsmittel befeuchteten Stieltupfers und anschließend mittels eines trockenen Stieltupfers abgestrichen.

Die Vorteile der Verwendung von Tupfern sind, dass die beprobte Oberfläche nicht beschädigt wird, eine große Fläche beprobt werden kann und die Verfahren auch für den Nachweis von Bakterien in geringer Anzahl und ungleichmäßiger Verteilung auf dem Tierkörper geeignet sind (Capita et al. 2004). Besonders auf geringfügig feuchten Oberflächen, wie beispielsweise auf frisch geschlachteten Schlachttierkörpern, ermittelt das Verfahren eine höhere Oberflächenkeimzahl als auf trockenen Oberflächen (Anderson et al. 1987).

Nachteilig ist die präzise, aufwendige Durchführung der Probenahme, die Erfahrung erfordert und eine mögliche Nutzung hängt von der zu untersuchenden Oberfläche ab (Louwers und Klein 1994). Für das Nass-Trocken-Tupfverfahren sind mikrobiologische Bewertungskriterien, vergleichbar mit der destruktiven Probenahme nach Verordnung (EG) Nr. 2073/2005 (Europäische Kommission 2005), für die Beprobung auf Schlachttierkörpern evaluiert (Zweifel et al. 2005).

### **2.6.2.2. Agarkontakt-Methode**

Abklatsch- bzw. Kontaktverfahren im Allgemeinen basieren auf dem direkten Kontakt von z.B. festem Nähragar mit der zu untersuchenden Oberfläche und der anschließenden direkten Bebrütung der Medien (Trautsch 2003). Gemäß DIN EN ISO 18593:2018-10 (2018) werden Abklatsch- bzw. Kontaktverfahren zur semiquantitativen mikrobiologischen Analyse von

Einrichtungsgegenständen, Umgebungs-, Geräte- und Utensilienoberflächen eingesetzt. Diese Kontaktverfahren sind aufgrund ihrer einfachen Handhabung sowie des geringen Arbeits- und Kostenaufwands gebräuchliche mikrobiologische Untersuchungsmethoden zur Erfassung der Betriebshygiene (Pless und Pletz 1995).

Generell erfolgt der Bakterientransfer direkt von einer kontaminierten Oberfläche auf die Agaroberfläche (z.B. unter der Verwendung von Agarkontaktplatten) und daher hängt die Wiederfindungsrate von der Adhäsion und der Ablösbarkeit der Bakterien von der beprobten Oberfläche ab (Schulze 2000; Capita et al. 2004). Bei der bakteriellen Besiedelung auf der zu beprobenden Oberfläche werden die drei Phasen Adsorption, Konsolidierung und Kolonisation unterschieden, wobei der Adsorptionsprozess reversibel ist und die Bakterien noch durch z.B. Waschen entfernt werden können, da zu diesem Zeitpunkt noch keine feste Adhäsion besteht (Notermans et al. 1991). In Untersuchungen wurde gezeigt, dass zwei bis drei Stunden nach dem Aufbringen einer Bakteriensuspension die Bakterien mit der Produktion von extrazellulären Polymeren beginnen, die sich als dünne Fasern entwickeln und in deren Folge sich eine feste Adhäsion an der Haut bzw. Oberfläche ausbildet (Firstenberg-Eden et al. 1979). Für mikrobiologische Untersuchungen werden verschiedene Abklatsch- bzw. Kontaktverfahren beschrieben, wie z.B. die Replicate Organism Direct Agar Contact (RODAC)-Platten, die Agarwurstmethode nach Ten Cate (1965), Dip Slides, Direct Surface Agar Plating, Membranfilterblots, Selbstklebebänder, Petrifilm-Zählplatten und Agarspritzen. Am häufigsten werden für die semiquantitative Untersuchung von Gegenständen kommerziell erhältliche RODAC-Platten verwendet, welche aus einer mit Nähragar gefüllten Petrischale bestehen, bei der der Nähragar einen erhabenen, konvexen Meniskus für die direkte Abklatsch- bzw. Kontaktfläche bildet. Ein Vorteil dabei ist, dass keine weiteren oder zusätzlichen Materialien für die Beprobung vor Ort benötigt werden (Louwers und Klein 1994; Capita et al. 2004).

Agarkontaktplatten ermöglichen zudem eine schnelle und einfache Beprobung der Hautoberfläche von lebenden Tieren unter der Berücksichtigung des Tierwohls (Bond et al. 2008; Cavana et al. 2015).

Das Abklatsch- bzw. Kontaktverfahren ist auf glatten, flachen oder leicht gewölbten Oberflächen einfach und schnell durchzuführen (Baumgart 1977; Niskanen und Pohja 1977; Snijders et al. 1984; Louwers und Klein 1994; Oberhäuser 2005). Jedoch ist die Genauigkeit des Abklatschverfahrens auf rauen Oberflächen geringer (Baumgart 1977; Niskanen und Pohja 1977). Bei der Beprobung feuchter oder nasser Oberflächen ist die Adhäsion der Bakterien auf der Agarkontaktfläche unzureichend (Louwers und Klein 1994).

Im Falle einer hohen Kontamination der zu untersuchenden Oberfläche ist die Keimzahl nicht genau ermittelbar, da der direkt bebrütete Nähragar von Mikroorganismen überwuchert wird (Niskanen und Pohja 1977). Nach Sibomana (1980) liefern Abklatsch- bzw. Kontaktverfahren

nur eine qualitative Orientierung hinsichtlich der Oberflächenkeimzahl und sind für eine quantitative Bestimmung ungeeignet.

Nach Globisch et al. (1996) sind die Methoden mittels Agarkontaktplatten grundsätzlich auch für eine orientierende Bestimmung der Oberflächenkeimzahl von Schlachttierkörpern geeignet.

Um eine quantitative Koloniezählung bei stark kontaminierten Oberflächen zu ermöglichen, lösten Baumgart und Kussmann (1975) sowie auch Kusch (1977) den Nähragar aus der Agarkontaktplatte und homogenisierten ihn in gepuffertem Peptonwasser (BPW). Das entstandene Homogenat diente anschließend als Grundlage für die Erstellung einer dezimalen Verdünnungsreihe. Diese Modifikation der Methode wurde als Agarkontakt-Methode bezeichnet (Baumgart und Kussmann 1975; Kusch 1977).

### **2.6.3. Methodenvergleich auf Schlachttierkörperoberflächen**

Studien (Baumgart und Kussmann 1975; Kusch 1977) haben gezeigt, dass im Falle einer hohen Kontamination auf der Schweinehaut repräsentative GKZ-Werte mit der Agarkontakt-Methode erzielt werden können. Snijders et al. (1984) kamen zu dem Schluss, dass die Agarkontakt-Methode mittels individueller Agarplatten mit einer Kontaktfläche von 7,5 cm<sup>2</sup> für die Bewertung der Kontamination von Schlachttierkörpern nicht geeignet ist. Allerdings kann eine kleine Kontaktfläche von beispielsweise 9 cm<sup>2</sup>, in Abhängigkeit zur untersuchenden Oberfläche, zu größeren Schwankungen der Ergebnisse führen (Louwers und Klein 1994).

Die Ergebnisse von Baumgart und Kussmann (1975) zeigten, dass die mit der Agarkontakt-Methode ermittelten Keimzahlen um ein bis zwei Zehnerpotenzen niedriger waren als die der Gewebeexzision. Vergleichsstudien ermittelten mit der semiquantitativen RODAC-Methode eine geringere Bakterienausbeute an Schweineschlachttierkörpern als unter der Verwendung vom Tupfverfahren (Sibomana 1980; Cordray und Huffman 1985). Diese Resultate stehen im Einklang mit Vergleichsuntersuchungen zwischen der RODAC-Methode und der Gewebestanzmethode an Rinder- und Schweineschlachttierkörper (Pless und Pletz 1995).

Kleiner und Hilgert (2004a; 2004b) zeigten durch die Beprobung von Schweinehaut, dass sich die mittleren GKZ-Werte vom Nass-Trocken-Tupfverfahren und von der RODAC-Methode um bis zu maximal 0,5 log unterschieden und schlussfolgerten die Eignung der RODAC-Methode für die mikrobiologische Untersuchung von Schweineschlachttierkörperoberflächen. Eine weitere Vergleichsstudie stellte fest, dass die RODAC-Methode aufgrund der Ungenauigkeit der Ergebnisse durch die methodisch bedingte Streubreite zwar keine geeignete Alternative für die destruktive Probenentnahme darstellt, jedoch grundsätzlich für eine der Orientierung dienenden Untersuchung auf Schlachttierkörpern geeignet ist (Globisch et al. 1996).

In dieser Arbeit wurde untersucht, dass diese schnelle, praktikable und tiergerechte Methode vergleichbare Ergebnisse zu dem nicht-destruktiven Standardverfahren erhebt und besonders bei höher erwarteten Oberflächenkeimzahlen auf Schweineschlachttierkörpern für eine separate, betriebsspezifische Prozessanalyse an mehreren Stufen geeignet ist.

Dazu wurde ein Methodenvergleich zwischen der Agarkontakt-Methode und dem Nass-Trocken-Tupfverfahren mit künstlich kontaminierten Schweinehautteilstücken durchgeführt. Zusätzlich zum experimentellen Teilversuch wurden die beiden nicht-destruktiven Methoden in einem deutschen Schlachtbetrieb an frisch geschlachteten Schweineschlachttierkörpern unter Feldbedingungen bzw. den Einflüssen des Schlachtprozesses miteinander verglichen. Ziel dieser Teiluntersuchungen war es, die Vergleichbarkeit der Resultate der GKZ-Untersuchungen der Agarkontakt-Methode zum Nass-Trocken-Tupfverfahren aufzuzeigen. Aufbauend auf diesen Resultaten wurde mittels Agarkontakt-Methode eine longitudinale Studie über den gesamten Schweineschlachtprozess in einem deutschen Schlachtbetrieb (vom Wartestall bis zur Kühlung) durchgeführt. Die hervorzuhebenden Besonderheiten dieser Prozessanalyse sind, dass individuelle Schlachtschweine mit der tiergerechten Beprobungsmethode bereits im Wartestall lebend und zusätzlich an weiteren Prozessstufen entlang der Schlachtkette wiederholt beprobt werden konnten, ohne den Arbeitsfluss des Schlachtbetriebs zu unterbrechen. In diesem Teil der Untersuchungen wird die Nutzbarkeit der Agarkontakt-Methode für eine zusätzliche, schlachthofspezifische und orientierende Prozesshygieneuntersuchung bewertet.

### 3. PUBLIKATION I

#### ***Comparison of the agar contact method and the wet-dry double swabbing method for determining the total viable bacterial count on pig carcass surfaces***

Roland Fürstenberg <sup>1</sup>, Diana Meemken <sup>1</sup>, Susann Langforth <sup>1</sup>, Julia Große-Kleimann <sup>2</sup>, Lothar Kreienbrock <sup>2</sup> and Nina Langkabel <sup>1</sup>

<sup>1</sup> Working Group Meat Hygiene, Institute of Food Safety and Food Hygiene, School of Veterinary Medicine, Freie Universität Berlin, 14163 Berlin, Germany

<sup>2</sup> Department for Biometry, Epidemiology and Information Processing, WHO Collaborating Centre for Research and Training for Health at the Human-Animal-Environment Interface, University of Veterinary Medicine Hannover, Foundation, 30559 Hannover, Germany

#### **Erläuterung des persönlichen Anteils an den Leistungen zur Umsetzung der Studie**

Konzipierung des Versuchsaufbaus

Vorbereitung und Bearbeitung des Beprobungsmaterials

Durchführung der Probenahmen

Sammlung der Daten

Durchführung der Laboruntersuchungen

Statistische Datenanalysen

Visualisierung der Daten

Anfertigung des ersten Manuskriptentwurfs

Umsetzung der Autoren- und Gutachterbeiträge für das finale Manuskript

Published in Open Access (CC BY 4.0)

Journal of Consumer Protection and Food Safety 2024, 19: 41-48

DOI: 10.1007/s00003-023-01473-6

© The Authors (2023)

Licensee Springer-Verlag GmbH, Heidelberg, Germany

ISSN (Print) 1661-5751

Received: 6 July 2023

Revised: 7 November 2023

Accepted: 16 November 2023

Published: online 6 December 2023

<https://doi.org/10.1007/s00003-023-01473-6>

## RESEARCH ARTICLE



# Comparison of the agar contact method and the wet-dry double swabbing method for determining the total viable bacterial count on pig carcass surfaces

Roland Fürstenberg<sup>1</sup> · Diana Meemken<sup>1</sup> · Susann Langforth<sup>1</sup> · Julia Grosse-Kleimann<sup>2</sup> · Lothar Kreienbrock<sup>2</sup> · Nina Langkabel<sup>1</sup>

Received: 6 July 2023 / Revised: 7 November 2023 / Accepted: 16 November 2023 / Published online: 6 December 2023  
© The Author(s) 2023

## Abstract

A practical and representative sampling method for microbiological examination of the slaughter process is useful for identifying abattoir-specific risk factors within the pig slaughter line. The aim of this study was to examine the suitability of an agar contact method (ACM), where the agar was homogenized before the microbiological processing, in comparison with the wet-dry double swabbing method (WDSM) for quantitative determination of total viable counts (TVC) on pig skin surfaces. In our experimental trial, pig skin pieces were artificially contaminated at 2 levels (3 log and 7 log cfu/ml) with a suspension of bacteria species commonly found on pig skin and cultivated *in vitro*. Within our field trial, pig carcasses were investigated at pre-chilling in an abattoir under standard processing conditions. For both sampling methods, TVC was determined, and statistical equivalence tests were calculated. Linear regression models showed the similarity of the sampling methods, with coefficient of determination ( $R^2$ ) > 90% and slope parameters of nearly 1 for both trials separately. Statistically significant equivalence between the 2 sampling methods was proven in both trials (with  $p < 0.0001$  within an equivalence range of  $\pm 0.5$  log cfu/ml, respectively). The field trial revealed TVC on carcass surfaces sometimes at or below the lower detection limit for the ACM, while TVC from all carcasses were able to be determined by WDSM. Overall, low contamination levels were less reliably detectable by ACM than by WDSM. The ACM can be seen as an additional and suitable sampling procedure for pig skin and can contribute to the identification of abattoir specific risk factors for investigations of the hygienic status at process stages along the pig slaughter line.

**Keywords** Artificial contamination · Pig skin · Microbiological load · Experimental trial · Agar contact plates

## 1 Introduction

Microbiological criteria for foodstuffs, as defined in Regulation No 2073/2005 (EC 2005) for process hygiene, are suitable to verify the hygienic status of food at the end of the slaughter line and to evaluate the process performance

(EFSA 2007; Zweifel et al. 2014). Strict compliance with slaughter hygiene principles is of utmost importance as a measure to prevent surface contamination of the carcasses (Zweifel and Stephan 2003). In turn, the hygienic condition of the carcass surface is an essential prerequisite for the hygienic quality of meat products at the end of the slaughter line (Gisske and Klemm 1963). However, monitoring along the slaughter process at different stages is particularly useful to be able to identify specific risk factors and processing steps for contamination within the slaughter line and to correct them. The determination of total viable count (TVC) of bacteria as a general hygienic indicator (Otten 2005) is useful for orientation regarding the microbiological contamination of fresh meat (Snijders et al. 1984; Charlebois et al. 1991).

Regulation (EC) No 2073/2005 (EC 2005) requires compliance with ISO 17604:2015-12 (2015), which

✉ Roland Fürstenberg  
roland.fuerstenberg@fu-berlin.de

<sup>1</sup> Institute of Food Safety and Food Hygiene, Working Group Meat Hygiene, School of Veterinary Medicine, Freie Universität Berlin, Berlin, Germany

<sup>2</sup> Department of Biometry, Epidemiology and Information Processing, WHO Collaborating Centre for Research and Training for Health at the Human-Animal-Environment Interface, University of Veterinary Medicine Hannover, Foundation, Hannover, Germany

predetermines sampling methods to be used for carcass surfaces. Among the prescribed sampling methods, only a few are suitable for practical hygiene monitoring (Schulze 2000). For carcass sampling, destructive and nondestructive sampling methods can be used as described in ISO 17604:2015-12 (2015). For destructive methods, a defined tissue sample from the carcass is excised and used to determine the bacterial count (Otten 2005). Due its invasive and destructive nature and the time and expertise required, excision sampling is often impractical for meat processing plants (Gallina et al. 2015), but is preferred for process hygiene control of pig carcasses before chilling (Bolton 2003). The microbiological limits for pig carcasses are based exclusively on excision, but alternative methods can be used if they have been certified and validated as correlating with tissue excision (EC 2005). Non-destructive methods involve different swabbing methods and are used to sample larger carcass areas. The tested surface remains intact, and the carcass retains its full commercial value after sampling. (Schulze 2000). Following Louwers and Klein (1994), swabbing methods are based on absorbing bacteria from the sampled matrix and are divided into single swabbing and wet-dry double swabbing method (WDSM). Sampling procedure of the WDSM is quick (Zweifel and Stephan 2003), and sampling areas with low incidences and uneven distributions of bacteria can be covered (Capita et al. 2004). However, this precise sampling method requires expertise (Louwers and Klein 1994). Compared to single dry swabbing, WDSM provided higher bacteria recovery rates (Kleiner 2000) and is recommended (EC 2005) and widely used in the EU meat industry (Peperell et al. 2005). A third surface sampling technique is the contact method, i.e., direct contact of solid agar on the testing surface. According to ISO 18593:2018 (2018), methods with contact plates such as Replicate Organism Direct Agar Contact (RODAC) are used for semi-quantitative microbiological analysis of fitments, equipment, and utensils. Sampling is quick and easy, and no other work materials are needed on site (Capita et al. 2004). Additionally, RODAC plates are suitable for microbiological sampling of carcass surfaces (Globisch et al. 1996; Kleiner and Hilgert 2004a, b). To enable quantitative colony counting, Baumgart and Kussmann (1975) and Kusch (1977) adapted the semiquantitative approach by, after sampling, homogenizing the agar slice in buffered peptone water (BPW) for preparation of a decimal dilution series and plating. They called this procedure the agar contact method (ACM).

Relatively few comparative studies of contact methods conducted on carcass surfaces exist (Snijders et al. 1984; Cordray and Huffman 1985; Kleiner and Hilgert 2004a, b), and studies focused on specific bacteria (Nortje et al. 1982; Fliss et al. 1991). Therefore, our study should show whether this practical, fast and easy sampling procedure could be a suitable method for studies of the hygienic status

of slaughter pigs at process stages of the slaughter line, to detect abattoir specific risk factors. To this aim, we compared WDSM and ACM on laboratory-contaminated pig skin pieces and on pig carcasses in a field trial at an abattoir.

## 2 Material and methods

### 2.1 Study design

The study was designed in 2 parts: an experimental trial on laboratory-contaminated pig skin pieces and a field trial on pig carcasses at an abattoir. Each skin piece/carcass was sampled using the 2 different sampling methods, WDSM and ACM.

### 2.2 Sampling methods

For WDSM, the sampling procedure was adapted from ISO 17604:2015-12 (2015). First, a 20 cm<sup>2</sup> sterile plastic template (COPAN, Brescia, Italy) was placed on the pig skin. In the experimental trial, this template was fixed by inserting 2 sterile cannulas (B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Germany), and in the field trial, it was held manually on carcass surfaces. A commercial wet cotton swab (3 M Health Care, Saint Paul, USA) was first squeezed out on the inner wall of its tube containing 10 ml BPW by turning. The damp swab was rubbed firmly across the delineated skin/carcass surface at a 45° angle in a meandering pattern with slight rotation and with 7 strokes both horizontally and vertically. Afterwards the swab was moved along the inner edge of the template to ensure the skin here was sampled, and the swab was returned into the tube. A second dry cotton swab (COPAN, Brescia, Italy) was used in the same way, then placed in the same tube with BPW as the associated wet swab. Both swabs pooled together constituted one sample.

For ACM, commercial agar contact plates containing plate count agar (PCA) with a slightly raised agar surface of 23 cm<sup>2</sup> (VWR International GmbH, Darmstadt, Germany) were used. Each agar plate was pressed firmly for 5 s on the surface without lateral movement and was closed again directly after sampling. The sampling was always performed by the same researcher.

### 2.3 Experimental trial with laboratory-contaminated pig skin pieces

For the experimental trial, in total 160 samples comprising 128 experimental test samples that were contaminated in the laboratory, and 32 status quo samples that were not contaminated in the laboratory, were collected from 32 pig skin pieces over 6 sampling days. The scalded, de-haired, and singed pig skin pieces (from neck, brisket, flank, rump,

or back) were purchased from a local wholesaler. On the same day the laboratory work was to be conducted, pig skin pieces were cut from the chilled carcasses and transported in a plastic bag to the laboratory under constant refrigeration at 4 °C. Each pig skin piece was cut into approximately 50 cm × 40 cm pieces and marked with 5 equally-sized fields for sampling. Two fields were marked for ACM by using a sterile stainless-steel round die cutter (diameter 50 mm) outlined with a food marker pen. Two fields for WDSM were delineated using a sterile plastic template (COPAN, Brescia, Italy). One field was used for status quo sampling by WDSM. From the 5 marked fields, 4 were contaminated as described below. The order of distribution of contaminated fields was changed randomly for all pig skin pieces.

Artificial contamination of the pig skin was performed using 2 concentrations of reference bacteria originating from DSMZ (German Collection of Microorganisms and Cell Cultures GmbH, Braunschweig, Germany) and ATCC (American Type Culture Collection, Manassas, USA). The following different species, commonly found on pig carcass surfaces (Corbeil 2014), were used to create the bacteria suspension: *Escherichia coli* DSMZ 1103; *Enterococcus faecalis* DSMZ 2570; *Staphylococcus aureus* DSMZ 799; *Micrococcus luteus* DSMZ 20030; *Streptococcus suis* DSMZ 9682; *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442. Each organism was prepared by suspending one colony forming unit (cfu) in 10 ml of Brain–Heart–Infusion broth (Oxoid Ltd, Hampshire, UK). After suspensions were incubated for 24 h at 30 °C (*P. aeruginosa*) or at 37 °C (other bacteria), volumes of 2.5 ml (*E. coli*) or 5 ml (other bacteria) were mixed to prepare the bacteria suspension for artificial contamination. The bacteria suspension was diluted so it contained up to 7 log cfu/ml using sodium chloride peptone broth (Merck KGaA, Darmstadt, Germany), confirmed by plating on PCA (Th. Geyer GmbH & Co. KG, Renningen, Germany). The high concentration, containing 7 log cfu/ml, represented high-level contamination and the low concentration, containing 3 log cfu/ml, represented low-level contamination.

For both sampling methods, 100 µl of bacteria suspension was pipetted into the marked fields on the pig skin pieces at room temperature; the suspensions were repeatedly spread out with a stainless-steel spatula until they were visibly dry. Afterwards, sampling of the respective fields using WDSM (low-level and high-level contamination; status quo field without artificial contamination) and ACM (low- and high-level contamination) was performed (see 2.2).

## 2.4 Field trial at the abattoir

The field trial was conducted at an industrial pig abattoir located in Northwestern Germany with a slaughter capacity of 2900 pigs per day. The sampling point was at the end of the slaughter line post-evisceration and dressing but directly

before the carcasses entered the chiller. In total, 58 samples from 29 slaughtered pigs from 9 different holdings were collected randomly. 3 carcasses from 8 holdings respectively and 5 carcasses from 1 holding were sampled. Each carcass was sampled in the perianal area, whereby one side was sampled using WDSM and the other side using ACM. The 2 sampling methods were used alternately on the carcass sides, starting from the first pig carcass being sampled by ACM on the left perianal side and by WDSM on the right perianal side. These sides were swapped for each subsequent pig carcass.

After sampling, pooled swabs and agar contact plates were transported at 4 °C to the institute's laboratory. Microbiological examination started the next day.

## 2.5 Microbiological examination

WDSM tubes were vigorously shaken with a vortex mixer (Vortex-Genie 2 Vortex Mixer, Modell: G-560 E, Scientific Industries, INC., Bohemia, New York, USA) for 30 s before decimal solution series were prepared. For determination of TVC by ACM, each agar slice was dislodged from the Petri dish with sterile forceps and transferred into a sterile blender bag with lateral filter (VWR International GmbH, Darmstadt, Germany). Afterwards, a volume of 100 ml BPW (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) was added, and the content of the blender bag was homogenized with a stomacher (Smasher™ High-Performance Blender/Homogenizer, bioMerieux, Marcy-l'Étoile, France) for 2 min with a speed of 560 strokes per minute. After homogenization, the resulting basic homogenate was used for the decimal dilution series. For quantitative analysis of TVC, duplicate 0.1 ml volumes from basic homogenate and each dilution series were dropped onto PCA and streaked out using a sterile loop (Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Germany). Incubation under aerobic conditions at 30 °C was  $48 \pm 2$  h for WDSM samples and  $72 \pm 2$  h for ACM samples. After incubation, colonies were counted for each dilution step and the TVC were calculated. Colonies were also calculated in the case when only 1 colony was counted per plate in the minimum dilution.

## 2.6 Statistical analyses

The minimum required sample size of  $n = 26$  was calculated with statistical software NCSS-PASS, Version 2021 (NCSS, LLC, Utah, USA), using a paired t-test for equivalence with a minimum power = 80%,  $\alpha = 5\%$ , confidence limits of  $\pm 0.15$  and  $\sigma = 0.25$ .

The weighted arithmetic mean TVC was calculated for each sample. Results as counted, in cfu/cm<sup>2</sup>, initially had skewed distributions, so all results were normalized by transforming via logarithms to the base 10. The



minimum limit of detection (1 colony counted only) was 1.00 log cfu/cm<sup>2</sup> for WDSM and 1.94 log cfu/cm<sup>2</sup> for ACM. In the case of a complete lack of visible growth, for statistical test purposes, bacteria counts were considered as half of the minimum limit of detection, which was 0.70 log cfu/cm<sup>2</sup> for WDSM and 1.64 log cfu/cm<sup>2</sup> for ACM.

T-tests (two one-sided equivalence tests, TOST) were used to determine if means were significantly different. Following Hübner et al. (2002), a range of 0 ± 0.5 log cfu/cm<sup>2</sup> for the mean difference was determined as a limit of equality. The level of significance was set at 0.025 for each one-sided test, yielding a total confidence limit of 95%.

Furthermore, linear regression models omitting any intercept were created and the coefficient of determination (R<sup>2</sup>) was used to assess how the data fitted the model. All statistical analyses were performed with SAS (SAS®, version 9.4, SAS Institute Inc., Cary, North Carolina, USA).

### 3 Results

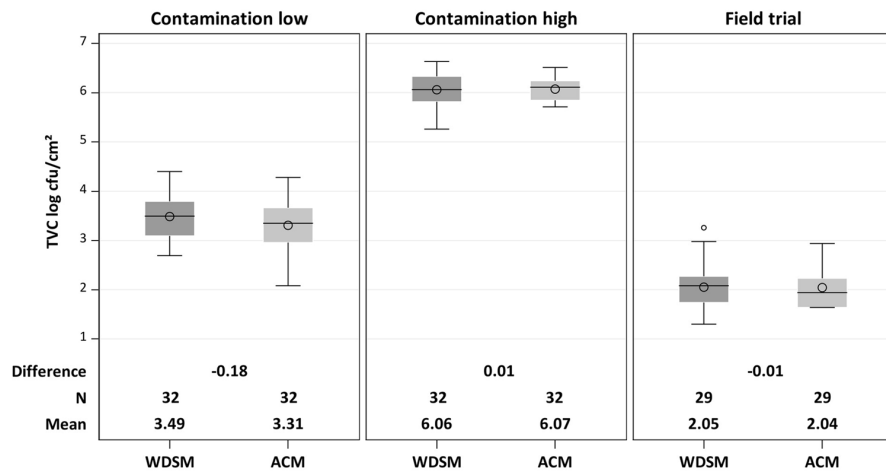
#### 3.1 Total viable counts and mean differences

In the experimental trial with artificially contaminated pig skin pieces, TVCs could be determined both for low- (3 log cfu/ml) and high- (7 log cfu/ml) level contamination. In the field trial, 9 samples taken using ACM showed no visible growth, and in 10 samples with the same method, only 1 colony could be counted.

In the experimental trial, for low-level contamination, the mean TVCs were 3.49 log cfu/cm<sup>2</sup> for WDSM and 3.31 log cfu/cm<sup>2</sup> for ACM. For high-level contamination, the mean TVC for WDSM was 6.06 log cfu/cm<sup>2</sup> while it was 6.07 log cfu/cm<sup>2</sup> for ACM. The mean difference between the 2 methods was -0.18 log cfu/cm<sup>2</sup> for low-level and 0.01 log cfu/cm<sup>2</sup> for high-level contamination. For the field trial, the mean TVCs were 2.05 log cfu/cm<sup>2</sup> for WDSM, and 2.04 log cfu/cm<sup>2</sup> for ACM with a mean difference of -0.01 log cfu/cm<sup>2</sup> (Fig. 1; Table 1).

The mean TVC of the 32 pig skin pieces from the status quo fields that had not been artificially contaminated in the

**Fig. 1** Boxplots of total viable count (TVC) (log cfu/cm<sup>2</sup>) on pig skin contaminated in the laboratory with low- and high-level numbers of bacteria and on carcass surfaces (field trial) by using the agar contact method (ACM) and wet-dry double swabbing method (WDSM), N = number of samples respectively for ACM and WDSM



**Table 1** Descriptive statistical measures of total viable count (TVC) (log cfu/cm<sup>2</sup>) measured on pig skin pieces with low- and high-level contamination and on carcass surfaces (field trial) by using agar contact method (ACM) and wet-dry double swabbing method (WDSM)

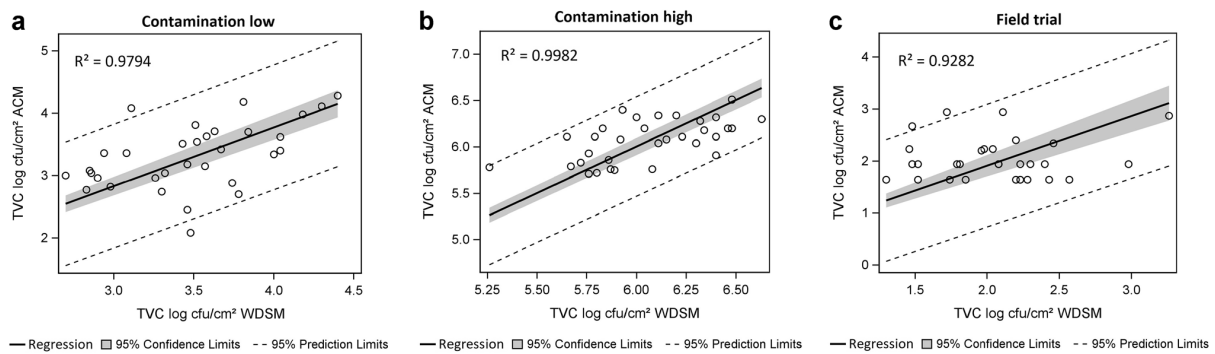
| Trial              | Method | Log cfu/cm <sup>2</sup> |      |        |       |       |      |      |
|--------------------|--------|-------------------------|------|--------|-------|-------|------|------|
|                    |        | N                       | Mean | Median | STD   | CV    | Min  | Max  |
| Experimental trial |        |                         |      |        |       |       |      |      |
| Low contamination  | ACM    | 32                      | 3.31 | 3.35   | ±0.52 | 15.83 | 2.08 | 4.28 |
|                    | WDSM   | 32                      | 3.49 | 3.50   | ±0.46 | 13.11 | 2.70 | 4.40 |
| High contamination | ACM    | 32                      | 6.07 | 6.11   | ±0.23 | 3.76  | 5.71 | 6.51 |
|                    | WDSM   | 32                      | 6.06 | 6.06   | ±0.31 | 5.17  | 5.26 | 6.63 |
| Field trial        |        |                         |      |        |       |       |      |      |
| Field trial        | ACM    | 29                      | 2.04 | 1.94   | ±0.41 | 19.85 | 1.64 | 2.94 |
|                    | WDSM   | 29                      | 2.05 | 2.08   | ±0.45 | 22.14 | 1.30 | 3.26 |

SD standard deviation, CV coefficient of variation

**Table 2** Results of equivalence tests at 0.025 significance level and 0.05 equivalence level for comparison of total viable counts of colonies by using agar contact method (ACM) and wet-dry double swabbing method (WDSM) in the trials

| Trial              | N  | Mean difference | 95% CL      |             | p-value     |             | Total    |
|--------------------|----|-----------------|-------------|-------------|-------------|-------------|----------|
|                    |    |                 | Lower limit | Upper limit | Lower limit | Upper limit |          |
| Experimental trial |    |                 |             |             |             |             |          |
| Low contamination  | 32 | -0.1778         | -0.3546     | -0.0011     | < 0.0001    | 0.0004      | 0.0004   |
| High contamination | 32 | 0.0134          | -0.0796     | 0.1065      | < 0.0001    | < 0.0001    | < 0.0001 |
| Field trial        | 29 | -0.00862        | -0.2274     | 0.2102      | < 0.0001    | < 0.0001    | < 0.0001 |

CL confidence limits



**Fig. 2** Similarity of total viable counts (TVC) (log cfu/cm<sup>2</sup>) in all trials; **a** pig skin with low-level contamination, **b** pig skin with high-level contamination, **c** field trial

laboratory was 3.47 log cfu/cm<sup>2</sup>, which was in the range of the mean TVC of low-level contamination.

### 3.2 Equivalence tests and linear regression models

Statistical equivalence between WDSM and ACM was proven by the equivalence tests in all experiments, as the confidence intervals calculated for mean differences fell fully within the acceptable range of 0 ± 0.5 log cfu/cm<sup>2</sup> (p < 0.0001 for both trials; Table 2). The linear regression models with log cfu/cm<sup>2</sup> ACM as the dependent variable and log cfu/cm<sup>2</sup> WDSM as the explaining variable showed the strong relation between the 2 methods, since values for R<sup>2</sup> exceeded 90% and slope parameters were nearly 1 for all models (Fig. 2; Table 3).

## 4 Discussion

In our investigation, the incubation times of 48 ± 2 h for WDSM samples and 72 ± 2 h for ACM samples yielded statistically equivalent results for the 2 methods (Table 2). Therefore, these results can be considered as comparable, and all results can be compared with each other. Similarly, Salo et al. (2000), who investigated incubation times of 48 h

**Table 3** Results of linear regression models for explaining total viable counts (TVC) with agar contact method (ACM) and wet-dry double swabbing method (WDSM) in log cfu/cm<sup>2</sup> intercept forced through zero

| Trial              | Slope  | R <sup>2</sup> |
|--------------------|--------|----------------|
| Experimental trial |        |                |
| Low contamination  | 0.9420 | 0.9794         |
| High contamination | 1.0007 | 0.9982         |
| Field trial        | 0.9551 | 0.9282         |

and 72 h for WDSM and ACM, respectively, reported there were no statistically significant differences in TVCs.

For our experimental trial, the decision was made to contaminate the pig skin surfaces in the laboratory so that the number of bacteria was known and similar on all skin parts. From our point of view, this was necessary, because studies have shown that different parts of the carcass surface contain different levels of contamination (Ghafir and Daube 2008), and contamination is likely to be variable because some areas of the carcass surface are more susceptible to contamination than others (Beneke et al. 2011). To minimize this influencing factor and to avoid the influence of any natural but non-homogenous skin contamination, the pig skin pieces

were contaminated (Pepperell et al. 2005) with a homogeneous solution of bacteria species that are commonly found in pig skin microbiota (Corbeil 2014) in 2 pre-determined concentrations. The low-level and high-level contamination, with 3 log cfu/ml and 7 log cfu/ml, respectively, were chosen because various TVC values can be found on pig carcasses at the different processing stages along the pig slaughter line (Wheatley et al. 2014). Comparing the results of both contamination levels with the initial status quo contamination on the pig skin pieces, the initial microbiota counts were in range of the TVC with low-level contamination. This likely indicates the influencing factor of status quo contamination on the low-level TVC results.

TVCs measured by ACM and WDSM were statistically equivalent for all trials, shown by sampling contaminated pig skin pieces less than 1 h after inoculation. This is in line with results reported by Oberhäuser (2005), who sampled 5 min after application of artificial contamination. In general, bacterial transfer occurs directly from a contaminated surface to the agar surface of agar contact plates, and therefore, the recovery rate depends on the adhesion and detachability of bacteria (Schulze 2000; Capita et al. 2004). According to Notermans et al. (1991), the adsorption process of bacteria is reversible and they can still be removed by washing, since 2 to 3 h after application of an inoculum firm adhesion to the skin is not formed (Fürstenberg-Eden et al. 1979). However, in our field trial, mean TVCs for 19 carcasses sampled by ACM were at or below the lower detection limit, with only 1 or no colonies detected. At the sampling position at the abattoir, only low numbers of bacteria on the carcasses could be expected (Moura-Alves et al. 2022). This, together with the results of our experimental trial with low-level contamination, shows the limitation of ACM for detecting low-level contamination on pig skin/carcass surfaces at the abattoir. Since WDSM was able to determine TVC values in all samples and the TVCs were equivalent between the 2 sampling methods, WDSM is more suitable than ACM for determining the TVC of freshly slaughtered pig carcasses.

In accordance with other studies (Baumgart and Kussmann 1975; Kusch 1977), we showed that representative TVCs in the case of our high-level contamination on pig skin were obtained with ACM in the experimental trial. Therefore, we conclude that ACM is useful for sampling in pig slaughter process where high bacterial contamination levels are expected, i.e., at the beginning of the slaughter line. However, our study showed ACM is not suitable for sampling at the end of the pig slaughter line, where low bacterial loads should occur (Wheatley et al. 2014). Snijders et al. (1984) concluded that ACM is not appropriate for assessing carcass contamination. However, they used agar plates with a contact surface of only 7.5 cm<sup>2</sup> compared to our 23 cm<sup>2</sup> sampling area. Additionally, a contact surface that is too small leads to greater variation of the results, depending

on the surface being examined (Louwers and Klein 1994). The sampling area used in this study (23 cm<sup>2</sup>) for ACM was large enough to yield comparable results to WDSM and so is appropriate for pig carcass surface sampling when high bacterial loads are expected.

For the low-level contamination of pig skin pieces in our study, the mean TVC was 0.18 logs higher for WDSM than for ACM. Also results of our field trial, with a mean difference of just 0.1 logs between mean TVCs measured by the 2 methods, are in agreement with other comparative studies (Kleiner and Hilgert 2004a, b), where mean TVCs differed by up to 0.5 logs based on 20 cm<sup>2</sup> for WDSM and RODAC methods. In contrast to our results, Cordray and Huffman (1985) found lower bacteria recovery using the semiquantitative RODAC method than when using dry swabbing on chilled pig carcasses. This discrepancy with our results for freshly slaughtered pigs can possibly be explained by the chill storage period, which typically leads to a decrease of microbial loads (Capita et al. 2004). On the moist sampling surfaces of freshly slaughtered pig carcasses, WDSM recovered higher TVCs than were determined on dry carcasses (Anderson et al. 1987). Since we used both WDSM and ACM with quantitative determination of TVCs, our results are more comparable between our 2 methods than results from swabbing techniques compared to the semi-quantitative results of the RODAC method, i.e., by Cordray and Huffman (1985). The only limitation is that WDSM is more suitable for lower carcass contamination levels than ACM.

Finally, our comparative study showed high concordance between the results of ACM and WDSM for determining TVC on pig skin surfaces. For each part of the examination, statistical equivalence of the results was proven by t-tests, and the linear regression models showed an excellent fit between the compared methods. The differences between TVCs generated by WDSM and ACM were  $\leq 0.5$  log, which can be expected for quantitative microbiological measurement methods in a laboratory and are considered as indicating equivalence (Hübner et al. 2002).

## 5 Conclusion

ACM and WDSM produced comparable TVCs, but ACM had a higher minimum limit of detection than WDSM. This relatively higher limit of detection must be taken into account if ACM is chosen as an appropriate technique for pig carcass sampling to determine the hygienic status (indicated by TVC) of contaminated pig carcasses. Therefore, we suggest that ACM can be used for individual cases and only for processing stages where relatively high carcass contamination and high resulting bacterial loads on the carcass are expected. Thus, ACM is suitable for sampling live pigs in the lairage area, and for sampling on the slaughter line

without work interruptions, as it is a very quick sampling technique.

**Acknowledgements** The authors thank the staff of the abattoir for the support and assistance with sampling.

**Author contributions** DM and NL conceived the first study conception. All other authors contributed to the final study conception and design. Material preparation, data collection and laboratory analysis were performed by RF. Statistical analyses were performed by RF, LK and JGK. The first draft of the manuscript was written by RF and all authors commented on previous versions of the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

**Funding** Open Access funding enabled and organized by Projekt DEAL. Open Access funding enabled and organized by Projekt DEAL. This study was conducted within the joint research project KontRed, which was supported by funds of the Federal Ministry of Food and Agriculture based on a decision of the Parliament of the Federal Republic of Germany via the Federal Office for Agriculture and Food under the innovation support program (Grant number: 281C104A18).

## Declarations

**Conflict of interest** The authors declare that they do not have a conflict of interest.

**Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

## References

- Anderson ME, Huff HE, Naumann HD, Marshall RT, Damare J, Johnston R, Pratt M (1987) Evaluation of swab and tissue excision methods for recovering microorganisms from washed and sanitized beef carcasses. *J Food Prot* 50:741–743. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-50.9.741>
- Baumgart J, Kussmann H (1975) A spray method for determining the surface bacterial content of animals for slaughter. *Fleischwirtschaft* 55:1113–1114
- Beneke B, Klees S, Stuhrenberg B, Fetsch A, Kraushaar B, Tenhagen BA (2011) Prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a fresh meat pork production chain. *J Food Prot* 74:126–129. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-10-250>
- Bolton DJ (2003) The EC decision of the 8th June 2001 (EC/471/2001): excision versus swabbing. *Food Control* 14:207–209. [https://doi.org/10.1016/s0956-7135\(02\)00093-2](https://doi.org/10.1016/s0956-7135(02)00093-2)
- Capita R, Prieto M, Alonso-Calleja C (2004) Sampling methods for microbiological analysis of red meat and poultry carcasses. *J Food Prot* 67:1303–1308. <https://doi.org/10.4315/0362-028x-67.6.1303>
- Charlebois R, Trudel R, Messier S (1991) Surface contamination of beef carcasses by fecal coliforms. *J Food Prot* 54:950–956. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-54.12.950>
- Corbeil J (2014) Microbiological status of porcine slaughter by-products in consideration of market regulations. Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität München. <https://doi.org/10.5282/edoc.16760>
- Cordray JC, Huffman DL (1985) Comparison of three methods for estimating surface bacteria on pork carcasses. *J Food Prot* 48:582–584. <https://doi.org/10.4315/0362-028x-48.7.582>
- EC (2005) European Commission Regulation (EC) No 2073/2005 of 15 November 2005 on microbiological criteria for foodstuffs. <https://eur-lex.europa.eu/eli/reg/2005/2073/oj> (current consolidated version: 08/03/2020). Accessed 03 July 2023
- EFSA (2007) Opinion of the Scientific Panel on biological hazards (BIOHAZ) on microbiological criteria and targets based on risk analysis. *EFSA J* 5:462. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2007.462>
- Firstenberg-Eden R, Notermans S, Thiel F, Henstra S, Kampelmacher EH (1979) Electron microscopic investigations into attachment of bacteria to teats of cows. *J Food Prot* 42:305–309. <https://doi.org/10.4315/0362-028x-42.4.305>
- Fliss I, Simard R, Ettriki A (1991) Comparison of three sampling techniques for microbiological analysis of meat surfaces. *J Food Sci* 56:249–250
- Gallina S, Bianchi DM, Ru G, Maurella C, Barzanti P, Baioni E, Virgilio S, Mioni R, Lanni L, Migliazzo A, Losio MN, Bove D, Scuota S, Goffredo E, Decastelli L (2015) Microbiological recovery from bovine, swine, equine, and ovine carcasses: comparison of excision, sponge and swab sampling methods. *Food Control* 50:919–924. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.10.052>
- Ghafir Y, Daube G (2008) Comparison of swabbing and destructive methods for microbiological pig carcass sampling. *Lett Appl Microbiol* 47:322–326. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2008.02433.x>
- Giske W, Klemm G (1963) Bacterial content of the skin of meat hogs as affected by various scalding methods. *Fleischwirtschaft* 15:288–292
- Globisch H, Wilkens S, Jacob A, Thien J (1996) Anwendbarkeit von Abklatschverfahren für die Untersuchung von Oberflächenkeimgehalten bei Schlachtierkörpern: Vergleichende Bestimmung der aeroben mesophilen Gesamtkeimzahl mittels Abklatschtechnik und destruktiver Probenahmetechnik. *Fleischwirtschaft* 76:1116–1118
- Hübner P, Gautsch S, Jemmi T (2002) In house Validierung (single laboratory validation) of microbiological methods. *Mitt Lebensm Hyg* 93:118–139
- ISO 17604:2015–12 (2015) Microbiology of the food chain–Carcass sampling for microbiological analysis. International Organization for Standardization, Geneva. <https://doi.org/10.31030/2305385>
- ISO 18593:2018 (2018) Microbiology of the food chain–Horizontal methods for surface sampling. International Organization for Standardization, Geneva. <https://doi.org/10.31030/2833890>
- Kleiner U (2000) The power of statement of swabs with the scope of hygiene controls. *Fleischwirtschaft* 80:118–121
- Kleiner U, Hilgert S (2004a) Conversion of the decision 2001/471/EC: comparison of the destructive and non-destructive sampling techniques for microbiological control of meat surfaces – 1. Swine carcass. *Fleischwirtschaft* 84:101–104
- Kleiner U, Hilgert S (2004b) Conversion of the decision 2001/471/EC: Comparison of the destructive and non-destructive sampling techniques for microbiological control of meat surfaces – 2. Sections of swine. *Fleischwirtschaft* 84:146–149
- Kusch D (1977) Ein Beitrag zur Hygienekontrolle in fleischverarbeitenden Betrieben. *J Food Saf Food Qual* 28:68–71
- Louwers J, Klein G (1994) Suitability of sampling methods for the investigation of the environment in EC-licensed meat rendering and processing plants. *Berl Muench Tieraerztl Wochenschr* 107:367–373

- Moura-Alves M, Carvalho M, Baggio Ribeiro DH, Barbosa J, Silveira L, Pista A, Pinto HP, Saraiva C, Teixeira P, Esteves A (2022) Hygiene indicators and salmonellae on surfaces of swine carcasses from two slaughterhouses in northern Portugal. *J Food Prot* 85:1566–1575. <https://doi.org/10.4315/JFP-21-312>
- Nortje GL, Swanepoel E, Naude RT, Holzapfel WH, Steyn PL (1982) Evaluation of three carcass surface microbial sampling techniques. *J Food Prot* 45:1016–1017. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-45.11.1016>
- Notermans S, Dormans J, Mead G (1991) Contribution of surface attachment to the establishment of micro-organisms in food processing plants: a review. *Biofouling* 5:21–36. <https://doi.org/10.1080/08927019109378226>
- Oberhäuser K (2005) Comparison of pour upon method and wet-dabbing method to judge the disinfecting qualities of building materials. Dissertation, Freie Universität Berlin. <https://doi.org/10.17169/refubium-13050>
- Otten K (2005) Praktische Umsetzung der Entscheidung 2001/471/EG zur Hygienekontrolle in einem mittelständischen Direktvermarkterbetrieb. Dissertation, Justus-Liebig-Universität Gießen. <http://geb.uni-giessen.de/geb/volltexte/2006/2694/>. Accessed 03 July 2023
- Pepperell R, Reid CA, Solano SN, Hutchison ML, Walters LD, Johnston AM, Buncic S (2005) Experimental comparison of excision and swabbing microbiological sampling methods for carcasses. *J Food Prot* 68:2163–2168. <https://doi.org/10.4315/0362-028x-68.10.2163>
- Salo S, Laine A, Alanko T, Sjöberg AM, Writanen G, Guðbjörnsdóttir B, Jessen B, Langsrud S, Lindquist K, Lundén J, Mäki M, Nerbrink E, Niclásen Ó, Tuominen P, Tuompo H, Vatunen E, Woivalin A (2000) Validation of the microbiological methods Hygicult dipslide, contact plate, and swabbing in surface hygiene control: a nordic collaborative study. *J AOAC Int* 83:1357–1366. <https://doi.org/10.1093/jaoac/83.6.1357>
- Schulze G (2000) The representativeness of RODAC technique. Dissertation, Freie Universität Berlin
- Snijders JMA, Janssen MHW, Gerats GE, Corstiaensen GP (1984) A comparative-study of sampling techniques for monitoring carcass contamination. *Int J Food Microbiol* 1:229–236. [https://doi.org/10.1016/0168-1605\(84\)90019-9](https://doi.org/10.1016/0168-1605(84)90019-9)
- Wheatley P, Giotis ES, McKeivitt AI (2014) Effects of slaughtering operations on carcass contamination in an Irish pork production plant. *Ir Vet J* 67:1–6. <https://doi.org/10.1186/2046-0481-67-1>
- Zweifel C, Stephan R (2003) Microbiological monitoring of sheep carcass contamination in three Swiss abattoirs. *J Food Prot* 66:946–952. <https://doi.org/10.4315/0362-028x-66.6.946>
- Zweifel C, Capek M, Stephan R (2014) Microbiological contamination of cattle carcasses at different stages of slaughter in two abattoirs. *Meat Sci* 98:198–202. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2014.05.029>

**Publisher's Note** Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

## 4. PUBLIKATION II

### ***Agar Contact Method as a Valuable Tool to Identify Slaughter Hygiene Deficiencies along the Slaughter Process by Longitudinally Sampling Pig Skin Surfaces***

Roland Fürstenberg<sup>1</sup>, Nina Langkabel<sup>1</sup>, Julia Große-Kleimann<sup>2</sup>, Lothar Kreienbrock<sup>2</sup> and Diana Meemken<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Working Group Meat Hygiene, Institute of Food Safety and Food Hygiene, School of Veterinary Medicine, Freie Universität Berlin, 14163 Berlin, Germany

<sup>2</sup> Department for Biometry, Epidemiology and Information Processing, WHO Collaborating Centre for Research and Training for Health at the Human-Animal-Environment Interface, University of Veterinary Medicine Hannover, Foundation, 30559 Hannover, Germany

#### **Erläuterung des persönlichen Anteils an den Leistungen zur Umsetzung der Studie**

Konzipierung des Versuchsaufbaus und der Methodik

Durchführung der Probenahmen und Laboruntersuchungen

Datenvalidierung

Datenkuratierung

Formelle Datenanalysen

Visualisierung der Daten

Erstellung des ersten Manuskriptentwurfs

Umsetzung der Autoren- und Gutachterbeiträge für das finale Manuskript

Published in Open Access (CC BY 4.0)

Journal: *Microorganisms* 2023, 11(10), 2512

DOI: 10.3390/microorganisms11102512

© 2023 by the authors

Licensee MDPI, Basel, Switzerland

ISSN (electronic) 2076-2607

Received: 31 August 2023

Revised: 24 September 2023

Accepted: 6 October 2023

Published: 8 October 2023

<https://doi.org/10.3390/microorganisms11102512>



Article

# Agar Contact Method as a Valuable Tool to Identify Slaughter Hygiene Deficiencies along the Slaughter Process by Longitudinally Sampling Pig Skin Surfaces

Roland Fürstenberg <sup>1</sup>, Nina Langkabel <sup>1</sup>, Julia Grosse-Kleimann <sup>2</sup>, Lothar Kreienbrock <sup>2</sup> and Diana Meemken <sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> Working Group Meat Hygiene, Institute of Food Safety and Food Hygiene, School of Veterinary Medicine, Freie Universität Berlin, 14163 Berlin, Germany; roland.fuerstenberg@fu-berlin.de (R.F.)

<sup>2</sup> Department for Biometry, Epidemiology and Information Processing, WHO Collaborating Centre for Research and Training for Health at the Human-Animal-Environment Interface, University of Veterinary Medicine Hannover, Foundation, 30559 Hannover, Germany

\* Correspondence: diana.meemken@fu-berlin.de; Tel.: +49-30-838-63847

**Abstract:** Examinations of total viable counts (TVCs) and *Salmonella* spp. on the skin of individual pigs during the slaughter process are useful to identify abattoir-specific risk factors for (cross-)contamination. At seven process stages (lairage to before chilling), pigs were bacteriologically investigated by repeatedly sampling the same animals using the agar contact method. The mean TVC of all pigs increased significantly at the first three tested process stages (mean count, after delivery: 5.70 log cfu/cm<sup>2</sup>, after showering: 6.27 log cfu/cm<sup>2</sup>, after stunning: 6.48 log cfu/cm<sup>2</sup>). Significant mean TVC reductions occurred after scalding/dehairing (mean count: 3.71 log cfu/cm<sup>2</sup>), after singeing/flaming (2.70 log cfu/cm<sup>2</sup>), and after evisceration (2.44 log cfu/cm<sup>2</sup>) compared with the respective preceding process stages. At the end of the slaughter line and before chilling, the mean TVC was 2.33 log cfu/cm<sup>2</sup>, showing that the slaughter process reduced contamination significantly. The slaughter process effectively reduced even very high levels of incoming TVCs, since at the individual animal level, at the end of the slaughter process, there was no difference in the TVCs of animals with initially high and initially low TVCs. Additionally, 12 *Salmonella* spp. isolates were recovered from 12 different pigs, but only until the stage after scalding/dehairing. Overall, the agar contact method used is valuable for detecting hygiene deficiencies at slaughter, and is animal-equitable, practical, and suitable for use on live animals.

**Keywords:** swine; slaughterhouse; microbial load; *Salmonella*; repeated sampling; agar contact plates



**Citation:** Fürstenberg, R.; Langkabel, N.; Grosse-Kleimann, J.; Kreienbrock, L.; Meemken, D. Agar Contact Method as a Valuable Tool to Identify Slaughter Hygiene Deficiencies along the Slaughter Process by Longitudinally Sampling Pig Skin Surfaces. *Microorganisms* **2023**, *11*, 2512. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11102512>

Academic Editors: Todd Riley Callaway and Teresa Semedo-Lemsaddek

Received: 31 August 2023  
Revised: 24 September 2023  
Accepted: 6 October 2023  
Published: 8 October 2023



**Copyright:** © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

## 1. Introduction

Initial bacterial contamination, cross-contamination, and re-contamination can be identified on carcasses at different stages during the slaughter process, meaning that the resultant meat can pose a risk factor for consumer health [1]. Therefore, in the European Union, food business operators must ensure that their products comply with microbiological criteria for food safety and process hygiene as laid down in Regulation (EC) No 2073/2005 [2,3]. In order to identify unacceptable or critical levels of bacterial loads on carcasses, the microbiological risk management process is based on monitoring procedures [4]. For this purpose, on pig carcasses, the total viable count (TVC) of aerobic mesophilic bacteria, *Enterobacteriaceae* counts, and tests for the presence/absence of *Salmonella* spp. (S.) are required as hygiene indicators [3,5,6]. In particular, the TVC is most frequently used to evaluate the hygiene of the entire meat production process [7,8] and can provide a record of the overall hygienic performance of the slaughter process over time [9]. Additionally, testing for *Salmonella* spp. is of utmost importance because of its zoonotic potential, and since pigs are regarded as one of the most common foodborne sources of human

*Salmonella* spp. infections [10–12]. Over 70% of the contamination with *Salmonella* spp. on a carcass originates from the slaughter pig itself, while 30% of the contamination is related to cross-contamination by carrier pigs in the slaughter line [13]. In addition, risks for bacterial contamination of carcasses can include the repeated introduction of bacteria into the abattoir via the animals, the equipment being contaminated during improper slaughter practices, and cross-contamination by resident bacteria during the slaughter process [14]. Furthermore, multidrug resistance has increased all over the world and is considered a public health threat [15]. Several recent investigations reported the emergence of virulent multidrug-resistant bacterial pathogens from different origins that increase the necessity of the proper use of antibiotics as well as the application of rapid accurate diagnostic tools for the screening of the emerging virulent multidrug-resistant strains [16–18]. Therefore, sampling at various process stages could be useful to identify hygienic deficiencies.

In accordance with the EN ISO 17604:2015-12 standard protocol [19], sampling methods for carcasses are divided into destructive and non-destructive methods. Various studies determined tissue excision, a destructive method, to be the method with the highest precision compared to non-destructive methods [20,21]. However, in the case of repeated sampling from the same pig carcass in order to identify deficiencies in process hygiene, tissue excision leads to substantial loss of the carcass surface [22]. Because of the proportional relationship between the lower microbiological recovery by using non-destructive methods compared with the destructive method, the results obtained using non-destructive methods can be also valuable in determining the slaughter hygiene [23]. For this reason, commercial abattoirs in Europe often use the non-destructive method of wet–dry double swabbing for monitoring [24]. Additionally, contact methods, as non-destructive methods, are used for semi-quantitative microbiological examination of the environment, fittings, equipment, and utensils [25]. To enable quantitative counting of bacteria, a modified microbiological procedure was developed and called the agar contact method [26,27]. Moreover, the suitability of contact methods for the microbiological sampling of carcass surfaces has already been proven [28]. Previous comparative investigations between the contact methods and the wet–dry double swabbing method on pig carcass surfaces showed that the wet–dry double swabbing method recovered TVCs that were only up to 0.5 log levels higher compared to the method using agar contact plates [29,30]. Differences of up to 0.5 log levels are within the normal laboratory range and can be regarded as similar [31], so the practical importance of this minor mean difference in TVC is questionable [32]. Our previous investigation on pig carcasses also showed that the agar contact method yielded comparable results to the wet–dry double swabbing method [33].

Major advantages of the agar contact method are that it is a fast, practical, and animal-equitable sampling technique that can be used during routine slaughter, including in the lairage, without interrupting the work process. Additionally, the agar contact method is suitable for the repeated sampling of the same animal and its resulting carcass at different process stages. Miliotis et al. (2014) [23] concluded that microbiological results measured at various stages of the process should be used to provide knowledge on the cause of possible problems. There are relatively few investigations spanning the pig slaughter line at all process stages, starting in the lairage and ranging to the end of dressing (before chilling) [34]. These abattoir-specific data, with additional assessment of the associated health risk potential, provide the basis for implementing an effective monitoring system [35].

The aim of this study was to examine the skin of live slaughter pigs and their respective carcasses longitudinally over the course of the slaughter process from the lairage to the end of the slaughter line to quantify the bacterial loads and to detect *Salmonella*-positive pigs. For this special case investigation, we used the agar contact method to realize the repeated sampling of individual pigs at all seven process stages. The trend of the TVC loads of all pigs over the course of the slaughter line was examined to identify process stages with possible risk factors for carcass contamination, and in addition, the effect of the process was investigated at the individual pig level and considering the pigs with the highest and the lowest incoming TVC loads.



## 2. Materials and Methods

### 2.1. Slaughter Line

The study was conducted at an industrial pig abattoir located in Northwestern Germany with a slaughter capacity of 2900 pigs per day. After arriving at the abattoir, slaughter pigs were showered for 5 min with water to cool and calm them after transport. After a resting time in the lairage of approximately one hour, they were driven to the carbon dioxide stunning system (Butina A/S, Holbæk, Denmark), where they were stunned and immediately bled in a hanging position with blood-draining knives in a rotating carousel (Anitec AB, Malmö, Sweden). After pre-washing, a combined process stage followed where the carcasses were scalded in a steam tunnel at 63.5 °C (BANSS Schlacht- und Fördertechnik GmbH, Biedenkopf, Germany) and immediately afterwards dehaired using rotating scrapers/rubber whips (BANSS Schlacht- und Fördertechnik GmbH, Biedenkopf, Germany). Singeing/flaming was carried out in two successive ovens, with wet polishing between both ovens (BANSS Schlacht- und Fördertechnik GmbH, Biedenkopf, Germany). After manual rectum cutting with a cutter (Schmid & Wezel GmbH, Maulbronn, Germany) and evisceration, the carcasses were split using a manually guided water-cooled splitting saw (Schmid & Wezel GmbH, Maulbronn, Germany), followed by trimming steps and official meat inspection before entering the chilling area.

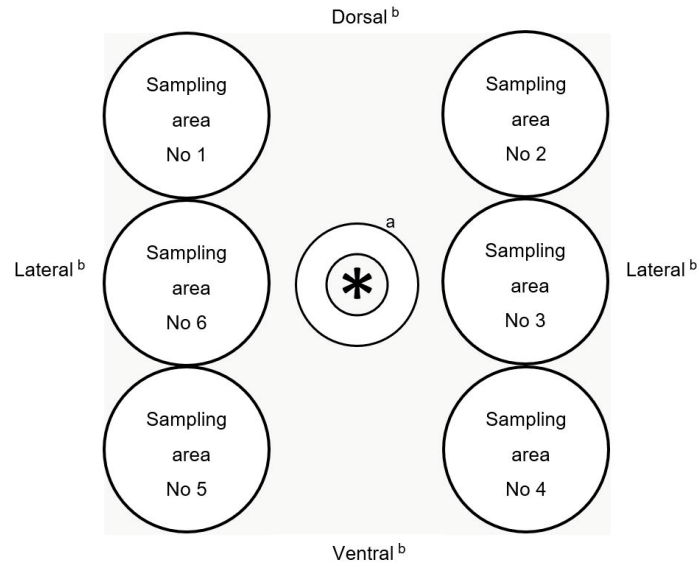
### 2.2. Sampling Procedure of Pig Skin and Carcass Surface

In order to examine the effect of the slaughter process on the microbial level and to identify specific process hygienic deficiencies, seven different process stages were identified at which the pigs (identified by individual marking) were sampled: 1. lairage before showering; 2. lairage after showering; 3. after stunning; 4. after scalding/dehairing; 5. after singeing/flaming; 6. after evisceration; and 7. before chilling.

Altogether, 87 conventionally raised fattening pigs were randomly chosen from ten different selected batches (i.e., nine individual pigs per batch for nine batches, and six individual pigs for one batch; the pigs were numbered from Pig ID 1 to 90, but three pigs of an unknown batch with the Pig ID 64, 65, and 66 were finally removed, resulting in 609 samples) and were sampled at the seven abovementioned process stages. During five visits between May and August 2022 (Wednesday: batches No 1, 2; Monday: batches No 3, 4; Tuesday: batches No 5, 6; Thursday: batches No 7, 8; Friday: batches No 9, 10), one visit per day was conducted, and pigs from two batches per day were sampled longitudinally along the slaughter line. There was a time interval of approximately one hour between the sampling of the two batches on every sampling day. For individual identification, in the lairage, the pigs were marked on their backs using a livestock pen (Schippers GmbH, Kerken, Germany), and after the stunning and after bleeding, the carcasses in the study were marked by a tattoo identification number using a tattoo marker and black ink (R & M Horn Farmservice Co. KG, Dortmund, Germany).

Sampling was performed by using commercial agar contact plates containing plate count agar with a raised contact surface of 23 cm<sup>2</sup> (VWR International GmbH, Darmstadt, Germany). For sampling, six areas around the anus were defined (three separate areas each of approximately 23 cm<sup>2</sup> directly left and three separate areas directly right from the anus). From one process stage to the other, a different area was sampled in a rotating manner for every individual pig, starting from sampling area 1 for the first pig and sampling area 2 for the second pig, etc. (Figure 1). Differing from this pattern of sampling, for process stage 4 (after scalding/dehairing), we used the same sampling area from where we had taken the sample for process stage 1 on each individual pig carcass, meaning sampling area 1 was sampled twice for the first pig, sampling area 2 was sampled twice for the second pig and so on. For repeated sampling of the same pig at different process stages, to take one sample, the cover of an agar contact plate was removed directly in front of the pig skin, and each agar contact plate was pressed firmly for 5 s against the perianal area without lateral movement and using constant, even pressure. The procedure was performed for all pigs in the lairage pen and for each pig's respective carcass. After sampling, the plates

were transported to the institute's laboratory in Berlin at 4 °C and processed within 24 h. During sampling using the agar contact plates in the perianal area, i.e., pressing the soft nutrient medium onto the skin, the live and free-running slaughter pigs in the lairage pens did not show any reaction, and furthermore, no restraint of the animals was required.



**Figure 1.** Schematic diagram of the sampling areas in the perianal region with the view of the sample taker from behind the standing live slaughter pig and the pig carcass; <sup>a</sup> = anatomical localization/position of the anus; <sup>b</sup> = anatomical direction.

### 2.3. Microbiological Analysis

For microbiological analysis of TVC via the drop plating method and for qualitative analysis of *Salmonella* spp., in contrast to the common contact method, each agar slice of the contact plates was dislodged from the Petri dish using sterile forceps and transferred into a blender bag with a filter (VWR International GmbH, Darmstadt, Germany). Afterwards, 100 mL of buffered peptone water broth (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) was added. According to German standard DIN 10161:2016-12 [36], the content of the blender bag was homogenized with a stomacher (bioMérieux, Marcy-l'Étoile, France) for two minutes with a speed of 560 strokes per minute. The resulting basic homogenate was used as a basis for TVC and *Salmonella* spp. detection.

For quantitative analysis of TVC, decimal dilution series were prepared from each basic homogenate with sodium chloride peptone agar (Merck KGaA, Darmstadt, Germany), using tenfold decimal dilutions up to  $10^{-6}$  dilution. From basic homogenate and each dilution series, duplicate 0.05 mL amounts were dropped onto plate count agar (Th. Geyer GmbH & Co. KG, Renningen, Germany) and streaked out using a loop (Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Germany). Plates were incubated under aerobic conditions at 30 °C for  $72 \pm 2$  h. Following this incubation, colonies were counted on each dilution step. Colonies were also counted in the case where only one colony had developed in the minimum dilution or in basic homogenate. Afterwards, the weighted arithmetic mean for each sample was calculated.

### 2.4. Isolation and Identification of *Salmonella* spp.

Qualitative analysis of *Salmonella* spp. was performed according to EN ISO 6579-1:2020-08 standard protocol [37]. The basic homogenate, which contained the agar slice and 100 mL of buffered peptone water broth (Merck KGaA, Darmstadt, Germany), homogenized with a stomacher, provided the basis for pre-enrichment. Deviating from the ISO standard protocol after incubation of the basic homogenate at 37 °C for 24 h for pre-enrichment, enrichment

broths, Rappaport Vassiliadis Bouillon (RV) (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) and Muller–Kauffmann Tetrathionate–Novobiocin Broth (MKTTn) (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) were incubated for 24 h at 37 °C for MKTTn and at 42 °C for RV, before streaking out on the two selective agars, Brilliant-Green Phenol-Red Lactose Sucrose Agar (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) and Miller and Mallinson ChromoSelect Agar (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Plates were incubated for 24 h at 37 °C. Biochemical testing for dulcitol, o-nitrophenyl- $\beta$ -D-galactopyranoside (ONPG), malonate, and salicin was carried out for further investigation of the isolates. Typical and suspect colonies were tested using agglutination tests (sifin diagnostics gmbh, Berlin, Germany), and *Salmonella* spp. confirmation was carried out using polymerase chain reaction tests, performed at the German Federal Institute for Risk Assessment (BfR) in Berlin, Germany.

#### Minimal Inhibitory Concentration (MIC)

The recovered *Salmonella* spp. isolates were tested for their susceptibility to a fixed panel of antimicrobials using the broth microdilution method, following the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) guidelines [38]. The MIC testing was performed at the German Federal Institute for Risk Assessment (BfR) in Berlin, Germany, and in this study, the breakpoints for susceptible, intermediate, and resistant to the antimicrobial agents for *Enterobacteriaceae* were used, which were determined according to the performance standards for antimicrobial susceptibility testing by CLSI [39].

#### 2.5. Statistical Analysis

For statistical analyses, TVC outcomes were transformed via logarithm to the base of ten, since the original values in colony forming units per square centimeter (cfu/cm<sup>2</sup>) showed a skewed distribution. The minimum limit of detection (one colony counted only) was 1.94 log cfu/cm<sup>2</sup>, and in the case of no visible growth, for statistical test purposes, bacteria counts were considered as half of the minimum limit of detection [40,41], which was 1.64 log cfu/cm<sup>2</sup> for TVC.

First, descriptive analyses were conducted on both the pig batch and individual pig levels to show the distribution of log TVC at the different stages. In order to calculate the effect of the process stage, batch, and perianal sampling area on log TVC, separate analyses of variance (ANOVA) were conducted. Afterwards, the microbiological status between the different stages was examined in a mixed model with batch as a random effect and individual pig variations as repeated measurements.

A line graph of the five animals with the highest and lowest incoming bacterial loads (lairage before showering) on the skin, respectively, was created to visualize the reduction effect of the slaughter process. Only individual pigs with complete data from all stages were involved.

The influence of the purely mechanical part of the slaughter process on TVC was investigated via *t*-test by comparing the reduction that occurred between the lairage before showering up to the singeing stage between the 10% of slaughter pigs with the initially (lairage before showering) highest TVC loads and all other animals sampled. For these analyses, only stage 1 (lairage before showering), considered as incoming bacterial load, and stage 5 (after singeing/flaming), considered as last mechanical part of the slaughter line, were taken into consideration.

Results of *Salmonella* spp. were recorded as present or absent for each live slaughter pig and its respective carcass at all process stages.

All statistical analyses were performed with SAS (SAS<sup>®</sup>, version 9.4, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA).

### 3. Results

The focus of our work was to examine the status quo of the contamination level on the slaughter pig surface and the respective carcass surface by means of longitudinal sampling of the same pigs at seven process stages along the entire slaughter line. We wanted to show,

via this study, the trend curve of surface contamination on slaughter pigs, starting after delivery of the animals in the lairage pens at the abattoir up to the process stage before chilling, to investigate whether the slaughter process reduces the pig surface contamination level in a meaningful way and to identify possible slaughter hygiene deviancies over the course of the slaughter line.

### 3.1. Descriptive Analysis of Total Viable Count at Batch Level

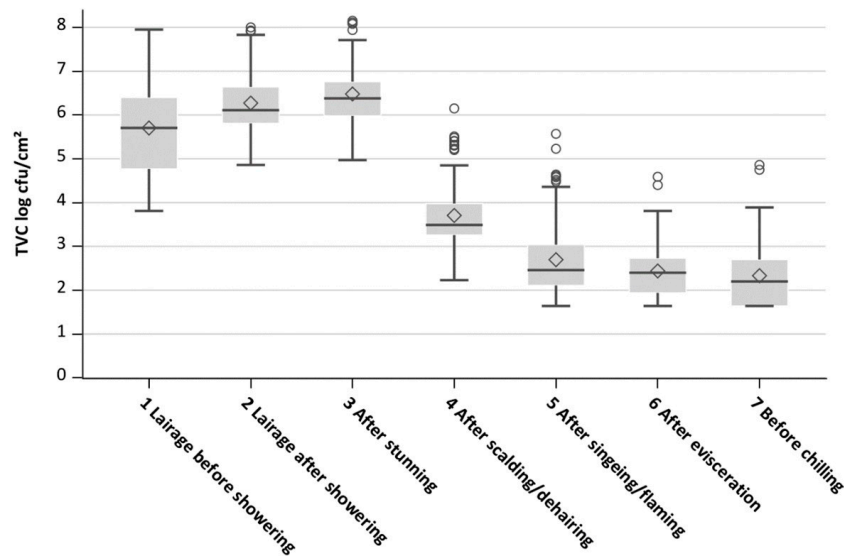
Six samples from four batches were unavailable, resulting in 603 samples being considered for analysis.

The mean TVC level of all batches at the first process stage in the lairage was 5.70 log cfu/cm<sup>2</sup> and then increased up to 6.48 log cfu/cm<sup>2</sup> after stunning. After this stage, the TVC of the carcasses reduced to 2.70 log cfu/cm<sup>2</sup> after singeing/flaming and reduced further to 2.33 log cfu/cm<sup>2</sup> before chilling (Table 1). Standard deviations ranged between 0.64 (after evisceration) and 1.05 (lairage before showering) log cfu/cm<sup>2</sup>. The boxplots in Figure 2 visualize the decrease in variation after the first process stage and the noticeable reduction in TVC after scalding/dehairing.

**Table 1.** Results of the total viable count (TVC log cfu/cm<sup>2</sup>) at the seven process stages.

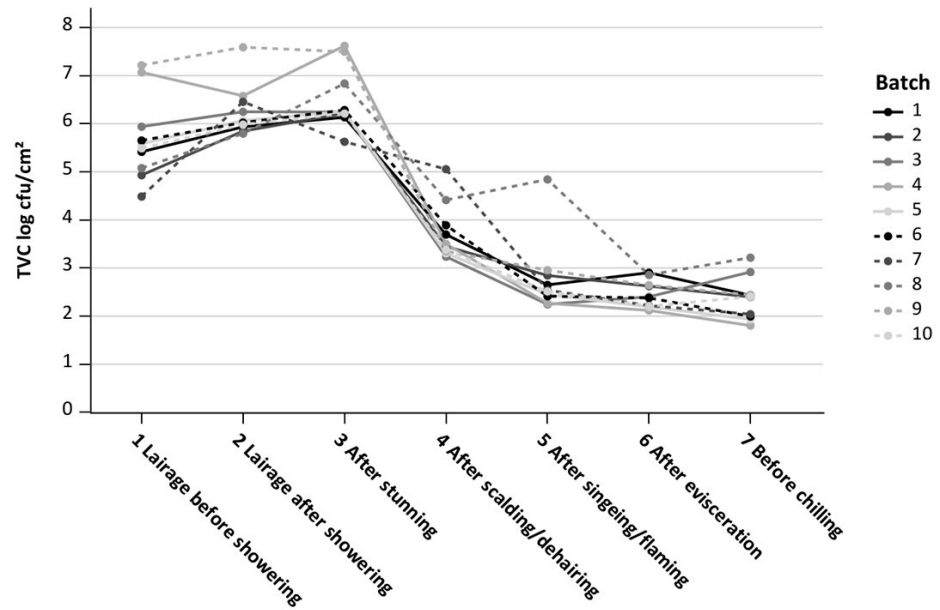
| Process Stage              | n  | Mean | Median | STD   | CV    | Min  | Max  | <LOD |
|----------------------------|----|------|--------|-------|-------|------|------|------|
| 1 Lairage before showering | 86 | 5.70 | 5.71   | ±1.05 | 18.36 | 3.81 | 7.95 | 0    |
| 2 Lairage after showering  | 86 | 6.27 | 6.11   | ±0.72 | 11.54 | 4.86 | 8.00 | 0    |
| 3 After stunning           | 87 | 6.48 | 6.38   | ±0.70 | 10.85 | 4.97 | 8.15 | 0    |
| 4 After scalding/dehairing | 86 | 3.71 | 3.49   | ±0.78 | 21.10 | 2.23 | 6.15 | 0    |
| 5 After singeing/flaming   | 86 | 2.70 | 2.46   | ±0.86 | 31.99 | 1.64 | 5.57 | 7    |
| 6 After evisceration       | 87 | 2.44 | 2.40   | ±0.64 | 26.06 | 1.64 | 4.59 | 14   |
| 7 Before chilling          | 85 | 2.33 | 2.20   | ±0.72 | 30.69 | 1.64 | 4.86 | 23   |

n = sample size; STD = standard deviation; CV = coefficient of variation; <LOD = below minimum limit of detection.



**Figure 2.** Boxplots of the mean logarithmic total viable counts (TVC log cfu/cm<sup>2</sup>) of all pig batches at seven process stages: 1 lairage before showering; 2 lairage after showering; 3 after stunning; 4 after scalding/dehairing; 5 after singeing/flaming; 6 after evisceration; 7 before chilling.

Figure 3 shows that the mean TVCs of each pig batch were close together in the range of approximately 1.50 log levels. In contrast to this, batches No 4 and No 9 both had a high incoming TVC of above 7 log cfu/cm<sup>2</sup> (lairage before showering), but this decreased to the log level of the other batches at process stage 5 (after singeing/flaming). At this stage, the mean TVC of batch No 8 (containing only six individual pigs compared to the nine pigs of all other batches) increased to 5 log cfu/cm<sup>2</sup>, which was around 2 log levels above the other batches, and then decreased in the range of log levels of the other batches after evisceration.



**Figure 3.** Trend curves of the mean logarithmic total viable count (TVC log cfu/cm<sup>2</sup>) for each of the ten pig batches at seven process stages: 1 lairage before showering; 2 lairage after showering; 3 after stunning; 4 after scalding/dehairing; 5 after singeing/flaming; 6 after evisceration; 7 before chilling; Batch = number of pig batch.

### 3.2. ANOVA of Total Viable Count at Batch Level

Modelling TVC log cfu/cm<sup>2</sup> only by process stage and together with batch as an interaction factor, respectively, both resulted in a statistically significant influence ( $p < 0.0001$ ). However, for perianal areas, no differences were detected ( $p = 0.8139$ ). The results of the mixed model with stage as a fixed effect, batch as a random effect, and individual pig variations are shown in Table 2. The TVC of pigs increased statistically significantly after process stage 1 (lairage before showering), first by 0.57 log cfu/cm<sup>2</sup> ( $p < 0.0001$ ) after showering and then again slightly after stunning by 0.21 log cfu/cm<sup>2</sup> ( $p = 0.0466$ ). After process stage 4 (scalding/dehairing), the TVC of the carcasses decreased by 2.78 log cfu/cm<sup>2</sup> ( $p < 0.0001$ ) and again by 1.00 log cfu/cm<sup>2</sup> ( $p < 0.0001$ ) after process stage 5 (singeing/flaming). After evisceration and before chilling, only small reductions of 0.26 log cfu/cm<sup>2</sup> ( $p = 0.0139$ ) and 0.11 log cfu/cm<sup>2</sup> ( $p = 0.2891$ ) occurred, respectively. The latter reduction was not statistically significant.

### 3.3. Total Viable Count at Individual Pig Level

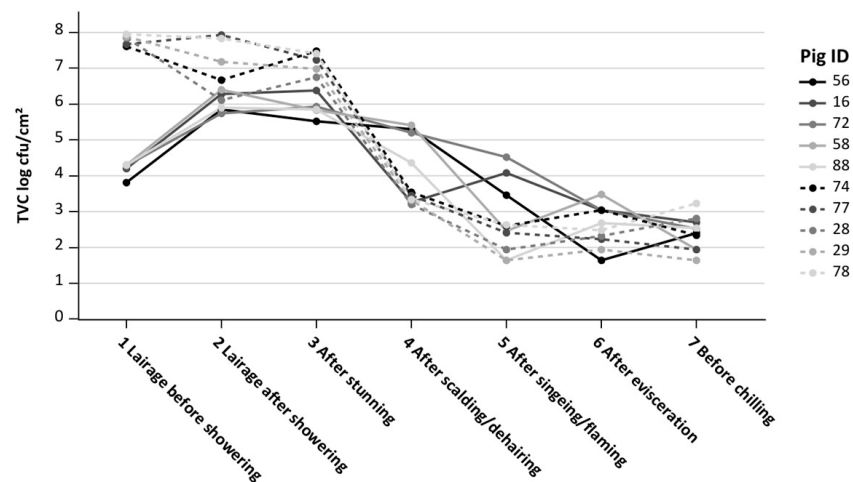
On an individual animal basis, the pigs with the five highest and five lowest incoming TVCs in the lairage were considered. The five pigs with the highest incoming TVC at lairage before showering, 7.50 to 8.00 log cfu/cm<sup>2</sup>, had similar outgoing loads before chilling, 1.70 to 3.20 log cfu/cm<sup>2</sup>, as did the five pigs with the lowest incoming TVCs. After scalding/dehairing, four of the five carcasses with low incoming TVC, 4.40 to 5.50 log cfu/cm<sup>2</sup>,

had TVCs above those of the five initially highest TVC carcasses, which had TVCs of 3.10 to 3.50 log cfu/cm<sup>2</sup> after scalding/dehairing (Figure 4).

**Table 2.** Mean differences of total viable count (TVC) values from one process stage to the following, and *p*-values of the mixed model with the process stage as a fixed effect, batch as a random effect and individual pigs as repeated measurements.

| Compared Process Stages                              | Mean Difference *<br>[TVC log cfu/cm <sup>2</sup> ] | <i>p</i> -Value |
|--|---|-----------------|
| 1 Lairage before showering–2 Lairage after showering | 0.57  | <0.0001         |
| 2 Lairage after showering–3 After stunning           | 0.21  | 0.0466          |
| 3 After stunning–4 After scalding/dehairing          | −2.78   | <0.0001         |
| 4 After scalding/dehairing–5 After singeing/flaming  | −1.00   | <0.0001         |
| 5 After singeing/flaming–6 After evisceration        | −0.26   | 0.0139          |
| 6 After evisceration–7 Before chilling               | −0.11   | 0.2891          |

\* = Negative values stand for a reduction from one stage to the following one.



**Figure 4.** Trend curves along the slaughter line of the five pigs with the highest and five pigs with the lowest initial total viable counts (TVC log cfu/cm<sup>2</sup>) in the lairage before showering; Pig ID = number of the individual pig.

### 3.4. Reduction Effect of Mechanical Stages

Variance homogeneity was first tested (Folded F = 0.0003), which is why the Satterthwaite method for unequal variances was used. The mean reduction in TVC of the 10% of pigs with the highest initial TVC (process stage 1: lairage before showering) to the last mechanical stage of the slaughter process (process stage 5: after singeing/flaming) was 5.11 log cfu/cm<sup>2</sup>, while the remaining animals showed a mean decrease of 2.75 log cfu/cm<sup>2</sup>. By means of a *t*-test, the mean difference of −2.36 log cfu/cm<sup>2</sup> (difference between the mean reduction after singeing/flaming of the 10% of pigs with the highest incoming load and the other 90% of pigs) was shown to be statistically significant (*p* < 0.0001).

### 3.5. *Salmonella* spp. Occurrence

In total, 2% of all samples (12/603) were *Salmonella*-positive. These samples belonged to 12 different pigs from four batches. *Salmonella*-positive samples were only detected at the process stages between lairage and after scalding/dehairing. Table 3 gives an overview of the *Salmonella*-positive samples and detected serovars per individual positive pig, batch and process stage.

**Table 3.** Detection of *Salmonella* spp. along the slaughter line at seven process stages by depicting isolates of each pig batch and individual pig.

| Pig Batch | Process Stage               |                             |             |  |         |         |         |
|-----------|-----------------------------|-----------------------------|-------------|--|---------|---------|---------|
|           | Stage 1                     | Stage 2                     | Stage 3     | Stage 4                                  | Stage 5 | Stage 6 | Stage 7 |
| 1         | 0                           | ONST (2 *)                  | ONST (6 *)  | 0  | 0       | 0       | 0       |
| 2         | ONST (12 *);<br>ONST (14 *) | ONST (11 *);<br>ONST (18 *) | ONST (17 *) | 0  | 0       | 0       | 0       |
| 3         | 0                           | 0                           | 0           | 0  | 0       | 0       | 0       |
| 4         | 0                           | 0                           | 0           | 0  | 0       | 0       | 0       |
| 5         | 0                           | 0                           | 0           | 0  | 0       | 0       | 0       |
| 6         | 0                           | 0                           | MST (51 *)  | MST (49 *);<br>MST (53 *);<br>MST (54 *) | 0       | 0       | 0       |
| 7         | 0                           | 0                           | SP (56 *)   | 0  | 0       | 0       | 0       |
| 8         | 0                           | 0                           | 0           | 0  | 0       | 0       | 0       |
| 9         | 0                           | 0                           | 0           | 0  | 0       | 0       | 0       |
| 10        | 0                           | 0                           | 0           | 0  | 0       | 0       | 0       |

Stage 1 = lairage before showering; Stage 2 = lairage after showering; Stage 3 = after stunning; Stage 4 = after scalding/dehairing; Stage 5 = after singeing; Stage 6 = after evisceration; Stage 7 = before chilling; 0 = no detection; \* = number of individual pig; ONST = monophasic O-antigen-negative *S. Typhimurium*; MST = monophasic *S. Typhimurium* 1,4,[5],12:i:-; SP = monophasic *Salmonella* spp. 9,12:l,v:-.

### 3.6. Phenotypic Characteristics of the Recovered *Salmonella* Spp. Isolates

The following serovars were detected in the 12 *Salmonella*-positive samples: monophasic *S. Typhimurium* 1,4,[5],12:i:- (n = 4), monophasic O-antigen-negative *S. Typhimurium* 1,4,12:i:- (n = 7), and monophasic *Salmonella* spp. 9,12:l,v:-. All four monophasic *S. Typhimurium* 1,4,[5],12:i:- were typically dulcitol-positive, and negative results for ONPG, malonate and salicin were observed in the biochemical testing.

The four monophasic *S. Typhimurium* 1,4,[5],12:i:- isolates were resistant to the antimicrobial agents ampicillin and sulfamethoxazole. All seven monophasic O-antigen-negative *S. Typhimurium* 1,4,12:i:- were resistant to ampicillin, sulfamethoxazole, and tetracycline. Monophasic *Salmonella* spp. 9,12:l,v:- (n = 1) was resistant to ciprofloxacin, nalidixic acid, and sulfamethoxazole. The results of MIC testing for antimicrobial susceptibility testing of the recovered *Salmonella* spp. isolates are shown in Table 4.

**Table 4.** Antimicrobial susceptibility test results for the 12 *Salmonella* spp. isolates, with breakpoints following Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI).

| Antimicrobial Agent(s) | Susceptible * |     | Intermediate * |   | Resistant * |     |
|------------------------|---------------|-----|----------------|---|-------------|-----|
|                        | n             | %   | n              | % | n           | %   |
| Amikacin               | 12            | 100 | 0              | 0 | 0           | 0   |
| Ampicillin             | 1             | 8   | 0              | 0 | 11          | 92  |
| Azithromycin           | 12            | 100 | 0              | 0 | 0           | 0   |
| Cefotaxime             | 12            | 100 | 0              | 0 | 0           | 0   |
| Ceftazidime            | 12            | 100 | 0              | 0 | 0           | 0   |
| Chloramphenicol        | 12            | 100 | 0              | 0 | 0           | 0   |
| Ciprofloxacin          | 11            | 92  | 0              | 0 | 1           | 8   |
| Colistin               | 12            | 100 | 0              | 0 | 0           | 0   |
| Gentamicin             | 12            | 100 | 0              | 0 | 0           | 0   |
| Meropenem              | 12            | 100 | 0              | 0 | 0           | 0   |
| Nalidixic acid         | 11            | 92  | 0              | 0 | 1           | 8   |
| Sulfamethoxazole       | 0             | 0   | 0              | 0 | 12          | 100 |
| Tetracycline           | 5             | 42  | 0              | 0 | 7           | 58  |
| Tigecycline            | 12            | 100 | 0              | 0 | 0           | 0   |
| Trimethoprim           | 12            | 100 | 0              | 0 | 0           | 0   |

\* = breakpoints susceptibility testing according to the performance standards for antimicrobial susceptibility testing by Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI); n = number of *Salmonella* spp. isolates.

#### 4. Discussion

Overall, the slaughter line investigated here reduced the variation in TVC values through the different process stages, but the analysis of the individual pigs also showed individual TVCs differing from the standard deviation of the average for all pigs. The trend of the variation of TVC values over the course of the slaughter line agrees with examinations by Schertenleib et al. (2011) [42].

After showering and resting of the slaughter pigs in the lairage, a statistically significant increase in microbiological load on the skin was found. Possible factors contributing to the increasing TVC could be that the shower water loosens dry dirt on the pig's skin, and additionally, within a resting time up to one hour, pigs could shed feces and lay down in contaminated areas of the lairage pens. The fecal shedding of pigs can lead to pre-slaughter skin cross-contamination via contact between the slaughter pigs or between the contaminated environment and the pigs during the stay in the lairage [43]. Similar to our results, a study investigating *Enterobacteriaceae* showed a statistically significant increase in the *Enterobacteriaceae* count after 30 min of continuous water misting on slaughter pigs [44]. In our study, the highest TVC values were determined after stunning and bleeding, and this is in line with previous studies covering the pig slaughter line [42,45]. Stunning leads to slackening of the sphincter muscles, which can result in leakage of feces from the rectum [46]. However, the increase of 0.21 log cfu/cm<sup>2</sup> from lairage after showering to after stunning was much less than a 0.5 log level, which is within the normal variation range of classical microbiology laboratory analyses [31]. The practical importance of this minor mean difference in TVC between the two process stages is questionable [32]. After showering and after stunning, where statistically significant TVC increases were shown, the process stages should be assessed as stages with a potential risk of cross-contamination. Scalding/dehairing and singeing/flaming led to significant reductions in TVC, presumably moderated by the ideal duration and optimal temperature in the scalding condenser and in the singeing machine [47,48]. This was confirmed especially by the TVC reductions after singeing/flaming of batches No 4 and No 9, which both arrived in the abattoir lairage with very high TVCs. The combined scalding and dehairing reduced the mean TVCs compared to the TVCs after stunning/bleeding by approximately 2.7 log cfu/cm<sup>2</sup>, which is in accordance with the results from Schertenleib et al. (2011) [42]. Another European study using sponges for sampling showed a comparable trend of TVC values along the slaughter line as in our results [34]. The current study showed that TVC values significantly reduced after scalding and singeing and agrees with various other studies [34,35,49,50]. Furthermore, the TVC values underwent a minor reduction after evisceration and the stage before chilling, which is in line with an Irish study [34].

Possible factors causing the small increase in TVC variation at the end of the slaughter line could be the cross-contamination of carcasses by equipment and utensils. In pig meat processing, evisceration is recognized as a critical step that often results in carcass contamination [51,52]. Differences between abattoir staff in the hygienic performance of evisceration could contribute to differences in the cross-contamination of pig carcasses and in the probability for the transfer of pathogens to the meat [51,53]. Overall, and in agreement with other studies [34,42], we showed that the pig slaughter process seems to harmonize the variations of the TVC by effectively reducing the bacterial load to similarly low values.

The results of the mixed model with the process stage as a fixed effect, the batch as a random effect, and individual pig variation confirmed the findings of the effects of most process stages, with statistically significant differences in TVCs when comparing each stage to its following stage, but not between evisceration and before chilling.

Notably, (1) some TVCs were low, i.e., just inside the minimum detection limit of our method, (2) contact methods are suitable for microbiological sampling of carcass surfaces [28], but produce TVCs up to 0.5 log levels lower than wet-dry double swabbing [29,30], and (3) differences of up to 0.5 log levels are within the normal laboratory range [31]. The agar contact method is not listed in the EN ISO 17604:2015-12 standard



protocol for carcass sampling for microbiological analysis [19]. Contact plates are commonly used for the microbiological examination of environmental surfaces [54], and the contact method is laid down in the EN ISO 18593:2018 [55] standard protocol. However, to realize our longitudinal examination without stopping the slaughter line or reducing the line speed, neither of which were acceptable, as we wanted to obtain a realistic picture of the actual slaughter process, and so we selected the agar contact method for the following important reasons. The selected procedure enabled the repeated sampling of individual slaughter pigs at seven process stages without interruption of the workflow. Additionally, this animal-equitable, fast, and practical sampling method can be used for sampling live pigs in the lairage without fixation of the pigs and also for carcass surfaces. Then, for this procedure using commercial agar contact plates, only a few further materials are required [56].

In order to avoid a reduction in skin contamination caused by repeated sampling with contact plates, six sampling areas around the anus were defined and a different area was systematically used for every pig at each process stage. In this study, no statistically significant differences for the changing perianal area between the individual stages were detected, and thus, the samples were considered comparable. In addition, this result and the possible distribution of contamination after showering in the lairage are the reasons why we chose the area from process stage 1 (lairage before showering) for resampling at process stage 4 (after scalding/dehairing) and considered the effect of the removal of the contamination from the same sampling area as very low.

However, batch No 8 showed higher TVCs after singeing/flaming, but similar TVCs after evisceration, compared to the other batches. Since the effectiveness of singeing/flaming on bacterial reduction differs depending on the system [47,48,57], it is possible that the carcass surfaces of batch No 8 were insufficiently processed by the ovens. The TVC reduction after evisceration could be explained by contamination on the perianal area being distributed to the front half of the carcass by the water used by the water-cooled splitting saw and, therefore, not being in the sampled area any longer. This saw is located after evisceration, but before trimming. In agreement with our results, reductions in *Enterobacteriaceae* after the evisceration of pig carcasses were shown previously [48]. Our results could also simply highlight the effect of individual batches in a slaughter process scenario during regular, routine work and with a representative sample of slaughter pigs. More in-depth studies are needed to resolve this point.

When considering individual pigs at slaughter, it was seen that regardless of the incoming microbiological load, the process harmonizes the outgoing TVC loads at the end of the slaughter line (before chilling) to a similar range. This was shown by our consideration of the five pigs with the highest compared to the five pigs with the lowest incoming TVCs.

Since we were able to detect several *Salmonella* spp. serovars on individual pig carcasses on the same sampling days, it could be that the pigs became contaminated with this pathogen via feces containing *Salmonella* spp. from contaminated lairage pens [58]. On the Tuesday, four monophasic *S. Typhimurium* 1,4,[5],12:i:- (all from batch No 6) were found. Additionally, on the Wednesday, seven O-antigen-negative monophasic *S. Typhimurium* 1,4,12:i:-, five from batch No 2 and two from batch No 1, were detected, suggesting that cross-contamination between pigs of the same and different batches is possible. It is already known that positive pigs can carry *Salmonella* spp. into the abattoir lairage and can contaminate the environment and slaughter pigs from other batches [59]. A period of two hours can be sufficient to infect pigs with *Salmonella* spp. [60]. Three of our 12 *Salmonella* spp. isolates were obtained after the combined process stage of scalding and dehairing. The three pigs involved could have been infected on the farm [61], or the carcasses could have been cross-contaminated by the dehairing process [62].

To classify the different patterns of resistance found in antimicrobial-resistant bacteria, in the literature, there are various different definitions for multiple drug-resistant (MDR), extensively drug-resistant (XDR) and pandrug-resistant (PDR) bacteria [63]. Since the

isolate monophasic O-antigen-negative *S. Typhimurium* 1,4,12:i:- showed resistance to ampicillin (antimicrobial class: penicillins), sulfamethoxazole (antimicrobial class: folate pathway inhibitors), and tetracycline (antimicrobial class: tetracyclines) in the antimicrobial susceptibility test, this organism can be characterized as MDR according to a commonly used definition of “resistant to three or more antimicrobial classes” [63–67]. The zoonosis monitoring report 2020 [68] confirmed that resistance to ampicillin, sulfamethoxazole, and tetracycline is frequent in *Salmonella* spp. on pig carcasses in German abattoirs. The finding that only a small percentage (8%, respectively) of the recovered *Salmonella* spp. were resistant to ciprofloxacin and nalidixic acid is in line with the results of the zoonosis monitoring program [68] run by the Federal Office of Consumer Protection and Food Safety (BVL) and the German Federal Institute for Risk Assessment (BfR) in Berlin, Germany.

Our study on the pig slaughter process has the following limitation. The results are specific to this longitudinal study, which was conducted only in a single abattoir, by using the agar contact method on the perianal area. This limits the generalizability and transferability of the results to other abattoirs. However, based on the installed slaughter line machines, it can be presumed that the results are representative for industrial slaughterhouses in Germany with similar slaughter capacities.

## 5. Conclusions

The consideration at the batch level and individual pig level of TVC trend curves determined with the agar contact method showed comparable trends to other previous studies on the pig slaughter process. Moreover, we were able to measure that, factually, the studied process harmonizes the outgoing TVC loads (for batches and individual pigs), regardless of incoming TVC loads, and thus, we were also able to draw conclusions about the functionality/effect of the seven slaughter line process stages. This study shows the importance of studying each process stage in depth and quantifying its effects in the slaughter process, with the aim of understanding and improving each process stage and the ultimate aim of improving pig meat safety. For the implementation of interventions to reduce the TVC on slaughter pig surfaces at the two process stages (after showering in the lairage and after stunning) that produced significant TVC increases, an evaluation should be carried out in further detailed investigations.

Finally, we showed that sampling pig skin via the agar contact method can be used to identify process stages with possible risk factors over the course of the slaughter process and to identify contaminated delivery batches for abattoir-specific testing. However, the agar contact method has the limitation that this particularly animal equitable sampling technique is more suitable for higher expected TVCs, which is the case in the live pig sector at lairage. Nonetheless, in particular for scientific assessment and the optimization of slaughter hygiene, TVCs and *Salmonella* spp. sampled using practical sampling methods, like the agar contact method, are useful, and indeed necessary, for special-case slaughter line examinations.

**Author Contributions:** Conceptualization, D.M. and N.L.; methodology, N.L., L.K., R.F. and D.M.; validation, N.L., L.K. and R.F.; formal analysis, R.F., J.G.-K. and L.K.; investigation, R.F.; resources, D.M. and N.L.; data curation, R.F. and J.G.-K.; writing—original draft preparation, R.F.; writing—review and editing, R.F., N.L., J.G.-K., L.K. and D.M.; visualization, J.G.-K., R.F. and L.K.; supervision, D.M. and N.L.; project administration, N.L. and D.M.; funding acquisition, D.M. and N.L. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This study was conducted within the joint research project KontRed (Development and implementation of technological procedures for the reduction of microbial contaminations in the poultry and pig slaughter process). The project was supported by funds of the Federal Ministry of Food and Agriculture (BMEL) based on a decision of the Parliament of the Federal Republic of Germany via the Federal Office for Agriculture and Food (BLE) under the innovation support program, grant number: 281C104A18.

**Data Availability Statement:** The data presented in this study are available upon request from the corresponding author.

**Acknowledgments:** We thank the staff of the abattoir, Bastian Wyink (Frankenförder Forschungsgesellschaft) for the collaboration in taking samples and Corinna Heucke for preparing data sets before final analysis. Furthermore, many thanks to Istvan Szabo and Marina Lamparter at the German Federal Institute for Risk Assessment for the support of the laboratory work.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

## References

1. Moura-Alves, M.; Carvalho, M.; Baggio Ribeiro, D.H.; Barbosa, J.; Silveira, L.; Pista, A.; Pinto, H.P.; Saraiva, C.; Teixeira, P.; Esteves, A. Hygiene indicators and salmonellae on surfaces of swine carcasses from two slaughterhouses in northern Portugal. *J. Food Prot.* **2022**, *85*, 1566–1575. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Gallina, S.; Bianchi, D.M.; Ru, G.; Maurella, C.; Barzanti, P.; Baioni, E.; Virgilio, S.; Mioni, R.; Lanni, L.; Migliazzo, A.; et al. Microbiological recovery from bovine, swine, equine, and ovine carcasses: Comparison of excision, sponge and swab sampling methods. *Food Control* **2015**, *50*, 919–924. [[CrossRef](#)]
3. EC. *European Commission Regulation (EC) No 2073/2005 of 15 November 2005 on Microbiological Criteria for Foodstuffs*; European Commission Regulation: Brussels, Belgium, 2005; pp. 1–26.
4. Lindblad, M.; Berking, C. A meat control system achieving significant reduction of visible faecal and ingesta contamination of cattle, lamb and swine carcasses at Swedish slaughterhouses. *Food Control* **2013**, *30*, 101–105. [[CrossRef](#)]
5. Piras, F.; Fois, F.; Mazza, R.; Putzolu, M.; Delogu, M.L.; Lochi, P.G.; Pani, S.P.; Mazzette, R. *Salmonella* Prevalence and Microbiological Contamination of Pig Carcasses and Slaughterhouse Environment. *Ital. J. Food Saf.* **2014**, *3*, 4581. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Betic, N.; Baltic, T.; Ciric, J.; Bajcic, A.; Raseta, M.; Mrdovic, B.; Karabasil, N. Process hygiene of pig carcasses in one large-scale slaughterhouse in the west of Serbia, during 48 months. In Proceedings of the IOP Conference Series: Earth and Environmental Science, Kopaonik, Serbia, 22–25 September 2019; p. 012046.
7. Barco, L.; Belluco, S.; Roccato, A.; Ricci, A. *Escherichia coli* and *Enterobacteriaceae* counts on pig and ruminant carcasses along the slaughterline, factors influencing the counts and relationship between visual faecal contamination of carcasses and counts: A review. *EFSA Support. Publ.* **2014**, *11*, 634E. [[CrossRef](#)]
8. Delhalle, L.; De Sadeleer, L.; Bollaerts, K.; Farnir, F.; Saegerman, C.; Korsak, N.; Dewulf, J.; De Zutter, L.; Daube, G. Risk factors for *Salmonella* and hygiene indicators in the 10 largest Belgian pig slaughterhouses. *J. Food Prot.* **2008**, *71*, 1320–1329. [[CrossRef](#)]
9. EFSA. The assessment of the comparison of the Australian monitoring programme for carcasses to requirements in Regulation (EC) No 2073/2005 on microbiological criteria on foodstuffs. *EFSA J.* **2010**, *8*, 1452. [[CrossRef](#)]
10. Martinez-Aviles, M.; Garrido-Esteva, M.; Alvarez, J.; de la Torre, A. *Salmonella* Surveillance Systems in Swine and Humans in Spain: A Review. *Vet. Sci.* **2019**, *6*, 20. [[CrossRef](#)]
11. Chalias, A.; Grispoldi, L.; Cenci Goga, B. A risk assessment model for *Salmonella* spp. in swine carcasses. *EFSA J.* **2022**, *20*, e200405. [[CrossRef](#)]
12. EFSA. The European Union One Health 2021 Zoonoses Report. *EFSA J.* **2022**, *20*, e07666. [[CrossRef](#)]
13. Berends, B.R.; Urlings, H.A.P.; Snijders, J.M.A.; Van Knapen, F. Identification and quantification of risk factors in animal management and transport regarding *Salmonella* spp. in pigs. *Int. J. Food Microbiol.* **1996**, *30*, 37–53. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Arguello, H.; Alvarez-Ordóñez, A.; Carvajal, A.; Rubio, P.; Prieto, M. Role of slaughtering in *Salmonella* spreading and control in pork production. *J. Food Prot.* **2013**, *76*, 899–911. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Algammal, A.; Hetta, H.F.; Mabrok, M.; Behzadi, P. Editorial: Emerging multidrug-resistant bacterial pathogens “superbugs”: A rising public health threat. *Front. Microbiol.* **2023**, *14*, 1135614. [[CrossRef](#)]
16. Algammal, A.M.; Abo Hashem, M.E.; Alfifi, K.J.; Al-Otaibi, A.S.; Alatawy, M.; ElTarabili, R.M.; Abd El-Ghany, W.A.; Hetta, H.F.; Hamouda, A.M.; Elewa, A.A.; et al. Sequence Analysis, AntibioGram Profile, Virulence and Antibiotic Resistance Genes of XDR and MDR *Gallibacterium anatis* Isolated from Layer Chickens in Egypt. *Infect Drug Resist.* **2022**, *15*, 4321–4334. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Algammal, A.M.; Ibrahim, R.A.; Alfifi, K.J.; Ghabban, H.; Alghamdi, S.; Kabrah, A.; Khafagy, A.R.; Abou-Elela, G.M.; Abu-Elala, N.M.; Donadu, M.G.; et al. A First Report of Molecular Typing, Virulence Traits, and Phenotypic and Genotypic Resistance Patterns of Newly Emerging XDR and MDR *Aeromonas veronii* in *Mugil seheli*. *Pathogens* **2022**, *11*, 1262. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Shafiq, M.; Zeng, M.; Permana, B.; Bilal, H.; Huang, J.; Yao, F.; Algammal, A.M.; Li, X.; Yuan, Y.; Jiao, X. Coexistence of bla (NDM-5) and tet(X4) in international high-risk *Escherichia coli* clone ST648 of human origin in China. *Front. Microbiol.* **2022**, *13*, 1031688. [[CrossRef](#)]
19. *ISO 17604:2015-12*; Microbiology of the food chain-Carcass sampling for microbiological analysis. International Organization for Standardization: Geneva, Switzerland, 2015. [[CrossRef](#)]
20. Fliss, I.; Simard, R.; Ettriki, A. Comparison of three sampling techniques for microbiological analysis of meat surfaces. *J. Food Sci.* **1991**, *56*, 249–250. [[CrossRef](#)]

21. Lindblad, M. Microbiological sampling of swine carcasses: A comparison of data obtained by swabbing with medical gauze and data collected routinely by excision at Swedish abattoirs. *Int. J. Food Microbiol.* **2007**, *118*, 180–185. [[CrossRef](#)]
22. Tenhagen, B.A.; Arth, O.; Bandick, N.; Fetsch, A. Comparison of three sampling methods for the quantification of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* on the surface of pig carcasses. *Food Control* **2011**, *22*, 643–645. [[CrossRef](#)]
23. Milios, K.T.; Drosinos, E.H.; Zoiopoulos, P.E. Food Safety Management System validation and verification in meat industry: Carcass sampling methods for microbiological hygiene criteria—A review. *Food Control* **2014**, *43*, 74–81. [[CrossRef](#)]
24. Pepperell, R.; Reid, C.A.; Solano, S.N.; Hutchison, M.L.; Walters, L.D.; Johnston, A.M.; Buncic, S. Experimental comparison of excision and swabbing microbiological sampling methods for carcasses. *J. Food Prot.* **2005**, *68*, 2163–2168. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Louwers, J.; Klein, G. Suitability of sampling methods for the investigation of the environment in EC-licensed meat rendering and processing plants. *Berl. Muench Tieraerztl. Wochenschr.* **1994**, *107*, 367–373.
26. Baumgart, J.; Kussmann, H. A spray method for determining the surface bacterial content of animals for slaughter. *Fleischwirtschaft* **1975**, *55*, 1113–1114.
27. Kusch, D. Ein Beitrag zur Hygienekontrolle in fleischverarbeitenden Betrieben. *J. Food Saf. Food Qual.* **1977**, *28*, 68–71.
28. Globisch, H.; Wilkens, S.; Jacob, A.; Thien, J. Anwendbarkeit von Abklatschverfahren für die Untersuchung von Oberflächenkeimgehalten bei Schlachtierkörpern: Vergleichende Bestimmung der aeroben mesophilen Gesamtkeimzahl mittels Abklatschtechnik und destruktiver Probenahmetechnik. *Fleischwirtschaft* **1996**, *76*, 1116–1118.
29. Kleiner, U.; Hilgert, S. Conversion of the decision 2001/471/EC: Comparison of the destructive and non-destructive sampling techniques for microbiological control of meat surfaces—2. Sections of swine. *Fleischwirtschaft* **2004**, *84*, 146–149.
30. Kleiner, U.; Hilgert, S. Conversion of the decision 2001/471/EC: Comparison of the destructive and non-destructive sampling techniques for microbiological control of meat surfaces—1. Swine carcass. *Fleischwirtschaft* **2004**, *84*, 101–104.
31. Hübner, P.; Gautsch, S.; Jemmi, T. In house validierung (single laboratory validation) of microbiological methods. *Mitteilungen Aus. Lebensm. Und. Hyg.* **2002**, *93*, 118–139.
32. Gill, C.O.; McGinnis, J.C. Improvement of the hygienic performance of the hindquarters skinning operations at a beef packing plant. *Int. J. Food Microbiol.* **1999**, *51*, 123–132. [[CrossRef](#)]
33. Fürstenberg, R.; Meemken, D.; Langforth, S.; Grosse-Kleimann, J.; Kreienbrock, L.; Langkabel, N. Comparison of the agar contact method and the wet-dry double swabbing method for determining the total viable bacterial count on pig carcass surfaces. *J. Consum. Prot. Food Saf.* **2023**. *submitted, revised, processing of minor revisions.*
34. Wheatley, P.; Giotis, E.S.; McKeivitt, A.I. Effects of slaughtering operations on carcass contamination in an Irish pork production plant. *Ir. Vet. J.* **2014**, *67*, 1–6. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Zweifel, C.; Spescha, C.; Stephan, R. Process stages in pig slaughter: Influence on the microbiological contamination of carcasses in two abattoirs. *Arch. Lebensm. Hyg.* **2007**, *58*, 7–12. [[CrossRef](#)]
36. *DIN 10161:2016-12*; Microbiological analysis of meat and meat products—Aerobic count at 30 °C—Drop plating method. Deutsches Institut für Normung e.V., Germany: Berlin, Germany, 2016. [[CrossRef](#)]
37. *ISO 6579-1:2020-08*; Microbiology of the food chain—Horizontal method for the detection, enumeration and serotyping of *Salmonella*—Part 1: Detection of *Salmonella* spp. (ISO 6579-1:2017 + Amd.1:2020). International Organization for Standardization: Geneva, Switzerland, 2020. [[CrossRef](#)]
38. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically*; Approved Standard—Tenth Edition. CLSI Document M07-A10; Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI): Wayne, PA, USA, 2015.
39. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing*, 30th ed.; CLSI Supplement M100; Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI): Wayne, PA, USA, 2020; ISBN 978-1-68440-066-9 (Print); ISBN 978-1-68440-067-6 (Electronic).
40. Hutchison, M.L.; Walters, L.D.; Avery, S.M.; Reid, C.A.; Wilson, D.; Howell, M.; Johnston, A.M.; Buncic, S. A comparison of wet-dry swabbing and excision sampling methods for microbiological testing of bovine, porcine, and ovine carcasses at red meat slaughterhouses. *J. Food Prot.* **2005**, *68*, 2155–2162. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
41. Ghafir, Y.; China, B.; Dierick, K.; De Zutter, L.; Daube, G. Hygiene indicator microorganisms for selected pathogens on beef, pork, and poultry meats in Belgium. *J. Food Prot.* **2008**, *71*, 35–45. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Schertenleib, T.I.; Stephan, R.; Scheeder, M.; Zweifel, C. Visual and microbiological process analysis of pig slaughtering in a small-scale abattoir. *J. Food Saf. Food Qual.* **2011**, *62*, 52–57. [[CrossRef](#)]
43. Nastasijevic, I.; Lakicevic, B.; Raseta, M.; Djordjevic, V.; Jankovic, V.; Mrdovic, B.; Brankovic-Lazic, I. Evaluation of Pig Welfare in Lairage and Process Hygiene in a Single Abattoir. *Meat. Technol.* **2018**, *59*, 8–22. [[CrossRef](#)]
44. Walia, K.; Lynch, H.; Grant, J.; Duffy, G.; Leonard, F.C.; Lawlor, P.G.; Gardiner, G.E. The efficacy of disinfectant misting in the lairage of a pig abattoir to reduce *Salmonella* and *Enterobacteriaceae* on pigs prior to slaughter. *Food Control* **2017**, *75*, 55–61. [[CrossRef](#)]
45. Van Ba, H.; Seo, H.W.; Seong, P.N.; Kang, S.M.; Cho, S.H.; Kim, Y.S.; Park, B.Y.; Moon, S.S.; Kang, S.J.; Choi, Y.M.; et al. The fates of microbial populations on pig carcasses during slaughtering process, on retail cuts after slaughter, and intervention efficiency of lactic acid spraying. *Int. J. Food Microbiol.* **2019**, *294*, 10–17. [[CrossRef](#)]
46. Swart, A.N.; Evers, E.G.; Simons, R.L.; Swanenburg, M. Modeling of *Salmonella* Contamination in the Pig Slaughterhouse. *Risk Anal.* **2016**, *36*, 498–515. [[CrossRef](#)]

47. Pearce, R.A.; Bolton, D.J.; Sheridan, J.J.; McDowell, D.A.; Blair, I.S.; Harrington, D. Studies to determine the critical control points in pork slaughter hazard analysis and critical control point systems. *Int. J. Food Microbiol.* **2004**, *90*, 331–339. [CrossRef]
48. Spescha, C.; Stephan, R.; Zweifel, C. Microbiological contamination of pig carcasses at different stages of slaughter in two European Union-approved abattoirs. *J. Food Prot.* **2006**, *69*, 2568–2575. [CrossRef] [PubMed]
49. Zweifel, C.; Fischer, R.; Stephan, R. Microbiological contamination of pig and cattle carcasses in different small-scale Swiss abattoirs. *Meat Sci.* **2008**, *78*, 225–231. [CrossRef] [PubMed]
50. Bolton, D.J.; Pearce, R.A.; Sheridan, J.J.; Blair, I.S.; McDowell, D.A.; Harrington, D. Washing and chilling as critical control points in pork slaughter hazard analysis and critical control point (HACCP) systems. *J. Appl. Microbiol.* **2002**, *92*, 893–902. [CrossRef] [PubMed]
51. Rivas, T.; Vizcaino, J.A.; Herrera, F.J. Microbial contamination of carcasses and equipment from an Iberian pig slaughterhouse. *J. Food Prot.* **2000**, *63*, 1670–1675. [CrossRef]
52. Biasino, W.; De Zutter, L.; Woollard, J.; Mattheus, W.; Bertrand, S.; Uyttendaele, M.; Van Damme, I. Reduced contamination of pig carcasses using an alternative pluck set removal procedure during slaughter. *Meat Sci.* **2018**, *145*, 23–30. [CrossRef]
53. Petruzzelli, A.; Osimani, A.; Pasquini, M.; Clementi, F.; Vetrano, V.; Paolini, F.; Fogliani, M.; Micci, E.; Tonucci, F. Trends in the microbial contamination of bovine, ovine and swine carcasses in three small-scale abattoirs in central Italy: A four-year monitoring. *Meat Sci.* **2016**, *111*, 53–59. [CrossRef]
54. Goverde, M.; Willrodt, J.; Staerk, A. Evaluation of the Recovery Rate of Different Swabs for Microbial Environmental Monitoring. *PDA J. Pharm. Sci. Technol.* **2017**, *71*, 33–42. [CrossRef]
55. ISO 18593:2018; Microbiology of the food chain –Horizontal methods for surface sampling. International Organization for Standardization: Geneva, Switzerland, 2018. [CrossRef]
56. Capita, R.; Prieto, M.; Alonso-Calleja, C. Sampling methods for microbiological analysis of red meat and poultry carcasses. *J. Food Prot.* **2004**, *67*, 1303–1308. [CrossRef]
57. Bryant, J.; Brereton, D.A.; Gill, C.O. Implementation of a validated HACCP system for the control of microbiological contamination of pig carcasses at a small abattoir. *Can. Vet. J.* **2003**, *44*, 51–55.
58. Hurd, H.S.; McKean, J.D.; Griffith, R.W.; Wesley, I.V.; Rostagno, M.H. *Salmonella enterica* Infections in Market Swine with and without Transport and Holding. *Appl. Environ. Microbiol.* **2002**, *68*, 2376–2381. [CrossRef]
59. González Santamarina, B. *Salmonella* Carried over by Pigs during Transport and Lairage. Doctoral Thesis, Freie Universität Berlin, Berlin, Germany, 2019. [CrossRef]
60. Hurd, H.S.; Gailey, J.K.; McKean, J.D.; Rostagno, M.H. Rapid infection in market-weight swine following exposure to a *Salmonella* Typhimurium-contaminated environment. *Am. J. Vet. Res.* **2001**, *62*, 1194–1197. [CrossRef] [PubMed]
61. van der Gaag, M.A.; Vos, F.; Saatkamp, H.W.; van Boven, M.; van Beek, P.; Huirne, R.B.M. A state-transition simulation model for the spread of *Salmonella* in the pork supply chain. *Eur. J. Oper. Res.* **2004**, *156*, 782–798. [CrossRef]
62. De Busser, E.V.; Maes, D.; Houf, K.; Dewulf, J.; Imberechts, H.; Bertrand, S.; De Zutter, L. Detection and characterization of *Salmonella* in lairage, on pig carcasses and intestines in five slaughterhouses. *Int. J. Food Microbiol.* **2011**, *145*, 279–286. [CrossRef]
63. Magiorakos, A.P.; Srinivasan, A.; Carey, R.B.; Carmeli, Y.; Falagas, M.E.; Giske, C.G.; Harbarth, S.; Hindler, J.F.; Kahlmeter, G.; Olsson-Liljequist, B.; et al. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: An international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin. Microbiol. Infect.* **2012**, *18*, 268–281. [CrossRef]
64. Cohen, A.L.; Calfee, D.; Fridkin, S.K.; Huang, S.S.; Jernigan, J.A.; Lautenbach, E.; Oriola, S.; Ramsey, K.M.; Salgado, C.D.; Weinstein, R.A.; et al. Recommendations for metrics for multidrug-resistant organisms in healthcare settings: SHEA/HICPAC Position paper. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* **2008**, *29*, 901–913. [CrossRef] [PubMed]
65. Falagas, M.E.; Koletsis, P.K.; Bliziotis, I.A. The diversity of definitions of multidrug-resistant (MDR) and pandrug-resistant (PDR) *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Med. Microbiol.* **2006**, *55*, 1619–1629. [CrossRef] [PubMed]
66. Hidron, A.I.; Edwards, J.R.; Patel, J.; Horan, T.C.; Sievert, D.M.; Pollock, D.A.; Fridkin, S.K.; National Healthcare Safety Network, T.; Participating National Healthcare Safety Network, F. NHSN annual update: Antimicrobial-resistant pathogens associated with healthcare-associated infections: Annual summary of data reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2006–2007. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* **2008**, *29*, 996–1011. [CrossRef]
67. Kallen, A.J.; Hidron, A.I.; Patel, J.; Srinivasan, A. Multidrug resistance among gram-negative pathogens that caused healthcare-associated infections reported to the National Healthcare Safety Network, 2006–2008. *Infect Control Hosp. Epidemiol.* **2010**, *31*, 528–531. [CrossRef]
68. The Federal Office of Consumer Protection and Food Safety (BVL). BVL-Report 16.1 Berichte zur Lebensmittelsicherheit, Zoonosen-Monitoring 2020, BVL. 2020. Available online: [https://www.bvl.bund.de/SharedDocs/Downloads/01\\_Lebensmittel/04\\_Zoonosen\\_Monitoring/Zoonosen\\_Monitoring\\_Bericht\\_2020.pdf?\\_\\_blob=publicationFile&v=7](https://www.bvl.bund.de/SharedDocs/Downloads/01_Lebensmittel/04_Zoonosen_Monitoring/Zoonosen_Monitoring_Bericht_2020.pdf?__blob=publicationFile&v=7) (accessed on 21 September 2023). (In German)

**Disclaimer/Publisher’s Note:** The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

## 5. DISKUSSION

### 5.1. Bewertung der Nutzung der Agarkontakt-Methode

Die in den eigenen Untersuchungen verwendete Agarkontakt-Methode basiert auf dem Abklatsch mittels gebrauchsfertigen Agarkontaktplatten, wie z.B. RODAC-Platten. Zur Beprobung der Hautoberfläche von Schlachtschweinen wird der Deckel einer Agarkontaktplatte direkt vor der zu beprobenden Stelle der Schweinehaut entfernt. Die konvexe Agaroberfläche wird daraufhin fünf Sekunden lang ohne seitliche Bewegung und mit konstantem, gleichmäßigem Druck fest gegen den zu untersuchenden Bereich gedrückt (Fürstenberg et al. 2023; 2024).

Das Charakteristikum der Agarkontakt-Methode im Vergleich zu anderen Abklatsch- bzw. Kontaktverfahren ist die modifizierte mikrobiologische Verarbeitung des Nähragars.

Da die semiquantitative Keimzahlbestimmung mittels RODAC-Methode bei hoher Kontamination infolge von Bakterienrasenbildung auf dem bebrüteten Nähragar häufig nicht möglich ist, homogenisierten Autoren (Baumgart und Kussmann 1975; Kusch 1977) den Nähragar nach dem Abklatschen in BPW, um dann aus dem Homogenisat eine Verdünnungsreihe zur quantitativen Keimzahlbestimmung herzustellen (Sibomana 1980).

In der Literatur ist bisher noch keine Vergleichsuntersuchung zwischen der Agarkontakt-Methode und dem Nass-Trocken-Tupfverfahren zur Ermittlung der GKZ mit einem experimentellen Teilversuch mit künstlich kontaminierten Schweinehautteilstücken beschrieben. Auch ein Vergleich der beiden Methoden im Schlachtbetrieb mittels Schweineschlachtierkörper unter regulären Arbeitsbedingungen und Schlachtprozesseinflüssen ist nicht beschrieben.

Da in zahlreichen Prozesshygienestudien an mehreren Verarbeitungsstufen (Spescha et al. 2006; Zweifel et al. 2007; Schertenleib et al. 2011) für die Probenahme das Nass-Trocken-Tupfverfahren verwendet wurde und die Agarkontakt-Methode den wesentlichen Vorteil der einfachen Durchführung aufweist, wurde im Rahmen dieser Arbeit die Vergleichbarkeit der Ergebnisse dieser beiden Verfahren in einem Methodenvergleich untersucht und bewertet.

Grundsätzlich konnte in den eigenen Untersuchungen gezeigt werden, dass die Durchführung der Beprobung der Agarkontakt-Methode tiergerecht, praktikabel, schnell und für die Anwendung bei höher kontaminierten Schlachtierkörpern und am lebenden Schlachtschwein geeignet ist (Fürstenberg et al. 2023; 2024).

Da im eigenen Methodenvergleich eine statistisch signifikante Äquivalenz zwischen der Agarkontakt-Methode und dem Nass-Trocken-Tupfverfahren gezeigt werden konnte, lässt

sich ableiten, dass derartig ermittelte mikrobiologische Ergebnisse eine mögliche Bewertungsgrundlage für die Oberflächenkeimzahl auf Schlachttierkörpern darstellen können (Fürstenberg et al. 2024).

Zudem wurde durch die Bewertung der Wiederfindungsraten von geringen und hohen Kontaminationen festgestellt, dass die Agarkontakt-Methode insbesondere für die Bestimmung von höheren GKZ-Werten auf Schlachttierkörperoberflächen geeignet ist (Fürstenberg et al. 2024). Folglich ist die Methode insbesondere für mikrobiologische Untersuchungen an Prozessstufen, wie z.B. im Wartestall und vor dem Brühen, an denen eine relativ hohe bakterielle Belastung des Schlachtschweins oder des Schlachttierkörpers zu erwarten ist, eine geeignete Alternative zum Nass-Trocken-Tupfverfahren. Die Möglichkeit, mittels Abklatschverfahren einen hohen Grad an Kontaminationen auf Schlachttierkörpern zu bestimmen, zeigte ebenfalls eine Studie (Kusch 1977) mit dem Agarwurstverfahren nach Ten Cate (1965), bei der der Nähragar homogenisiert wurde und als Basis für die Herstellung einer Verdünnungsreihe und der abschließenden quantitativen Keimzählung Verwendung fand.

Eine Vergleichsstudie stellte fest, dass die Agarkontakt-Methode mit der Gewebestanzprobe korreliert (Nortje et al. 1982), wobei andere Studien mittels Agarkontakt-Methoden im Vergleich mit der Gewebestanzprobe signifikant geringere Keimzahlen ermittelten (Baumgart und Kussmann 1975; Fliss et al. 1991).

Eine Gegenüberstellung von nicht-destruktiven Methoden ergab, ähnlich zu den eigenen Ergebnissen, keinen signifikanten Unterschied bei der vergleichenden Betrachtung der Werte von *Escherichia coli* auf Schafschlachttierkörpern zwischen der Agarkontakt-Methode und dem Nass-Trocken-Tupfverfahren (Fliss et al. 1991).

## **5.2. Anwendung der Agarkontakt-Methode**

Für mikrobiologische Monitoringuntersuchungen von Schlachttierkörpern im Rahmen der Eigenkontrollen sind in der Verordnung (EG) Nr. 2073/2005 Richt- und Grenzwerte definiert (Europäische Kommission 2005). Im Fall von unbefriedigenden mikrobiologischen Ergebnissen des allgemeinen Trends im Hygieneprozess müssen Maßnahmen wie die Verbesserung der Schlachthygiene oder die Überprüfung der Prozesskontrolle erfolgen (Milius et al. 2014). Die in dieser Verordnung aufgeführten Grenzwerte für die aerobe mesophile Gesamtkeimzahl von Schweineschlachttierkörpern gelten nur für im destruktiven Verfahren (Gewebestanzprobe) entnommene Proben, welche nach dem Herrichten, aber vor dem Kühlen genommen wurden (Europäische Kommission 2005). Die Auswahl aller zulässigen destruktiven und nicht-destruktiven Probenahmemethoden ist im Anhang 1 Kapitel 3 der Verordnung (EG) Nr. 2073/2005 (Europäische Kommission 2005) in Verbindung mit der ISO 17604 (2015) Standardnorm festgelegt. Jedoch ist die Verwendung von alternativen

Untersuchungsmethoden unter der Voraussetzung zulässig, dass diese gemäß Standardprotokollen zertifiziert wurden (Europäische Kommission 2005) und eine Validierung die Korrelation dieser Ergebnisse mit denen der Gewebestanzprobe nachweisen kann (Pearce und Bolton 2005).

Die Agarkontakt-Methode ist zum gegenwärtigen Zeitpunkt dieser Arbeit nicht für die mikrobiologische Untersuchung von Schlachttierkörpern validiert oder zertifiziert.

Anhand der in der Methodenvergleichsuntersuchung (Fürstenberg et al. 2024) nachgewiesenen statistischen Äquivalenz zwischen den beiden nicht-destruktiven Beprobungsmethoden bei höheren Oberflächenkeimzahlen, können die mikrobiologischen Ergebnisse der Agarkontakt-Methode präziser bewertet und beurteilt werden. Die Agarkontakt-Methode ist somit ein geeignetes Verfahren insbesondere für die Bestimmung des Hygienestatus von Schlachtschweinen und Schweineschlachttierkörpern, die einen hohen Kontaminationsgrad aufweisen.

Insbesondere durch die Anwendung der Agarkontakt-Methode wurde die Durchführung einer zum Zeitpunkt dieser Arbeit gegenwärtigen longitudinalen Prozesskontrolle des mikrobiologischen Status in einem Schweineschlachtbetrieb mit moderner Schlachttechnologie ermöglicht. Durch den entscheidenden Vorteil einer schnellen, praktikablen und einfachen Probenahme konnten individuelle Schlachtschweine an sieben Prozessstufen, beginnend im Wartestall bis zur Kühlung, wiederholt beprobt werden, ohne dass eine Unterbrechung der Schlachtroutine des Schlachtbandes notwendig war (Fürstenberg et al. 2023).

Lebensmittelunternehmer müssen nach Vorgabe der europäischen Gesetzgebung Verordnung (EG) Nr. 852/2004 (Europäisches Parlament, Rat der Europäischen Union 2004a) und Verordnung (EG) Nr. 853/2004 (Europäisches Parlament, Rat der Europäischen Union 2004b) in Verbindung mit der Durchführungsverordnung Verordnung (EG) 2019/627 (Europäische Kommission 2019) sicherstellen, dass nur saubere Tiere am Schlachtbetrieb angeliefert werden. In der AVV LmH sind grobe Bewertungskriterien für die Sauberkeit aufgeführt, da bei Verschmutzungen im Allgemeinen von einem Risiko für eine fäkale Kontamination des Fleisches ausgegangen werden kann (Anonymous 2009). Eine Kontamination von Schlachttierkörpern kann sich jedoch auch ohne visuell feststellbare Verschmutzungen darstellen, daher werden longitudinale Prozessuntersuchungen zur Ermittlung von möglichen mikrobiellen Kontaminationen, Kreuzkontaminationen oder Rekontaminationen an verschiedenen Prozessstufen empfohlen (Gill 2004; Pearce et al. 2004; Spescha et al. 2006). Eine schlachtbetriebsspezifische mikrobiologische Prozessanalyse an mehreren Prozessstufen durchzuführen, welche bereits im Wartestall nach Anlieferung der



Schlachtschweine beginnt, eignet sich dafür, Schwachstellen im Prozess zu identifizieren und Korrekturmaßnahmen zielgenau umzusetzen.

Die Agarkontakt-Methode ermöglicht durch den entscheidenden Vorteil der tiergerechten Probenahme am lebenden Tier eine Bestimmung der Oberflächenkeimzahl am Schlachtschwein bereits im Wartestall (Fürstenberg et al. 2023). Darüber hinaus lässt sich durch die schnelle, einfache und praktikable Durchführung der Probenahme eine wiederholte Beprobung von individuellen Schlachtierkörpern entlang des Schlachtprozesses realisieren, ohne die Beprobungsmethode wechseln, ohne den Arbeitsablauf unterbrechen und ohne Oberflächenmaterial großflächig entfernen zu müssen. Den wesentlichen Vorteil der Probenahme während des regulären Betriebsablaufs bestätigten Untersuchungen von Gebrauchsoberflächen in Lebensmittelbetrieben unter der Verwendung von gebrauchsfertigen RODAC-Platten (Schulze und Hildebrandt 1994).

Um schlachtbetriebsspezifische Daten zu erheben, die mit den routinemäßig eingesetzten Verfahren vergleichbar sind und eine objektive Beurteilung der Schlachthygiene ermöglichen, ist es hingegen unerlässlich, dieselbe Beprobungstechnik über einen längeren Zeitraum anzuwenden (Zweifel und Stephan 2003b).

### **5.3. Einfluss der Schlachtierkontamination**

Basierend darauf, dass der Eintrag durch das Tier zu Beginn der Schlachtung als möglicher Einfluss auf den Effekt des Schlachtprozesses zu berücksichtigen sei (Zweifel et al. 2007), wurde in den eigenen Untersuchungen der Effekt der Kontamination zu Beginn der Schlachtung auf die Oberflächenkeimzahl desselben Schlachtschweins am Ende der Schlachtkette zum Zeitpunkt vor der Kühlung genauer betrachtet (Fürstenberg et al. 2023).

Basierend darauf erfolgte die vergleichende Bewertung der GKZ-Werte vom Perianalbereich der fünf Schlachtschweine mit den höchsten zu den fünf Schweinen mit den niedrigsten GKZ-Werten, sowohl nach Anlieferung im Wartestall als auch vor der Kühlung. Im Unterschied zu den Ergebnissen von Zweifel et al. (2007) wurde bei der eigenen Betrachtung einzelner Schweine festgestellt, dass unabhängig von der mikrobiologischen Belastung nach Anlieferung der Tiere in den Schlachtbetrieb die GKZ-Werte am Ende der Schlachtkette auf ein ähnliches Kontaminationslevel reduziert wurden (Fürstenberg et al. 2023). Somit lässt sich aus der eigenen Prozessanalyse nachweisen, dass die Kontamination, welche am lebenden Schlachtschwein im Wartestall erhoben wurde, keinen wesentlichen Einfluss auf die GKZ-Werte der Schlachtierkörper am Ende der Schlachtkette hat (Fürstenberg et al. 2023). Im Vergleich zu den von Bolton et al. (2002) ermittelten durchschnittlichen Hautkontaminationen von  $5 \log \text{KbE}/\text{cm}^2$  bei Endmastschweinen, liegen die eigenen erhobenen Werte mit  $5,70 \log \text{KbE}/\text{cm}^2$  auf einem leicht höheren Kontaminationsniveau. Wie sich jedoch der

Reduktionseffekt des Prozesses bei Tieren mit einer stärkeren Verschmutzung und höherer Kontamination verhält, kann auf Grundlage dieser Arbeit nicht bewertet werden. Der untersuchte Schlachtprozess konnte die mikrobiologischen Ergebnisse auf ein ähnliches Level harmonisieren (Fürstenberg et al. 2023).

#### 5.4. Beprobung lebender Schlachtschweine im Wartestall

Die Wasserberieselung von Schweinen im Wartestall zur Verbesserung ihres Wohlbefindens kann Auswirkungen auf die bakterielle Kontamination von Schlachttierkörpern haben (Viltrop et al. 2023). Bei der vergleichenden Betrachtung der zwei Prozessstufen vor und nach 5-minütiger Wasserberieselung der Schlachtschweine im Wartestall wurde ein statistisch signifikanter Anstieg ( $p < 0,0001$ ) der GKZ nach erfolgter Berieselung ermittelt (Fürstenberg et al. 2023). Diese Feststellung steht im Einklang mit den Ergebnissen einer Studie, die einen statistisch signifikanten Anstieg des Gehalts an *Enterobacteriaceae* nach kontinuierlicher 30-minütiger Wasserbesprühung bei Schlachtschweinen zeigte (Walia et al. 2017). Allerdings wurde in einer weiteren Untersuchung auch festgestellt, dass das Besprühen mit kaltem Wasser die GKZ auf der Haut von lebenden Schlachtschweinen nicht verändert (Bolton et al. 2002).

Die eigene Methodenvergleichsuntersuchung, bei der für die Agarkontakt-Methode äquivalente Ergebnisse bei hohen Kontaminationen (durchschnittlich 6 log KbE/cm<sup>2</sup>) nachgewiesen wurden, unterstreicht, dass diese im Wartestall erhobenen Daten repräsentative Ergebnisse darstellen (Fürstenberg et al. 2024).

Im Wartestall an den beiden Prozessstufen vor und nach dem Berieseln wurde bei insgesamt fünf individuellen Schlachtschweinen *Salmonella* nachgewiesen, wovon vier *Salmonella*-positive Schlachtschweine auf einen Lieferbetrieb (A) und ein *Salmonella*-positives Schlachtschwein auf einen anderen Lieferbetrieb (B) zurückzuführen sind (Fürstenberg et al. 2023). Da diese fünf monophasischen *Salmonella* Typhimurium Isolate mit der Antigenformel 1,4,12:i:- an demselben Beprobungstag und bei unterschiedlichen Lieferpartien nachgewiesen werden konnten, besteht die Möglichkeit, dass die Schweine durch *Salmonella*-haltige Fäkalien in verschmutzten Wartestallabteilen kontaminiert wurden (Hurd et al. 2002). Bereits eine Aufenthaltsdauer im Wartestall von zwei Stunden kann ausreichend sein, damit sich Schweine mit *Salmonella* infizieren können (Hurd et al. 2001). Aufgrund der Tatsache, dass positive Schweine *Salmonella* in den Schlachtbetrieb hineintragen und die Umgebung sowie andere Lieferpartien kontaminieren können (González Santamarina 2019), deuten die eigenen Resultate auf eine Möglichkeit der Kreuzkontamination zwischen den Schlachtschweinen im Wartestall hin.

Diese Ergebnisse sollten dennoch unter Berücksichtigung folgender Aspekte betrachtet werden: Im Wartestall könnten besonders die Länge des zeitlichen Aufenthalts der Schlachttiere und die Reinigungs- und Desinfektionsmethoden einen wesentlichen Einfluss auf die Hautkontamination haben (Delhalle et al. 2008).

### **5.5. Prozessstufe nach dem Betäuben und Entbluten als Risikopunkt**

In der eigenen Schlachtprozessanalyse wurde ein statistisch signifikanter Anstieg der GKZ im Perianalbereich der Schlachttierkörper nach dem Betäuben und Entbluten ermittelt (Fürstenberg et al. 2023). Übereinstimmend damit haben Studien die höchsten GKZ-Werte nach dem Betäuben und Entbluten erhoben (Bolton et al. 2002; Schertenleib et al. 2011; Nastasijevic et al. 2018; Van Ba et al. 2019). Bedingt durch die Betäubung der Schlachtschweine können Fäkalien aus dem Rektum und über den Perianalbereich fließen (Swart et al. 2016) und den Schlachttierkörper kontaminieren. Im weiteren Prozess der eigenen Untersuchung wurden hingegen statistisch signifikante Reduktionen durch die beiden Stufen Brühen und Abflammen festgestellt (Fürstenberg et al. 2023).

Allerdings kann das Fleisch grundsätzlich während der weiteren Schlachtung mit austretendem Magen-Darminhalt in Kontakt kommen und somit das Risiko einer Rekontamination bestehen (Bacon et al. 2000).

### **5.6. Oberflächenkeimzahlen an den Prozessstufen**

Beim Vergleich der GKZ-Ergebnisse über die einzelnen Prozessstufen von Betäubung und Entbluten bis nach der Eviszeration zeigten sich in der eigenen longitudinalen Untersuchung mittels Agarkontakt-Methode vergleichbare Trends, wie sie in anderen europäischen Studien mit Nass-Trocken-Tupfern (Spescha et al. 2006; Zweifel et al. 2007; Schertenleib et al. 2011) bzw. Beprobungsschwämmen (Wheatley et al. 2014) ermittelt wurden.

Allerdings muss bei der Bewertung unter anderem der Einfluss der jeweiligen Sauberkeit der untersuchten Schlachtpartien, der Probenahmestellen, der Anzahl und Größe der beprobten Stellen sowie der individuellen Schlachtprozessstufen berücksichtigt werden.

Darüber hinaus ist es zwingend erforderlich, auch die Art der Verschmutzungen zu berücksichtigen. Grundsätzlich reduzieren die einzelnen Prozessstufen der Schweineschlachtkette die Verunreinigungen auf der Schlachttierkörperoberfläche deutlich (Ellerbroek et al. 2018). Stark anhaftende fäkale Verschmutzungen können jedoch möglicherweise auch nach dem Entborsten auf der Schlachttierkörperoberfläche bestehen bleiben (Ellerbroek et al. 2018). Währenddessen können leicht anhaftende Verunreinigungen

sich schneller auf dem Schlachttierkörper, die Umgebung und das Schlachtequipment verteilen (Gill 2004).

Zweifel et al. (2007) schlussfolgerte auf Grundlage einer Schlachtprozessuntersuchung im Gegensatz zu den eigenen Ergebnissen, dass die Eingangskontamination der Schlachttiere möglicherweise einen Effekt auf die mikrobiologische Beschaffenheit des Fleisches am Ende der Schlachtkette gehabt haben könnte.

Im Allgemeinen konnten mit Hilfe von mikrobiologischen Ergebnissen der Agarkontakt-Methode für den untersuchten Schlachtbetrieb Anhaltspunkte gezeigt werden, wo systemische und individuelle Defizite im Schweineschlachtprozess auftauchen.

## **5.7. Limitationen**

### **5.7.1. Publikation I**

Die Limitation der Agarkontakt-Methode beim Nachweis geringer Oberflächenkeimzahlen untermauerte auch die im Zuge dieser Arbeit durchgeführte longitudinale Untersuchung im Schweineschlachtbetrieb, wo insbesondere am Ende der Schlachtkette einzelne Resultate unterhalb der Nachweisgrenze lagen.

In der Prozessanalyse wurde ausschließlich die Perianalregion der Schweineschlachttierkörper einmalig beprobt. Um die Aussagekraft der Ergebnisse umfassender bewerten zu können, besteht die Möglichkeit, zusätzlich weitere Hautregionen zu beproben und als Poolprobe zu verwenden. Die Verordnung (EG) 2073/2005 gibt die Beprobung von vier Stellen eines jeden Schlachttierkörpers vor (Europäische Kommission 2005). In der Untersuchung von Ghafir und Daube (2008) wurde nachgewiesen, dass die verschiedenen Oberflächenregionen des Schlachttierkörpers unterschiedlich stark kontaminiert sein können.

Entscheidend für die Auswahl der Perianalregion als Beprobungsfläche in diesem Projekt war die Vermutung, dass hier die höchsten Oberflächenkeimzahlen durch den Austritt von Darminhalt aus dem Rektum zu erwarten sind. Jedes Schlachtschwein bzw. jeder Schlachttierkörper wurde einmalig beprobt, da ausschließlich dadurch eine longitudinale Prozesskontrolle mit Wiederholungsbeprobungen realisiert werden konnte und weil eine Probenahme am lebenden Tier mit so wenig Intervention wie möglich verbunden sein sollte.

Des Weiteren konnte in der Methodenvergleichsuntersuchung die Vergleichbarkeit der Resultate nachgewiesen werden, die durch die Beprobung von Flächen mit einer geringen Größe von 20 cm<sup>2</sup> (Nass-Trocken-Tupfverfahren) und 23 cm<sup>2</sup> (Agarkontakt-Methode) ermittelt wurden (Fürstenberg et al. 2024).

### 5.7.2. Publikation II

Innerhalb der Prozessstufen am Ende der Schweineschlachtkette, an denen geringe bakterielle Oberflächenbelastungen angenommen werden (Wheatley et al. 2014; Moura-Alves et al. 2022), liegen die Resultate der Agarkontakt-Methode im Bereich der unteren Nachweisgrenze. Diese Feststellung aus dem Feldversuch und die Ergebnisse unseres experimentellen Versuchs mit niedriger Konzentration der künstlichen Kontamination zeigen die Grenzen der Agarkontakt-Methode für den Nachweis geringer Kontaminationen auf Schlachtierkörperoberflächen auf. Da das Nass-Trocken-Tupfverfahren in der Lage war, GKZ-Werte in allen Proben zu bestimmen, ist das Nass-Trocken-Tupfverfahren zur Bestimmung der GKZ von frisch geschlachteten Schweineschlachtierkörpern mit niedrigen Konzentrationen des zu erwartenden Oberflächenkeimgehalts besser geeignet als die Agarkontakt-Methode (Fürstenberg et al. 2024).

Um einen möglichen Einfluss der Grundkontamination auf der Schweinehaut ausschließen zu können, wäre es darüber hinaus möglich gewesen, die Schweinehaut vor dem Inokulieren zu dekontaminieren.

Die Entscheidung, Schweinhautteilstücke nicht zu dekontaminieren, wurde getroffen, um die realen Bedingungen einer Schlachtierkörperoberfläche abzubilden. Des Weiteren würde durch ein mögliches Dekontaminieren die Haut unter anderem entfettet oder verändert, so dass keine Vergleichbarkeit mehr bestünde.

Auf Grundlage der in dieser Arbeit präsentierten Vorgehensweise kann nicht ausgeschlossen werden, dass an anderen Stellen des Schlachtierkörpers höhere Werte ermittelt werden könnten. Da innerhalb einer Stunde noch keine feste Adhäsion der aufgetragenen Bakterien ausgebildet wird (Fürstenberg-Eden et al. 1979) und die Ergebnisse des experimentellen Versuchs im Bereich der aufgetragenen künstlichen Kontamination lagen, ist anzunehmen, dass im Wesentlichen das Inokulat nachgewiesen wurde.

## 6. ZUSAMMENFASSUNG

Die Bestimmung der aeroben mesophilen Gesamtkeimzahl auf Schlachttierkörpern eignet sich im Speziellen zur Beurteilung der Prozesshygiene am Ende der Schweineschlachtkette. Für diese mikrobiologische Schlachttierkörperuntersuchung stehen verschiedene destruktive und nicht-destruktive Techniken zur Verfügung, welche unterschiedliche Vor- und Nachteile aufweisen. Die Agarkontakt-Methode, bei der der Nähragar für eine quantitative Keimzahlbestimmung homogenisiert wird, basiert auf der Anwendung von Agarkontaktplatten. Die Probenahmetechnik mittels Agarkontaktplatten ist für die Untersuchung von Gegenständen nach DIN EN ISO 18593:2018 genormt und besitzt den entscheidenden Vorteil einer schnellen und praktikabel durchführbaren Beprobung.

Um die Aussagekraft der Ergebnisse der Agarkontakt-Methode für die Anwendung auf Schweineschlachttierkörperoberflächen bewerten zu können, wurde in einer Methodenvergleichsuntersuchung die Agarkontakt-Methode mit dem nach DIN EN ISO 17604:2015-12 genormten Nass-Trocken-Tupfverfahren in Bezug auf den Nachweis der aeroben mesophilen Gesamtkeimzahl verglichen. Dazu wurden beide Methoden in einem experimentellen Ansatz mit inokulierten Schweinehautteilstücken und in einem konventionellen Schlachtbetrieb auf Schweineschlachttierkörpern untersucht.

Es ergab sich für beide Teilversuche eine statistisch signifikante Äquivalenz zwischen den beiden nicht-destruktiven Beprobungsmethoden. Der Feldversuch im Schlachtbetrieb ergab Oberflächenkeimzahlen des Schlachtkörpers, welche vereinzelt an oder unter der minimalen Nachweisgrenze für die Agarkontakt-Methode lagen. Insgesamt war die Ermittlung einer geringen Anzahl an Oberflächenkeimen mit der Agarkontakt-Methode weniger zuverlässig als mit dem Nass-Trocken-Tupfverfahren. Allerdings wurde die Vergleichbarkeit der Ergebnisse beider Methoden bei hohen Oberflächenkeimzahlen ermittelt. Insbesondere ermöglicht diese praktikable und tiergerechte Methode die mikrobiologische Untersuchung von lebenden Schlachtschweinen und Schlachttierkörpern an mehreren Schlachtprozessstufen, ohne den Arbeitsablauf unterbrechen oder die Methode wechseln zu müssen.

Die Agarkontakt-Methode realisierte eine longitudinale Studie in einem industriellen Schlachtbetrieb mit moderner Schlachttechnologie zur Bestimmung der Oberflächenkeimzahl und Salmonellen von Schlachtschweinen, beginnend im Wartestall bis zur Prozessstufe vor der Kühlagerung. Die Untersuchung ergab einen mit zahlreichen Studien vergleichbaren Verlauf der Gesamtkeimzahl über den gesamten Schlachtprozess. Zudem konnten die Berieselung im Wartestall sowie die Betäubung und Entblutung als Stufen mit einem

möglichen Risiko der Kreuzkontamination identifiziert werden. Es konnte gezeigt werden, dass die Agarkontakt-Methode einen wichtigen Beitrag zur Ermittlung von systemischen und individuellen Defiziten im Schweineschlachtprozess und von kontaminierten Schlachtschweinpartien im Rahmen einer zusätzlichen betriebsspezifischen Schlachtprozessanalyse leisten kann. Die mit dieser einfachen Probenahmetechnik erhobenen Gesamtkeimzahlen und Salmonellen auf Schweinehautoberflächen können ein sinnvolles und praktikables Mittel zur ergänzenden Einschätzung und Optimierung der Schlachthygiene sein.

## 7. SUMMARY

### **The suitability of the agar contact method to determine the microbiological status of pig skin and carcass surfaces along the pig slaughter process from the lairage to the stage before chilling**

The determination of the total viable count of aerobic mesophilic bacteria on carcasses is particularly suitable for assessing the process hygiene at the end of the pig slaughter line. Various destructive and non-destructive techniques are available for microbiological carcass examination, which possess different advantages and disadvantages. The agar contact method, in which the culture medium is homogenized for quantitative counting, is based on the use of agar contact plates. Methods using agar contact plates are standardized according to ISO 18593:2018 for testing devices with the decisive advantage of a fast and practicable sampling procedure.

In order to evaluate the representativeness of the results of the agar contact method on pig carcass surfaces, the agar contact method was compared with the wet-dry double swabbing method standardized according to ISO 17604:2015-12 with regard to the detection of the total viable count in a comparative study. For this purpose, both methods were investigated comparatively firstly in an experimental approach on inoculated pig skin pieces and secondly on pig carcasses in a conventional abattoir.

A statistically significant equivalence between the two non-destructive sampling methods was found for both trials. The field trial in the abattoir showed carcass surface bacteria counts that were at or below the minimum limit of detection for the agar contact method. Overall, the recovery rate of a low number of surface bacteria with the agar contact method was less reliable than with the wet-dry double swabbing method. However, for high carcass surface bacteria counts, the comparability of the results of both methods was determined. In particular, this practicable and animal equitable method offers the possibility of sampling live slaughter pigs and realized sampling at various slaughter process stages without interrupting the workflow or changing the method.

The agar contact method enabled a longitudinal study in an abattoir with current slaughter technology for determining the total viable count and *Salmonella* of the slaughter pig surface, starting in the lairage to the stage before chilling. The investigation revealed a trend of the total viable count of the entire slaughter line comparable to various studies. In addition, showering in the lairage pen as well as stunning and bleeding were identified as stages with a potential



risk of cross-contamination. It could be shown that the agar contact method can contribute to the identification of process stages with the potential risk for systemic and individual deficiencies in the pig slaughter process and contaminated pig batches in relation of an additional abattoir specific slaughter process analysis. The total viable count and *Salmonella* isolates from pig skin surfaces recovered by such a simple sampling technique can be a useful and practicable way for evaluating and optimizing the slaughter hygiene.

## 8. LITERATURVERZEICHNIS

Alban L, Stärk K D C (2005):

Where should the Effort be put to Reduce the *Salmonella* Prevalence in the Slaughtered Swine Carcass Effectively?

Prev Vet Med 68: 63-79. DOI: 10.1016/j.prevetmed.2005.01.001.

Anderson M E, Huff H E, Naumann H D, Marshall R T, Damare J, Johnston R, Pratt M (1987):

Evaluation of Swab and Tissue Excision Methods for Recovering Microorganisms from Washed and Sanitized Beef Carcasses.

J Food Prot 50: 741-743. DOI: 10.4315/0362-028X-50.9.741.

Anonymous (2009):

Allgemeine Verwaltungsvorschrift über die Durchführung der amtlichen Überwachung der Einhaltung von Hygienevorschriften für Lebensmittel und zum Verfahren zur Prüfung von Leitlinien für eine gute Verfahrenspraxis (AVV Lebensmittelhygiene - AVV LmH) vom 09. November 2009; zuletzt geändert durch Verwaltungsvorschrift vom 07.07.2022 (BAnz AT 19.07.2022 B2). Abgerufen am 05.01.2024, von [https://www.verwaltungsvorschriften-im-internet.de/bsvwwbund\\_09112009\\_329225270006.htm](https://www.verwaltungsvorschriften-im-internet.de/bsvwwbund_09112009_329225270006.htm)

Anonymous (2023):

QS Qualität und Sicherheit GmbH. Leitfaden Schlachtung/Zerlegung. 2023. Abgerufen am 09.11.2023, von [https://www.q-s.de/services/files/downloadcenter/j-fleischwirtschaft/2023/leitfaeden/deutsch/Leifaden\\_Schlachtung\\_Zerlegung\\_01.01.2023.pdf](https://www.q-s.de/services/files/downloadcenter/j-fleischwirtschaft/2023/leitfaeden/deutsch/Leifaden_Schlachtung_Zerlegung_01.01.2023.pdf).

Arguello H, Carvajal A, Naharro G, Arcos M, Rodicio M R, Martin M C, Rubio P (2013): Sero- and Genotyping of *Salmonella* in Slaughter Pigs, from Farm to Cutting Plant, with a Focus on the Slaughter Process.

Int J Food Microbiol 161: 44-52. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2012.11.013.

Bacon R, Belk K, Sofos J, Clayton R, Reagan J, Smith G (2000):

Microbial Populations on Animal Hides and Beef Carcasses at Different Stages of Slaughter in Plants Employing Multiple-Sequential Interventions for Decontamination.

J Food Prot 63: 1080-1086. DOI: 10.4315/0362-028X-63.8.1080.

Baumgart J (1977):

Überwachung der Betriebshygiene: Empfehlenswerte mikrobiologische Methoden.  
Fleischwirtschaft 57: 978-985.

Baumgart J, Kussmann H (1975):

A Spray Method for Determining the Surface Bacterial Content of Animals for Slaughter.  
Fleischwirtschaft 55: 1113-1114.

Biasino W, De Zutter L, Woollard J, Mattheus W, Bertrand S, Uyttendaele M,  
Van Damme I (2018):

Reduced Contamination of Pig Carcasses using an Alternative Pluck Set Removal  
Procedure during Slaughter.  
Meat Sci 145: 23-30. DOI: 10.1016/j.meatsci.2018.05.019.

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: 174-182. DOI: 10.1016/j.foodcont.2013.08.018.

Blagojevic B, Nesbakken T, Alvseike O, Vågsholm I, Antic D, Johler S, Houf K, Meemken D,  
Nastasijevic I, Vieira Pinto M, Antunovic B, Georgiev M, Alban L (2021):

Drivers, Opportunities, and Challenges of the European Risk-Based Meat Safety Assurance  
System.  
Food Control 124. DOI: 10.1016/j.foodcont.2021.107870.

Bolton D J (2003):

The EC Decision of the 8th June 2001 (EC/471/2001): Excision versus Swabbing.  
Food Control 14: 207-209. DOI: 10.1016/s0956-7135(02)00093-2.

Bolton D J, Pearce R A, Sheridan J J, Blair I S, McDowell D A, Harrington D (2002):

Washing and Chilling as Critical Control Points in Pork Slaughter Hazard Analysis and  
Critical Control Point (HACCP) Systems.  
J Appl Microbiol 92: 893-902. DOI: 10.1046/j.1365-2672.2002.01599.x.

Bond R, Collin N S, Lloyd D H (2008):

Use of Contact Plates for the Quantitative Culture of *Malassezia Pachydermatis* from Canine Skin.

J Small Anim Pract 35: 68-72. DOI: 10.1111/j.1748-5827.1994.tb02536.x.

Bryant J, Brereton D A, Gill C O (2003):

Implementation of a Validated HACCP System for the Control of Microbiological Contamination of Pig Carcasses at a Small Abattoir.

Can Vet J 44: 51-55.

BVL (2020):

Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (BVL). BVL-Report 16.1 Berichte zur Lebensmittelsicherheit, Zoonosen-Monitoring 2020, BVL. 2020. Abgerufen am 04.01.2024, von [https://www.bvl.bund.de/SharedDocs/Downloads/01\\_Lebensmittel/04\\_Zoonosen\\_Monitoring/Zoonosen\\_Monitoring\\_Bericht\\_2020.pdf?\\_\\_blob=publicationFile&v=7](https://www.bvl.bund.de/SharedDocs/Downloads/01_Lebensmittel/04_Zoonosen_Monitoring/Zoonosen_Monitoring_Bericht_2020.pdf?__blob=publicationFile&v=7).

BVL (2021):

Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (BVL). BVL-Report 17.3 Berichte zur Lebensmittelsicherheit, Zoonosen-Monitoring 2021. BVL. 2021. Abgerufen am 04.01.2024, von [https://www.bvl.bund.de/SharedDocs/Downloads/01\\_Lebensmittel/04\\_Zoonosen\\_Monitoring/Zoonosen\\_Monitoring\\_Bericht\\_2021.pdf;jsessionid=206E17419CBEAF1682198325DC67A4AB.internet002?\\_\\_blob=publicationFile&v=5](https://www.bvl.bund.de/SharedDocs/Downloads/01_Lebensmittel/04_Zoonosen_Monitoring/Zoonosen_Monitoring_Bericht_2021.pdf;jsessionid=206E17419CBEAF1682198325DC67A4AB.internet002?__blob=publicationFile&v=5).

BVL (2022):

Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (BVL). BVL-Report 18.3 Berichte zur Lebensmittelsicherheit, Zoonosen-Monitoring 2022, BVL. 2022. Abgerufen am 04.01.2024, von [https://www.bvl.bund.de/SharedDocs/Downloads/01\\_Lebensmittel/04\\_Zoonosen\\_Monitoring/Zoonosen\\_Monitoring\\_Bericht\\_2022.pdf?\\_\\_blob=publicationFile&v=2](https://www.bvl.bund.de/SharedDocs/Downloads/01_Lebensmittel/04_Zoonosen_Monitoring/Zoonosen_Monitoring_Bericht_2022.pdf?__blob=publicationFile&v=2)

Capita R, Prieto M, Alonso-Calleja C (2004):

Sampling Methods for Microbiological Analysis of Red Meat and Poultry Carcasses.

J Food Prot 67: 1303-1308. DOI: 10.4315/0362-028x-67.6.1303.

Casaburi A, Piombino P, Nychas G J, Villani F, Ercolini D (2015):

Bacterial Populations and the Volatilome Associated to Meat Spoilage.

Food Microbiol 45: 83-102. DOI: 10.1016/j.fm.2014.02.002.

Casanova-Higes A, Andres-Barranco S, Mainar-Jaime R C (2017):

Influence of On-farm Pig *Salmonella* Status on *Salmonella* Shedding at Slaughter.

Zoonoses Public Hlth 64: 328-336. DOI: 10.1111/zph.12301.

Cavana P, Petit J Y, Perrot S, Guechi R, Marignac G, Reynaud K, Guillot J (2015):

Efficacy of a 2% Climbazole Shampoo for Reducing *Malassezia* Population Sizes on the Skin of Naturally Infected Dogs.

J Mycol Med 25: 268-273. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.mycmed.2015.10.004>.

Cê E R, Giombelli A, Kich J D, Moresco K S, Miranda A, Pedrao M R, Johann G,

Badaro A C L, Hashimoto E H, Machado-Lunkes A (2023):

Monitoring of Pig Slaughter Stages and Correlation in the Prevalence of Pathogens and Levels of Microorganisms That Indicate Microbiological Quality and Hygiene Using a Predictive Model.

J Food Prot 86: 100034. DOI: 10.1016/j.jfp.2022.100034.

Cordray J C, Huffman D L (1985):

Comparison of Three Methods for Estimating Surface Bacteria on Pork Carcasses.

J Food Prot 48: 582-584. DOI: 10.4315/0362-028x-48.7.582.

Dainty R H, Edwards R A, Hibbard C M (1985):

Time Course of Volatile Compound Formation during Refrigerated Storage of Naturally Contaminated Beef in Air.

J Appl Bacteriol 59: 303-309. DOI: 10.1111/j.1365-2672.1985.tb03324.x.

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, eds R. L. Singh, and S. Mondal (2019): 145-168.

Cambridge: Elsevier Academic Press – ISBN: 978-0-12-816333-7. DOI: 10.1016/B978-0-12-816333-7.00006-0

De Busser E V, De Zutter L, Dewulf J, Houf K, Maes D (2013):

*Salmonella* Control in live Pigs and at Slaughter.

Vet J 196: 20-27. DOI: 10.1016/j.tvjl.2013.01.002.

Delhalle L, De Sadeleer L, Bollaerts K, Farnir F, Saegerman C, Korsak N, Dewulf J, De Zutter L, Daube G (2008):

Risk Factors for *Salmonella* and Hygiene Indicators in the 10 largest Belgian Pig Slaughterhouses.

J Food Prot 71: 1320-1329. DOI: 10.4315/0362-028x-71.7.1320.

Di Ciccio P, Ossiprandi M C, Zanardi E, Ghidini S, Belluzzi G, Vergara A, Ianieri A (2016): Microbiological Contamination in Three Large-Scale Pig Slaughterhouses in Northern Italy.

Ital J Food Saf 5: 6151. DOI: 10.4081/ijfs.2016.6151.

Dias M R, Dianin K C S, Bersot L S, Nero L A (2017):

Self-Monitoring Microbiological Criteria for the Assessment of Hygienic Procedures During Chicken Slaughtering.

Braz J Poult Sci 19: 317-324. DOI: 10.1590/1806-9061-2016-0381.

EFSA (2007):

Opinion of the Scientific Panel on biological hazards (BIOHAZ) on microbiological criteria and targets based on risk analysis.

EFSA J 5: 462. DOI: 10.2903/j.efsa.2007.462.

EFSA (2020):

Welfare of Pigs at Slaughter, EFSA Panel on Animal Health and Welfare (AHAW).

EFSA J 18: 113. DOI: 10.2903/j.efsa.2020.6148.

EFSA und ECDC (2022):

European Food Safety Authority (EFSA), European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). The European Union One Health 2021 Zoonoses Report.

EFSA J 20: e07666. DOI: 10.2903/j.efsa.2022.7666.

EFSA und ECDC (2023):

European Food Safety Authority (EFSA), European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). The European Union One Health 2022 Zoonoses Report.

EFSA J 21: e8442. DOI: 10.2903/j.efsa.2023.8442.

Ellerbroek L, Pudollek H P, Haneke M, Dusinski A, Stank A, Oetjen M, Freter S, Langkabel N (2018):

Zur Bedeutung der Sauberkeit von Tieren für die Schlachthygiene.

Amtstierärztlicher Dienst und Lebensmittelkontrolle 25: 10-19.

Europäisches Parlament, Rat der Europäischen Union (2002):

Verordnung (EG) Nr. 178/2002 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 28. Januar 2002 zur Festlegung der allgemeinen Grundsätze und Anforderungen des Lebensmittelrechts, zur Errichtung der Europäischen Behörde für Lebensmittelsicherheit und zur Festlegung von Verfahren zur Lebensmittelsicherheit.

ABl. L 31 vom 01.02.2002: 1–24. Abgerufen am 08.12.2023, von <http://data.europa.eu/eli/reg/2002/178/oj>.

Europäisches Parlament, Rat der Europäischen Union (2004a):

Verordnung (EG) Nr. 852/2004 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 29. April 2004 über Lebensmittelhygiene.

ABl. L 139 vom 30.04.2004: 1–54. Abgerufen am 08.12.2023, von <http://data.europa.eu/eli/reg/2004/852/oj>.

Europäisches Parlament, Rat der Europäischen Union (2004b):

Verordnung (EG) Nr. 853/2004 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 29. April 2004 mit spezifischen Hygienevorschriften für Lebensmittel tierischen Ursprungs.

ABl. L 139 vom 30.04.2004: 55–205. Abgerufen am 08.12.2023, von <http://data.europa.eu/eli/reg/2004/853/oj>.

Europäische Kommission (2005):

Verordnung (EG) Nr. 2073/2005 der Kommission vom 15. November 2005 über mikrobiologische Kriterien für Lebensmittel.

ABl. L 338 vom 22.12.2005: 1–26. Abgerufen am 07.12.2023, von <http://data.europa.eu/eli/reg/2005/2073/oj>.

Europäisches Parlament, Rat der Europäischen Union (2017):

Verordnung (EU) 2017/625 des Europäischen Parlaments und des Rates über amtliche Kontrollen und andere amtliche Tätigkeiten zur Gewährleistung der Anwendung des Lebens- und Futtermittelrechts und der Vorschriften über Tiergesundheit und Tierschutz, Pflanzengesundheit und Pflanzenschutzmittel.

ABl. L 95 vom 07.04.2017: 1–142. Abgerufen am 13.02.2024, von <http://data.europa.eu/eli/reg/2017/625/oj>.

Europäische Kommission (2019):

Durchführungsverordnung (EU) 2019/627 der Kommission vom 15. März 2019 zur Festlegung einheitlicher praktischer Modalitäten für die Durchführung der amtlichen Kontrollen in Bezug auf für den menschlichen Verzehr bestimmte Erzeugnisse tierischen Ursprungs gemäß der Verordnung (EU) 2017/625 des Europäischen Parlaments und des Rates und zur Änderung der Verordnung (EG) Nr. 2074/2005 der Kommission in Bezug auf amtliche Kontrollen.

ABl. L 131 vom 17.05.2019: 51–100. Abgerufen am 13.02.2024, von [http://data.europa.eu/eli/reg\\_impl/2019/627/oj](http://data.europa.eu/eli/reg_impl/2019/627/oj).

Evangelopoulou G, Kritas S, Govaris A, Burriel A R (2014):

Pork Meat as a Potential Source of *Salmonella enterica* subsp. *arizonae* Infection in Humans.

J Clin Microbiol 52: 741-744. DOI: 10.1128/JCM.02933-13.

Firstenberg-Eden R, Notermans S, Thiel F, Henstra S, Kampelmacher E H (1979):

Electron Microscopic Investigations into Attachment of Bacteria to Teats of Cows.

J Food Prot 42: 305-309. DOI: 10.4315/0362-028x-42.4.305.

Fliss I, Simard R, Etriki A (1991):

Comparison of Three Sampling Techniques for Microbiological Analysis of Meat Surfaces.

J Food Sci 56: 249-250.

Fürstenberg R, Langkabel N, Grosse-Kleimann J, Kreienbrock L, Meemken D (2023):

Agar Contact Method as a Valuable Tool to Identify Slaughter Hygiene Deficiencies along the Slaughter Process by Longitudinally Sampling Pig Skin Surfaces.

Microorganisms 11: 15. DOI: 10.3390/microorganisms11102512.



Fürstenberg R, Meemken D, Langforth S, Grosse-Kleimann J, Kreienbrock L, Langkabel N (2024):

Comparison of the Agar Contact Method and the Wet-Dry Double Swabbing Method for Determining the Total Viable Bacterial Count on Pig Carcass Surfaces.

J Consum Prot Food Saf 19: 41-48. DOI: 10.1007/s00003-023-01473-6.

Gallina S, Bianchi D M, Ru G, Maurella C, Barzanti P, Baioni E, Virgilio S, Mioni R, Lanni L, Migliazzo A, Losio M N, Bove D, Scuota S, Goffredo E, Decastelli L (2015):

Microbiological Recovery from Bovine, Swine, Equine, and Ovine Carcasses: Comparison of Excision, Sponge and Swab Sampling Methods.

Food Control 50: 919-924. DOI: 10.1016/j.foodcont.2014.10.052.

Ghafir Y, Daube G (2008):

Comparison of Swabbing and Destructive Methods for Microbiological Pig Carcass Sampling.

Lett Appl Microbiol 47: 322-326. DOI: 10.1111/j.1472-765X.2008.02433.x.

Gill C O (2004):

Visible Contamination on Animals and Carcasses and the Microbiological Condition of Meat.

J Food Prot 67: 413-419. DOI: 10.4315/0362-028x-67.2.413.

Gill C O, Badoni M, McGinnis J C (2001):

Microbiological Sampling of Meat Cuts and Manufacturing Beef by Excision or Swabbing.

J Food Prot 64: 325-334. DOI: 10.4315/0362-028x-64.3.325.

Giske W, Klemm G (1963):

Bacterial Content of the Skin of Meat Hogs as Affected by Various Scalding Methods.

Fleischwirtschaft 15: 288-292.

Globisch H, Wilkens S, Jacob A, Thien J (1996):

Anwendbarkeit von Abklatschverfahren für die Untersuchung von Oberflächenkeimgehalten bei Schlachtierkörpern: Vergleichende Bestimmung der aeroben mesophilen Gesamtkeimzahl mittels Abklatschtechnik und destruktiver Probenahmetechnik.

Fleischwirtschaft 76: 1116-1118.

González Santamarina B (2019):

*Salmonella* carried over by Pigs during Transport and Lairage.

Dissertation, Berlin: Freie Universität Berlin. DOI: 10.17169/refubium-2215.

Gram L, Ravn L, Rasch M, Bruhn J B, Christensen A B, Givskov M (2002):

Food Spoilage—Interactions between Food Spoilage Bacteria.

Int J Food Microbiol 78: 79-97. DOI: 10.1016/s0168-1605(02)00233-7.

Hernandez M, Gomez-Laguna J, Luque I, Herrera-Leon S, Maldonado A, Reguillo L, Astorga R J (2013):

*Salmonella* Prevalence and Characterization in a free-range Pig Processing Plant: Tracking in Trucks, Lairage, Slaughter Line and Quartering.

Int J Food Microbiol 162: 48-54. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2012.12.026.

Hurd H S, Gailey J K, McKean J D, Rostagno M H (2001):

Rapid Infection in Market-Weight Swine following Exposure to a *Salmonella* Typhimurium-contaminated Environment.

Am J Vet Res 62: 1194-1197. DOI: 10.2460/ajvr.2001.62.1194.

Hurd H S, McKean J D, Griffith R W, Wesley I V, Rostagno M H (2002):

*Salmonella enterica* Infections in Market Swine with and without Transport and Holding.

Appl Environ Microbiol 68: 2376–2381. DOI: 10.1128/AEM.68.5.2376-2381.2002.

ISO 17604:2015-12 (2015):

Microbiology of the Food Chain - Carcass Sampling for Microbiological Analysis.

International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.

DOI: 10.31030/2305385.

ISO 18593:2018 (2018):

Microbiology of the Food Chain –Horizontal Methods for Surface Sampling.

International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.

DOI: 10.31030/2833890.

Kakouri A, Nychas G J (1994):

Storage of Poultry Meat under modified Atmospheres or Vacuum Packs: Possible Role of Microbial Metabolites as Indicator of Spoilage.

J Appl Bacteriol 76: 163-172. DOI: 10.1111/j.1365-2672.1994.tb01612.x.

Kleiner U, Hilgert S (2004a):

Conversion of the Decision 2001/471/EC: Comparison of the Destructive and Non-Destructive Sampling Techniques for Microbiological Control of Meat Surfaces –

1. Swine Carcase.

Fleischwirtschaft 84: 101-104.

Kleiner U, Hilgert S (2004b):

Conversion of the Decision 2001/471/EC: Comparison of the Destructive and Non-Destructive Sampling Techniques for Microbiological Control of Meat Surfaces –

2. Sections of Swine.

Fleischwirtschaft 84: 146-149.

Kusch D (1977):

Ein Beitrag zur Hygienekontrolle in fleischverarbeitenden Betrieben.

J Food Saf Food Qual 28: 68-71.

Lambert A D, Smith J P, Dodds K L (1991):

Shelf-Life Extension and Microbiological Safety of Fresh Meat - a Review.

Food Microbiology 8: 267-297. DOI: 10.1016/S0740-0020(05)80002-4.

Laukkanen-Ninios R, Ghidini S, Gómez Laguna J, Langkabel N, Santos S, Maurer P, Meemken D, Alban L, Alvseike O, Vieira-Pinto M (2022):

Additional post-mortem Inspection Procedures and Laboratory Methods as Supplements for Visual Meat Inspection of Finishing Pigs in Europe—Use and Variability.

J Consum Prot Food Saf 17: 363-375. DOI: 10.1007/s00003-022-01391-z.

Louwers J, Klein G (1994):

Suitability of Sampling Methods for the Investigation of the Environment in EC-Licensed Meat Rendering and Processing Plants.

Berl Muench Tieraerztl Wochenschr 107: 367-373.

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. DOI: 10.1016/j.foodcont.2014.02.041.

Moura-Alves M, Carvalho M, Baggio Ribeiro D H, Barbosa J, Silveira L, Pista A, Pinto H P, Saraiva C, Teixeira P, Esteves A (2022):

Hygiene Indicators and Salmonellae on Surfaces of Swine Carcasses from two Slaughterhouses in Northern Portugal.

J Food Prot 85: 1566-1575. DOI: 10.4315/JFP-21-312.

Mrdovic B, Raseta M, Brankovic-Lazic I, Milijasevic M, Baltic B, Nastasijevic I (2017):

Pigs and Cattle Slaughter Process Hygiene in a Large-Scale and Small-Scale Abattoir: A Report from one County in Serbia.

Meat Technology 58: 65-72.

Nastasijevic I, Lakicevic B, Raseta M, Djordjevic V, Jankovic V, Mrdovic B, Brankovic-Lazic I (2018):

Evaluation of Pig Welfare in Lairage and Process Hygiene in a Single Abattoir.

Meat Technology 59: 8-22. DOI: 10.18485/meattech.2018.59.1.2.

Nauta M, Barfod K, Hald T, Sorensen A H, Emborg H D, Aabo S (2013):

Prediction of *Salmonella* Carcass Contamination by a Comparative Quantitative Analysis of *E. coli* and *Salmonella* during Pig Slaughter.

Int J Food Microbiol 166: 231-237. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2013.07.014.

Niskanen A, Pohja M S (1977):

Comparative Studies on the Sampling and Investigation of Microbial Contamination of Surfaces by the Contact Plate and Swab Methods.

J Appl Bacteriol 42: 53-63. DOI: 10.1111/j.1365-2672.1977.tb00669.x.

Nørrung B, Buncic S (2008):

Microbial Safety of Meat in the European Union.

Meat Sci 78: 14-24. DOI: 10.1016/j.meatsci.2007.07.032.

Nortje G L, Swanepoel E, Naude R T, Holzapfel W H, Steyn P L (1982):

Evaluation of Three Carcass Surface Microbial Sampling Techniques.

J Food Prot 45: 1016-1017. DOI: 10.4315/0362-028X-45.11.1016.

Notermans S, Dormans J, Mead G (1991):

Contribution of Surface Attachment to the Establishment of Micro-Organisms in Food Processing Plants: A Review.

Biofouling 5: 21-36. DOI: 10.1080/08927019109378226.

Nychas G J, Skandamis P N, Tassou C C, Koutsoumanis K P (2008):

Meat Spoilage during Distribution.

Meat Sci 78: 77-89. DOI: 10.1016/j.meatsci.2007.06.020.

Oberhäuser K (2005):

Comparison of pour upon method and wet-dabbing method to judge the disinfecting qualities of building materials.

Dissertation, Berlin: Freie Universität Berlin. DOI: 10.17169/refubium-13050

Otten K (2005):

Praktische Umsetzung der Entscheidung 2001/471/EG zur Hygienekontrolle in einem mittelständischen Direktvermarkterbetrieb.

Dissertation, Gießen: Justus-Liebig-Universität Gießen.

Pearce R, Bolton D J (2005):

Excision vs Sponge Swabbing—a Comparison of Methods for the Microbiological Sampling of Beef, Pork and Lamb Carcasses.

J Appl Microbiol 98: 896-900. DOI: 10.1111/j.1365-2672.2004.02525.x.

Pearce R A, Bolton D J, Sheridan J J, McDowell D A, Blair I S, Harrington D (2004):

Studies to Determine the Critical Control Points in Pork Slaughter Hazard Analysis and Critical Control Point Systems.

Int J Food Microbiol 90: 331-339. DOI: 10.1016/s0168-1605(03)00333-7.

Petruzzelli A, Osimani A, Pasquini M, Clementi F, Vetrano V, Paolini F, Foglini M, Micci E, Paoloni A, Tonucci F (2016):

Trends in the Microbial Contamination of Bovine, Ovine and Swine Carcasses in Three Small-Scale Abattoirs in Central Italy: A Four-Year Monitoring.

Meat Sci 111: 53-59. DOI: 10.1016/j.meatsci.2015.08.016.

Pless P, Pletz H (1995):

Zur Aussagekraft von Abklatschuntersuchungen bei der Bestimmung des Oberflächenkeimgehalts von Schlachttierkörpern und sanierten Oberflächen.

In: Proceedings 36. Arbeitstagung Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft e.V. (DVG), Arbeitsgebiet Lebensmittelhygiene, Garmisch-Partenkirchen, Tagungsbericht Teil 1: 63-67. Eigenverlag der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft, Gießen

Rivas T, Vizcaino J A, Herrera F J (2000):

Microbial Contamination of Carcasses and Equipment from an Iberian Pig Slaughterhouse. J Food Prot 63: 1670-1675. DOI: 10.4315/0362-028x-63.12.1670.

Schertenleib T I, Stephan R, Scheeder M, Zweifel C (2011):

Visual and Microbiological Process Analysis of Pig Slaughtering in a Small-Scale Abattoir. J Food Saf Food Qual 62: 52-57. DOI: 10.2376/0003-925x-62-52.

Schulze G (2000):

The Representativeness of RODAC Technique.  
Dissertation, Berlin: Freie Universität Berlin.

Schulze G, Hildebrandt G (1994):

Untersuchungen zur Repräsentanz der RODAC-Abklatschtechnik.

In: Proceedings 35. Arbeitstagung Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft e.V. (DVG), Arbeitsgebiet Lebensmittelhygiene, Garmisch-Partenkirchen Tagungsbericht Teil 1: 178-188. Eigenverlag der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft, Gießen

Sibomana G (1980):

Vergleichende Untersuchungen über die Brauchbarkeit von Probenentnahmeverfahren zur Oberflächenkeimzahlbestimmung bei Schlachttierkörpern.

Dissertation, Berlin: Freie Universität Berlin.

Simonsen B, Bryan F L, Christian J H B, Roberts T A, Tompkin R B, Silliker J H (1987):

Prevention and Control of Food-borne Salmonellosis through Application of Hazard Analysis Critical Control Point (HACCP).

Int J Food Microbiol 4: 227-247. DOI: 10.1016/0168-1605(87)90040-7.

Snijders J M A, Janssen M H W, Gerats G E, Corstiaensen G P (1984):  
A Comparative-Study of Sampling Techniques for Monitoring Carcass Contamination.  
Int J Food Microbiol 1: 229-236. DOI: Doi 10.1016/0168-1605(84)90019-9.

Spescha C, Stephan R, Zweifel C (2006):  
Microbiological Contamination of Pig Carcasses at Different Stages of Slaughter in Two  
European Union-Approved Abattoirs.  
J Food Prot 69: 2568-2575. DOI: 10.4315/0362-028x-69.11.2568.

Sui L, Yi Z, Xiao X, Ma J, Huang H, Xu C, Wang W, Qu X (2023):  
Investigation of Microbial Communities across Swine Slaughter Stages and Disinfection  
Efficacy Assessment in a Pig Slaughterhouse.  
LWT 187: 115334. DOI: 10.1016/j.lwt.2023.115334.

Swart A N, Evers E G, Simons R L, Swanenburg M (2016):  
Modeling of *Salmonella* Contamination in the Pig Slaughterhouse.  
Risk Anal 36: 498-515. DOI: 10.1111/risa.12514.

Ten Cate L (1965):  
A Note on a Simple and Rapid Method of Bacteriological Sampling by Means of Agar  
Sausages.  
J Appl Bacteriol 28: 221-223. DOI: 10.1111/j.1365-2672.1965.tb02146.x.

Tenhagen B A, Arth O, Bandick N, Fetsch A (2011):  
Comparison of Three Sampling Methods for the Quantification of Methicillin-resistant  
Staphylococcus aureus on the Surface of Pig Carcasses.  
Food Control 22: 643-645. DOI: 10.1016/j.foodcont.2010.09.035.

Tierschutz-Schlachtverordnung (2012):  
Verordnung zum Schutz von Tieren im Zusammenhang mit der Schlachtung oder Tötung  
und zur Durchführung der Verordnung (EG) Nr. 1099/2009 des Rates (Tierschutz-  
Schlachtverordnung - TierSchIV). Abgerufen am 10.02.2024, von [https://www.gesetze-im-internet.de/tierschlv\\_2013/](https://www.gesetze-im-internet.de/tierschlv_2013/)

Trautsch M (2003):

Suitability of a New Rapid Test for Checking Surface Cleanliness within the Scope of Self Performed Tests in Food Processing Industries.

Dissertation, München: Ludwig-Maximilians-Universität München.

Van Ba H, Seo H W, Seong P N, Kang S M, Cho S H, Kim Y S, Park B Y, Moon S S, Kang S J, Choi Y M, Kim J H (2019):

The Fates of Microbial Populations on Pig Carcasses during Slaughtering Process, on Retail Cuts after Slaughter, and Intervention Efficiency of Lactic Acid Spraying.

Int J Food Microbiol 294: 10-17. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2019.01.015.

Van Putten G, Corstiaensen G P, Van Logtestijn J G, Zuidhof S (1983):

Showering Pigs Intended for Slaughter, 1: A Prospective Study of the Preference of Pigs Intended for Slaughter for Showering following Transport and the Effects on Carcass Quality.

Tijdschrift voor Diergeneeskunde 108: 645-652.

Viltrop A, Niine T, Tobias T, Sassu E L, Bartolo I D, Pavoni E, Alborali G L, Burow E, Smith R P (2023):

A Review of Slaughter Practices and Their Effectiveness to Control Microbial - esp. *Salmonella* spp. - Contamination of Pig Carcasses.

J Food Prot 86: 100171. DOI: 10.1016/j.jfp.2023.100171.

Walia K, Lynch H, Grant J, Duffy G, Leonard F C, Lawlor P G, Gardiner G E (2017):

The Efficacy of Disinfectant Misting in the Lairage of a Pig Abattoir to Reduce *Salmonella* and *Enterobacteriaceae* on Pigs Prior to Slaughter.

Food Control 75: 55-61. DOI: 10.1016/j.foodcont.2016.12.028.

Warriss P D (2003):

Optimal Lairage Times and Conditions for Slaughter Pigs: A Review.

Vet Rec 153: 170-176. DOI: 10.1136/vr.153.6.170.

Weeding C, Guise H, Penny R (1993):

Factors Influencing the Welfare and Carcass and Meat Quality of Pigs: The Use of Water Sprays in Lairage.

Anim Prod 56: 393-397.



Wheatley P, Giotis E S, McKeivitt A I (2014):

Effects of Slaughtering Operations on Carcass Contamination in an Irish Pork Production Plant.

Ir Vet J 67: 1-6. DOI: 10.1186/2046-0481-67-1.

Yu S L, Bolton D, Laubach C, Kline P, Oser A, Palumbo S A (1999):

Effect of Dehairing Operations on Microbiological Quality of Swine Carcasses.

J Food Prot 62: 1478-1481. DOI: 10.4315/0362-028x-62.12.1478.

Zdolec N, Kotsiri A, Houf K, Alvarez-Ordenez A, Blagojevic B, Karabasil N, Salines M, Antic D (2022):

Systematic Review and Meta-Analysis of the Efficacy of Interventions Applied during Primary Processing to Reduce Microbial Contamination on Pig Carcasses.

Foods 11: 2110. DOI: 10.3390/foods11142110.

Zweifel C, Baltzer D, Stephan R (2005):

Microbiological Contamination of Cattle and Pig Carcasses at Five Abattoirs Determined by Swab Sampling in Accordance with EU Decision 2001/471/EC.

Meat Sci 69: 559-566. DOI: 10.1016/j.meatsci.2004.10.007.

Zweifel C, Fischer R, Stephan R (2008):

Microbiological Contamination of Pig and Cattle Carcasses in Different Small-Scale Swiss Abattoirs.

Meat Sci 78: 225-231. DOI: 10.1016/j.meatsci.2007.06.025.

Zweifel C, Spescha C, Stephan R (2007):

Process Stages in Pig Slaughter: Influence on the Microbiological Contamination of Carcasses in Two Abattoirs.

Arch Lebensm hyg 58: 7-12. DOI: 10.2377/0003-925x-58-7.

Zweifel C, Stephan R (2003a):

Microbiological Monitoring of Sheep Carcass Contamination in Three Swiss Abattoirs.

J Food Prot 66: 946-952. DOI: 10.4315/0362-028x-66.6.946.

Zweifel C, Stephan R (2003b):

Mikrobiologische Monitoringuntersuchungen von Schlachttierkörpern im Rahmen der Selbstkontrolle: Informationsgehalt und Aussagekraft verschiedener Auswertungsmodelle.

Fleischwirtschaft 83: 88-92.

## PUBLIKATIONSVERZEICHNIS

### Veröffentlichte wissenschaftliche Artikel mit Peer-Review Verfahren und alleiniger Erstautorenschaft

- I. Roland Fürstenberg, Diana Meemken, Susann Langforth, Julia Große-Kleimann, Lothar Kreienbrock und Nina Langkabel (2024)  
**Comparison of the agar contact method and the wet-dry double swabbing method for determining the total viable bacterial count on pig carcass surfaces**  
*Journal of Consumer Protection and Food Safety* (2024), 19: 41-48, akzeptiert am 16.11.2023, publiziert am 06.12.2023 (online)  
DOI: 10.1007/s00003-023-01473-6
  
- II. Roland Fürstenberg, Nina Langkabel, Julia Große-Kleimann, Lothar Kreienbrock und Diana Meemken (2023)  
**Agar Contact Method as a Valuable Tool to Identify Slaughter Hygiene Deficiencies along the Slaughter Process by Longitudinally Sampling Pig Skin Surfaces**  
*Microorganisms* (2023), 11(10), 2512, akzeptiert am 06.10.2023, publiziert am 08.10.2023 (online)  
DOI: 10.3390/microorganisms11102512

## Vorträge (als Vortragender)

Roland Fürstenberg, Nina Langkabel, Susann Langforth, Corinna Heucke,  
Lothar Kreienbrock, Diana Meemken (2022)

### **Longitudinale Untersuchungen zur aeroben mesophilen Gesamtkeimzahl im Schweineschlachtprozess mittels Abklatschverfahren.**

*22. Fachtagung für Fleisch- und Geflügelfleischhygiene (online)*

01.03.2022 - 02.03.2022, Berlin

In: 22. Fachtagung für Fleisch- und Geflügelfleischhygiene, Abstracts - Institut für  
Lebensmittelsicherheit und -hygiene, Arbeitsgruppe Fleischhygiene, Dr. Nina Langkabel;  
Bundesinstitut für Risikobewertung, Dr. Frederic Müller (Hrsg.)

Berlin: BfR Abstracts, S. 13 – 15

ISBN: 978-3-00-070935-7

Roland Fürstenberg, Nina Langkabel, Susann Langforth, Lothar Kreienbrock,  
Diana Meemken (2022)

### **Vergleichsuntersuchungen zum Agar-Abklatschverfahren und Nass-Trockentupfverfahren zur Ermittlung der aeroben mesophilen Gesamtkeimzahl auf Tierkörperoberflächen beim Schlachtschwein.**

*62. Arbeitstagung des Arbeitsgebietes Lebensmittelsicherheit und Verbraucherschutz 2022*

25.10.2022 - 28.10.2022, Garmisch-Partenkirchen

In: Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft e.V., DVG Arbeitsgebiet  
Lebensmittelsicherheit und Verbraucherschutz (Hrsg.) (1. Aufl.)

Verlag der DVG Service GmbH, Gießen; S. 123 – 126

ISBN: 978-3-86345-629-0

Roland Fürstenberg, Nina Langkabel, Susann Langforth, Julia Große-Kleimann,  
Lothar Kreienbrock, Diana Meemken (2023)

### **Einfluss unterschiedlicher Berieselungsszenarien auf den Oberflächenkeimgehalt von Mastschweinen im Wartestall.**

*23. Fachtagung für Fleisch- und Geflügelfleischhygiene*

28.02.2023 - 01.03.2023, Berlin

In: 23. Fachtagung für Fleisch- und Geflügelfleischhygiene – Abstracts - Institut für  
Lebensmittelsicherheit und -hygiene, Arbeitsgruppe Fleischhygiene, Dr. Nina Langkabel  
(Hrsg.)

Berlin: BfR Abstracts, S. 41 – 43

ISBN: 978-3-00-074045-9

Roland Fürstenberg, Diana Meemken, Susann Langforth, Julia Große-Kleimann,  
Lothar Kreienbrock, Nina Langkabel (2023)

**Longitudinal studies of total viable counts on pig skin surface along the slaughter process by using a modified agar contact method.**

*SafePork 2023: The 14th International Symposium on the Epidemiology and Control of Biological, Chemical and Physical Hazards in Pigs and Pork, Animal Health and Welfare Impacts on Pork Safety*

15.05.2023 - 17.05.2023, New Orleans, Louisiana, United States

In: SafePork Conference Proceedings - published by Iowa State University Digital Press (Hrsg.)

Iowa State University Library, Ames, IA, USA, Article 16356

Online Abstract: <https://www.iastatedigitalpress.com/safepork/article/id/16356/>

**Vorträge (als Mitwirkender/Co-Autor)**

Nina Langkabel, Roland Fürstenberg, Susann Langforth, Julia Große-Kleimann,  
Corinna Heucke, Lothar Kreienbrock, Diana Meemken (2023)

**Mögliche Interventionsmaßnahmen zur Verbesserung der Schlachthygiene beim Schwein vom Wartestall bis zur Kühlung.**

*63. Arbeitstagung des Arbeitsgebietes Lebensmittelsicherheit und Verbraucherschutz 2023*

26.09.2023 - 29.09.2023, Garmisch-Partenkirchen

In: 63. Arbeitstagung des Arbeitsgebietes Lebensmittelsicherheit und Verbraucherschutz – Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft (Hrsg.) (1. Aufl.)

Verlag der DVG Service GmbH, Gießen, S. 94 – 97

ISBN: 978-3-86345-685-6

Diana Meemken, Roland Fürstenberg, Celine Buder, Susann Langforth, Corinna Heucke,  
Julia Große-Kleimann, Lothar Kreienbrock, Nina Langkabel (2024)

**Vom Wartestall bis zur Kühlung: Optimierung der Schlachthygiene beim Schwein.**

*12. Leipziger Tierärztekongress*

18.01.2024 - 20.01.2024, Leipzig

In: Proceedings zum 12. Leipziger Tierärztekongress – Tagungsband 4

Dr. Reiko Rackwitz, Prof. Dr. Uwe Truyen (Hrsg.)

Universität Leipzig. Leipziger Blaue Hefte: LBH, Leipzig, S. 106 – 109

Diana Meemken, Roland Fürstenberg, Nina Langkabel (2024)

**Kontaminationen an Schlachthofequipment und mögliche Interventionen zur Verringerung der Kreuzkontamination.**

24. Fachtagung für Fleisch- und Geflügelfleischhygiene

05.03.2024 - 06.03.2024, Berlin

In: 24. Fachtagung für Fleisch- und Geflügelfleischhygiene – Abstracts - Institut für Lebensmittelsicherheit und -hygiene, Arbeitsgruppe Fleischhygiene, Dr. Nina Langkabel (Hrsg.)

Berlin: BfR Abstracts, S. 19 – 20

ISBN: 978-3-00-077341-9

## DANKSAGUNG

Zunächst möchte ich mich ganz herzlich bei Frau Prof. Dr. Diana Meemken für die Möglichkeit der Promotion, das Vertrauen und für die tatkräftige Hilfe bei den umfangreichen Laborarbeiten bedanken. Deine fachliche Expertise und deine Hilfsbereitschaft haben mich nicht nur auf wissenschaftlicher Ebene bereichert, sondern auch mein Selbstvertrauen gestärkt. Die Erfahrungen und Fähigkeiten, die ich durch dich gewonnen habe, werden mich auf meinem weiteren Weg begleiten.

Bei meiner Betreuerin Frau Dr. Nina Langkabel bedanke ich mich für die sehr gute fachliche Koordination des Projekts, die sehr schnellen Korrekturen aller Textentwürfe und die konstruktiven Hilfestellungen.

Ein ganz besonders herzlicher Dank gebührt meinem Projektpartner Bastian Wyink. Durch deine enorme Einsatzbereitschaft, deine zielorientierte Arbeitsweise und deine stets positive und zuversichtliche Art hast du ein erfolgreiches Durchführen der sehr komplexen Probenahmen erst möglich gemacht. Damit hast du mich tief beeindruckt und stets mit Zuversicht erfüllt. Ich werde die gemeinsamen Beprobungsausfahrten, insbesondere die Wanderungen im Torfmoor mit den faszinierenden Eindrücken der heimischen Natur und Vogelvielfalt und die unterhaltsamen Gesellschaftsspieleabende im Hotel für immer in positiver Erinnerung behalten.

Ebenfalls möchte mich bei Nina Aumüller bedanken, die durch ihre tatkräftige Unterstützung zum erfolgreichen Gelingen der umfangreichen Beprobungen maßgeblich beigetragen hat und uns stets selbst zu früher Stunde mit einem herzlichen und fröhlichen „Moin“ begrüßte.

Ich danke allen Doktoranden und Mitarbeitern der AG Fleischhygiene für den gemeinsamen Austausch, unzählige wertvolle Hilfestellungen bei fachlichen Fragestellungen und das sehr angenehme Bestreiten des Promotionsalltags.

Ein sehr großes Dankeschön gebührt Lieselotte Bräutigam, deren unermüdliche Labortätigkeit entscheidend zur Erarbeitung der Resultate beigetragen hat.

## *Danksagung*

---

Des Weiteren bin ich sehr dankbar dafür, dass ich im Rahmen des Projekts die einzigartige Chance erhalten habe, meine Forschung auf der SafePork-Konferenz in New Orleans vorstellen zu dürfen. Die unzähligen Eindrücke und Erfahrungen in „The Big Easy“ haben mich persönlich in vielerlei Hinsicht unbeschreiblich bereichert.

Dir Sebastian, danke ich dafür, dass du zu jeder Zeit an mich glaubt und mir stets die Daumen für ein positives Gelingen gedrückt hast. Durch dich hatte ich den teilweise nötigen Abstand zu meiner Forschung um die Sachverhalte erneut und klarer betrachten und bewerten zu können.

Meinen Eltern gilt der größte Dank, da sie mir diese Promotion ermöglicht haben. Ihr habt immer an mich und an das erfolgreiche Gelingen dieser Arbeit geglaubt und mir alle notwendigen Freiräume für das Vorankommen geschaffen und stets Rückhalt gegeben, selbst in Momenten, in denen das Ziel in nahezu unerreichbarer Ferne zu sein schien. Ich danke euch von Herzen für eure Geduld und eure unermüdliche Unterstützung.



## **FINANZIERUNGSQUELLEN**

Die Studie wurde im Rahmen des folgenden Verbundprojekts durchgeführt.

### **Akronym KontRed**

*"Entwicklung und Implementierung technologischer Verfahren zur Reduktion von mikrobiellen Kontaminanten im Geflügel- und Schweineschlachtprozess"*

Die Förderung des Projekts erfolgte aus Mitteln des Bundesministeriums für Ernährung und Landwirtschaft (BMEL) aufgrund eines Beschlusses des deutschen Bundestages. Die Projektträgerschaft erfolgte über die Bundesanstalt für Landwirtschaft und Ernährung (BLE) im Rahmen des Programms zur Innovationsförderung. Förderkennzeichen: 281C104A18.

## **INTERESSENKONFLIKTE**

Im Rahmen dieser Arbeit bestehen keine Interessenkonflikte durch die finanzielle Unterstützung Dritter.

# **SELBSTSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG**

Hiermit bestätige ich, dass ich die vorliegende Arbeit mit dem Titel

**„Eignung der Agarkontakt-Methode  
zur Bestimmung des mikrobiologischen Status von Schlachtschwein- und  
Schlachtierkörperoberflächen im Schweineschlachtprozess  
vom Wartestall bis zur Kühlung“**

selbständig angefertigt habe. Ich versichere, dass ich ausschließlich die angegebenen Quellen und Hilfen in Anspruch genommen habe.

Kremmen OT Beetz, den 21.06.2024

Roland Fürstenberg









9 783967 2925 10

**mbv**berlin mensch und buch verlag

49,90 Euro | ISBN: 978-3-96729-251-0