

Listeria monocytogenes in Umfeldproben aus Sachsen-Anhalt

Anne-Catrin Geuthner

Landesamt für Verbraucherschutz Sachsen-Anhalt

Fachbereich Lebensmittelsicherheit

Tagung des Landesverbandes der Lebensmittelkontrolleure Thüringen e.V.

Heilbad Heiligenstadt

12.05.2023

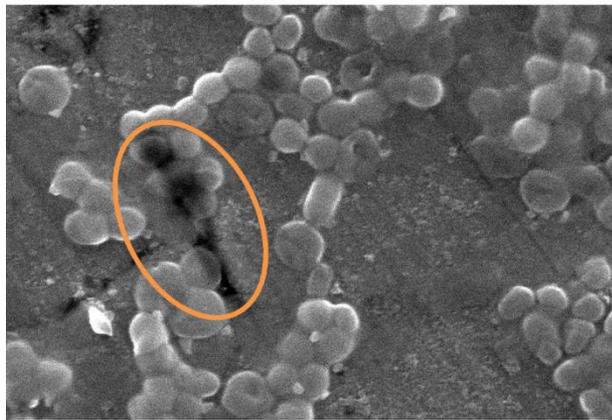


SACHSEN-ANHALT

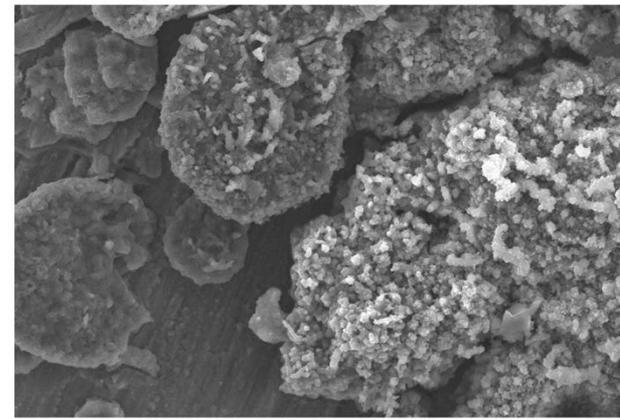
Landesamt für
Verbraucherschutz

Listeria monocytogenes

- grampositiv, beweglich, fakultativ intrazellulär
- Temperaturoptimum - 0,4 °C bis + 45 °C
- Besonders empfängliche Personengruppen :
YOPIs (young, old, pregnant, immunosuppressed)
- Fähigkeit zur Biofilmbildung



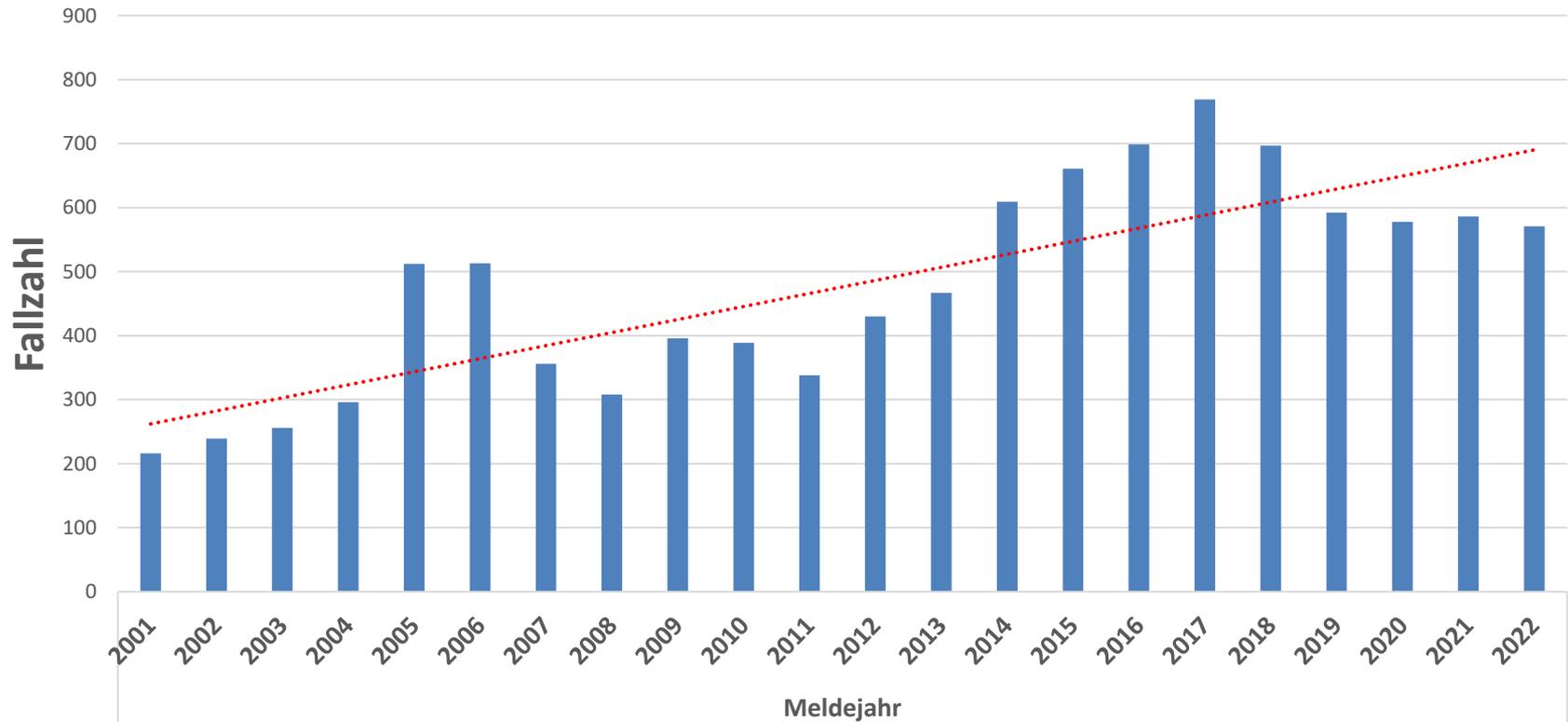
6µm



60µm

Doijad et al., PLoS ONE 2015

Listeriose-Fälle in Deutschland



»Robert Koch-Institut: SurvStat@RKI 2.0, <https://survstat.rki.de>, Abfragedatum: 02.03.2023«

Listeriose-Ausbrüche in Deutschland

Stand 08.09.2020:

19 laufende Ausbrüche mit **222 Erkrankten** und **24 Toten**

Stand 06.03.2023:

100 laufende Ausbrüche mit

832 Erkrankten und **54 Toten**

Large Nationwide Outbreak of Invasive Listeriosis Associated with Blood Sausage, Germany, 2018–2019

96 Erkrankte, 5 Tote

Sven Halbedel,¹ Hendrik Wilking,¹ Alexandra Holzer, Sylvia Kleta, Martin A. Fischer,
Stefanie Lüth, Ariane Pietzka, Steliana Huhulescu, Raskit Lachmann, Amrei Krings,
Werner Ruppitsch, Alexandre Leclercq, Rolf Kamphausen, Maylin Meincke, Christiane Wagner-Wiening,
Matthias Contzen, Iris Barbara Kraemer, Sascha Al Dahouk, Franz Allerberger, Klaus Stark,² Antje Flieger²

Molecular Tracing to Find Source of Protracted Invasive Listeriosis Outbreak, Southern Germany, 2012–2016

77 Erkrankte, 4 Tote



SACHSEN-ANHALT

Landesamt für
Verbraucherschutz

Landesamt für Verbraucherschutz Sachsen-Anhalt

Anne-Catrin Geuthner

12.05.2023

Warum Umgebungsproben untersuchen?

Rechtsgrundlagen / DIN ISO Normen / LFGB § 64 ASU

VO (EG) Nr. 2073/2005 über mikrobiologische Kriterien in Lebensmittel
Artikel 5 Spezifische Bestimmungen über Probenahme und Untersuchung

„Lebensmittelunternehmer, die verzehrfertige Lebensmittel herstellen, welche ein durch *Listeria monocytogenes* (*Lm*) verursachtes Risiko für die öffentliche Gesundheit bergen könnten, **haben** im Rahmen ihres Probenahmeplans Proben aus den Verarbeitungsbereichen und Ausrüstungsgegenständen auf *Lm* **zu untersuchen**.“

„Proben sind bei den bei der Lebensmittelherstellung genutzten Verarbeitungsbereichen und Ausrüstungsgegenständen zu entnehmen, wenn dies nötig ist, um sicherzustellen, dass die [mikrobiologischen] Kriterien eingehalten werden.“



Bei Probenahme ist die ISO-Norm 18593 als Referenzverfahren heranzuziehen!



Probenahme - Umgebungsproben -

Rechtsgrundlagen / DIN ISO Normen / LFGB § 64 ASU

ASU § 64 LFGB B 80.00 1 bis 5

Horizontales Verfahren für Probenahmetechniken von Oberflächen (Februar 2019)

Bestimmung des Oberflächenkeimgehaltes auf Einrichtungs- und Bedarfsgegenständen im Lebensmittelbereich

- Teil 1: Quantitatives Tupfverfahren
 - Teil 2: Semiquantitatives Tupfverfahren
 - Teil 3: Abklatschverfahren
 - Teil 4: Prüfung von Packmitteln
 - **Teil 5: Horizontales Verfahren für Probenahmetechniken von Oberflächen (Februar 2019)**
- Übernahme der gleichnamigen Norm DIN EN **ISO 18593 Oktober 2018**



SACHSEN-ANHALT

Landesamt für
Verbraucherschutz

Landesamt für Verbraucherschutz Sachsen-Anhalt
Anne-Catrin Geuthner
12.05.2023

Probenahme - Umgebungsproben -

§ 64 LFGB B 80.00- 5

Anwendungsbereich

- Verfahren für Probenahmetechniken mittels Abklatschplatten, Stieltupfer, Schwämmen und Tücher an Oberflächen in der Umgebung der Lebensmittelkette
- Gilt **nicht** für die Validierung von Reinigungs- und Desinfektionsverfahren
- **keine** Angaben hinsichtlich
 - Probenahmehäufigkeit
 - Anzahl der Probenahmestellen
 - Notwendigkeit zur Rotation der Probenahmestellen



Probenahme - Umgebungsproben -

§ 64 LFGB B 80.00- 5

Probenahmestellen

- Einteilung der Oberflächen mit und ohne Lebensmittelkontakt
- Berücksichtigung des gesamten Produktionsumfeldes
 - sämtliche Hohlräume oder Übergänge von Paneelenwänden zum Fußboden oder Rollen auf Rollbahnen
 - Fußböden vor und hinter Hygieneschleusen
 - sämtliche Tore und Türen mit Bodenkontakt
 - Dichtungsprofile und Isoliermaterial
 - Türen, Wände, Decken
 - sämtliche Formen von Kondenswasser
 - sämtliche Ansammlungen von stehendem Wasser



Probenahme - Umgebungsproben -

§ 64 LFGB B 80.00- 5

Probenahmefläche

Für den Nachweis von Mikroorganismen **bei zugänglichen Flächen** sollte die gesamte Probenahmefläche **so groß wie möglich** sein

zwischen 1000 cm² und 3000 cm² (0,1 m² bis 0,3 m²)

Zeitpunkt der Probenahme

- Nicht sofort oder kurz nach der Reinigung und Desinfektion aufgrund der Gefahr der Zellschädigung – schwer kultivierbar
- wenn nach Reinigung und Desinfektion, dann vor Produktionsbeginn
- Während der Produktion, nach mindestens zwei Stunden Produktionszeit, oder am Ende der Produktionsdurchläufe



Probenahme - Umgebungsproben -



§ 64 LFGB B 80.00- 5

Probenahmetechniken

- für die Probenahme von **schwer zugänglichen Flächen** (< 100 cm²) sollten **sterile Stieltupfer** verwendet werden
- die Auswahl von feuchten oder trockenen Stieltupfern hängt vom Zustand der Oberfläche ab, die beprobt werden soll
- für die Probenahme von **zugänglichen Flächen** (> 100 cm²) sollten **sterile Schwämme** (feucht/trocken) verwendet werden
- Verdünnungsmittel für trockene Tupfer/Schwämme
z.B. Pepton-Kochsalzlösung, Ringerlösung, isotonische Kochsalzlösung bzw. wenn erforderlich Neutralisationsmedium



Probenahme - Umgebungsproben -

Aus eigener Erfahrung

Probenahmetechniken

!Wichtig!

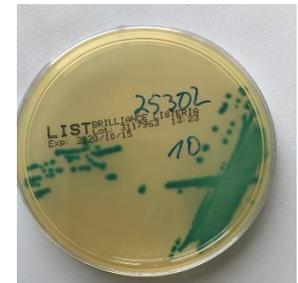
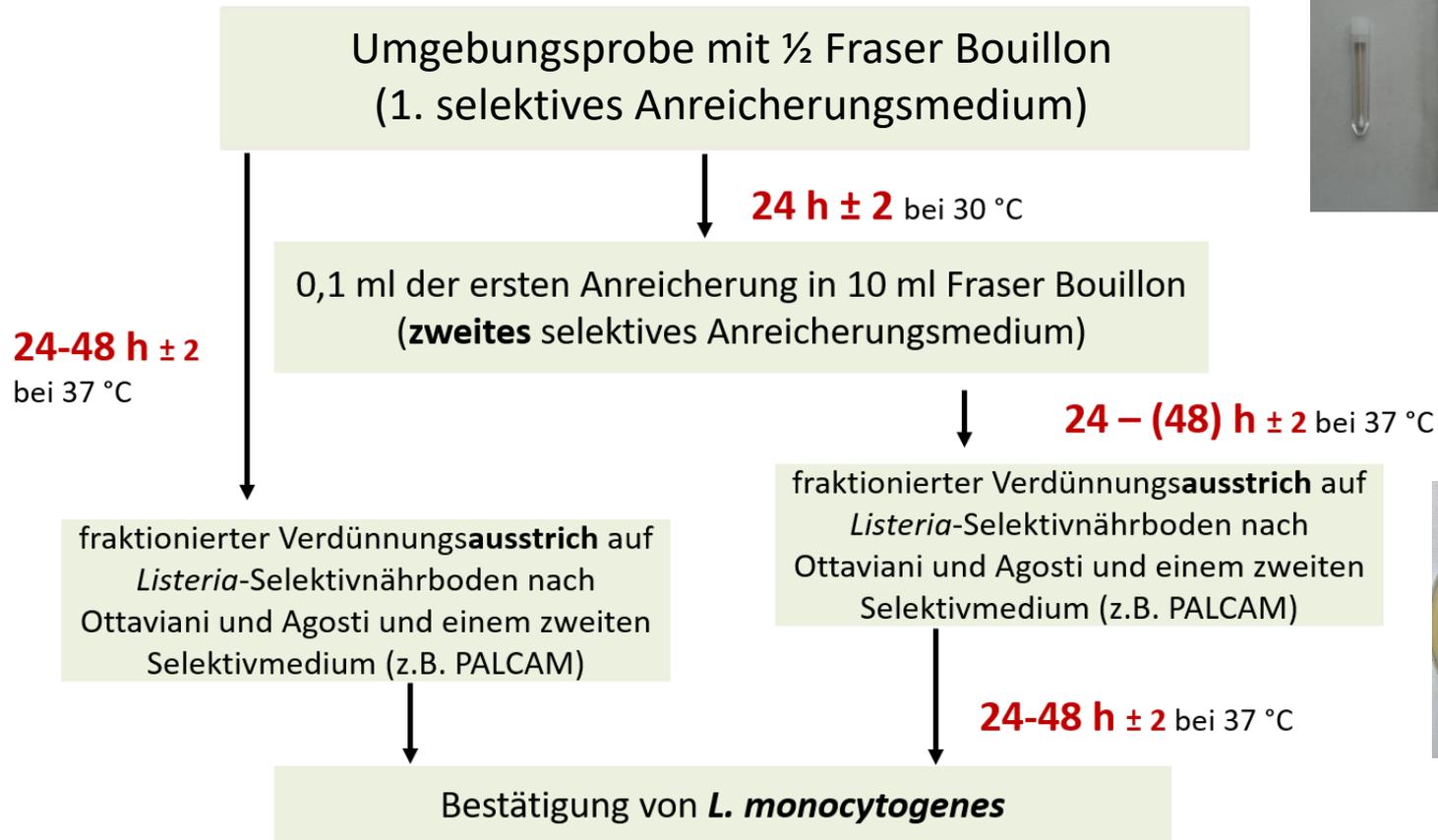
- ist eine genaue Beschreibung von beprobter Fläche und Entnahmeort
- im Rahmen des Umfeldmonitorings sollte nicht nur auf *Listeria monocytogenes* untersucht werden
 - andere Listerien-Arten (*Listeria spp.*) können frühzeitig Hinweise auf mögliche Kontaminationen mit *Listeria monocytogenes* geben
- gleiche Auswahl der beprobten Fläche und Entnahmeort zur Erstellung von regelmäßigen **Trendanalysen**



Untersuchung auf *Listeria monocytogenes*

ASU § 64 LFGB L 00.00-32/1

Nachweisverfahren in Umgebungsproben



Untersuchung auf *Listeria monocytogenes*

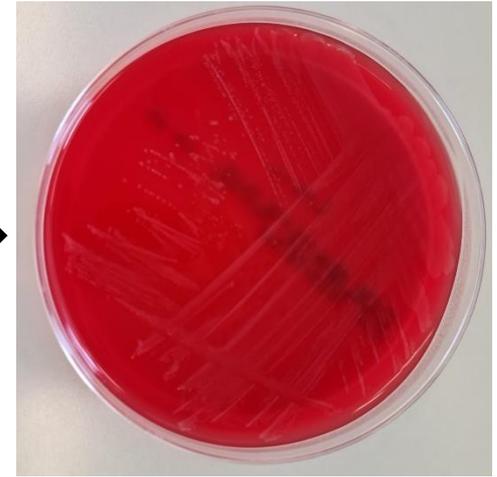
Bestätigung von *L. monocytogenes*



Anfertigen von Reinkulturen



Beimpfen des nicht-selektiven Nährbodens



Bestätigungsreaktionen

Bebrütung 24 h bei 37 °C



SACHSEN-ANHALT

Landesamt für
Verbraucherschutz

Landesamt für Verbraucherschutz Sachsen-Anhalt
Anne-Catrin Geuthner
12.05.2023

Untersuchung auf *Listeria monocytogenes*

Bestätigung von *L. monocytogenes*

Bestätigung von
Listeria monocytogenes

- Hämolysetest
- Kohlenhydratabbau
- CAMP – Test
- **MALDI TOF**

Ergibt die Prüfung mittels
MALDI-TOF kein
eindeutiges Ergebnis



biochemische Prüfung
Molekularbiologische Prüfung

Bestätigung der *Listeria* spp.

- Katalase Reaktion
- Gramfärbung
- MALDI TOF

Untersuchungszeitraum

Listeria monocytogenes **negativ**

Listeria monocytogenes **positiv**

4 Tage

bis zu 10 Tagen



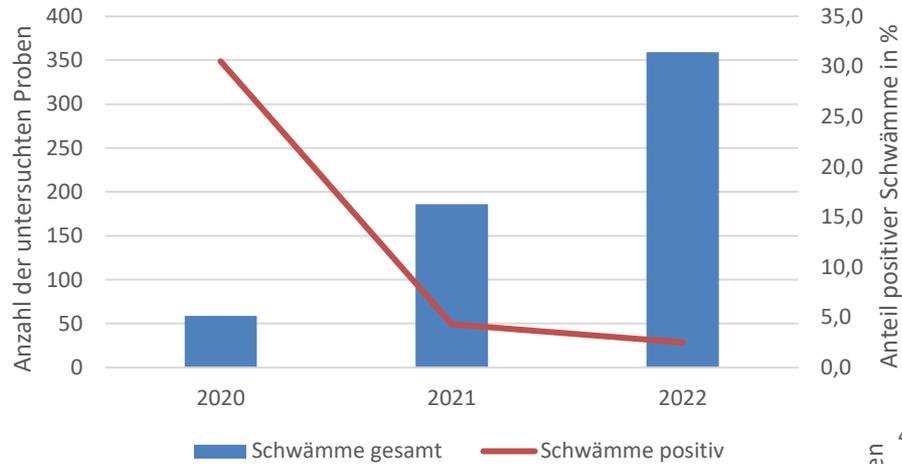
SACHSEN-ANHALT

Landesamt für
Verbraucherschutz

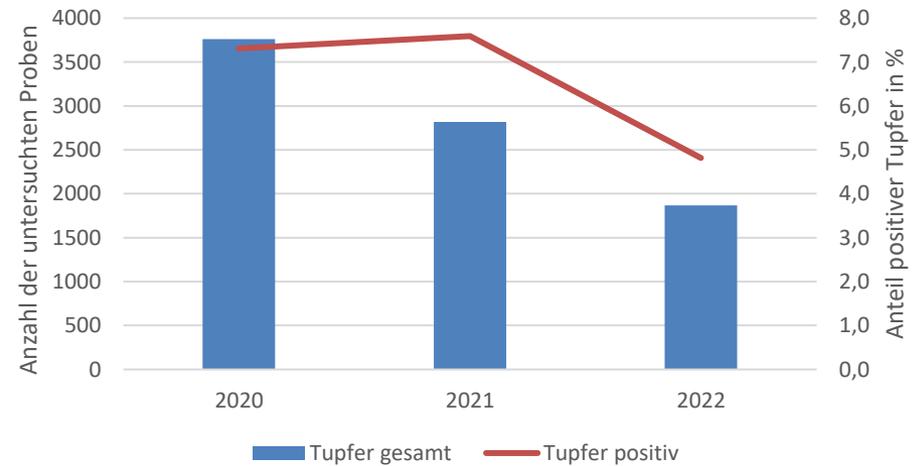
Landesamt für Verbraucherschutz Sachsen-Anhalt
Anne-Catrin Geuthner
12.05.2023

Untersuchungsergebnisse - Umgebungsproben -

Schwammtupfer auf *L. monocytogenes*

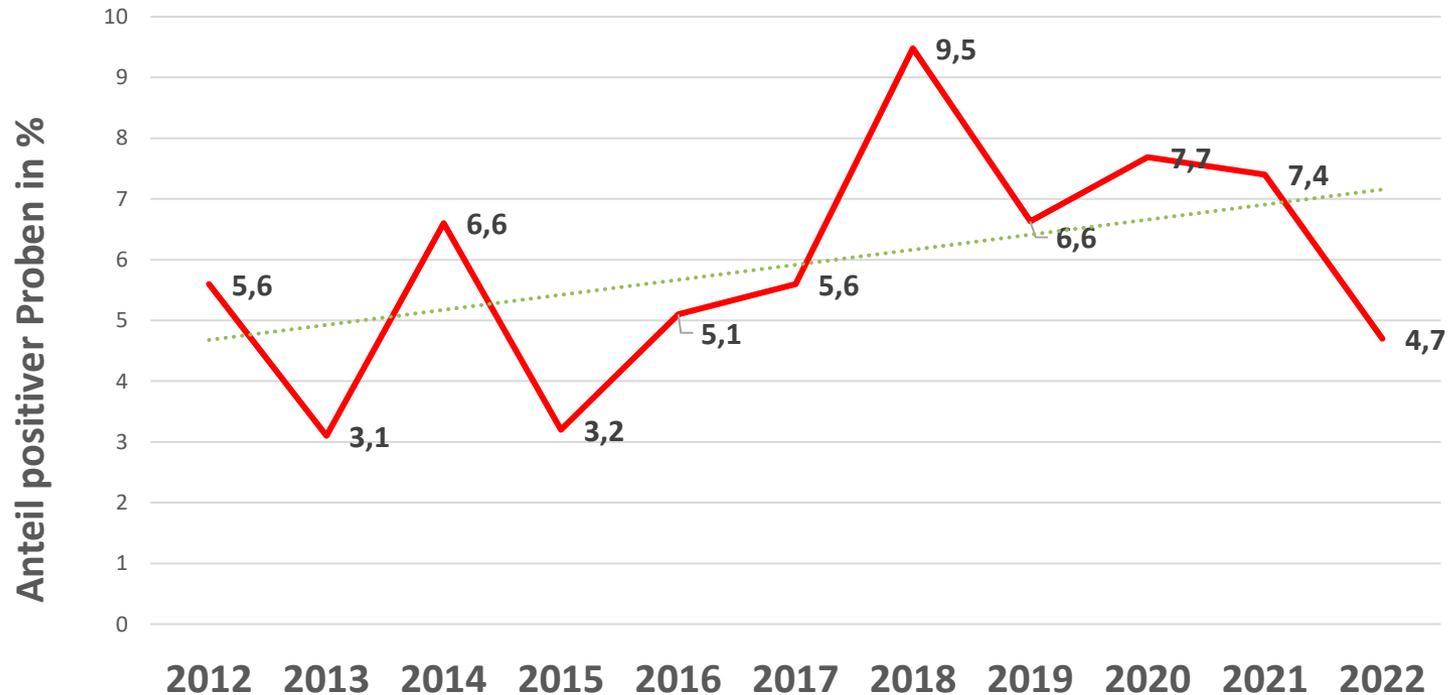


Tupfer auf *L. monocytogenes*



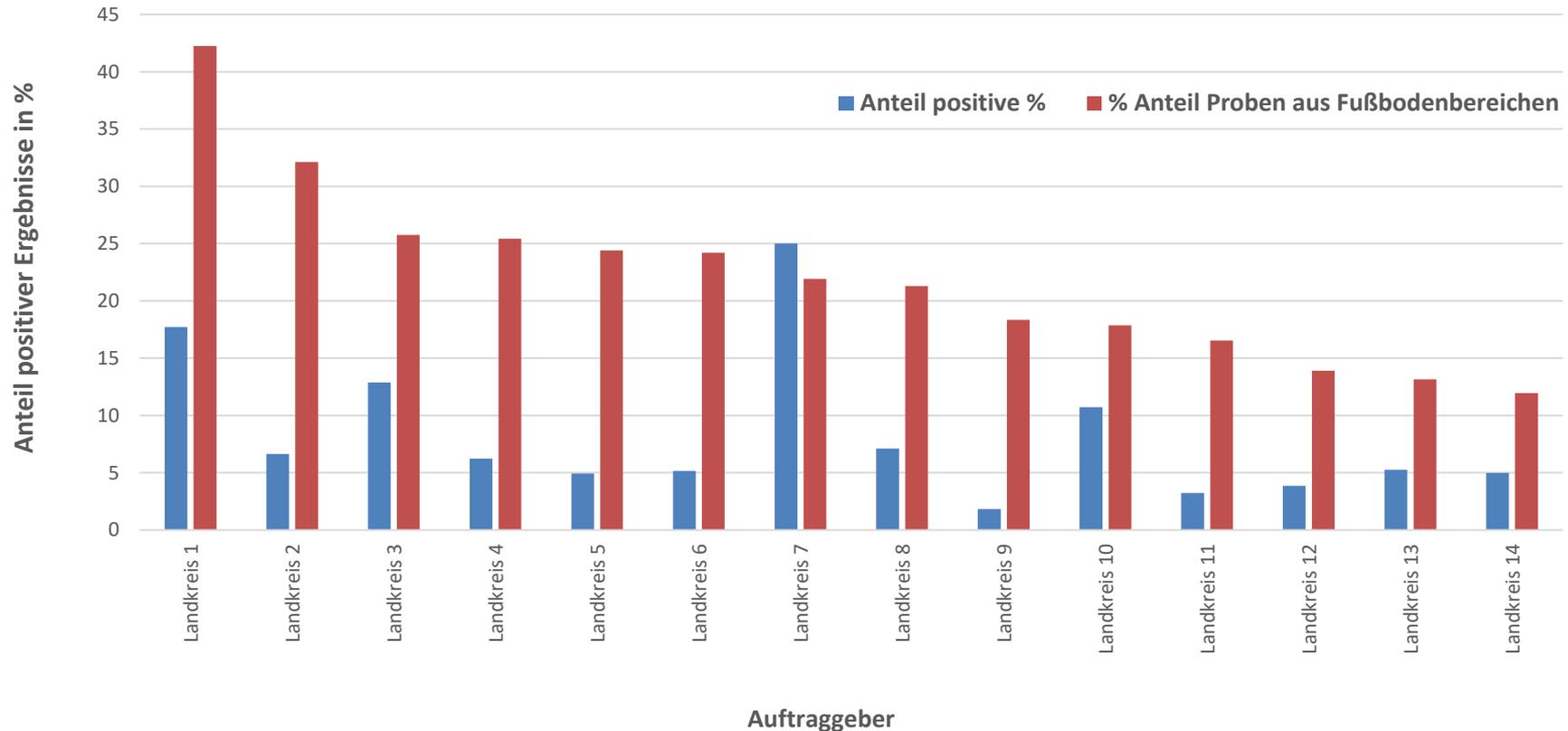
Untersuchungsergebnisse - Umgebungsproben -

Anteil *L. monocytogenes* positiver Umgebungsproben



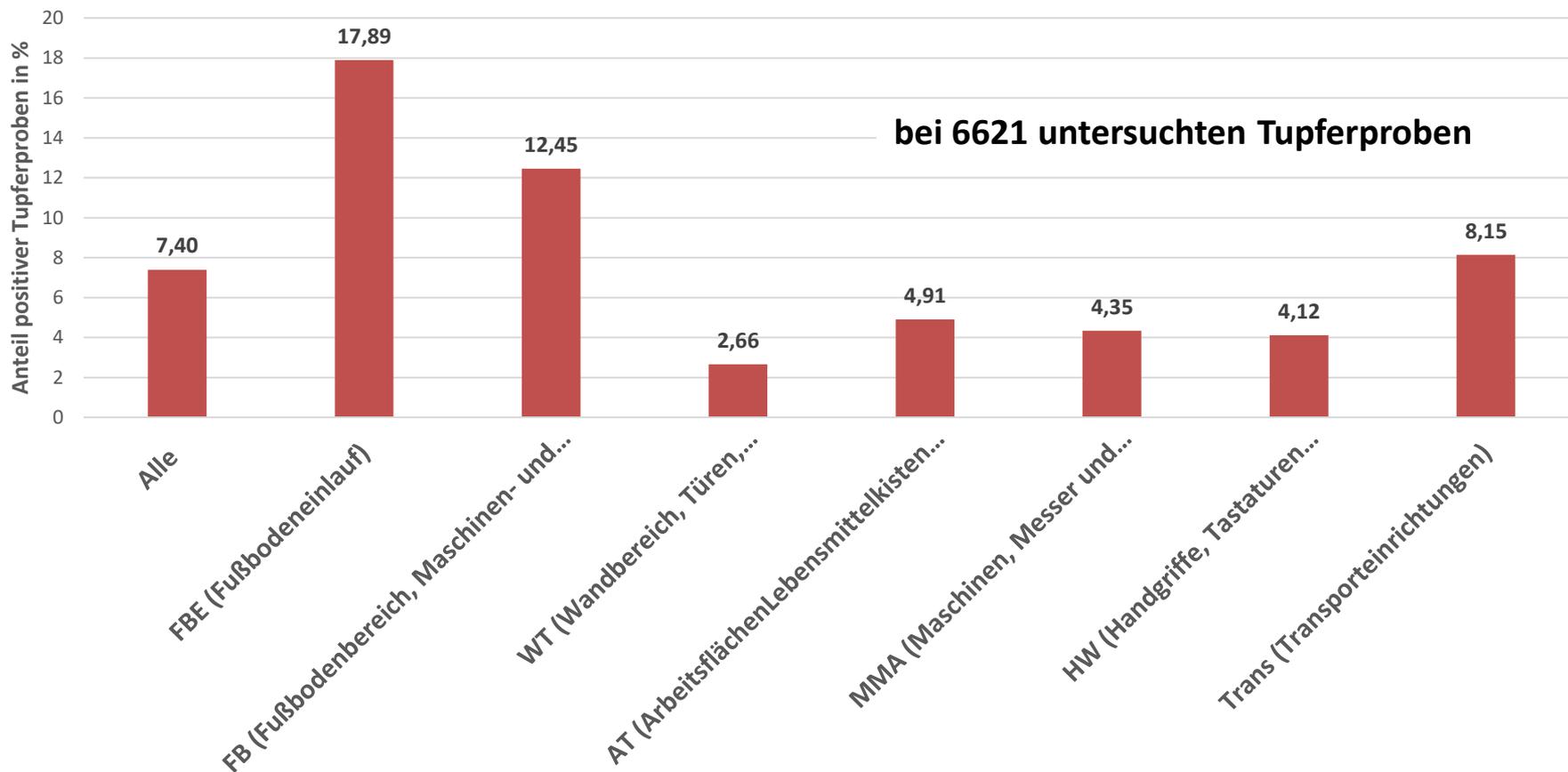
Untersuchungsergebnisse - Umgebungsproben -

Positive *L. monocytogenes* Tupferproben nach Auftraggeber (2018-2021)



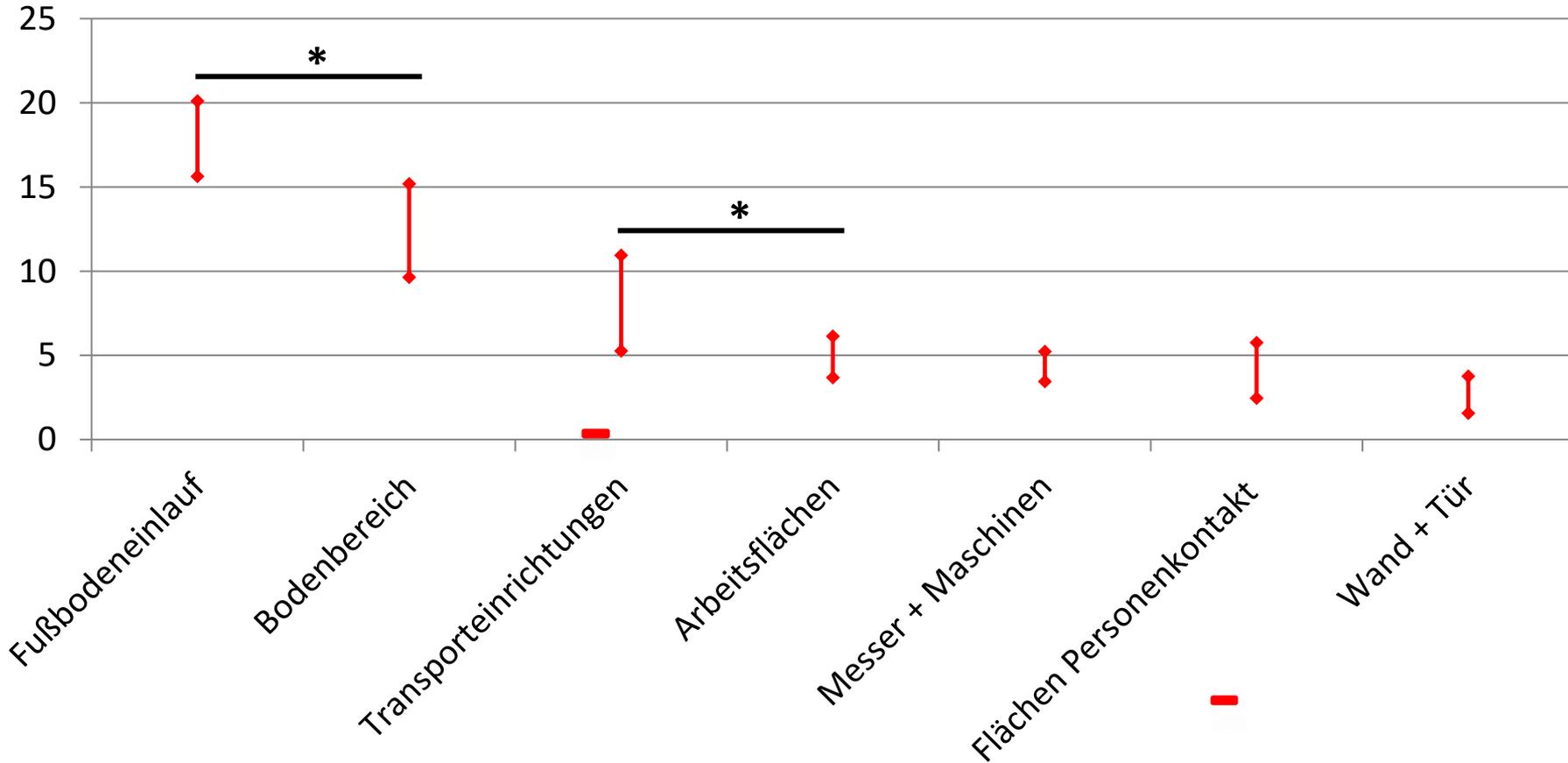
Untersuchungsergebnisse - Umgebungsproben -

Entnahmestellen von *L. monocytogenes* positiven Umgebungsproben (2018-2021)



Untersuchungsergebnisse - Umgebungsproben -

Wo befinden sich Listerien im Betrieb?



Typisierung von *L. monocytogenes*

Mikrobiologie



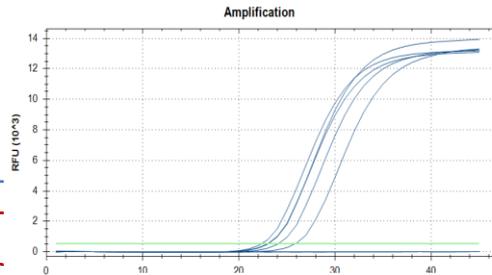
Biochemie



Von Witmadrid - Eigenes Werk,
Gemeinfrei,
<https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=5715510>

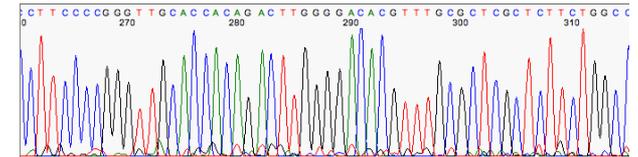
<https://www.bruker.com/de/products-and-solutions/mass-spectrometry/maldi-tof.html>

MALDI-TOF

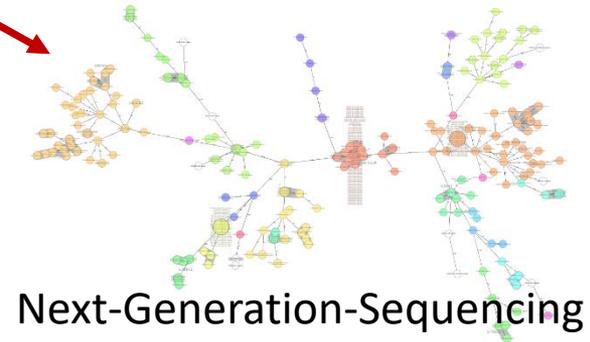


PCR/real-time PCR

Sanger-Sequenzierung



Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE)



Next-Generation-Sequencing



SACHSEN-ANHALT

Landesamt für
Verbraucherschutz

Landesamt für Verbraucherschutz Sachsen-Anhalt

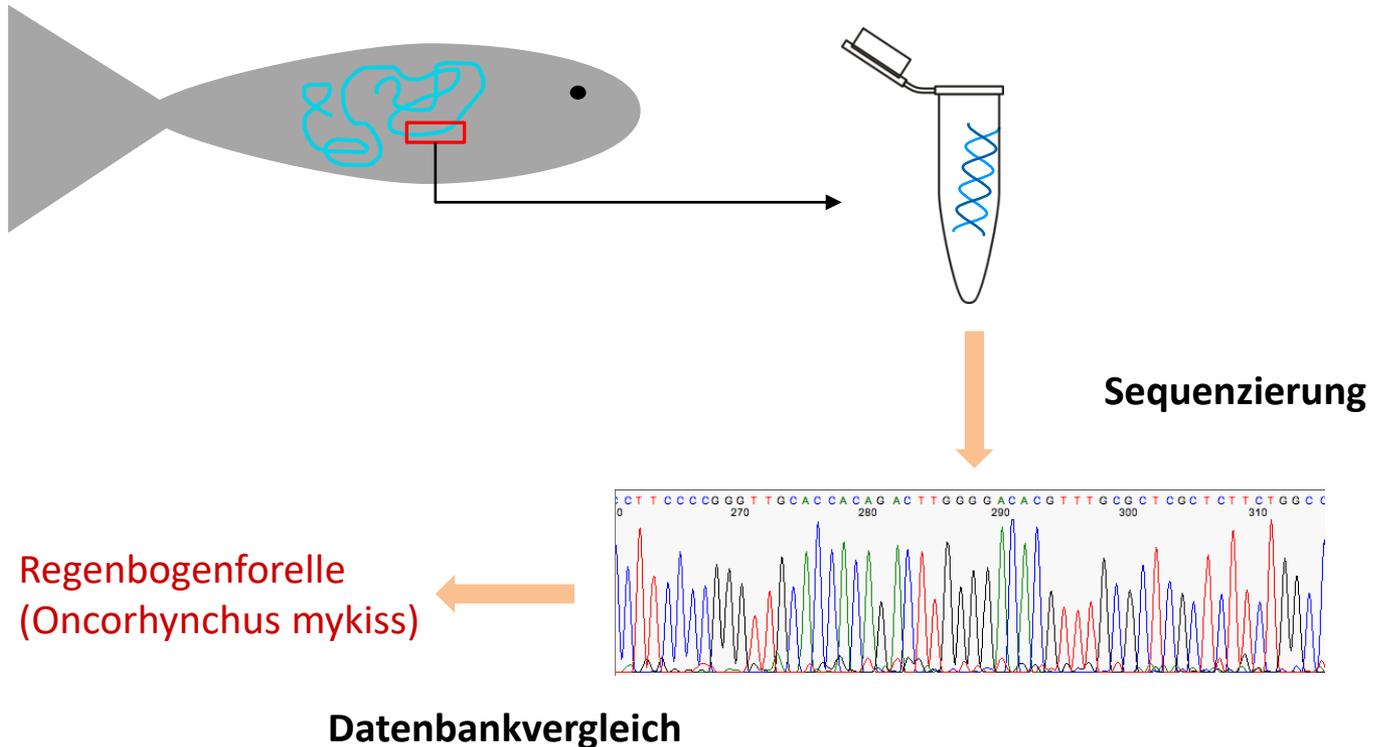
Anne-Catrin Geuthner

12.05.2023

Sequenzierung

= Aufschlüsseln der Gensequenz (Basenabfolge)

Bis jetzt:



Was ist NGS?

- = Next Generation Sequencing (2nd generation sequencing)
- Seit 2007
- Hochdurchsatz-Sequenzierung
 - einzelne DNA-/RNA-Moleküle massenhaft parallel sequenzieren
- Ermöglicht Analyse verschiedenster komplexer Genome und Mischproben innerhalb kürzester Zeit

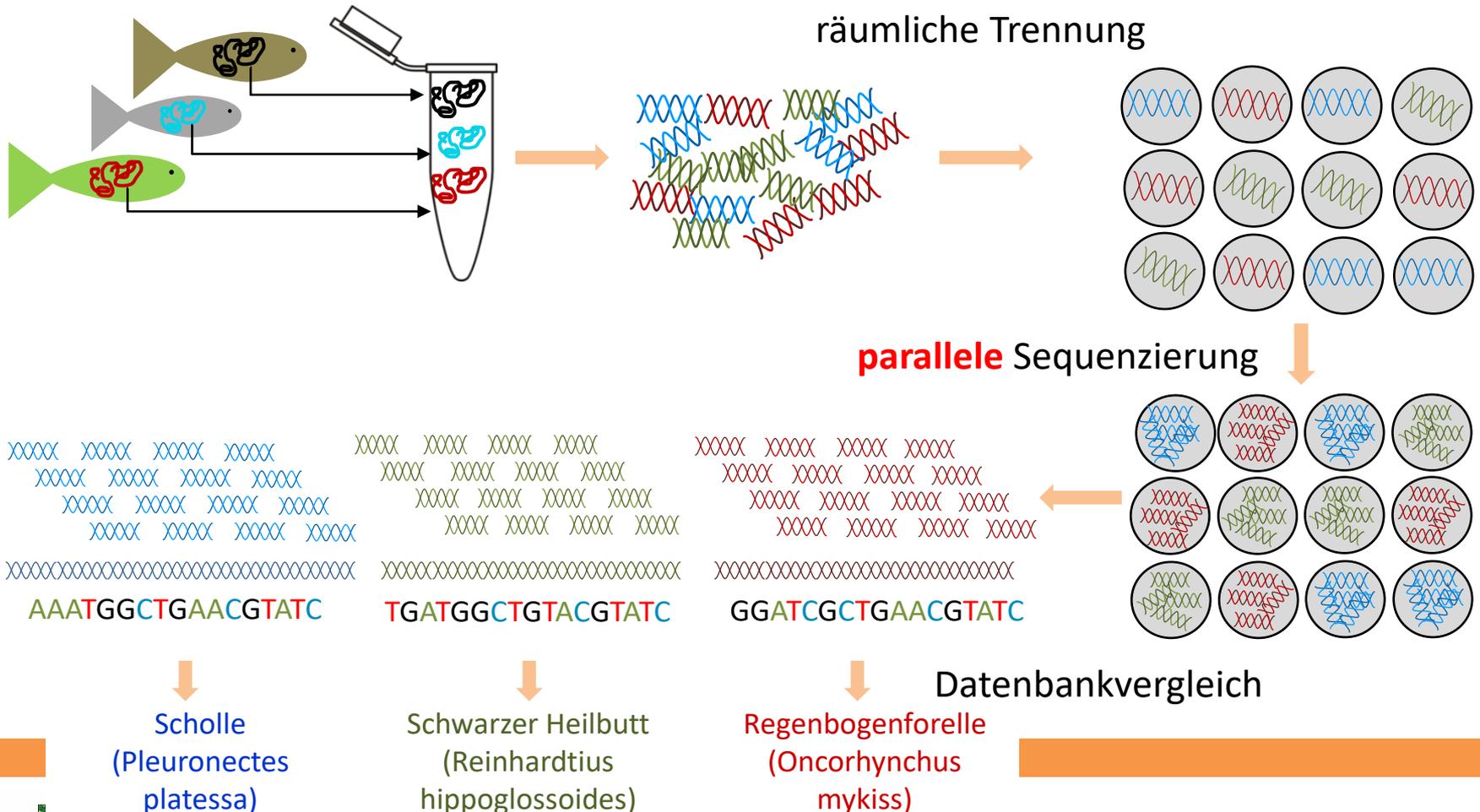


SACHSEN-ANHALT

Landesamt für
Verbraucherschutz

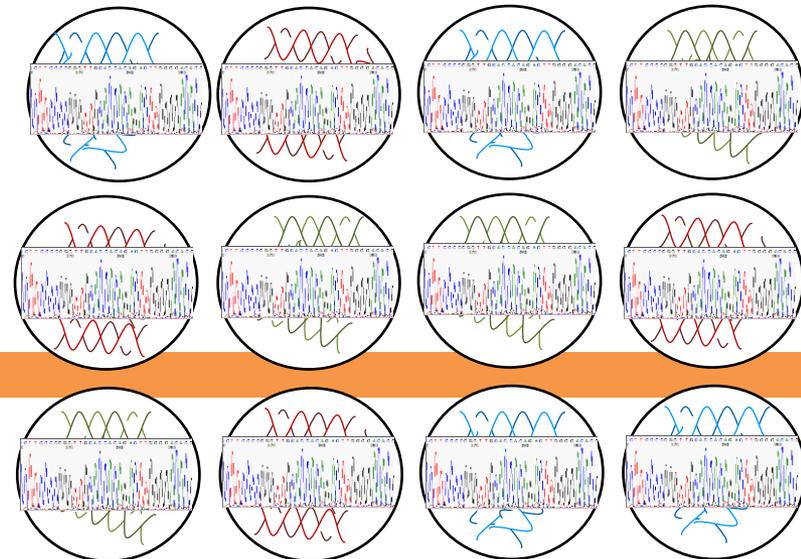
Wie funktioniert nun NGS?

Next Generation Sequencing = massive parallel sequencing



Datenauswertung

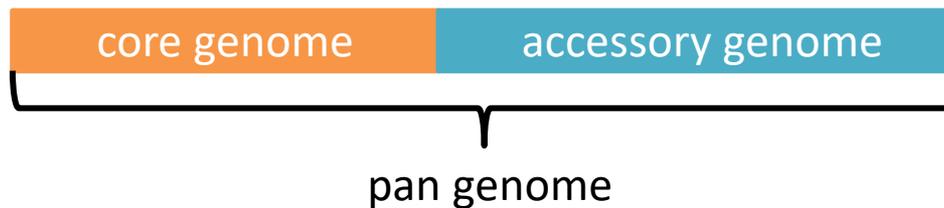
- erhebliche Datenmengen → pro Probe ca. mehrere Hundert Megabyte bis **2 GB** Rohdaten
- Auswertung sehr großer Datenmengen durch Kombination verschiedener Programme und Abgleich mit Datenbanken
- Infrastruktur aus Auswerterechner, Datenspeicher, Sicherungssysteme nötig
- Bioinformatische Kenntnisse erforderlich



Feintypisierung von *L. monocytogenes*

Neues Werkzeug – Next Generation Sequencing

- Gesamtes Genom wird zur Typisierung herangezogen
 - Genomgröße ca. 2,9 -3,2 Mio Basen



- z.B. 1701 Gene des Kerngenoms (cgMLST) werden verglichen

Ruppitsch et al., J Clin Microbiol. 2015

→ sehr tiefe Auflösung = Feintypisierung



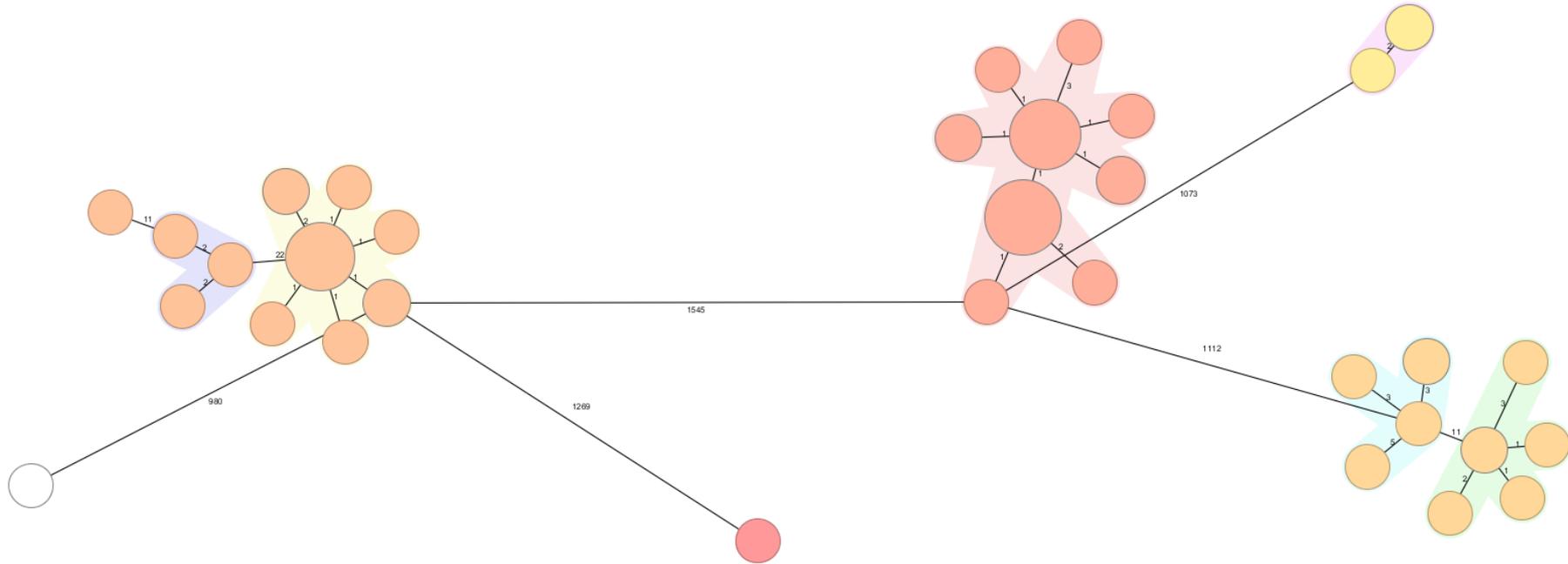
SACHSEN-ANHALT

Landesamt für
Verbraucherschutz

Landesamt für Verbraucherschutz Sachsen-Anhalt
Anne-Catrin Geuthner
12.05.2023

Feintypisierung – Was ist möglich?

Nachweis von Verwandtschaftsverhältnissen



Feintypisierung – Was ist möglich?

Nachweis von Persistenz

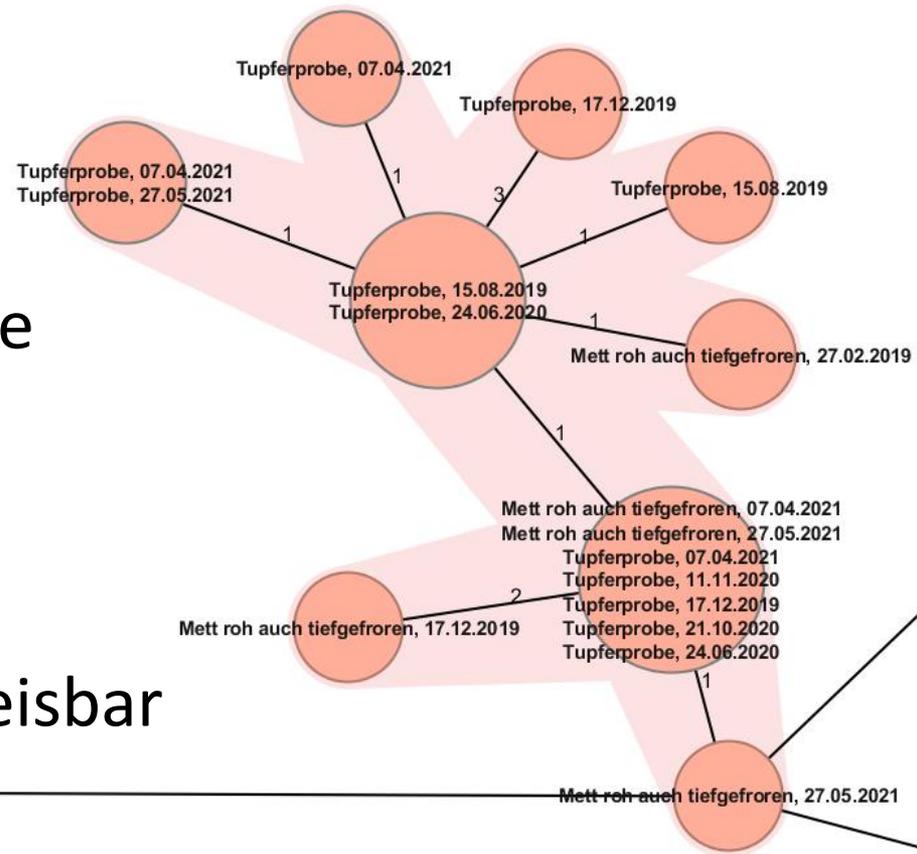
Persistenz

- wiederholte Isolation
- identischer Subtyp
- unterschiedliche Zeitpunkte

Sehr eng verwandte *Listeria monocytogenes* Stämme

seit 2019 im Betrieb nachweisbar

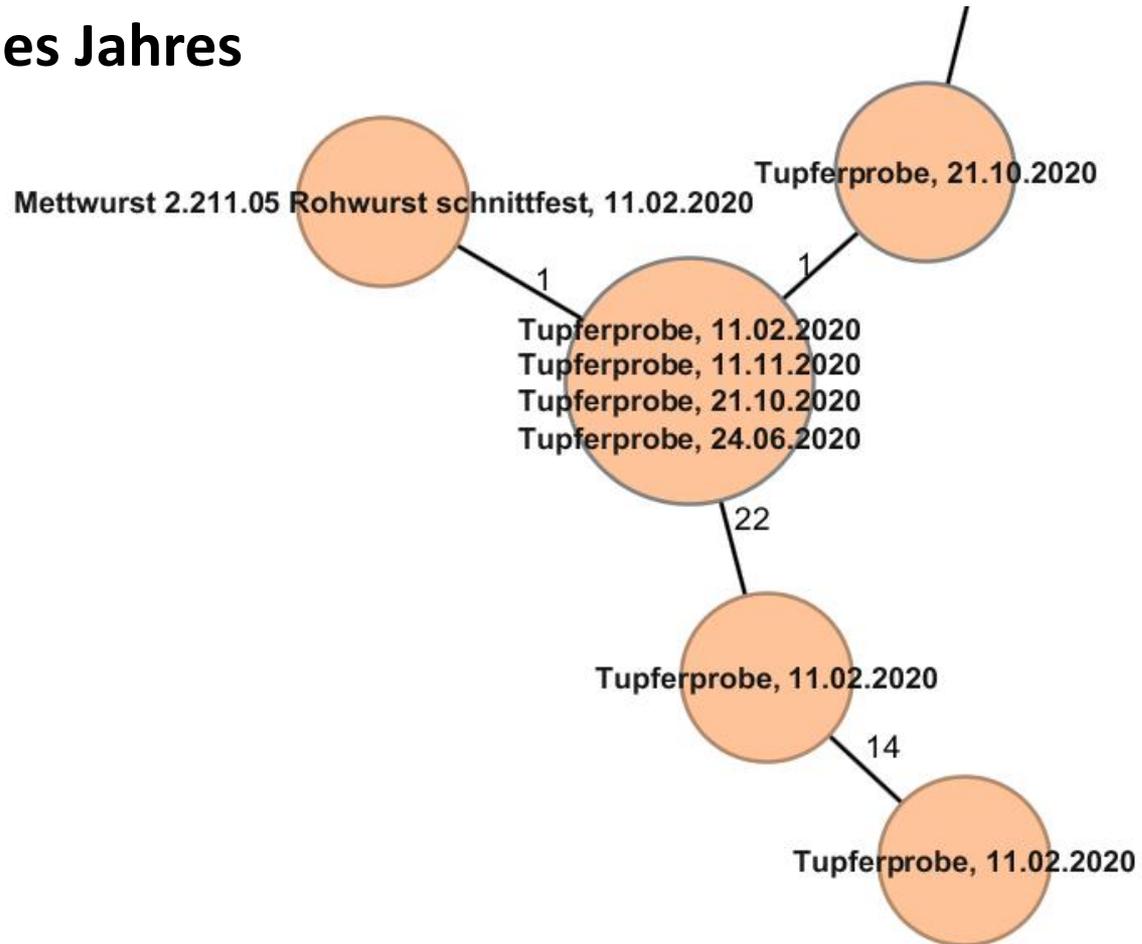
= **Persistenter Stamm!**



5

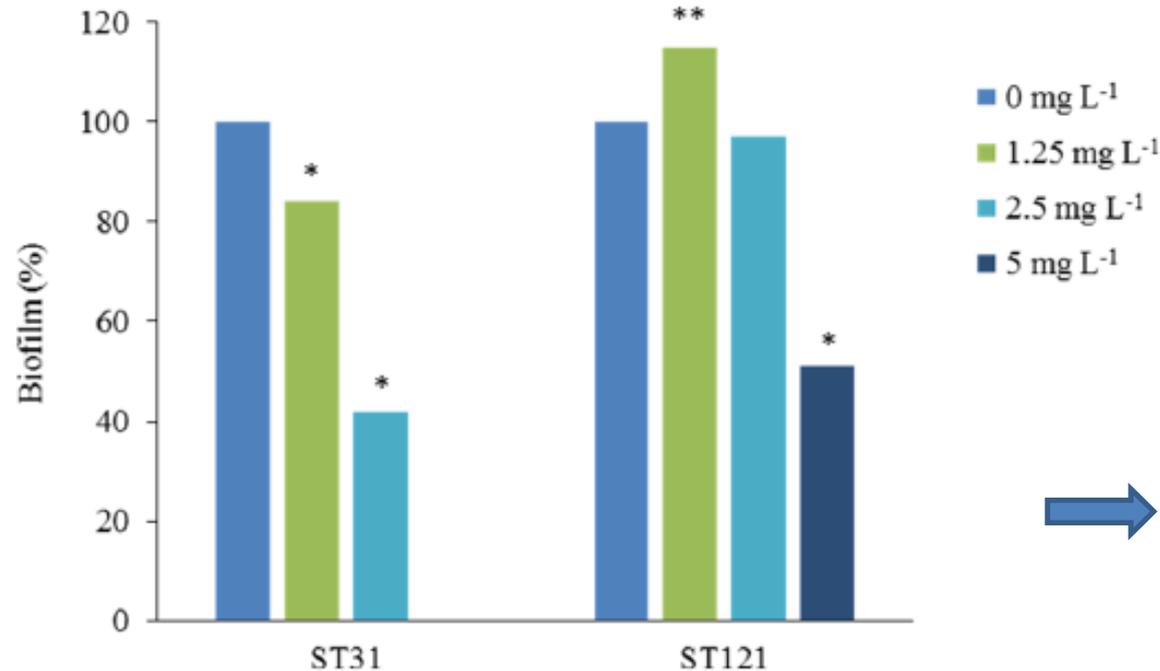
Feintypisierung – Was ist möglich?

Innerhalb eines Jahres



Feintypisierung – Was ist möglich?

Wie kommt es zur Persistenz?



z.B. durch
Anwendung
subletal wirkender
Desinfektions-
mittelkonzentration

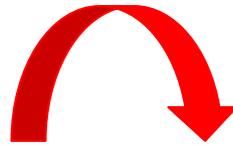
➔ Entstehung von
Biofilmen

Martínez-Suárez et al. (2016), Front. Microbiol.

Herausforderung Biofilm

Listeria monocytogenes in Biofilmen resistent gegen QAT und PES!

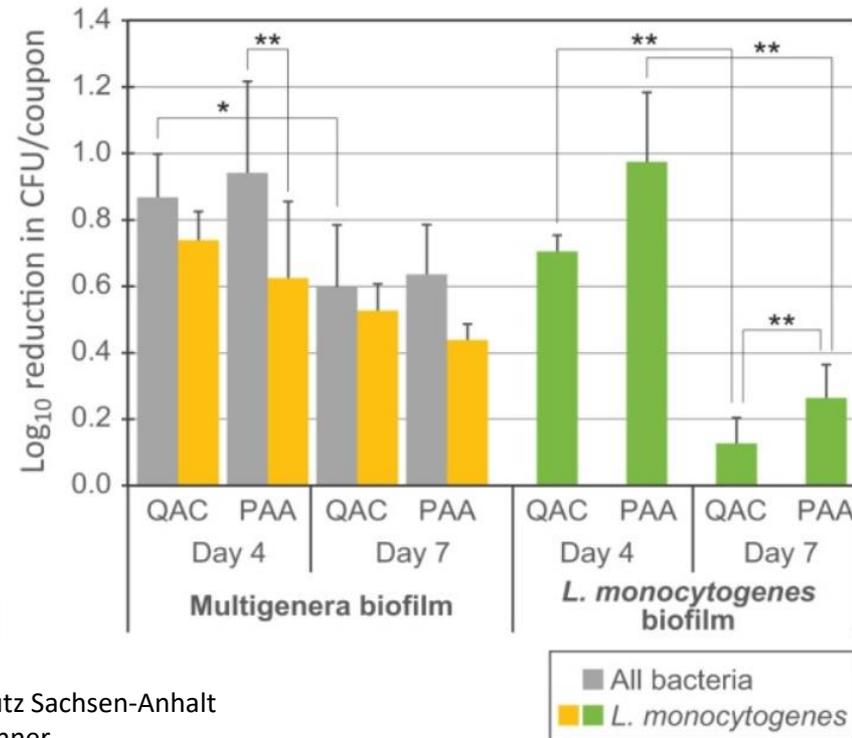
- Selektion im Betrieb gegenüber den angewandten Desinfektionsmitteln in unterer Anwenderkonzentration
- Wirksamkeit der Mittel in Biofilmen vermindert



Persistenz von *L. monocytogenes*
in Biofilmen vermeiden

→ Voraussetzung dafür ist es,
die **Persistenz** zu **erkennen!**

Fagerlund et al. (2017) Appl Environ Microbiol

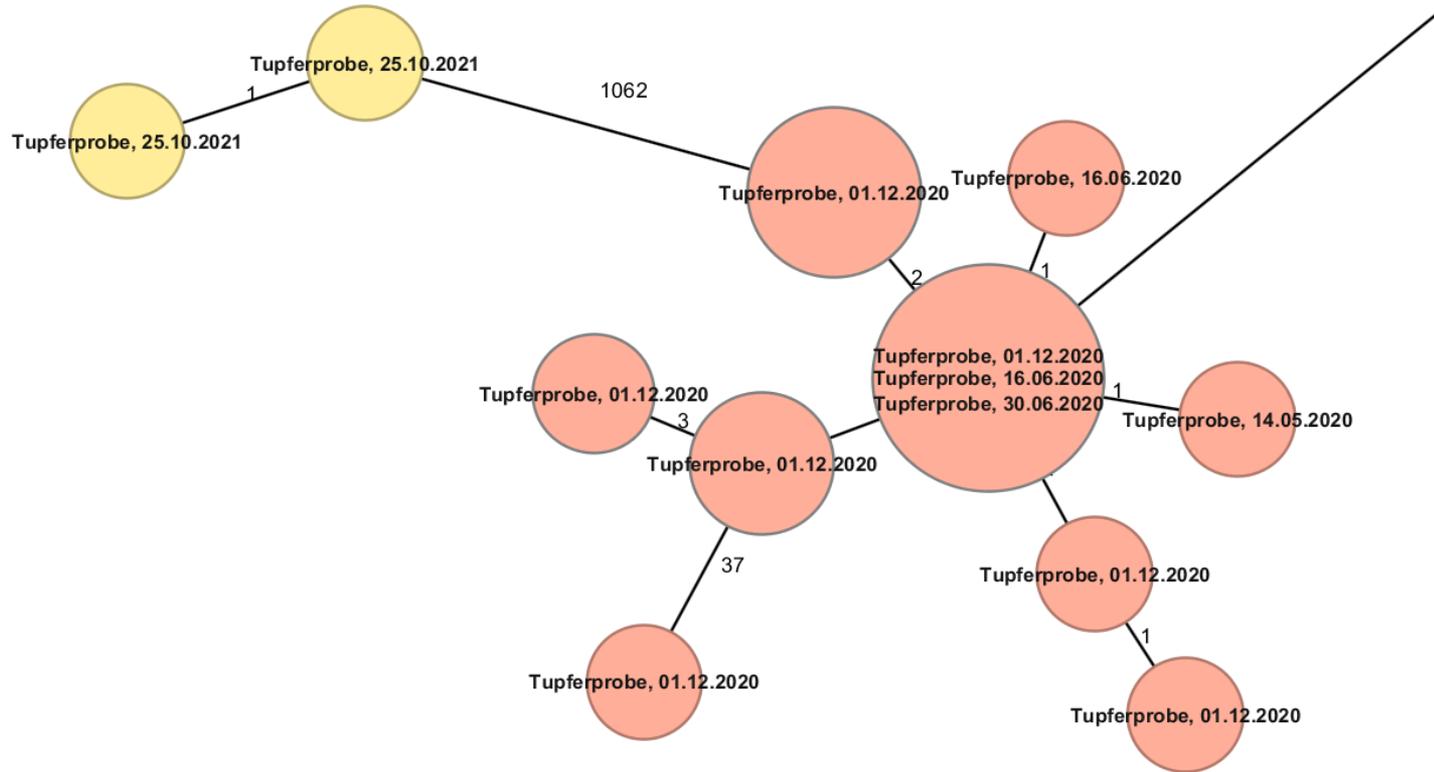


SACHSEN-ANHALT

Landesamt für
Verbraucherschutz

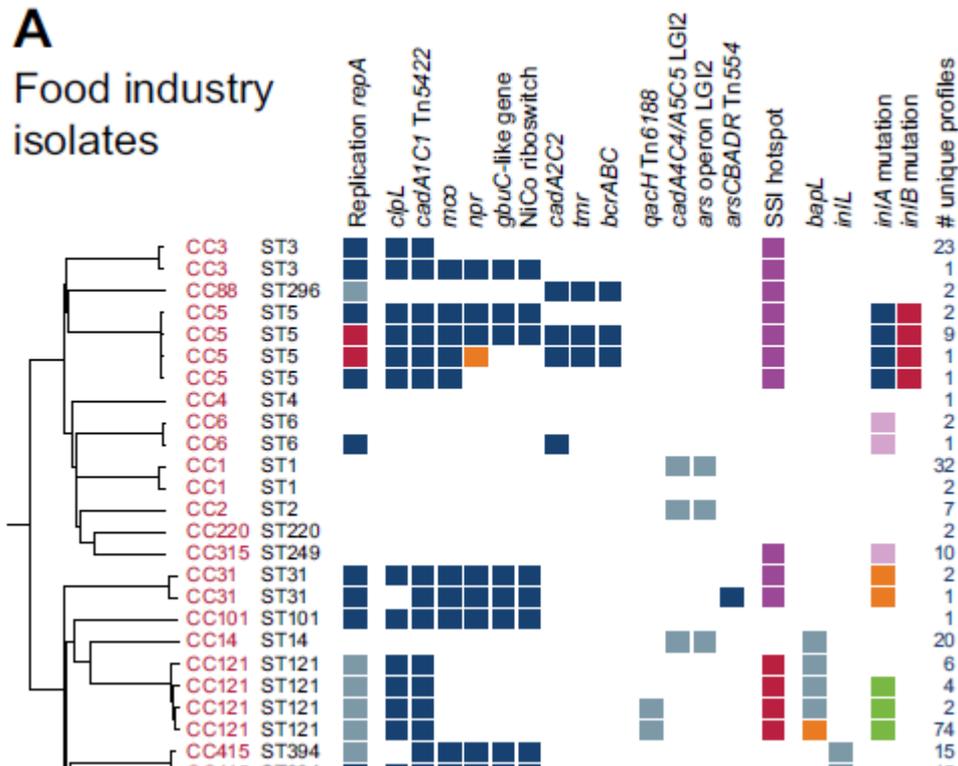
Landesamt für Verbraucherschutz Sachsen-Anhalt
Anne-Catrin Geuthner
12.05.2023

Beispiel für erfolgreiche Bekämpfung der Persistenz

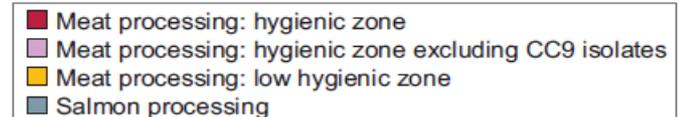
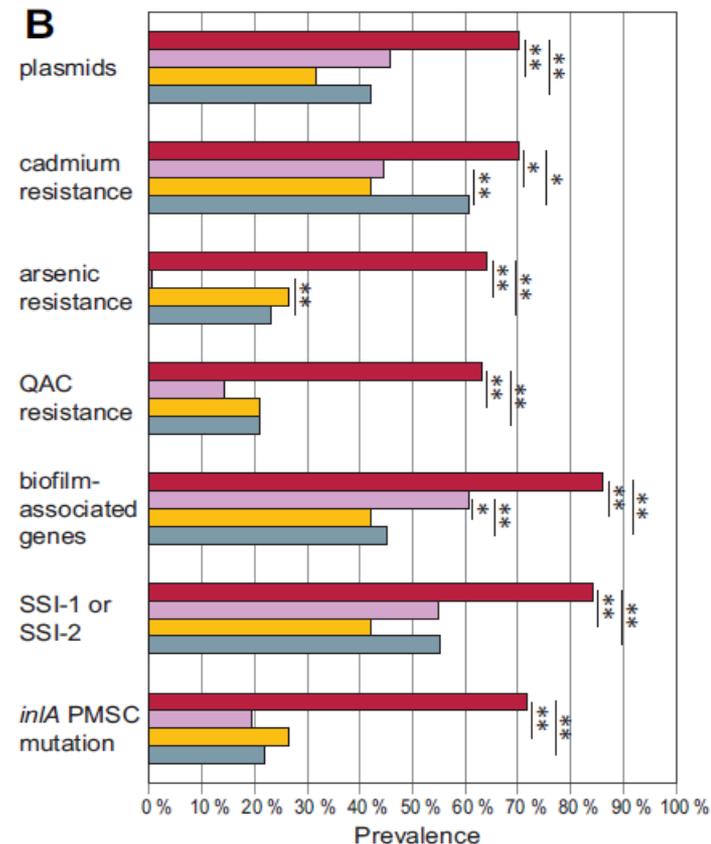


Feintypisierung – Was ist möglich?

Nachweis von Resistenz/Persistenz/Virulenz vermittelnden Genen



Fagerlund et al. (2022) Appl Environ Microbiol



Vorteile der Feintypisierung

Wir sehen Zusammenhänge, welche wir vorher nicht gesehen haben:

- Informationen über **Verwandtschaftsverhältnisse** und –grade zwischen Isolaten
 - Persistenz erkennen und verhindern
 - Frühzeitiges Eingreifen möglich z.B.
 - Anpassung R/D Regime
 - weiteres Hygienemanagement
 - ggf. Eintragsquelle erkennen und eliminieren
 - z.B. über Stufenkontrollen und epidemiologische Untersuchungen



Vorteile der Feintypisierung

Wir sehen Zusammenhänge, welche wir vorher nicht gesehen haben:

- Informationen über **Pathogenitäts-, Virulenz-, Resistenzfaktoren, Biofilmbildung**
 - Maßnahmen ableitbar für Vermeidung/Bekämpfung im Betrieb
 - z.B. Anpassung des R/D Regimes
 - Hygienemanagement

=

Schutz des Verbrauchers vor Infektion mit *Listeria monocytogenes* durch Lebensmittel



Zusammenfassung

- ✓ Vorkommen von *Listeria monocytogenes* in Betrieben sicher durch Tupferproben von Fußbodenbereichen und Fußbodeneinläufen nachzuweisen
- ✓ alleinige Entnahme an anderen Stellen ist nicht ausreichend
- ✓ Erkennen und Ausschalten von persistenten Kontaminationen in Betrieben durch Feintypisierung

Ergreifen von wirksamen Maßnahmen in Betrieben vor Ort durch die amtliche Überwachung



**Schutz des Verbrauchers vor Infektion mit
Listeria monocytogenes durch Lebensmittel**

Vielen Dank für Ihre Aufmerksamkeit!

