

DIPLOMARBEIT

Der Vergleich verschiedener chromogener Nährmedien für den Nachweis von *Listeria monocytogenes* in Lebensmittel unter Verwendung von Chromoplate Listeria Selektiv Agar, PALCAM Agar sowie Ottaviani Agosti ready-to-use agar plates.

angestrebter akademischer Grad

Magistra der Naturwissenschaften (Mag. rer. nat.)

Verfasserin: Elisabeth Lintner

Matrikel-Nummer: 0205060

Studienrichtung: Ernährungswissenschaften

Betreuer: Univ. Prof. Dr. M. Manafi

Wien, 01.02.2010

Danksagung

Diese Diplomarbeit wurde am Hygiene Institut der Medizinischen Universität Wien, in der Abteilung Lebensmittelhygiene, unter der Leitung von Univ. Prof. Dr. M. Manafi, durchgeführt.

Hiermit möchte ich mich bei Univ. Prof. Dr. M. Manafi für die Zuweisung des Diplomarbeitsthemas und für die Betreuung bedanken. Während der gesamten Aufarbeitung der Diplomarbeit stand er mir stets mit kompetenten Rat zur Seite.

Danke an das gesamte Personal des Hygiene Instituts, die mir mit Rat und Tat zur Seite gestanden sind.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung und Fragestellung	1
2. Literaturüberblick	3
2.1 Einführung.....	3
2.1.1 Geschichte.....	3
2.1.2 Der Organismus <i>Listeria monocytogenes</i> und seine Charakteristiken.....	4
2.1.3 Verbreitung von <i>Listeria monocytogenes</i>	11
2.2 Pathogenese und Erkrankungen.....	14
2.2.1 Listeriolysin.....	14
2.2.2 Listeriose.....	17
2.2.2.1 Epidemiologie	17
2.2.2.2 Charakteristiken.....	22
2.2.2.3 <i>L.monocytogenes</i> während der Schwangerschaft.....	24
2.2.2.4 <i>L.monocytogenes</i> bei immunsupprimierten Personen.....	27
2.3 <i>L. monocytogenes</i> in Lebensmittel.....	29
2.3.1 <i>L.monocytogenes</i> in Milch und Milchprodukten.....	29
2.3.2 <i>L.monocytogenes</i> in Fischprodukten.....	31
2.3.3 <i>L.monocytogenes</i> in „ready-to-eat“ Produkten (RTE).....	34
3. Material und Methoden	36
3.1 Untersuchungsmaterial.....	36
3.1.1 Lebensmittelproben.....	36
3.2 Methodik.....	37
3.2.1 Nachweisverfahren für <i>L.monocytogenes</i> in Lebensmittel.....	37
3.2.2 Entwicklung verschiedener Methoden.....	37
3.2.2.1 Nährmedien.....	37
3.2.2.2 Aktuelle konventionelle Methoden.....	40
3.2.2.3 Rapid - Test Systeme.....	43
3.2.2.4 Konventionelle Methoden zum Nachweis von <i>L.monocytogenes</i>	44
3.2.2.5 Nährmedien.....	45
3.2.2.5.1 Fraser-Anreicherungsbouillon (½).....	45
3.2.2.5.2 Voll-Fraser–Anreicherungsbouillon	47
3.2.2.5.3 PALCAM - <i>Listeria</i> -Selektiv Agar.....	48

3.2.2.5.4 Chromoplate Listeria Selektiv Agar Basis nach OTTAVIANI und AGOSTI (ISO 11290).....	50
3.2.2.5.5 Blutplatten.....	52
3.2.2.5.6 ALOA - Agar.....	53
3.2.3 Verwendete Nährböden und Geräte.....	57
3.2.4 Probenteilung.....	58
3.2.5 Kontamination mit Referenzstämmen.....	58
3.2.5.1 Referenzstämmen.....	59
3.2.5.2 Kontaminationsvorgang.....	60
3.2.5.3 Erstellen einer Verdünnungsreihe.....	61
3.2.6 Konventionelle Methode.....	62
3.2.6.1 Untersuchung der Lebensmittelprobe – grafischer Überblick	62
3.2.6.2 Die Methode mit Ottaviani Agosti ready-to-use agar plates und Chromoplate Listeria agar – grafischer Überblick.....	64
3.2.6.3 API Listeria Identifikationssystem.....	67
4. Ergebnisse	70
4.1 Auswertung der Lebensmitteluntersuchungen	70
4.1.1 Probenverteilung.....	70
4.1.2 Probenbeurteilung.....	71
4.1.3 Auswertung der nativen Lebensmittelproben.....	73
4.1.3.1 Gesamtauswertung.....	73
4.1.3.2 Rohmilchkäse.....	74
4.1.3.3 Gemischtes Faschiertes.....	75
4.1.4 Auswertung der absichtlich kontaminierten Lebensmittelproben.....	75
4.1.5 Auswertung der Referenzstämmen.....	76
4.1.5.1 Erscheinungsbild von Listeria monocytogenes auf den verschiedenen Nährmedien.....	76
4.2 Auswertung der Wiederfindungsraten	79
4.2.1 Wiederfindungsrate mit ATCC5579.....	79
4.2.2 Wiederfindungsrate mit ATCC7644.....	81
4.2.3 Wiederfindungsrate mit DSM20600.....	82
5. Diskussion	83

6. Zusammenfassung	86
7. Summary	87
8. Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen	88
9. Anhang	91
10. Literatur	93
11. Lebenslauf	101

1. Einleitung und Fragestellung

Der Mikroorganismus *Listeria monocytogenes* ist seit mehr als 100 Jahren bekannt. Seither kommt es weltweit immer wieder zu Erkrankungen und Infektionen. Dieses grampositive, stäbchenförmige Bakterium ist unter den insgesamt 6 Species *Listeriae* für Mensch und Tier pathogen, kältetolerant und resistent, kommt ubiquitär in der Natur vor und stellt daher auch ein erhöhtes Gefahrenpotential für eine Infektion dar.

Diagnostisch genutzt wird seine Eigenschaft zur β -Hämolyse, welche bei allen *Listeria monocytogenes*-Stämmen nachweisbar ist. Dieses auch Listeriolysin O genannte Hämolysin ist auch der Hauptvirulenzfaktor für seine Pathogenität.

Das Krankheitsbild der durch *Listeria monocytogenes* hervorgerufenen Listeriose betrifft vor allem Individuen mit erhöhter Abwehrschwäche, Säuglinge und Kleinkinder, Personen im hohen Alter, Schwangere und auch Immunsupprimierte wie bsp. bei einer HIV-Infektion. Weiters betroffen sind Diabetiker, Alkoholranke, Mangelernährte, sowie auch Transplantationspatienten.

Die Mehrheit der Menschen jedoch entwickelt eine natürliche Immunität gegen diesen Erreger.

Listeriose Ausbrüche äußern sich in einzelnen Fällen durch eine grippeähnliche Symptomatik, bei mit hoher Keimzahl verunreinigten Lebensmittel kann es auch zu Gastroenteritiden, in schweren Fällen auch zu Störungen des Zentralnervensystems kommen, manchmal sogar mit Todesfolge.

Dokumentiert sind in Deutschland 2006 508 Listeriosefälle und 2007 510. In Österreich wurden im Zeitraum von 2000 bis 2006 insgesamt 85 Krankheitsausbrüche gezählt, 2007 20 Erkrankungen und 2008 31, wobei NÖ mit 7 Fällen am häufigsten betroffen war. Bei Schwangeren gab es 2008 4 Listerioseerkrankungen, davon verstarb eine Mutter am dritten Tag nach der Entbindung. Insgesamt betrug die Letalität 2008 19% [WEWALKA, 2008].

Trotz aller gesetzten präventiven Maßnahmen ist es von größter Wichtigkeit *Listeria*

monocytogenes schnell und eindeutig aufzuspüren, nachzuweisen und zu identifizieren um Kontaminationen bzw. eine Erkrankung zu verhindern.

Die vorliegende Studie sollte daher prüfen, ob sich im Handel frei erhältliche Lebensmittel, wie Rohmilchkäse und gemischten Faschiertem *L.monocytogenes* nachweisen lässt.

Dazu wurden insgesamt 50 der Lebensmittelproben zu gleichen Teilen untersucht. Drei verschiedene *Listeria monocytogenes*-Stämme standen als Kontrolle zur Verfügung.

Zur Detektion wurden die Nährböden PALCAM Agar, Ottaviani Agosti ready-to-use agar plates und Chromoplate Listeria Selektiv Agar verwendet und auf Anwuchs und Anwuchsverhalten getestet.

2. Literaturüberblick

2.1 Einführung

Beim Mikroorganismus *Listeria monocytogenes* handelt es sich um ein Bakterium, welches hauptsächlich durch verunreinigte Lebensmittel zu einer Reihe von spontanen und oftmals auch lebensbedrohenden Krankheitsausbrüchen führen kann.

Innerhalb der bekannten 6 Arten des Genus *Listeria*, ist *Listeria monocytogenes* lebensmittelhygienisch die bedeutendste humanpathogene Art. Der ausschlaggebende Grund ist die extreme Kältetoleranz des Erregers. *Listerien* können sich auch bei Temperaturen unter 0° Celsius vermehren, sie sind psychrophil (kälteliebend). Dabei ist wichtig zu wissen, dass sich der Mikroorganismus im Kühlschrank vermehren und somit Infektionen wie die bekannte Listeriose beim Menschen verursachen kann [BÜLTE, 2008].

Um spontane oder lebensbedrohende Infektionen von *Listeria monocytogenes* zu vermeiden, ist es von besonderer Bedeutung die Charakteristika des Erregers (Listeriose), wie die Verbreitung des Erregers in der Natur und das Verhalten in Lebensmittel zu verstehen.

2.1.1 Geschichte

Listeria monocytogenes trat erstmals im Jahre 1891 in der wissenschaftlicher Literatur auf, in Frankreich wurden kleine, grampositive, stabförmige Mikroorganismen in menschlichen Geweben untersucht. 1911 berichtete HÜLPHERS [HÜLPHERS, 1911] in Schweden über die Anwesenheit von grampositiven, stabförmigen Mikroorganismen in der Leber von Kaninchen und nannte sie *Bacillus hepatis*.

1926 wurde der Organismus *Listeria monocytogenes* an der Cambridge Universität in England komplett von MURRAY [MURRAY et al., 1926] charakterisiert. Während der Untersuchung einer Epidemie bei Kaninchen und Meerschweinchen wurden auch

Versuchstiere mit dem Erreger infiziert. Die Infektion induzierte eine ausgeprägte Monozytose und führte zu hepatischen Läsionen. Somit wurde dem Erreger der Name *Bacterium monocytogenes* gegeben.

Ein Jahr später isolierte PIRIE [1940] in Süd Afrika einen kleinen, grampositiven *Bazillus* aus der Leber von afrikanischen Wüstenrennmäusen (Gerbil), den er *Listerella hepatolitica*, zu Ehren von Lord Lister, einem anerkannten Arzt, nannte.

Im selben Jahr wurde der Name *Listeria monocytogenes* als Gattungsname für diesen Mikroorganismus vorgeschlagen [GRAY und KILLINGER, 1926].

2.1.2 Der Organismus *Listeria monocytogenes* und seine Charakteristiken

Listerien sind grampositive, relativ kurze, Katalase-positive und Oxidase-negative Stäbchenbakterien, die fakultativ aerob wachsen. Sie sind peritrich begeißelt, welches es ihnen ermöglicht, sich in einer relativ engen Spanne von 20° bis 25° Celsius „taumelnd“ zu bewegen. Sobald die Temperatur mehr als 30° Celsius beträgt, ist die Produktion der sogenannten Flagellaten vermindert und sind sie somit wenig bzw. unbeweglich.

Unter dem Mikroskop erscheinen *Listerien* in einer Größe von 0,5 x 0,5 bis 2,5 µm, sie bilden weder Sporen noch Kapseln und können entweder einzeln, in Gruppen oder auch in kurzen Ketten vorliegen. In Cerebrospinalflüssigkeiten neigen sie auch zu einer kokkoide Form (0,5 x 0,5 bis 0,6 µm) oder können auch gramnegativ erscheinen, wenn Kulturen älter sind und eine Größe von 10µm aufweisen [BÜLTE, 2008].

Es gibt in der Gattung *Listeria* **6 Spezies**:

L.monocytogenes, *L.innocua*, *L.ivanovii*, *L.welshimeri*, *L.seeligeri* und *L.grayi*. *L.ivanovii* hat zusätzlich 2 Unterarten, nämlich *L.ivanovii subsp. ivanovii* und *L.ivanovii subsp. iondoniensis*. Während *L.monocytogenes* pathogen in Menschen und Tieren ist, ist *L.ivanovii* pathogen in Tieren. Die anderen Arten gelten als apathogen. *L.seeligeri* gehört eigentlich zu den apathogenen Stämmen, allerdings besitzt es einen Teil des Virulenz Gen Klusters, der in *L.monocytogenes* und *L.ivanovii* enthalten ist.

Generell sollten jedoch alle der genannten Stämme als potenziell pathogen angesehen werden, allerdings existieren deutliche Unterschiede in ihrer Virulenz. Die Kriterien einer Pathogenität oder Apathogenität wird diagnostisch durch die β -Hämolyse (auch Listeriolysin O genannt) gekennzeichnet, die bei allen bedenklichen Stämmen nachweisbar ist und das Hauptvirulenz der pathogenen Stämme darstellt. Sind Stämme nicht-hämolysierend, können sie als apathogen eingestuft werden. *L. monocytogenes* hat 13 deutlich O-antigenetische Muster, die folgende Serovare beinhalten: 1/2a, 1/2b, 1/2c, 3a, 3b, 3c, 4a, 4b, 4c, 4d, 4e, 4ab und 7. *L. monocytogenes* werden in drei Linien eingeteilt, basierend auf den Zusammenhängen mit Erkrankungen. Linie I, dazu gehören die Serovare 1/2b, 3b, 4b und 4e, hat die höchste Pathogenität und ist mit 98% am häufigsten für epidemische Erkrankungen verantwortlich. Serotyp 4b ist am deutlichsten virulent und führt mit 33-50% am häufigsten zu Listeriose Erkrankungen verantwortlich. Linie II, dazu gehören die Serovare 1/2a, 1/2c, 3a und 3c, hat ein dazwischenliegendes pathogenes Potential und ruft sporadische Erkrankungen hervor. Schlussendliche Linie III, dazu gehören die Serovare 4a und 4c, haben eine niedrige Pathogenität [BÜLTE, 2008; BHUNIA, 2008; CLIVER und RIEMANN, 2002].

Da *Listeria monocytogenes* keinerlei hohe Nähransprüche stellt, gilt er als oligotroph. Es handelt sich um einen relativ resistenten und widerstandsfähigen Mikroorganismus, wobei es ihm möglich ist unter aeroben als auch anaeroben Bedingungen zu wachsen. Erwähnenswerte Beispiele wären stehende Gewässer, tiefe Erdbodenschichten, Stroh und trockener Fäzes [BÜLTE, 2008].

Wie resistent dieser Erreger ist, zeigt eine Studie von CONE et al. aus dem Jahr 2008. Rückblickend auf diese Studie ist zu erwähnen, dass in den letzten 22 Jahren 14 hauptsächlich ältere Patienten mit dieser Infektion in ein Wüstenspital südwestlich von Südkalifornien gebracht wurden. Blutagar wurde mit dem Blut, Cerebrospinalflüssigkeit oder Gelenkflüssigkeit dieser Patienten beimpft und täglich auf ein Erregerwachstum beobachtet. Durch weitere biochemische Reaktionen konnte der Erreger identifiziert werden.

Die Ergebnisse der genannten Studie zeigten, dass im Gegensatz zu anderen Autoren, welche Meningitis und Bakteriämie in 75% fanden, die Infektion mit Meningitis und

Bakteriämie in lediglich 36% auftrat. Betroffen waren vor allem Patienten, welche an Erkrankungen wie Gehirnabszesse, prothetischen Gelenksentzündungen und Aneurysmen litten. 35% der Patienten starben an Listeriose. Bei Patienten mit Bakteriämie oder Meningitis gab es keine Todesfälle. In der Wüste Südkaliforniens zeigt sich die Listeriose gewöhnlich als Bakteriämie oder Meningitis, hervorgerufen durch verunreinigte Lebensmittel [CONE et al., 2008].

Listerien können bei Temperaturen zwischen - 4° und bis + 50° Celsius wachsen, wobei die Maximaltemperatur bei 24° und das Optimum zwischen +30° und +37° liegt. Wichtig ist, dass die nicht nur bei Kühl- und Gefriertemperaturen überdauern, sondern unter diesen Bedingungen auch wachsen.

Abhängig von extrinsischen sowie intrinsischen Faktoren vermehren sich *Listerien* unterschiedlich stark. Lebensmittel sollten daher generell bis zum Mindesthaltbarkeitsdatum verzehrt werden, um eine mikrobielle Kontamination zu vermeiden. Mit steigender Lagerungsdauer wächst auch die Gefahr des Verderbs und steigt drastisch an, wenn Lebensmittel mit Erregern kontaminiert sind. Um eine eventuelle Kontamination mit *Listeria monocytogenes* zu vermeiden, ist bsp. ein niedriger pH-Wert sinnvoll [BÜLTE, 2008].

Aus Tabelle 1 ist ersichtlich, dass *Listeria monocytogenes* oft bei Kühltemperaturen und auch Gefriertemperaturen über das Mindesthaltbarkeitsdatum hinaus überleben kann. Dies zeigt deutlich, wie resistent der Mikroorganismus ist.

Lebensmittel	Lagerung (°C)	Überlebenszeit	Literatur
Rinderhackfleisch	4	> 14 Tage	ICMSF (1996)
Hackfleisch	-18	> 6 Monate	BÜLTE (2008)
Leber	4	> 40 Tage	BÜLTE (2008)
Rohwurst	4,4	> 42 Tage	BÜLTE (2008)
Eiscreme	-18	> 5 Monate	LUND (2000)
Butter	6,5-7,2	> 120 Tage	MAIJALA (2001)

Tabelle 1: Überlebenszeiten von *Listeria monocytogenes* in Lebensmittel bei unterschiedlichen Lagerungstemperaturen [BÜLTE, 2008]

Die Generationszeit ist bei *Listerien* im Gegensatz zu anderen psychrophilen Bakterien

relativ lange, sie beträgt bei +5° Celsius 13 bis 25 Stunden (psychrophile *Enterobacteriaceae* beträgt sie 8 bis 12 Stunden). Bei 10° Celsius bis 13° Celsius beträgt sie noch 5 bis 9 Stunden, bei 35° Celsius, ab der das Bakterium unbeweglich ist, nur mehr 0,6 Stunden. Bei kühleren Temperaturen wie 0° bis +1° Celsius beträgt sie 62 bis 131 Stunden [KRÄMER, 2007].

Listerien können bei einem relativ breiten pH-Bereich wachsen, zwischen pH 4,5 bis 9,6. Das Optimum liegt bei pH 7,0. Beträgt der pH-Wert < 3,5 wird der Mikroorganismus abgetötet.

RITZ et al. [2008] ermittelten in einer Studie den Effekt von Temperaturen unter 0° Celsius, pH-Wert und Hochdruck auf das Überleben von *Listeria monocytogenes* in geräuchertem Lachs. In den letzten 15 Jahren wurden neue Technologien entwickelt, um den Lebensmittelverderb und die Anzahl an pathogenen Mikroorganismen durch die Anwendung von Hochdruck zu verhindern. Da *Listeria monocytogenes* bei Kühlschranktemperaturen überleben kann, führt der Gefrierprozess zu keiner Abnahme des Erregers. Ziel dieser Studie war eine Aussage zu treffen, ob die Kombination von Hochdruck und Temperaturen unter 0° Celsius deren Anzahl in geräuchertem Lachs vermindern kann. Dazu wurden die Effekte von Hochdruck (100, 150 und 200 MPa) kombiniert mit -10° Celsius, -14° Celsius und -18° Celsius und pH-Wert 7,0 und 4,5 untersucht. Die Resultate zeigten, dass 200 MPa, -18° Celsius und pH 4,5 am effektivsten waren *Listeria monocytogenes* zu inaktivieren [RITZ et al., 2008].

Fleischwaren und Fleischerzeugnisse mit einem pH-Wert 5,0 bis 5,6 sind in der Lage, die Säureempfindlichkeit von *Listerien* zu reduzieren, also die Säuretoleranz zu steigern.

Durch Adaptionsprozesse ist es dem Mikroorganismus möglich auch bei relativ niedrigen pH-Werten zu überleben. Dieses Phänomen wird auch als *stress hardening* bezeichnet und „tritt nach Anpassung der Erregerzellen an unwirtliche Umgebungsbedingungen auf [BÜLTE, 2008].“

Auch durch Zusatz von Salz, beim Kühlen oder bei Trocknungsvorgängen kann *stress hardening* auftreten. Dadurch ist es *Listerien* möglich auch in säurehaltigen

Lebensmittel über einen längeren Zeitraum zu überleben. Säureresistente *Listerien* zeigen außerdem eine höhere Virulenz als Säureempfindliche.

HILL und GAHAN [1996] haben schon im Jahre 1966 gezeigt, dass die Exposition von *Listeria monocytogenes* bei pH 5,5 in einer relativ kurzen Zeit (1 Stunde) dazu führen kann, dass die Zellen bei einem pH von 3,5, welcher unter diesen Umständen normalerweise zum Absterben führen können, überleben können. Bakterien, auch jene, die durch Lebensmittel übertragen werden, haben im Laufe der Zeit ein ausgeklügeltes genetisches System entwickelt, welches Proteine kodiert, die dann den Bakterien das Überleben in einer unwirklichen Umgebung erlaubt. In der oben genannten Studie wurde das Überleben von adaptierten und nicht-adaptierten Bakterien in unterschiedlichen säurehaltigen Lebensmittel wie Joghurt und Hüttenkäse untersucht. Es zeigte sich, dass säure-adaptierte Bakterien ein verbessertes Überleben gegenüber Lebensmittel hatten, die einen niedrigen pH-Wert aufwiesen, wie bsp. Orangensaft oder Salat Dressing. In Lebensmittel, die einen höheren pH-Wert aufwiesen, darunter Mozzarella oder Hüttenkäse, traten keine Säure-Adaptionsprozesse auf, welche das Überleben gesteigert hätten [HILL et al., 1996; LABBÉ und SANTOS, 2001].

Eine weitere wichtige Rolle in der Vermehrung von pathogenen Mikroorganismen wie *Listeria monocytogenes* spielt der aw-Wert. Laut Definition handelt es sich beim aw-Wert, dem *Activity of Water*, um das Maß für frei verfügbares Wasser in einem Material. Potentiell gefährliche Bakterien benötigen für ihre Stoffwechselvorgänge frei verfügbares Wasser. Das optimale Wachstum für Mikroorganismen liegt bei einem aw-Wert zwischen 0,9 bis 1,0. Dadurch kann das Lebensmittel schneller verderben und/oder einen Wachstumsherd für potentiell gefährliche Bakterien darstellen.

Listeria monocytogenes benötigt einen aW-Wert von 0,92.

Der Wasseranteil von Weichkäse liegt bei ca. 50-60%, zudem kann Weichkäse unter anderem aus Rohmilch hergestellt werden, das eine weitere wichtige Infektionsquelle für *Listeria monocytogenes* darstellen kann. Während der Reifeperiode von Weichkäse, der einen hohen aw-Wert hat, sinkt der pH-Wert stetig und in weiterer Folge zu einer Entsäuerung. Sind *Listerien* enthalten, können sie sich unter solchen Umständen relativ leicht vermehren. Weichkäse wird oft mit einer speziellen Bakterienkulturen wie

Rotschmiere behandelt bzw. „geschmiert“ und entwickeln dann auch einen Außenschimmel.

Grundsätzlich sind alle geschmierten Weichkäsesorten besonders anfällig, auch jene, die eine schmierige Oberfläche aufweisen. Wegen der Säureempfindlichkeit von *Listerien* und ihrer Fähigkeit unter aeroben und anaeroben Bedingungen zu wachsen, besiedeln sie hauptsächlich oder ausschließlich die Käserinde. Auf den Genuss dieser sollte aus diesem Grund eventuell verzichtet werden [BÜLTE, 2008].

Eine Studie aus Italien von CATALDO et al. aus dem Jahr 2007 untersuchte unter anderem die Überlebensmöglichkeiten von *Listerien* in italienischen Weichkäse mit hohen Salz- und niedrigen pH-Wert. *Listerien* sind relativ widerstandsfähig gegenüber Salzen und erst ab einer Konzentration von > 10% Natriumchlorid werden sie gehemmt. Beurteilt wurde erstens in vitro das Überleben, Säuretoleranz, Produktion von Biofilmen und die Möglichkeit in Zellen des Intestinaltrakts einzudringen, in einem zweiten Schritt wurde während einer Lagerung bei +4° Celsius das Überleben von säure-adaptierten und nicht-adaptierten *Listerien* in einen künstlich kontaminierten italienischen Weichkäse kontrolliert. Die Ergebnisse zeigten, dass durch die Kontamination mit säure-adaptierten und nicht-adaptierten Bakterien gute Überlebenschancen auftraten. Auch der pH-Wert oder der Salzgehalt des Lebensmittels führten nicht dazu, dass sich keine *Listerien* finden ließen. Aus dieser Studie ging hervor, dass manche italienische Weichkäsesorten eine potentielle Gefahr darstellen können, mit *Listerien* kontaminiert zu sein [CATALDO et al., 2007].

Heutzutage ist es möglich gezielt Kulturen zu verwenden, die das Wachstum von *Listeria monocytogenes* verhindern können, also eine bakterizide oder bakteriostatische Wirkung aufweisen. Diese sogenannten Bakterizide sind proteinogene Toxine oder antimikrobielle aktive Proteine und Peptide, die ubiquitär vorkommen und natürliche Antibiotika darstellen, um infektiöse Erkrankungen zu bekämpfen. Sie werden von Bakterienstämmen abgesondert, um das Wachstum anderer Arten zu unterdrücken. In Einzellern haben sie die Funktion, konkurrierende Spezies zu unterdrücken, um deren Wachstum zu hemmen [SANG, 2008].

Die wesentliche Wirkung von Bacteriocinen besteht darin, die bakteriellen Zellwände

zu schädigen oder auch wie im Falle des peptidantibiotischen Bacitracins, die Biosynthese der Zellwand zu hemmen. Generell können Bacteriocine in drei Gruppen eingeteilt werden:

- Klasse I: Lantibiotika (ungefähr 3 kDa wie bsp. das Nisin)
- Klasse II: kleine, hitzestabile Peptide (<30 kDa)
- Klasse III: große, hitzeempfindliche Proteine (>30 kDa)

[BÜLTE, 2008; BIERBAUM, 1999]

Nisin wird vom Milchsäurebakterium *Lactococcus lactis* erzeugt und ist der Prototyp der lantobiotischen Gruppe antimikrobieller Peptide. Es weist ein breites Wirkungsspektrum auf und ist in der Lage grampositive Bakterien zu hemmen, das in Bezug auf pathogene Mikroorganismen sowie klinisch relevante Antibiotika-resistente Bakterien eine wichtige Rolle spielt. Nisin wird in vielen Ländern als Konservierungsmittel mit der Nummer E234 in verschiedensten Lebensmittel eingesetzt und gilt als nicht-toxisch für den Menschen [BIERBAUM, 1999; FIELD et al., 2008].

In einer Studie von OLASUPO et al. [2004] wurde die antimikrobielle Aktivität von Nisin allein und in Kombination mit natürlichen organischen Verbindungen wie Carvacrol, Zimtsäure, Eugenol, Diacetyl und Thymol u.a. bezüglich des Wachstums von *L.innocua* untersucht. Es zeigte sich, dass es durchaus sehr effektiv ist, all die Komponenten zusammen mit Nisin zu verwenden, um das Wachstum pathogener Mikroorganismen in Lebensmittel zu verhindern.

Es gibt zudem weitere Indikationen, dass auch Gewürze antimikrobielle Wirkungen gegen pathogene Mikroorganismen wie *L.monocytogenes* haben. Darunter zum Beispiel Pfeffer, Knoblauch, Paprika.

2.1.3 Verbreitung von *Listeria monocytogenes*

Aufgrund der Tatsache, dass *Listeria monocytogenes* überall in der Natur vorkommt bsp. im landwirtschaftlichen Nutzungsbereich wie Erdboden, Wasser, mit Luftsauerstoff reagierenden Silagen, Pflanzen wie im Wald oder auf Feldern, auch in Abwasser, Lebensmittel wie Milch, menschlichen und tierischen Fäzes sowie morscher Vegetation, ist es nicht verwunderlich, dass der Erreger auch seinen Weg in landwirtschaftliche Nutztiere wie Rinder, Schafe, Geflügel, Fische, Ziegen, auch Schweine, findet. Sogar bei Haustieren wie Hund, Katze, Kaninchen kann der Erreger vorkommen und eine große Gefahr darstellen. In Wildtieren (Fuchs, Hirsch u.s.w.) hingegen wird der Erreger eher seltener gefunden. Weitere mögliche Wirtstiere wären Vögel, Geflügel wie Ente, Gans, Pute, sogar Insekten wie Ameisen oder Fliegen. *Listeria monocytogenes* gelangt mit dem Kot von infizierten Tieren auf die Felder und kann sodann aufgrund seiner relativ großen Widerstandskraft für lange Zeit dort verweilen und sich auch vermehren [BÜLTE, 2008].

Da *Listeria monocytogenes* überall auf der Erde vorkommt, ist er auch in allen rohen Lebensmittel zu finden (Meerestiere wie Muscheln, Fleisch, Milch, Gemüse, Geflügel).

Insbesondere Silagen stellen eine große Infektionsquelle für Nutztiere dar und in weiterer Folge eine Gefahr für den Menschen, sobald der Erreger seinen Weg in die Nahrungsmittelkette gefunden hat. Die Anwesenheit von *Listerien* in Silagen sind stark pH abhängig, Proben mit einen pH-Wert von 5,0-6,0 oder höher sind stärkere Quellen für *Listerien* als Proben mit einen pH-Wert unter 5,0 [LABBÉ und SANTOS, 2001].

Das Kontaminationsrisiko in Silagen ist besonders hoch, wenn Erde darin enthalten ist. Beträgt der Aschegehalt mehr als 70 mg/kg Trockenmasse weist das auf eine Kontamination der Silage hin. Die Erde kann auch durch Maulwurfshügel auf den Feldern eingebracht werden oder wenn die Ernte zu kurz während regnerischen Wetter geschnitten wird. Eine Kontamination der Silage durch die Erde wird oft in der Nähe von Bodengruben beobachtet, wenn Traktoren mit erdigen Reifen für den Abtransport der Masse verwendet wird. Wegen der geringeren Dichte und höheren Risiko einer

mechanischen Schädigung der Plastikhülle, stellen große Ballen von Silagen ebenso eine große Infektionsquelle dar. An der Oberfläche der Ballen können sich die Mikroorganismen besser vermehren, da dort die aeroben Bedingungen für das Wachstum gegeben sind. Listerioseausbrüche können allerdings auch dann auftreten, wenn auch nicht mit Silagen gefüttert wird, sondern mit Futter niedriger Qualität oder verrotteter Vegetation [BRUGÈRE-PICOUX, 2008].

BRUGÈRE-PICOUX [2008] berichtet in einer Studie aus 2008, dass *Listeria monocytogenes* in Silagen und Fäzes gesunder Tiere vorkommen und unter bestimmten Bedingungen der Erreger pathogen werden kann und Listeriose auslöst. Listeriose kommt vor allem bei Wiederkäuern vor, die Tiere infizieren sich hauptsächlich durch kontaminierte Silagen. Der Erreger breitet sich vor allem entlang der Hirnnerven V (Nervus trigeminus) und XII (Nervus hypoglossus) und den Lymphgefäßen aus und zeigt durch die entstehende Listeriose typischen Symptome wie vestibuläre Ataxie, Kreise ziehen, Schiefelage des Kopfes und Defizite der Schädelnerven. Andere klinische Symptome der Listeriose wären Sepsis, Fehlgeburt, Mastitis und Gastroenteritis. Wichtig ist, dass eine Diagnose nicht nur bei schon erkrankten Tieren mit typischen Symptomen gestellt wird, sondern auch bei gesund erscheinenden Tieren, welche den pathogenen Erreger über Fäzes, Urin, Fehlgeburten und Milch ausscheiden können. Entscheidend ist, mit der Behandlung sehr früh zu beginnen, um ein grobes Fortschreiten der Erkrankung zu verhindern. Antibiotika sollten über einen längeren Zeitraum verabreicht werden. Am besten wäre es die Tiere bereits vor dem Ausbruch einer Krankheit zu impfen um sie zu immunisieren [BRUGÈRE-PICOUX, 2008].

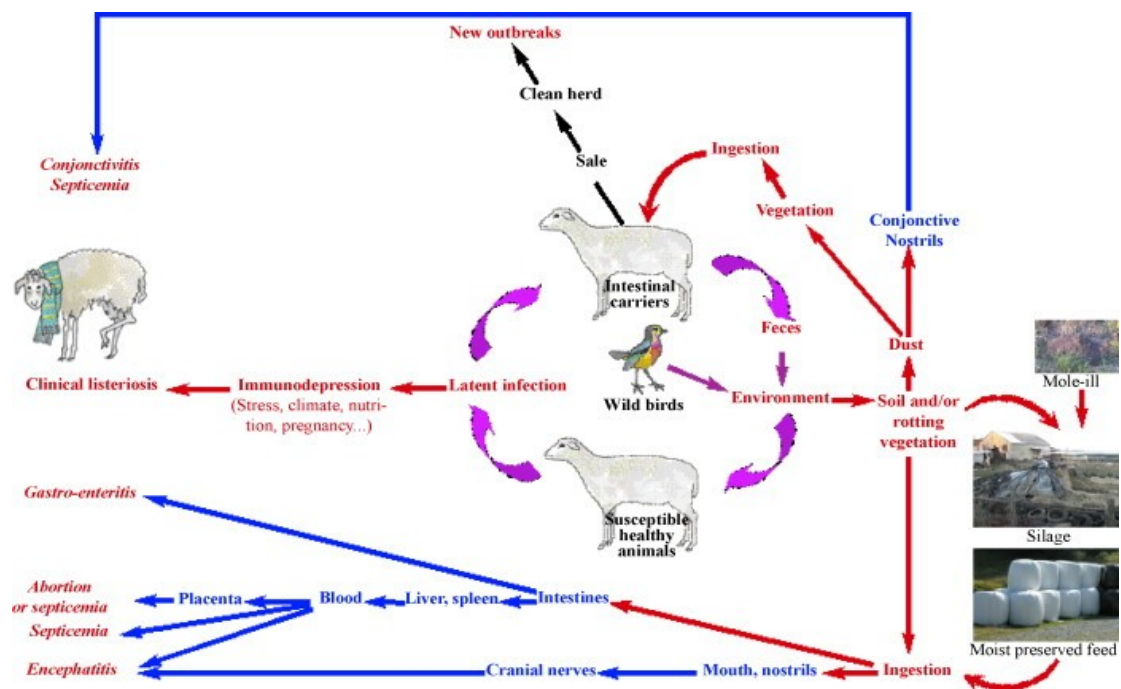


Abbildung 1: Ätiologie und Pathogenese der Listeriose bei Schafen [DENNIS, 1993]

In Abbildung 1 wird deutlich, dass sich durch die ubiquitären Verbreitung von *Listerien* der Erreger wie in einer Kettenreaktion immer weiter verbreiten kann. Es wurde auch beobachtet, dass die Krankheit Listeriose eher im warmen (Europa, Australien, Nord Amerika) als in kalten Klima auftritt. Kommt Listeriose in kälteren Gebieten vor, dann ist das meistens auf die Verwendung von Silagenfutter zurückzuführen. Allein in Frankreich enthielten 4,9% der Fäzes Proben von Schafen und Ziegen *Listeria monocytogenes*. Wilde Vögel können ebenfalls relativ hohe Mengen an *Listerien* beinhalten und vor allem leben diese Tiere häufig in landwirtschaftlichen Gebieten. Dadurch können sie den Erreger mit dem Fäzes auf die Felder, Wiesen, Silagen, Wasser verbreiten. Schafe, die dem Erreger gegenüber exponiert sind, sind Überträger und können ihn über die Milch, Urin etc. weitergeben. Sind bsp. Schafe von dem Erreger befallen, stellen sie eine Gefahr dar, die landwirtschaftliche Farm zu kontaminieren. Bei der gastrointestinalen Form, sowie bei einer septikämischen Erkrankung beträgt die Inkubationszeit 1-2 Tage, bei einer Encephalitis liegt sie bei 4-6 Wochen [BRUGÈRE-PICOUX, 2008].

Bei Ziegen verläuft die Listeriose meist dramatischer als bei Schafen.

Bei der meningoencephalitischen Form oder der *zentralnervöse Form* kommt es aufgrund einer Gehirn-Haut-Entzündung zu neurologischen Ausfällen. Die Symptome wären Drehbewegungen, Herabhängen der Ohren, zitternde Lippen, Zittern der Augen und im fortgeschrittenen Stadium Festliegen in Seitenlage mit Ruderbewegungen. Bei der *metrogenen Form*, ausgelöst von *L.ivanovii*, kommt es zu Fehlgeburten von trächtigen Mutterschafen. Bei der *septikämischen Form* erfolgt eine Ausbreitung der Erreger im Blut und ist durch Fieber, Schwäche, Saugunlust und Durchfall gekennzeichnet. Meistens tritt sie nur sporadisch auf. Es können auch die Milchdrüsen von Muttertieren betroffen sein, führen aber eher selten zu einer klinischen Mastitis. Fehlgeburten ereignen sich meistens im letzten Monat der Trächtigkeit. Es können Fieber, Depressionen oder auch Endometritis auftreten [BRUGÈRE-PICOUX, 2008].

2.2 Pathogenese und Erkrankungen

2.2.1 Listeriolysin

Das pathogene Potential von *L.monocytogenes* wird assoziiert mit der Produktion von Lysteriolysin O (α -Listeriolysin). Listeriolysin ist ein Sulfhydryl (SH-) aktivierendes, porenbildendes Toxin und ist ähnlich zu Streptolysin O und Pneumolysin. Es hat ein Molekulargewicht von 58-60 kDa. Cholesterol dient als Rezeptor und ca. 30-40 Moleküle von Listeriolysin sind notwendig, um eine Erythrozytenzelle zu lysieren. Durch seine lysierende Wirkung auf die Erythrozyten wird es auch Hämolysin genannt und ruft auf einem bluthaltigen Nährboden eine β -Hämolyse hervor [BHUNIA, 2008].

Bei einer Hämolyse wird durch das β -Hämolysin die Erythrozytenwände geschädigt, Hämoglobin tritt aus und diffundiert in die Umgebung. Der Blutfarbstoff ist dann abgebaut und dadurch entsteht eine relativ scharf begrenzte klare Zone im sonst undurchsichtigen Agar. Mit Hilfe der Untersuchung der Anwesenheit des Listeriolysins kann man zwischen pathogenen und apathogenen Stämmen unterscheiden. Apathogene

Stämme sind nicht-hämolysierend.

Listerien dringen durch eine gerichtete Phagozytose in die Wirtszelle ein (bsp. Epithelzellen der Schleimhaut wie Mund, Nase, Augen, Haut und vor allem auch Darmzellen) und verbleiben zunächst in einer Vakuole. Der Erreger befindet sich nun nach Induktion einer eigenen Endozytose im Inneren der Zelle und dadurch versagen sämtliche Abwehrreaktionen der Wirtszelle. Das Listeriolysin spielt in der Pathogenese vor allem für das Überleben der Bakterien im Inneren der Phagozyten eine wesentliche Rolle und hat seine größte Aktivität im sauren Milieu innerhalb der Makrophagen. Das Listeriolysin bildet Poren in den Membranen der Phagosomen und bahnt den Bakterien dadurch einen freien Weg zum Zytoplasma, wo sie sich vermehren können. Gleich im Anschluss kommt es zu einer Polymerisation des Aktins der betroffenen Zelle und mit Hilfe dieses Mechanismus bildet das Bakterium Ausstülpungen und induziert die Aufnahme durch die Nachbarzelle. Somit kommt es zu einer Zell-zu-Zell-Verteilung des Erregers und durch hierbei gebildeten Zellfortsätzen können *Listerien* sämtliche Barrieren überwinden, intrazellulär weiterwandern und in Folge Darmwand, Blut-Hirn-Schranke, Plazenta durchdringen und schlussendlich kann die humorale Abwehr nicht mehr wirken [BÜLTE, 2008].

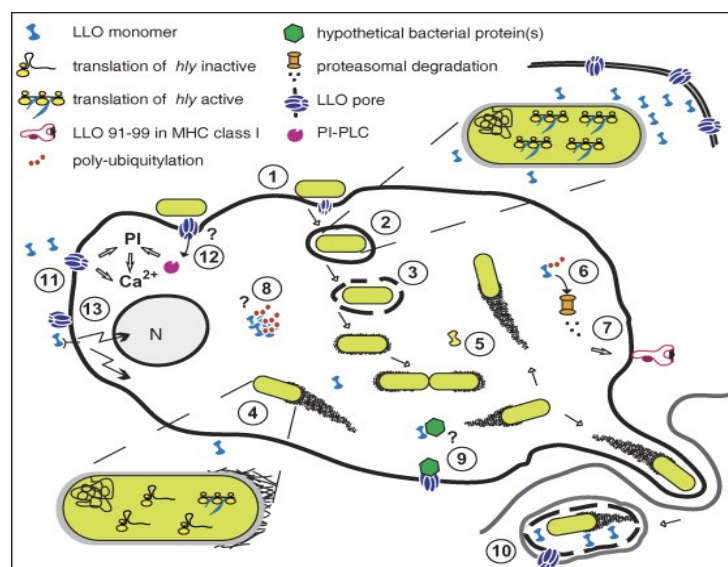


Abbildung 2: Schematic representation of the regulation and activities of LLO during infection [SCHNUPF und PORTNOY, 2007]

(1) Die Aktivität von LLO beeinflusst den Eintritt von *L.monocytogenes* in die Wirtszelle. (2) Regulatorisch vermehrte Expression von LLO bei einer Infektion. Die Aktivität von LLO hemmt die Reifung von Phagosomen und führt zu einem Riss in der phagosomen Membran (3). (4) Im Zytosol der Wirtszelle ist die Translation von LLO limitiert. Die Aktivität von LLO im Zytosol der Wirtszelle wird durch das pH-Optimum von LLO (5) und Ubiquitin-vermittelte Abbau von Wirtsproteosomen kontrolliert (6). (7) Der Abbau von LLO führt zu der Bildung und Präsentation des LLO 91-99 Epitops durch MHC Moleküle der Klasse 1 an der Zelloberfläche. Andere Mechanismen, die eventuell die Toxizität von LLO kontrollieren können wären (8) Denaturierung und die Aggregation von LLO im Zytosol (neutraler pH Wert) und (9) Inaktivierung von LLO Monomeren oder Inaktivität von LLO Monomeren oder Poren (10). LLO vermittelt auch den Riss der sekundären Phagosome nach der Zell-zu-Zell Verteilung (11).

LLO Poren führen zu intrazellulären Ca^{2+} Schwankungen und Stimulationen des phosphoinositidischen Metabolismus und kann PI-PLC durch das Plasma und phagosomalen Membran translozieren (12). Schlussendlich zeigen LLO Monomere, Oligomere und Poren, dass sie häufig zelluläre Antworten in einer Vielzahl von Zelltypen auslösen können (13). Somit stellen *L.monocytogenes* und *L.ivanovii* fakultativ intrazelluläre Parasiten dar, welche sich in den Makrophagen vermehren können.

“N” = Nukleus der Zelle

L.monocytogenes produziert zwei Typen der Phospholipase C:

1. phosphatidylinositol-spezifische Phospholipase C (PI-PLC)
2. phosphatidylcholin-spezifische Phospholipase C (PC-PLC)

Die Phosphatidylinositol-spezifische Phospholipase (PI-PLC) ist an der Lysis der phagosomalen Vakuole beteiligt. Sie stellt keinen eigenständigen Virulenzfaktor dar, korreliert aber gleich stark mit der Produktion des LLO und somit kann der Nachweis des Enzyms ein Hinweis auf einen weiteren möglichen Pathogenitätsfaktor sein.

Beide Typen sind verantwortlich Risse in der Membran hervorzurufen.

PI-PLC ist ein 33-36 kDa großes Enzym und wird zusammen mit Hämolysin exprimiert. Es arbeitet synergistisch mit LLO um die Lipid-Doppelschicht der Phagosomen zu zerstören, sodass *L.monocytogenes* entfliehen kann. Das Substrat für PI-PLC ist Phosphatidylinositol, es hat allerdings keine Aktivität an Phosphatidylethanolamin, Phosphatidylcholin oder Phosphatidylserin [BHUNIA, 2008; BÜLTE, 2008].

2.2.2 Listeriose

2.2.2.1 Epidemiologie

Aufgrund der weiten Verbreitung von *L.monocytogenes* besteht die erhöhte Gefahr einer Infektion, welche sporadisch und in kleinen Epidemien weltweit vorkommt. Die Listeriose gehört zu den Krankheiten, die eine der größten Raten an Todesfällen aller lebensmittelbedingten Infektionen hat (20-30%). Man kann sogar von einem epidemischen Potential sprechen. Die Veränderung der Lebensmittelproduktion, deren Verbreitung und Lagerung haben dazu geführt, dass sich die Listeriosefälle in vielen Ländern der Welt verstreut und ausgebreitet haben [De VALK et al., 2005].

In Deutschland ist eine Listeriose Erkrankung seit 2001 meldepflichtig und die Listeriose Inzidenzen (Neuerkrankungen an Listeriose pro 1,000,000 Bewohner pro Jahr) sind von 0,26 pro 100,000 Einwohner (217 Fälle) im Jahr 2001 auf 0,62 pro 100,000 Einwohner (519 Fälle) im Jahr 2005 angestiegen. Allerdings trat dieser Anstieg nur bei Schwangerschaft-assoziierten Fällen und in Altersgruppen ≥ 60 Jahren auf. Die häufigsten Neuerkrankungen wurden bei Neugeborenen sowie Erwachsenen ≥ 70 Jahren verzeichnet. Es dominierte hier vor allem das männliche Geschlecht, außer bei Erwachsenen und im gebärfähigen Alter. Die Gründe für das Auftreten der Listeriose in Deutschland sind soweit noch unklar, denn neu installierte Überwachungseinheiten und das erhöhte diagnostische Bewusstsein alleine, können nicht den großen Anstieg der Inzidenzen von 2004-2005 erklären [KOCH und STARK, 2006].

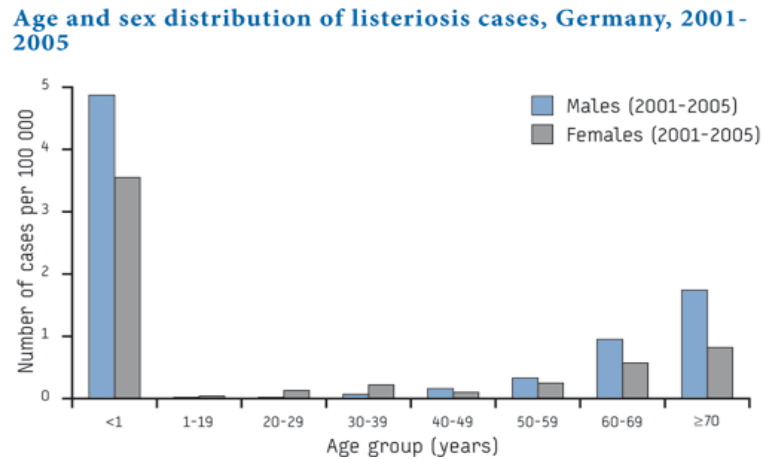


Abbildung 3: Age and sex distribution of listeriosis cases, Germany, 2001-2005 [KOCH und STARK, 2006]

2006 wurde Listeriose in 23 EU Mitgliedsstaaten gemeldet und war nach *Campylobacter*, *Salmonellen*, *Yersinien* und VTEC Infektionen die fünft häufigste Infektionskrankheit. Es traten 0,3 Fälle pro Jahr pro 100,000 Einwohner der gesamten EU auf, was darauf hindeutet, dass Listeriose eine eher seltene Krankheit ist. Charakteristisch sind die hohen Todesfälle, die ungefähr 30% ausmachen und 91% der Patienten müssen lange Krankenhausaufenthalte auf sich nehmen. Am meisten betroffen sind Patienten mit geschwächten Immunsystem, ältere Personen ≥ 65 Jahre, schwangere Frauen, Kinder und Neugeborene. *L.monocytogenes* kam 2006 am häufigsten in ready-to-eat Produkten vor, nämlich zu 2,4% in Rindfleisch, 3,9% in Schweinefleisch, 2,7% in anderen Fleischarten, 1,3% in Käse und 12,6% in Fischprodukten. Mehr als 54% der gemeldeten Fällen betrafen Männer [DENNY und McLAUHLIN, 2008].

Seasonal distribution of human cases of listeriosis in the European Union in 2005 and 2006

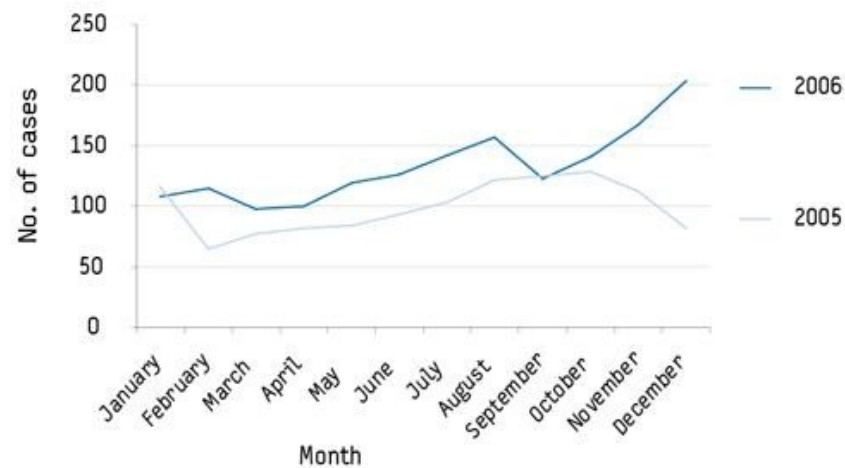


Abbildung 4: Seasonal distribution of human cases of listeriosis in the European Union in 2005 and 2006 [DENNY und McLAUHLIN, 2008]

2006 trat Listeriose erst relativ spät im Jahr auf, hingegen im Jahr 2005 war sie gleichmäßig verteilt.

Human cases of listeriosis reported in Europe in 1999–2006

Country	Number of confirmed cases							
	2006	2005	2004	2003	2002	2001*	2000*	1999*
Austria	10	9	19	8	16	9	14	13
Belgium	67	62	70	76	44	57	48	64
Cyprus	1							
Czech Republic ⁺	78	15	16					
Denmark	56	46	41	29	28	38	39	44
Estonia ⁺	1	2	2					1
Finland	45	36	35	41	20	28	18	46
France	290	221	236	220	218	187	261	275
Germany	508	510	296	256	240	216	33	31
Greece	6		3		5	3	2	1
Hungary ⁺	14	10	16					
Ireland	7	11	11	6	6	7	7	
Italy	51	51	25			31	13	17
Latvia ⁺	2	3	5	8	16		36	
Lithuania ⁺	4	2	1	2				
Luxembourg	4							
Malta ⁺	0							
Netherlands	64	96	55	52	32	16		
Poland ⁺	28	22	10	5	31			
Portugal			38					
Slovakia ⁺	12	5	8	6	7			
Slovenia ⁺	7		1	6				
Spain	78	68	100	52	49	57	35	32
Sweden	42	35	44	48	39	67	46	27
United Kingdom	208	223	232	255	158	156	115	116
EU Total	1583	1427	1264	1070	909	872	586	667
Bulgaria ^x	6							
Iceland								
Liechtenstein								
Norway	27	14	21*	18*	17*	18*		

All data from 2006 Zoonoses Community Summary Report, except:

* Data from 2004 Zoonoses Community Summary Report

x European Union Member State since 2007

+ European Union Member State since 2004

Abbildung 5: Human cases of listeriosis reported in Europe in 1999-2006

[DENNY und McLAUHLIN, 2008]

Abbildung 5 zeigt die menschlichen Listeriose Fälle in den europäischen Ländern zwischen 1999 und 2006. 2006 wurde menschliche Listeriose von 23 EU Mitgliedsstaaten gemeldet, auch von Bulgarien und Norwegen. Alle Fälle wurden im Labor nachgewiesen. Die Daten wurden fallbasiert von allen Ländern gemeldet, in Österreich und Litauen lagen die Daten gesammelt vor.

Erst im Jahr 2008 kam es zu einem relativ großen Krankheitsausbruch von Listeriose in Kanada (Toronto) an der zahlreiche Menschen starben. Die Public Health Agency of Canada berichtet, dass die erkrankten Personen durch kontaminierte Lebensmittel (Fertigprodukte) infiziert wurden. Dies betraf in erster Linie verseuchtes Fleisch durch hygienische Mängel in einem Erzeugerbetrieb. In der folgenden Tabelle sind die bestätigten und verdächtigen Fälle aufgelistet:

Province	Confirmed Cases	Deaths where Listeriosis was underlying or contributing cause *
Ontario	41	7
BC	5	1
Alberta	2	0
Saskatchewan	2	0
Manitoba	1	1
Quebec	5	1
New Brunswick	1	0
Total	57	10

Tabelle 2: *Listeria monocytogenes* outbreak [ANONYMOUS 1, 2009]

*As recorded on death certificate or as assessed by attending physician.

Es wird insbesondere risikoreichen Gruppen empfohlen vorbeugende Maßnahmen bei der Zubereitung von Nahrungsmittel zu treffen, bevor die Lebensmittel verzehrt werden. Das betrifft vor allem rohe, unpasteurisierte Milch und rohes Gemüse (sollte sorgfältig gewaschen werden). Die Personen zeigten Symptome wie Erbrechen, heftige Kopfschmerzen, Nackensteifheit, Übelkeit und anhaltendes Fieber [BRIDEAU, 2008].

Ebenso 2007 wurden in Massachusetts 5 Listeriose Fälle identifiziert und es gab 3

Todesfälle. Die sofort angeordneten Untersuchungen bezogen pasteurisierte und geschmacksneutrale Milch mit ein, wobei letztendlich die Quelle für die Krankheitsausbrüche in einer örtlichen Molkerei gefunden wurde. Dieser Ausbruch zeigt das große Potential einer Kontamination von Milch nach Pasteurisierung an [KNOX et al., 2007].

2.2.2.2 Charakteristiken

Exposition allein bedeutet nicht, dass daraus eine Erkrankung resultieren wird. Am häufigsten wird *Listeria monocytogenes* mit dem Stuhl gesunder Menschen ausgeschieden, die keine Anzeichen einer Krankheit aufweisen. Ungefähr 1-10% gesunder Menschen, so wird geschätzt, tragen symptomlos *Listerien* in ihren Gastrointestinaltrakt mit sich [BUBERT, 2006].

Für eine Reduzierung von *Listerien* sorgt, abhängig vom Gesundheitszustand, Menge und Art des aufgenommenen Lebensmittels, die Magensäure des Menschen. Aus diesem Grund kann nur mehr eine kleine Menge von *Listerien* in den Dünndarm, dem eigentlichen Angriffsort, gelangen. Weiter erwähnenswert ist auch die menschliche Darmflora, die nicht nur *Listerien* sondern auch andere pathogene Mikroorganismen vor einer Ansiedlung hindert. Erkrankt ein gesunder Mensch an Listeriose, dann dürfte eine sehr große Menge von *Listerien* Zellen und/oder ein besonders virulenter Stamm Ursache sein [BÜLTE, 2008].

Bezüglich der Inkubationszeit gibt es in der Literatur unterschiedliche Angaben. Es wurde Listeriose bei Patienten beobachtet, die 3 bis 70 Tage das ursächliche Nahrungsmittel zu sich genommen hatten. Drei Wochen soll eine mediane Inkubationszeit betragen. Manche Autoren [HANDRICK et al., 2005] geben an, dass Listeriose keine zyklische Infektionskrankheit ist und dadurch eine Inkubationszeit nicht genau angegeben werden kann. Allerdings kann es nach der Aufnahme eines kontaminierten Lebensmittels mit hoher Keimdosis nach 1 bis 6 Tagen zu einer Enteritis kommen. 10 Zellen/g Lebensmittel sollen bei Hochrisikogruppen für eine Infektion genügen [KRÄMER, 1999]. CLIVER und RIEMANN [2002] berichten, dass die

Inkubationszeit von der Dosis sowie von der Prädisposition der Person abhängt, es wurde jedoch eine Spanne von 24 Stunden bis 91 Tagen dokumentiert [CLIVER und RIEMANN, 2002].

Das Robert Koch Institut in Deutschland berichtet, dass aufgrund der langen Inkubationszeit (3 bis 70 Tage) die Erregermenge zum Zeitpunkt einer Infektion nicht mehr ermittelt werden kann und es schwer ist, Aussagen über die infektiöse Dosis zu treffen. Außerdem hängt die für eine Infektion erforderliche Dosis stark vom Gesundheitszustand der jeweiligen Person ab. Dokumentiert sind infektiösen Dosen von 10^5 bis 10^9 KBE pro ml bzw. g Lebensmittel bei gesunden Erwachsenen und weniger als 10 bis 10^4 KBE pro ml bzw. g Lebensmittel bei Risikopersonen. Erwähnenswert ist auch, dass Tierexperimente nicht weiterhelfen, da bsp. Mäuse im Darm nicht über die entsprechenden Rezeptoren verfügen [ANONYMOUS 2, 2006].

Bei Erwachsenen wird bei der Listeriose zwischen 2 primären Syndromen unterschieden:

1. Invasive Form

Diese Form der Listeriose ist charakterisiert durch den Ausbruch gleich mehrerer ernster Symptome (Nicht-Schwangerschaft assoziiert) wie Meningitis, Sepsis, primäre Bakteriämie, Endokarditis, nicht-meningitische Zentralnervensystem Infektion, Konjunktivitis und grippeähnliche Erkrankung wie Fieber, Müdigkeit, Übelkeit, Erbrechen, Diarrhoe, Unwohlsein.

Schwangerschaft-assoziierte Symptome wären grippeähnliche Symptome: Fieber, Kopfschmerzen, Muskelschmerzen, Rückenschmerzen, Frühwehen, Amnionitis, spontaner Abbruch, Totgeburt,

- früher Ausbruch einer neonatalen Infektion: Sepsis, Granulomatosis infantiseptica
- und
- später Ausbruch einer neonatalen Infektion: Meningitis

Die mittlere Inkubationszeit beträgt ungefähr 30 Tage. Die invasive Form der Listeriose

tritt zwar meistens nur sporadisch auf, ist aber aufgrund der hohen Mortalitätsrate (20-30%) besonders gravierend [LABBÉ und SANTOS, 2001].

2. Nicht- Invasive Form

Im Gegensatz zu der Invasiven Listeriose beträgt die mittlere Inkubationszeit der invasiven Form ungefähr 18-20 Stunden. Es handelt sich um eine fiebrige Gastroenteritis mit Symptomen wie Fieber, Müdigkeit, Unwohlsein, Kopfschmerzen, Neusea, Krämpfe, Erbrechen und Diarrhoe. Wird eine Gastroenteritis festgestellt, werden Kliniken und öffentliche Gesundheitsbehörden angeraten den Stuhl auf die Anwesenheit von *Listeria monocytogenes* zu untersuchen [LABBÉ und SANTOS, 2001].

Listeria monocytogenes wird zu 90% in der Leber, 10% in der Milz, Galle und die regionalen Lymphknoten innerhalb von 24 Stunden verbreitet und sind es insbesondere Schwangere, immungeschwächte Personen (AIDS Patienten, Krebs Patienten mit Chemotherapie Behandlung, Transplantationspatienten, Alkoholranke, Diabetiker und Patienten mit Herzerkrankungen), Säuglinge und Kleinkinder, ältere Menschen und auch Mangelernährte, die gegenüber diesem Erreger besonders anfällig sind. Ebenso Patienten, die magensäurehemmende Medikamente einnehmen, sowie Personen mit Leberzirrhose und chronischen Darmentzündungen sind stark gefährdet [BHUNIA, 2008; BÜLTE, 2008].

2.2.2.3 *L.monocytogenes* während der Schwangerschaft

Listeria monocytogenes ist in der Lage während der Schwangerschaft die plazentare Barriere zu durchbrechen, trophoblastische Zellen in der Plazenta zu infizieren, dann schnell in trophoblastische Strukturen wie Syncytiotrophoblast, ein maternales Endothel, auszustreuen und den Fötus im Mutterleib zu infizieren. Die auch als *konnatale Listeriose* bezeichnete Erkrankung kann grundsätzlich in jedem Stadium der Schwangerschaft auftreten, doch insbesondere im letzten Drittel kann es zu Komplikationen wie Totgeburt, Frühwehen, spontaner Abbruch, ein infizierter Fötus oder ein infizierter Säugling kommen. Die Plazenta ist grundsätzlich relativ gut gegen

eine Kolonisation von *Listerien* geschützt, doch es reicht schon ein einziges Bakterium aus, um in die Plazenta einzudringen, sich dort eine Nische zu suchen, zu vermehren und stellt somit auch die Quelle einer Infektion für die Mutter dar. Aus diesem Grund können Frühwehen oder ein spontaner Abbruch als protektive Maßnahmen für die Mutter angesehen werden. Während der Schwangerschaft werden selektive Faktoren der zellulären Immunität unterdrückt, um die Abstoßung des Fötus zu verhindern. Folglich resultiert dies in einer verminderten mütterlichen Widerstandsfähigkeit und in einem 12-fach erhöhten Risiko der Schwangeren an Listeriose zu erkranken. Solch selektiven Faktoren wären Veränderungen des Hormonspiegels oder Serum Faktoren, welche die Synthese oder Aktivierung von Lymphozyten oder Makrophagen bewirken. Im letzten Drittel der Schwangerschaft gibt es für gewöhnlich 3 mögliche Wege:

1. eine asymptomatische maternale Infektion und resultierend ein infizierter Säugling
2. eine erkrankte Mutter, bei der frühzeitig die Geburt stattfindet und sie entweder eine Totgeburt erleidet oder ein krankes Kind bekommt
3. ein uninfizierter Fötus, doch Tod der Mutter.

In den meisten Fällen weisen die Mütter grippeähnliche Symptome wie Fieber oder Rückenschmerzen auf. Lediglich eine positive Blutkultur ist ein sicherer Beweis für eine Erkrankung. Neonatale Mortalität und Morbidität kommen aber mit bis zu 36% relativ häufig vor [LABBÉ und SANTOS, 2001; BHUNIA, 2008; BÜLTE, 2008].

Es existieren 2 Formen der neonatalen Listeriose:

Die charakteristische Erkrankung einer „early onset neonatal listeriosis“ umfasst Neugeborene in der ersten Lebenswoche. Die Infektion erfolgt im Uterus über das mütterliche Blut und es resultiert eine Erkrankung während der Geburt oder kurz danach. In etwa 45 bis 70% der neonatalen Listeriose ist eine „early onset listeriosis“. Die häufigsten Symptome wären Atemnot, Zyanosen, Atemstillstand, Lungenentzündung, neurologische Abnormalitäten, Fieber und Sepsis. Eine Meningitis kommt in diesem Fall seltener vor. Neugeborene mit einer „early onset neonatal listeriosis“ können auch eine *Granulomatosis infantiseptica* ausbilden. Bei dieser

Erkrankung handelt es sich um ein Syndrom ausgestreuter Abszesse oder granulomatöse Entzündungen in verschiedenen inneren Organen, inkludiert Leber, Milz, Lungen, Nieren, sowie das Gehirn. Das Neugeborene erscheint generell krank, in manchen Fällen gar schwach und kann respiratorische oder zirkuläre Insuffizienzen entwickeln. Die Letalitätsrate beträgt ca. 15 bis 50%. *Listeria monocytogenes* kann aus dem Blut, Cerebrospinalflüssigkeiten, Plazenta, Fruchtwasser, Urin oder extern aus der Bindehaut, Ohr, Nase oder Rachen isoliert werden.

Im Gegensatz zur „early onset neonatal listeriosis“ tritt eine „late onset neonatal listeriosis“ eine bis mehrere Wochen nach der Geburt ein. Die Kinder werden gesund geboren und auch die Mütter hatten eine unkomplizierte Schwangerschaft. Das Krankheitsbild einer Meningitis dominiert in dieser Form der Listeriose häufiger als eine Sepsis. Da die ursächliche Infektionsquelle bei der „early onset neonatal listeriosis“ über transplazentäre Transmission bekannt ist, ist der Infektionsweg bei der „late onset neonatal listeriosis“ nicht ganz geklärt. Es wird allerdings angenommen, dass die Infektion über den kontaminierten Geburtskanal oder über externe Quellen erfolgen kann. Die Sterblichkeitsrate liegt bei ca. 10 bis 20% [RYSER und MARTH, 2007].

Eine neonatale Infektion mit *Listeria monocytogenes* kann durch die Gabe von entsprechenden Antibiotika verhindert werden.

In einer Studie detektierten NORIEGA et al. [2008] in der Klinik von Alemana, Santiago, 15 Fälle von neonatalen Listeriosen zwischen 2007 und 2008. Sieben der Schwangerschaft-assoziierten Fälle werden hier aufgezeigt. Es handelte sich bei den schwangeren Frauen um Erstgebärende, mit ähnlichen Lebensstilen und Ernährungsangewohnheiten. In einem Fall handelte es sich um eine 31 jährigen Frau in der 18. Schwangerschaftswoche. Sie klagte über Kopfschmerzen, hatte 39,5° Grad Fieber und fühlte sich generell unwohl. Sie wirkte jedoch gesund und hatte auch keine Beschwerden im Unterbauch. Das Blutbildes zeigte 8,700 Leukozyten/mm³, 9% waren stäbchenförmig. Durch weitere Untersuchungen wurde erkannt, dass die Frau an *Listeria monocytogenes* Serotyp 4 erkrankt war. Ihr wurde Ampicillin und Gentamicin über 21 Tage verabreicht und konnte eine weitere Gefährdung für das ungeborene Kind abgewendet werden [NORIEGA et al., 2008].

2.2.2.4 *L.monocytogenes* bei immunsupprimierten Personen

Besondere Wichtigkeit für die Widerstandsfähigkeit und Empfindlichkeit einer Person gegenüber *Listeria monocytogenes* spielt die zelluläre Immunität, denn Listeriose tritt meistens bei Menschen auf, die eine beeinträchtigte zelluläre Immunität haben. Die zelluläre Immunität hängt oft von der Aktivität einkerniger Phagozyten als Erstantwort, nicht-spezifischen Effektoren und spezifischen T-Zellen als Zweitantwort, ab. Eine Änderung in der Funktion von T-Zellen oder Makrophagen durch eine Immunsuppression würde zu einer Beeinträchtigung der zellulären Immunität führen und somit eine *Listerien* Infektion nach der ersten Infektion oder nach weiteren Kontakt mit *Listerien* auszulösen. Transplantationspatienten (Niere, Leber.), Alkoholranke, AIDS Patienten, ältere Personen, Diabetiker und Krebspatienten mit Steroidbehandlungen oder Gabe von zytotoxischen Arzneien gehören zu jener Gruppe an Personen, die besonders gefährdet ist an Listeriose zu erkranken [LABBÉ und SANTOS, 2001].

ORTEGA et al. [2000] berichtet in einer Studie über den eher seltenen Auftritt einer Listeriose bei HIV-Patienten. Bisher sind ungefähr 50 Fälle bekannt, an denen Personen mit einer HIV Infektion an Listeriose erkrankt sind. Obwohl normalerweise eine intakte Funktion der T-Zellen für die Immunität wichtig wäre, sind erst zwei HIV Patienten mit *Listeria monocytogenes* seit Beginn der AIDS Epidemie im Jahre 1981 in ein Spital eingeliefert worden. Der erste Fall betraf einen HIV-infizierter Mann, welcher mit 364 CD4+ Zellen/mm³, Fieber und Kopfschmerzen im Hinterkopfbereich eingeliefert wurde. Die Computertomographie Untersuchung des Schädels bzw. Gehirns zeigte keine Abnormalitäten, *Listeria monocytogenes* wuchs jedoch in Flüssigkeitskulturen (Cerebrospinalflüssigkeit). Der Patient konnte nach einer erfolgreichen Behandlung mit Ampicillin und Tobramycin entlassen werden. Im zweiten Fall wurde ebenfalls ein 47 jähriger HIV-infizierter Mann, mit 44 CD4+ Zellen/mm³ und einer Zirrhose verursacht durch Hepatitis C Virus mit Symptomen wie Fieber und Bauchschmerzen hospitalisiert, überdies war der Patient gegenwärtig wegen einer *Pneumocystis carinii* pneumonia (PCP) in Behandlung. Diagnostiziert wurde eine

bakterielle Peritonitis und dem Patienten Ceftriaxon verabreicht. Trotz dieser Maßnahmen verstarb der Patient 72 Stunden später an hepatischer Enzephalopathie. Post mortem konnte festgestellt werden, dass *Listeria monocytogenes* ein weiteres Wachstum zeigte [ORTEGA et al., 2000].

Das die Behandlung mit Ampicillin ein erfolgreicher Weg ist, zeigen die nächsten Studien.

LEVIDIOTOU et al. [2004] zeigten, dass insbesondere Erwachsene Patienten mit malignen Tumoren einem hohen Risiko ausgesetzt sind von *Listeria monocytogenes* infiziert zu werden. Das mikrobiologische Laboratorium des Universitätsspitals in Ioannina, Griechenland, forschte in einem Zeitraum von Jänner 1990 bis Dezember 2002 nach Fällen, in denen *L.monocytogenes* involviert war. Es zeigte sich, dass durch *Listerien* hervorgerufene Meningitiden bei drei Patienten auftraten. Der erste Patient litt an einem Gehirn Tumor, der Zweite an chronisch lymphatischer Leukämie und der Dritte an einem Non-Hodgkin Lymphom. Alle diese Patienten waren über 70 Jahre alt und in Therapie. Aus dem Blut und der Cerebrospinalflüssigkeit wurde schlussendlich *L.monocytogenes* Typ 4b isoliert. Es wurden alle Patienten mit Ampicillin und Gentamicin behandelt, verstarben jedoch kurze Zeit später. Die in dieser dargestellten Fälle zeigen deutlich die hohe Mortalitätsrate bei immunsupprimierten Personen durch *L.monocytogenes* auf. Patienten mit Meningitis und malignen Tumoren sollten daher besonders wegen einer möglichen *Listerien* Infektion beobachtet werden [LEVIDIOTOU et al., 2004].

PATIL et al. [2007] berichten, dass Ampicillin bei HIV-Patienten mit durch *Listerien* hervorgerufener Meningitis verabreicht werden soll. So zeigte ein offensichtlich gesund wirkender HIV-positiver 45 jähriger Mann atypische Symptome einer Meningitis. Blutproben sowie Cerebrospinalflüssigkeit wurden für biochemische und mikrobiologische Tests herangezogen. Die Ergebnisse gaben Aufschluss darüber, dass die Cerebrospinalflüssigkeit eine Pleozytose mit Lymphozyten als dominierenden Teil aufwies. Eine durchgeführte Gramfärbung erwies sich als negativ, allerdings ergab das Kulturwachstum grampositive Bakterien mit taumelnder Bewegung. Schlussendlich konnte mit Hilfe biochemischer Untersuchungen *Listeria monocytogenes* identifiziert

werden. Daraufhin wurde der Patient erfolgreich mit Ampicillin behandelt. Als Fazit kann angemerkt werden, dass atypische klinische -und laborchemische Befunde eine Diagnosefindung erschweren können, da solche Infektionen auch unbemerkt fortschreiten. Besonders wichtig ist, die Patienten so früh wie möglich mit dem entsprechenden Antibiotikum zu behandeln, um einen Erfolg zu erzielen [PATIL et al., 2007].

2.3 *L. monocytogenes* in Lebensmittel

Listerien sind primäre Erdbewohner und durch ihre außergewöhnliche Resistenz gibt es eine Reihe von Übertragungsmöglichkeiten für *L.monocytogenes* in der Lebensmittelproduktion. Über Pflanzen, Erdboden, Schlamm und Silagen (Fahrzeuge), über Nutztiere (Milch, Fleisch), über Fäzes/Dünger (Personal bsp: Schuhwerk, Insekten, Nager), über Böden und Wasser als auch über Felder und Wiesen (Staub, Insekten etc.) kann *L.monocytogenes* einen Weg in die Lebensmittelproduktion finden. Weiters kommt hinzu, dass durch eine unsachgemäße Desinfektion und Reinigung von Geräten in Betrieben, wie Dichtungen von Maschinen, Kondenswasserbereiche, Innenseite von Rohrleitungen und Gullys, Mikroorganismen wie *L.monocytogenes* schleimige Biofilme bilden und sie besiedeln können. Prinzipiell sind auch andere Bakterien in der Lage Biofilme zu bilden und sich zu vermehren.

2.3.1 *L.monocytogenes* in Milch und Milchprodukten

Listerien können direkt in die Milch gelangen, wenn bsp. entzündliche Erkrankungen des Euters (Mastitis) vorliegen. Besonders gefährlich sind hier jene Produkte, die nicht mehr erhitzt werden, wie Rohmilch und Rohmilchkäse (Brie, Camembert, Roquefort, Mont d'Or, Reblochon). Dies ist allerdings eine gelegentlich und selten auftretende Erscheinung aber auch ein Beleg für eine sekundäre Kontamination während der Milcherzeugung durch kontaminiertes Einstreu, Futter oder Silagen.

Trotz Pasteurisierung, kann es durchaus vorkommen, dass die Produkte mit *Listerien* kontaminiert sein können. Der Grund dafür ist entweder eine unzureichende

Pasteurisierung oder eine sekundäre Belastung der Milch durch kontaminierte Leitungen oder Geräte im Betrieb. Besonders gefährdet sind Weichkäsesorten (Rotschmierkäse, Camembert, Blauschimmelkäse) mit einem hohen Wasser und einem hohen pH-Wert. Bei länger gereiften halbfesten oder Hartkäsesorten, Frischkäse und Sauermilchkäse (Harzer, Roller, Quargel, Olmützer) sinkt der Wassergehalt sowie der pH-Wert ab und es besteht dadurch seltener die Gefahr an einer Listerieninfektion zu erkranken. Ein besonderes Augenmerk gilt hier vor allem Käsesorten, bei welchen während der Fermentation der pH-Wert ansteigt wie bsp. Weichkäsesorten mit Rotschmiere. Wie schon erwähnt, wird *L.monocytogenes* sehr häufig an der Oberfläche von Weichkäse gefunden und dies in relativ hohen Konzentrationen (10^5 bis 10^7 KBE/g). Im Inneren des Käses kommt es wegen des niedrigen pH-Wertes ($< 5,5$) zu keiner Vermehrung von *L.monocytogenes*, allerdings können diese Bakterien überleben. Reift der Käse länger (Weisschimmelkäse) kann es auch im Inneren zu einem pH-Wert Anstieg und zu einer Ansiedlung und Vermehrung von *L.monocytogenes* kommen. Das niedrigste Risiko einer Listerienkontamination geht von Emmentaler, Frischkäse, Quark und Schmelzkäse aus [KRÄMER, 2007; BÜLTE, 2008].

KALOREY et al. [2008] sammelten 2060 Proben von Milchkühen in Indien ein und untersuchten sie auf *Listeria monocytogenes*. Die Anreicherung auf Selektivagar Platten und die resultierende Befunde basierten auf biochemischen Tests gefolgt von Christie, Atkins, CAMP Test, PI-PLC Assay. *Listeria spp.* wurde aus 139 Proben (6,75%) isoliert, 105 Proben (5,1%) zeigten einen positiven Befund. Die restlichen positiven Befunde betrafen *L.seeligeri*, *L.innocua*, *L.welshimeri*. Alle 105 Proben positiv für *L.monocytogenes* zeigten eine Hämolyse und waren CAMP positiv. 90 Isolate waren positiv bei PI-PLC Assay. Diese Studie hat gezeigt, dass es von enormer Wichtigkeit ist, strikte hygienische Maßnahmen zu treffen, Rohmilch sehr sorgfältig und ordentlich zu pasteurisieren um eine Infektion zu minimieren [KALOREY et al., 2008].

In einer Studie von MATAK et al. [2005] wird auf die Verwendung von UV-Licht bei Schafmilch hingewiesen um die Anzahl von *L.monocytogenes* zu verringern. Eine Reihe von Schafmilchkäsesorten wurden unter Verwendung von unpasteurisierter Milch unter UV-Bestrahlung produziert. Durch dieser Anwendung kann die Lebensmittelsicherheit

enorm erhöht werden. Die Nachfrage sowie die Popularität von Schafmilch ist in den letzten Jahren deutlich gestiegen und wird Schafmilchkäse im Handel reichlich angeboten.

Wie MATAK et al. zeigen konnten wurde frische Schafmilch mit *L.monocytogenes* mit 10 KBE/ml beimpft und UV Licht ausgesetzt (Benutzung der CiderSure 3500 Apparatur, FPE Inc., Macedon, NY). Die beimpfte Milch wurde dem UV Licht bei Dosen zwischen 0 und 20 mJ/cm² ausgesetzt um die optimale UV Dosis zu eruieren. Eine größere als 5-log Reduktion wurde dann erreicht, wenn die Milch eine UV Dosis von 15,8 +/- 1,6 mJ/cm² erhielt. Somit resultiert das Ergebnis, dass eine Behandlung mit UV Licht durchaus für die Reduzierung von *L.monocytogenes* in Schafmilch herangezogen werden kann. Allerdings kann UV Licht bei einer Wellenlänge von 254 nm die Sensorik sowie die chemischen Eigenschaften der Schafmilch verändern. Allerdings sprechen die U.S. Code of Federal Regulations und die Pasteurized Milk Ordinance auch die Möglichkeit an alternative Temperaturbehandlungen gegenüber UV Licht zu entwickeln [MATAK et al., 2005].

2.3.2 *L.monocytogenes* in Fischprodukten

Listeria monocytogenes wird oft an Oberflächengewässer, Seen und in Küstengewässer angetroffen. Unverschmutztes Wasser sowie Grund und Quellwasser sind generell frei von *Listerien*. Wird in verschmutzten Gewässern gefischt, so kann es durchaus vorkommen, dass eine Kontamination eintritt noch bevor das rohe Fischmaterial die Verarbeitungsbetriebe erreicht.

Im Allgemeinen wird Fisch als ein gesundes Lebensmittel angesehen, doch wie bei allen anderen Tierprodukten besteht beim Verzehr roher Teilen erhöhte gesundheitliche Gefahr aufgrund von pathogene Bakterien oder Parasiten. Bei Fisch und Fischprodukten ist es häufig der Fall, dass vor allem vakuumverpackter geräucherter Lachs oder Forellen belastet sind. Ähnlich wie bei Milch und Milchprodukten ist dies auf eine primäre Kontamination der Fische, schlecht desinfizierte Geräte und Maschinen, Lagerung bei zu hohen Temperaturen, sowie auch auf unzureichende Betriebshygiene zurückzuführen. Geräucherte Fischprodukte sind besonders betroffen, da sie nicht

eingesalzen werden, somit ein hoher aW-Wert herrscht und sich *Listerien* unter solchen Bedingungen gut vermehren können. Wird der Fisch geräuchert und eingesalzen, besteht diese Gefahr jedoch nicht.

In den letzten Jahren wurde Sushi, ein japanisches Gericht mit rohem oder geräucherten Fisch, immer beliebter. ATANASSOVA et al. [2008] untersuchten in einer Studie aus dem Jahr 2008 die mikrobiologische Qualität von Sushi aus Sushi Lokalen und vom Einzelhandel. 250 Sushi Proben wurden auf ihren mikrobiologischen Status und die Prävalenz pathogener Bakterien getestet. Weiters wurde zwischen gefrorenen Sushi vom Supermarkt und frisch zubereitetem Sushi in Sushi Lokalen verglichen. *Listeria monocytogenes* wurde in drei Proben (1,2%) nachgewiesen. *Escherichia coli* und *Staphylococcus aureus* wurden am meisten in den frisch zubereiteten Produkten analysiert. Überraschenderweise geht aus dieser Studie hervor, dass die mikrobiologische Qualität bei industriell gefertigtem Sushi höher als bei frisch zubereitetem Sushi war. Außerdem hängt die Qualität stark von den Fähigkeiten und Gewohnheiten der Sushi-Köche ab, sodass es dadurch auch eine große Variation zwischen den einzelnen Sushi Lokalen gibt [ATANASSOVA et al., 2008].

Beim Umgang mit rohen Fischmaterial ist die Einhaltung und Berücksichtigung des HACCP-Konzeptes besonders unumgänglich. Die Personalschulung in Sachen Hygiene ist besonders wichtig.

Eine Studie von RORVIK [2000] sagt aus, dass speziell geräucherter Lachs von *Listerien* befallen wird. Kalträuchern eliminiert *Listerien* bei Temperaturen zwischen 17,1° bis 21,1° Celsius, während das Bakterium hingegen zwischen 22,2° bis 30° Celsius überlebt. Unter natürlichen kalträuchernden Bedingungen zwischen 19° bis 22° Celsius nimmt die Dichte und die Anzahl von *Listeria monocytogenes* ab. Werden die Produkte unter Hitze geräuchert, so wird *Listeria monocytogenes* eliminiert, sobald während des gesamten Räucherungsprozesses Rauch zugefügt wird. *Listerien* können sich auch während der Lagerung in geräucherten Lachs stark vermehren, daher sollten angegebenen Haltbarkeitsdaten bei Kühlschranklagerung kürzer sein, da *Listerien* auch im Kühlschrank überleben können. Roher Lachs ist eine wichtige Kontaminationsquelle, dennoch sollten sämtliche hygienische Maßnahmen, sowie

Berücksichtigung des HACCP-Konzepts eingehalten werden [RORVIK, 2000].

Die Arbeiterkammer Wien hat im Jahr 2005 diverse verpackte Räucherlachsprodukte auf die Richtigkeit der Haltbarkeitsangaben untersucht. Es ist oft der Fall, dass solche Produkte gekauft und ungeöffnet im Kühlschrank über einen längeren Zeitraum gelagert werden oder auch auf Vorrat gekauft werden. Eine ähnliche Untersuchung wurde von der Arbeiterkammer Wien bereits 2002 durchgeführt, welche zeigt, dass sich bereits vor Ende des Ablaufdatums (Haltbarkeitsdatums) rund ein Drittel der untersuchten Produkte in einem qualitativ schlechten Zustand befanden und schon als verdorbene Lebensmittel zu bezeichnen waren, da hier bereits *Listerien* nachgewiesen werden konnten. Aus dieser Studie geht auch heraus, dass im Sommermonat Juni 19 verpackte Produkte wie Räucherlachs oder Wildlachs untersucht wurden. Darunter befanden sich 3 Produkte als „gefangen im Nordwestatlantik“ etikettiert, der Rest der Produkte stammten aus Aquakulturen. Die Proben wurden bis zum angegebenen Mindesthaltbarkeitsdatum gekühlt gelagert und dann untersucht. Daraufhin wurden die Proben sensorisch überprüft (Geruch, Geschmack, Aussehen, Farbe etc.) und mikrobiologisch untersucht. Die Ergebnisse zeigten folgendes Bild:

Qualität Räucherlachs 2005 und 2002		
	2005	2002
Gesamtanzahl	19 Produkte	30 Produkte
Beanstandet(verdorben bzw <i>Listerien</i> nachgewiesen)	6 Produkte (31,6%)	10 Produkte (33%)
Erhöhte Keimzahl, aber noch nicht beanstandet	5 Produkte (26,3%)	(nicht extra beurteilt)
Nicht beanstandet	8 Produkte (42,1%)	20 Produkte (67%)

Tabelle 3: Verpackter Räucherlachs [Arbeiterkammer Wien, SCHÖFFL, 2005]

Aus dieser Untersuchung ging ebenfalls hervor, dass eine Verpackung unter Schutzatmosphäre keine absolute Sicherheit gewährleistet, da von sieben untersuchten Produkten nur vier Produkte einwandfrei waren. Bei drei Produkten wurden *Listerien* nachgewiesen. Sinnvoll wäre es daher, die Produkte ungefähr zwei Wochen vor Ablauf des Mindesthaltbarkeitsdatums zu verbrauchen [SCHÖFFL, 2005].

2.3.3 *L.monocytogenes* in „ready-to-eat“ Produkten (RTE)

Eine Kontamination von „ready-to-eat“ Produkten (RTE) durch *Listerien* kann bereits vor der Konsumation passieren. Die öffentliche Erreichbarkeit und die begrenzte Kontrolle im Einzelhandel sowie in Restaurants erhöht die fortlaufende Vermehrung und das Auftreten von *Listerien* in RTE Produkten.

LIANOU und SOFOS [2007] dokumentierten, das Auftreten und die Weitergabe von *Listeria monocytogenes* in „ready-to-eat“ Produkten im Einzelhandel sowie in Restaurants. Die potentielle Quelle dieses pathogenen Bakteriums schließt die Umwelt, Lebensmittelhändler, eintreffende rohe Inhaltsstoffe oder verarbeitete Produkte die während des Verarbeitungsprozesses durch ungenügende Hygiene und Desinfektion im Betrieb mit *Listeria monocytogenes* kontaminiert wurden, mit ein. *L.monocytogenes* kommt in verschiedensten vorgepackten oder verpackten RTE Produkten vor, oft auch in sehr hohen Konzentrationen. Besonders wichtig ist, dass exakte Kontrollen durchgeführt werden. Ausgezeichnete Fabrikationspraktiken, einwandfreie Desinfektion, angebrachte Reinigung sämtlicher Geräte die mit dem Produkt in Berührung kommen, Sanierungen und Hygiene Programme, Kontrollen der Temperaturen sind alles bedeutende Punkte hervorzuheben, um eine Kontamination und das Wachstum von *L.monocytogenes* zu verhindern. Einhaltung des HACCP-Konzepts, Schulung des Personals und des Leiters sind unumgänglich [LIANOU und SOFOS, 2007].

WAGNER et al. [2007] berichten in einer Studie über das Überleben von *Listerien* in „ready-to-eat“ Produkten in Wiener Haushalten. 1585 Proben wurden in 103 (n=946) Supermärkten und 61 Haushalten (n=640) gesammelt und untersucht. 124 Proben (13,1%) und 45 Proben (4,8%) von 946 gesammelten Proben im Lebensmitteleinzelhandel wurden positiv auf *L.monocytogenes* und *Listeria spp.* getestet, darunter gab es 5 Proben von geräuchertem Fisch, welche die Toleranzgrenze von 100 KBE/g Lebensmittel überschritten. Die höchsten Konzentrationen wurden in Fisch und Meeresfrüchte (19,4%) gefunden, gefolgt von rohen Fleischwürsten (6,3%), Weichkäse (5,5%) und gekochte Fleischprodukte/Pasteten (4,5%).

Bezogen auf den Haushalt gab es nur eine Familie, bei denen die Küche und Lebensmittel mit *Listerien* kontaminiert waren. Auch in den Fäzesproben der Familie konnten *Listerien* nachgewiesen werden. Dies beweist, dass auch beim Verzehr von gering belasteten Lebensmittel (< 100 KBE/g) *Listerien* durch den GIT passieren können [WAGNER et al., 2007]. Relativ häufig kommt es auch vor, dass *Listerien* vor allem in „ready-to-eat“ Produkten (RTE) nachgewiesen werden können. RTE Produkte wie gefüllte Sandwiches mit Milchprodukten wie Weichkäse oder halbfesten Schnittkäse, geräuchertem Fisch, Salaten und Fleisch wie Faschiertes, Roastbeef, aufgeschnittene Wurstwaren werden bei Temperaturen von +2 Grad Celsius bis +4 Grad Celsius gelagert. Allerdings können auch unter diesen Bedingungen *Listerien* auftreten. Die EFSA (European Food Safety Authority) hat im Jahr 2006 Daten über RTE Produkte verschiedener Fleischsorten zusammengestellt. Hier ein Auszug über Rindfleisch:

		Units Tested Presence		L. m. presence in 25 g		Units Tested Enumeration		> detection but ≤ 100 cfu/g		L. m. > 100 cfu/g	
	Details	N	% Pos	N	%	N	%	N	%	N	%
Single samples											
Belgium	Meat preparation intended to be eaten raw, at retail	-	-	117	0.9	0					
	Minced meat intended to be eaten raw, at processing	67	14.9	-	-	-					
	Minced meat intended to be eaten raw, at retail	-	-	36	0	0					
France	Meat products, cooked	-	-	57	29.8	7.0					
Ireland	Meat products, cooked, at retail	44	15.9	44	2.3	0					
	Meat products, cooked, at retail	-	-	208	0	0					
Italy	Meat products, cooked	350	0								
Netherlands	Meat products, cooked	951	0.8	951	0.8	0					
Batch											
Belgium	Meat products, cooked	122	27.0	-	-	-					
Czech Republic	Meat products, cooked	373	0	-	-	-					
Italy	Meat products, cooked	96	7.3	-	-	-					
Poland	Meat products, cooked	79	10.1	8	12.5	0					
EU Total		2,082	3.5	1,421	2.0	0.3					

1. Data are only presented for sample size ≥ 25

Abbildung 6: *L.monocytogenes* in ready-to-eat products and meat preparations of bovine meat [EFSA, 2006]

In 5 Proben wurde *L.monocytogenes* in 25g gefunden, doch nur Frankreich wurde über positive Proben mit mehr als 100 KBE/g berichtet.

3. Material und Methoden

3.1 Untersuchungsmaterial

Für die Untersuchung wurden Proben von gemischten Faschierten (Schweine -und Rindfleisch) und aus Rohmilch hergestellter Käse herangezogen. Die Proben wurden in erster Linie im fertig abgepackten Zustand gekauft, ein Teil der Proben wurde offen gekauft. Die Proben wogen zwischen 50 und 150g.

Referenzstämme, die von der Veterinärmedizinischen Universität in Wien bereitgestellt wurden konnten zur Untersuchung herangezogen werden. Die Eigenschaften und Wachstumsmuster der Referenzstämme wurden auf verschiedenen Nährböden getestet, um *Listeria monocytogenes* nachzuweisen.

3.1.1 Lebensmittelproben

Die getesteten Lebensmittelproben wurden in folgenden Geschäften gekauft:

- Zielpunkt – 1010 Wien
- Spar Gourmet – 1010 Wien
- Penny Markt – 1010 Wien
- Lidl Markt – 1010 Wien
- Lidl Markt – 1030 Wien
- Hofer – 1040 Wien
- Billa – 1040 Wien
- Naschmarkt – 1040 Wien
- Zielpunkt – 1040 Wien
- Spar – 1040 Wien
- Spar - 1050 Wien

- Penny Markt – 1050 Wien
- Merkur – 1070 Wien
- Hofer – 1070 Wien
- Spar – 1090 Wien
- Merkur – 1140 Wien
- Spar – 1140 Wien

3.2 Methodik

3.2.1 Nachweisverfahren für *L.monocytogenes* in Lebensmittel

Eine schnelle Identifikation von *Listeria monocytogenes* in Lebensmittel ist besonders wichtig um die Konsumenten vor einer Infektion zu schützen.

Eine schnelle Detektion und Auszählung pathogener *Listerien* in Lebensmittel ist aufwendig und zeitintensiv vor allem wenn konventionelle Methoden angewendet werden. Für den Nachweis einer geringen Anzahl von *Listeria monocytogenes* in Lebensmittel benötigt man Anreicherungsschritte, Anreicherungskulturen und eine selektive Plattierung [REISSBRODT, 2004].

3.2.2 Entwicklung verschiedener Methoden

3.2.2.1 Nährmedien

Im Laufe der Zeit wurden mehrere Isolationsmedien entwickelt um *L.monocytogenes* nachweisen zu können.

McBRIDE und GIRARD [1960] entwickelten 1960 das erste feste Medium, um *L.monocytogenes* aus gemischten Kulturen nachweisen zu können [McBRIDE und GIRARD, 1960].

LOVETT [1988] berichtet, dass nach einem Listerioseausbruch in Massachusetts 1983

ein weiteres Medium (Modified McBride Agar, MMA) durch Zugabe von Cycloheximiden, Acriflavine und Nalidixinsäure als selektive Reagenzien verwendet wurde, der McBrides Agar [LOVETT, 1988].

In der Methode von HENRY [1933] wird der Mikroorganismus zunächst für 18-24 Stunden bei 30° Celsius auf einem durchsichtigen Medium kultiviert und weiters von einem Stereomikroskop unter Verwendung schräg einfallenden Lichts gescannt. *Listerien* Kolonien weisen charakteristische blau bis grüne Kolonien auf [HENRY, 1933; VARDAR-ÜNLÜ et al., 1998].

1986 entwickelten LEE und McCLAIN den LPM Agar zum Nachweis von *L.monocytogenes* in Proben mit reichlich gemischter Mikroflora. Der LPM Agar war eine Modifikation des McBride Agars und er war das erste Medium, das ein Breitbandantibiotikum als Wirkstoff enthielt – Moxalactam. Moxalactam ist sehr wirksam gegen eine Reihe von grampositiven und gramnegativen Bakterien, Glycerin Anhydride, Lithium Chloride und Phenylethanol sind weitere Bestandteile des Agars. *Listerien* Selektive Supplemente werden dem LPM Agar nach der Autoklavierung zugegeben [ANONYMOUS 3].

VAN NETTEN et al. entwickelten 1988 ein neues Medium RAPAMY für die Gewinnung und Isolierung *Listeria spp.* in Lebensmittel. Die leicht hemmende Eigenschaften des Mediums wurde durch die Verwendung von Columbia Blutagar anstatt Tryptose Agar und durch das Hinzufügen von 0,05% Eisenammonium Citrat und 2,5% Eidotter Emulsion vermieden. Neben *Listeria spp.* können auch *Enterokokken* auf RAPAMY Agar wachsen. Später wurde auch der PALCAM Agar entwickelt [VAN NETTEN et al., 1988].

Viele Studien wurden zur Auswertung der einzelnen Nährmedien durchgeführt, zusammenfassend kann folgendes ausgesagt werden:

- Der „Modified McBride Agar“ (MMA) wies keine genügende Selektion auf.
- Der LPM Agar hemmte andere Mikroorganismen in ihrem Wachstum, förderte sie jedoch bei *Listeria monocytogenes*.
- PALCAM und OXFORD Agarplatten wurden bis 2005 für die Kultivierung von

Listerien eingesetzt und zeigten auch gute positive Ergebnisse, doch konnte anhand der Morphologie der Kolonien nicht auf die Art zurückgeschlossen werden.

DONELLY und BAIGENT entwickelten 1986 das heute oft verwendete Medium „*Listeria* Enrichment Broth“ (LEB). LEB enthält Nalidixinsäure, welche das Wachstum gramnegativer Bakterien hemmt, sowie Acriflavine hydrochloride, welche vor allem grampositive Bakterien in ihrem Wachstum hemmen [DONELLY und BAIGENT, 1986].

Nalidixinsäure und Acriflavine hydrochloride wurden ebenfalls für den „Enrichment Broth“ (EB) der US Food and Drug Administration (FDA), welches Cycloheximid enthält, welches Schimmelpilze sowie Hefen in ihrem Wachstum unterdrückt, herangezogen. Diese Organismen kommen relativ häufig in Lebensmittel vor.

Zu den Proben wird der „Enrichment Broth“ hinzugefügt und bei 30° Celsius für 24 bis 48 Stunden bebrütet. Nach der Inkubation werden die Kulturen auf OXFORD und LPM Agar ausgestrichen [CORRY et al., 1995].

Der OXFORD Agar wurde von CURTIS et al. [1989] für die Isolierung *L.monocytogenes* aus Fäzesproben oder Spitalsproben entwickelt. Der Agar enthält selektiv hemmende Bestandteile wie Lithium Chloride, Colistin, Fosfomycin, Acriflavine, Cefotetane, Cyclohexamide sowie das Indikatorsystem Äsculin und Eisen für die Differenzierung der *Listerien* Arten. *Listeria spp.* hydrolisiert Äsculin und erzeugt schwarze Zonen um die Kolonien. Gramnegative Bakterien werden komplett gehemmt. Grampositive Bakterien werden ebenfalls unterdrückt, jedoch können manche *Staphylokokken* als Äsculin-negativ erscheinen. *Listerien* sind normalerweise nach 24 Stunden bei 30° Celsius Inkubation sichtbar, doch nach 48 Stunden erscheinen die Kolonien größer [CORRY et al., 1995].

3.2.2.2 Aktuelle konventionelle Methoden

In den Sommermonaten des Jahres 1983 brach in Massachusetts (USA) Listeriose aus. Sieben Fälle ereigneten sich bei Kindern, 42 Fälle bei immunsupprimierten Patienten, 14 Menschen (29%) starben. Als Quelle der Infektion wurde pasteurisierte Milch ausfindig gemacht, welche von infizierten Milchkühen stammte. In dem betroffenen Betrieb wurden Inspektionen durchgeführt und diese zeigten, dass die Milch unsachgemäß pasteurisiert wurde. Somit wurde bestätigt, dass *Listeria monocytogenes* in roher wie in pasteurisierter Milch überleben und sich vermehren kann [FLEMING, 1985].

Seit diesem Ereignis wurde eine Bouillon für die Anreicherung herangezogen, welche Nalidixinsäure, Cycloheximide und Acriflavine enthielt, die verhindern sollten, dass es zu einer Überwucherung von *Listeria monocytogenes* Kulturen mit Begleitflora kommt. Um *L.monocytogenes* zu isolieren wurde der modifizierte McBride's Agar (MMA) verwendet.

Bis heute sind aufgrund der guten Erfahrungen PALCAM, OXFORD und LPM Agarplatten in Verwendung. Sie werden sogar von der US Food and Drug Administration (FDA), dem US Department of Agriculture (USDA) in der ISO Detektion als Gewinnungsmethode empfohlen. Nationale Empfehlungen wie bsp. in Deutschland basieren auf diesen ISO Standards. *Listeria spp.* wachsen auf diesen Agarplatten und werden durch die Aktivität der β -D-Glucosidase, die in pathogenen und apathogenen Arten auftritt, detektiert. Das Enzym Äsculinase spaltet Äsculin, welches sich als gräulich bis grünliche Kolonien niederschlägt und bei der Reaktion dieses Produkts mit Eisen entsteht Äsculetin und Glucose, wobei sich schwarze bis braune Höfe um Kolonien aller *Listeria spp.* zeigen [REISSBRODT, 2004].

L.monocytogenes, *L.innocua*, *L.grayi*, *L.seeligeri* und *L.welshimeri* können kleine Kolonien bilden, wenn sie auf einem 0,2-1,0 prozentigen Äsculin Agar wachsen. *L.ivanovii* und *L.murrayi* können dies allerdings nicht. Das Phänomen wurde in einer Studie beobachtet, wenn nur Agarplatten verwendet wurden, die Äsculin enthielten. Ein

Medium enthielt 0,5% Äsculin und Eisen, wodurch *Listeria* Arten Kulturen mit Durchmessern zwischen normal und klein wachsend produzierten. Wurden den Kulturen jedoch zuvor in einer Glucose Bouillon gegeben, zeigten alle kleinen Isolate innerhalb von 5 Minuten Äsculinase Aktivität, während die normal gewachsenen Isolate erst nach 20-70 Minuten Äsculinase Aktivität zeigten [SIRAGUSA et al., 1990].

Es kann allerdings dann zu Komplikationen in der Differenzierung kommen, wenn **nur** Äsculin als Differenzierungsmerkmal zur Detektion herangezogen wird, denn auch die meisten grampositiven Organismen wie *Staphylokokkus aureus*, *Enterokokkus faecium* and *E.faecalis* sind in der Lage Äsculin zu hydrolisieren und schwarze Kolonien zu bilden. Durchaus kann es dazu kommen, dass sich die gesamte Petrischale schwarz färbt und eine Beurteilung, welche Kolonie Äsculinase Aktivität aufweist unmöglich ist [FIRSTENBERG-EDEN und SHELEF , 2000].

Für Routinemethoden wurde aus diesem Grund der PALCAM-Agar verwendet.

Ceftazidim und Acriflavine unterdrücken das Wachstum gramnegativer Bakterien und der meisten grampositiven Bakterien. *Listeria monocytogenes* hydrolisiert Äsculin zu Äsculetin und Glucose. Äsculetin zeigt schwarze Komplexe mit Eisen (III) Ionen und *L.monocytogenes* bildet grau-grüne Kolonien mit schwarzen Zentren und Höfe. Mannitol positive Bakterien wie *Staphylokokken* und *Enterokokken* zeigen gelbe Kolonien. Die gelbe Farbe wird durch die Änderung des pH-Wertes während der Fermentation wegen dem Indikator Phenolrot hervorgerufen [ANONYMOUS 4].

Detection systems of *Listeria* spp. plating media^a

Plating medium	Substrate for detection of		Colony colour	
	β -D-Glucosidase	PI-PLC ^b	non-pathogenic <i>Listeria</i> spp.	<i>L. monocytogenes</i> / <i>L. ivanovii</i>
PALCAM; -Oxford LPM; -MOX Harlequin™ <i>Listeria</i>	Esulin	–	grey, with brown-black surround	grey, with brown-black surround
(Lab m) BCM® <i>Listeria monocytogenes</i> (Biosynth)	CHE- β -D-glucopyranoside	–	black	black
Rapid'L. mono (Bio-Rad)	–	5-Bromo-4-chloro-3-indoxyl-myo-inositol-1-phosphate (X-IP) X-IP	white	blue-turquoise
LIMONO-Ident-Agar (Heipha)	–	X-IP	white	<i>L. monocytogenes</i> : blue-turquoise <i>L. ivanovii</i> : blue-green with a yellow halo
ALOA (AES, Biolife) CHROMagar™ <i>Listeria</i> (CHROMagarBBL™) CHROMagar™ <i>Listeria</i> (BD) OCLA (Oxoid)	5-Bromo-4-chloro-3-indoxyl- β -D-glucopyranoside	L- α -Phosphatidyl-inositol	blue-turquoise	blue-turquoise, surrounded by a white precipitate

Abbildung 7: Detection systems of *Listeria* spp. plating media [REISSBRODT, 2004]

a: *Listeria monocytogenes* blood agar (LMBA) uses haemolysis of sheep blood for detection of pathogenic *Listeria* spp.

b: Phosphatidylinositol-phospholipase C

Die Identifikation von *Listeria* spp. ist in der Routineuntersuchung sehr zeitaufwendig, zeitintensiv und manchmal auch aufgrund unverlässlicher biochemischer und phänotypischer Standardmethoden wie Zuckerfermentation und der CAMP Test, unzuverlässig. Seitdem allerdings die meistens *Listeria* Arten auch in Lebensmittel gefunden werden und daher auch ein potentiellies Risiko einer Kontamination mit *Listeria monocytogenes* muss ihre Anwesenheit schnell und zuverlässig von den jeweiligen Lebensmittelfirmen aufgedeckt werden [REBUFFO et al., 2006].

Daher gibt es eine Reihe von Rapid Test Systemen, die schnell und einfach ein positives oder negatives Ergebnis für den Nachweis von *L.monocytogenes* liefern.

3.2.2.3 Rapid - Test Systeme

[ANONYMOUS 5.; HITCHINS, 2002].

1. *API Listeria System* (Fa. bioMérieux)

Der API Listeria ist ein Teststreifen mit unterschiedlichen biochemischen Reaktionen, mit dem nach 24 Stunden eine Identifikation von *Listeria* Isolaten erfolgen kann. Dieser Teststreifen reduziert die benötigte Identifizierungszeit, welche normalerweise für eine konventionelle Identifikation benötigt wird auf einen wesentlich kürzeren Zeitraum [BILLE et al., 1992].

2. *AccuProbe™ Listeria monocytogenes culture confirmation test* (Gen-Probe, Inc, San Diego, CA; 10, 19).
3. *GeneTrak Listeria monocytogenes test kit* (Organon Teknika Corp.)
4. *Probelia Listeria monocytogenes test kit* (BioControl)
5. *VIDAS Listeria monocytogenes test kit* (bioMérieux)
6. *Transia Plate Listeria monocytogenes* (Diffchamb SA, Lyon, France)(38)
7. FDA, SRL application of Niederhauser *et al.* method for PCR detection and identification of *L. monocytogenes*
8. *BAX Listeria monocytogenes test.* (Qualicon, Wilmington, DE)
9. *Micro ID test strip* (Fa. Organon Technica)
10. *ELISA kits* (enzyme-linked immunosorbent assay)
11. *Nucleic acid assay kits*

3.2.2.4 Konventionelle Methoden zum Nachweis von *L.monocytogenes*

Der Nachweis von *Listeria monocytogenes* erfolgt in einer Reihe von Aufarbeitungsstufen, die den in den USA angewandten Methoden sehr ähnlich ist. Zunächst werden die Bakterien angereichert, sodann erfolgt ein erster Ausstrich auf einem Selektivmedium und ein zweiter Ausstrich auf einer Blutplatte, der sogenannte CAMP Test (Christie–Atkins–Munch–Peterson Test). Der CAMP Test ist eine sehr nützliche Methode um *Listeria spp.* Isolate zu identifizieren. Nach einer Inkubation von 28 bis 48 Stunden bei 35° Celsius werden die Platten auf Hämolyse untersucht. *Listeria monocytogenes* ist im CAMP Test gegen *Staphylokokkus aureus* stark, gegen *Rhodokokkus* schwach positiv. Der CAMP Test wird in den ISO und der AOAC Protokollen verwendet und wird von der FDA und der USDA-FSIS Methoden als optional angesehen [HITCHINS, 2002].

Das Prinzip des CAMP Tests ist, dass sich dadurch der Nachweis von *Streptococcus sp.* erbringen lässt. Aufgrund des *S.aureus*- β -Hämolysins (Sphingomyelinase) erfolgt eine verstärkte Hämolyse durch B-*Streptokokken*, das durch eine schüssel- oder keilförmigen Aufhellung der Blutplatte erkennbar wird. Es wird eine Blutplatte in der Mittellinie mit *S.aureus* ausgeimpft. Eine bekannte B-*Streptokokke* wird auf der einen Seite ausgeimpft, darunter eine bekannte D-*Streptokokke* (*Enterococcus sp.*). Beide Impfstriche dürfen die Mittellinie nicht berühren. Der zu testenden Keim wird daraufhin auf der gegenüberliegenden Seite ausgeimpft, auch hier muss sorgsam vorgegangen werden, um die Mittellinie nicht zu berühren. Daraufhin wird für 24 Stunden bei 37° Celsius aerob bebrütet.

Positiv erscheint der Test, wenn die bekannte B-*Streptokokke* einen pfeilähnlichen Hämolysehof zum *S.aureus* Stamm bildet. *Enterokokken* bilden hingegen keinen Hämolysehof, somit erscheint der Test **negativ**.

3.2.2.5 Nährmedien

3.2.2.5.1 Fraser-Anreicherungsbouillon (½)

Hersteller: Firma Merck, Deutschland

Artikelnummer: 1.10398.0500

Typische Zusammensetzung (g/Liter):

Proteose Pepton	5
Caseinpepton	5
Hefeextrakt	5
Fleischextrakt	5
Natriumchlorid	20
di-Natriumhydrogenphosphat	9,6
Kaliumhydrogenphosphat	1,35
Äsculin	1
Lithiumchlorid	3

pH 7,2 ± 0,2

Beschreibung:

Der Fraser-Anreicherungsbouillon (½) dient zur selektiven Voranreicherung von *Listerien* aus Lebensmittel oder Umweltproben. Er ist leicht gelblich gefärbt und licht- und durchlässig. Durch den hohen Anteil von Lithiumchlorid und Kochsalz werden *Enterokokken* und die gramnegative Begleitflora gehemmt. Seine Zusammensetzung entspricht den Vorgaben der DIN EN ISO 11290-1:2005, welche nach „der EG-Verordnung 2073/2005 über mikrobiologische Kriterien für Lebensmittel als

Referenzmethoden vorgeschrieben sind“[HEIPHA].

Für die Untersuchung des Nachweises nach der DIN EN ISO 11290-1:2005 wird die Lebensmittelprobe in Fraser-Anreicherungsbouillon ($\frac{1}{2}$) suspendiert und bei 30° Celsius für 24 Stunden inkubiert. Dann wird aus der Voranreicherung 0,1ml in den 10ml Fraser-Anreicherungsbouillon überimpft.



Abbildung 8: Fraser-Listeria-Selektiv-Anreicherungsbouillon

Zubereitung:

55,0g der Fraser-Anreicherungsbasis werden in 1 Liter demineralisierten Wasser gelöst und anschließend 15 Minuten bei 121° Celsius autoklaviert. Für die Zubereitung des Fraser-Anreicherungsbouillons ($\frac{1}{2}$) muss nach dem Autoklavieren und Abkühlen auf ungefähr 50° Celsius 1 Fläschchen Fraser-Listeria-Selektivsupplement sowie 1 Fläschchen Ammoniumeisen(III)-citrat hinzugefügt werden.

Zusammensetzung Fraser-Listeria-Selektivsupplement:

- 1 Fläschchen Natrium-1-ethyl-1,4-dihydro-7-methyl-4-oxo-1,8-naphthyridin-3-carboxylat
- 1 Fläschchen Ammoniumeisen(III)-citrat

Artikelnummer: 1.10399.0001



Abbildung 9: Fraser-Listeria-Selektivsupplement

3.2.2.5.2 Voll-Fraser–Anreicherungsbouillon

Hersteller: Merck, Deutschland

Artikelnummer: 1.10398.0500

Typische Zusammensetzung des Bouillon (g/Liter):

Proteose Pepton	5
Caseinpepton	5
Hefeextrakt	5
Fleischextrakt	5
Natriumchlorid	20
di-Natriumhydrogenphosphat	9,6
Kaliumhydrogenphosphat	1,35
Äsculin	1
Lithiumchlorid	3

pH 7,2 ± 0,2

Beschreibung:

Der Voll-Fraser–Anreicherungsbouillon ist ebenfalls leicht gelblich gefärbt, licht- und durchlässig und dient als weitere selektive Voranreicherung von *Listeria spp.* aus Lebensmittel oder Umweltproben.

Dem Bouillon muss nach dem 15 minütigen Autoklavieren bei 121° Celsius und Abkühlen auf ungefähr 50° Celsius 2 Fläschchen Fraser-Listeria-Selektivsupplement sowie 1 Fläschchen Ammoniumeisen(III)-citrat hinzugefügt werden. Bebrütung für 48 Stunden bei 35° oder 37° Celsius.

Listerien hydrolysieren Äsculin zu Äsculetin und Glucose, das gebildete Äsculetin bildet mit Eisen(III)-Ionen unlösliche und braun-schwarze Produkte. Das gewonnene Bakterienmaterial aus dem Fraser-Anreicherungsbouillon wird weiters auf einem ALOA und einen weiteren Selektivagar wie bsp. PALCAM ausgestrichen. Ist die Keimdichte von *Listerien* allerdings zu niedrig, kann eine Schwarzfärbung ausbleiben.

3.2.2.5.3 PALCAM -Listeria-Selektiv Agar

Hersteller: Merck, Deutschland

Artikelnummer: 1.11755.0500

Typische Zusammensetzung (g/Liter):

Peptone	23
Hefeextrakt	3
Stärke	1
Äsculin	0,8
Ammoniumeisen(III)-citrat	0,5
Lithiumchlorid	15
D(-)-Mannit	10

Glucose	0,5
Natriumchlorid	5
Agar-Agar	13
Phenolrot	0,08

PH 7,0± 0,2

Beschreibung:

Der klar und leicht rötlich gefärbte Nährboden dient der selektiven Anreicherung von *Listerien* aus Lebensmittel wie Milch und Milchprodukte oder Umweltproben. Er entspricht auch der DIN EN ISO 11290-2.

Der PALCAM-*Listeria*-Selektiv Agar baut auf dem mit Glucose angereicherten Columbia Agar auf, sodass *Listerien* optimalste Wachstumsbedingungen vorfinden. Es ist möglich, quantitative Züchtungen von *L.monocytogenes* zu erzielen, gleichzeitig aber die unerwünschte gramnegative und auch zum Teil grampositive Begleitflora durch Lithiumchlorid, Acriflavin und das Antibiotikasupplement zu hemmen. Die typische Äsculinhydrolyse durch *Listerien* führt zur Bildung von braun-schwarzen Eisen(III)-äsculetin und zur braun-schwarzen Verfärbung des Nährbodens um die grau-grünen *Listerien* Kolonien herum. Mannitol-positive Keime wie bsp. *Staphylokokken* wachsen, sofern sie nicht gehemmt werden, als gelbe Kolonien (Phenolrot-Indikator). Mannitol-negative *L.monocytogenes* können von anderen *Listeria spp.* deutlich unterschieden werden. Der Nährboden wird bei 30° Celsius für 48 Stunden inkubiert.

Verdächtige Kolonien können mittels Gramfärbung (positiv), Katalase (positiv), Säurebildung aus Glucose (positiv) und H₂S-Bildung (negativ) als charakteristische *Listerien* bestätigt werden. Allerdings weist nur *L.monocytogenes* eine typische β-Hämolyse auf und ist auch positiv im CAMP Test.

Zubereitung:

35,9g der Basis werden in 500ml demineralisierten Wasser und weiters in einem Wasserbad gelöst. Dann erfolgt eine 15 minütige Autoklavierung bei 121° Celsius. Nach dem Abkühlen auf ungefähr 50° Celsius wird 1 Fläschchen PALCAM-Listeria-Selektivsupplement mit 1ml demineralisierten Wasser versetzt und geschwenkt. Dieses wird dann dem Nährboden hinzugefügt und gut gemischt. Anschließend werden die Platten unter dem Abzug gegossen und im Kühlschrank gelagert.

Zusammensetzung PALCAM-Listeria-Selektivsupplement nach van Netten et al.[1988]:

- Hemmhofmischung (Lyophilisat)

Artikelnummer: 1.12122.0001



Abbildung 10: PALCAM-Listeria-Selektivsupplement nach van Netten et al. [1988]

3.2.2.5.4 Chromoplate Listeria Selektiv Agar Basis nach OTTAVIANI und AGOSTI (ISO 11290)

Hersteller: Merck, Deutschland

Artikelnummer: 1.00427.0500

Typische Zusammensetzung (g/Liter):

Pepton aus Fleisch	18
Pepton aus Casein	6
Hefeextrakt	10
Natriumpyruvat	2
Glucose	2
Magnesiumglycerophosphat	1
Magnesiumsulfat	0,5
Lithiumchlorid	10
di-Natrium-hydrogenphosphat	2,5
5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl- β -D-Glucopyranosid	0,05
Agar-Agar	13

pH 7,0 $\pm$ 7,4

Beschreibung:

Chromoplate Listeria Selektiv Agar hat eine hohe und reichhaltige Grundlage, die das Wachstum vieler Bakterien begünstigt. Durch die Zugabe von Hemmstoffen kann das Wachstum von Hefen und Pilzen, sowie grampositiven und gramnegativen Begleitkeimen reduziert werden. Durch 5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl- β -D-Glucopyranosid ist eine Differenzierung von β -D-Glucosidase-positiven und -negativen Bakterien möglich. Da *Listerien* β -D-Glucosidase-positiv sind, wachsen sie als blaugüne, türkise Kolonien. Dem Nährboden wird zum Nachweis von *Listeria monocytogenes* L- α -Phosphatidylinosit hinzugefügt, da *Listeria monocytogenes* als Virulenzfaktor das Enzym Phosphatidylinosit-Phospholipase C (PI-PLC) besitzt und bilden sich durch diese Phospholipase-Aktivität sich undurchsichtige Höfe um *L.monocytogenes* Kolonien.

Zubereitung:

35g Basis werden in 300ml demineralisierten Wasser gelöst und gut geschwenkt. Zugabe von weiteren 176ml demineralisierten Wasser und gut mischen. Danach wird ein Wasserbad (ca. 90° Celsius) hergerichtet und die Basis vollständig darin gelöst. Danach wird der Bouillon auf 50° Celsius abgekühlt und 1 Fläschchen Listeria Agar Selektiv-Supplement (Hersteller: Merck, Deutschland) hinzugegeben.

Zusammensetzung Listeria Agar Selektiv-Supplement: Artikelnummer: 1.00432.0010

- Natrium-1-ethyl-1,4-dihydro-7-methyl-4-oxo-1,8-naphthyridin-3-carboxylat

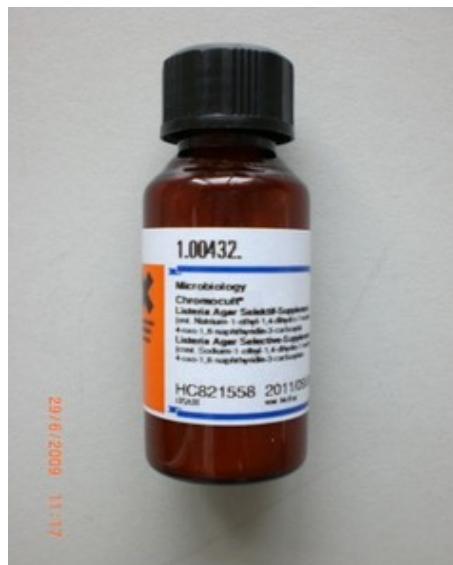


Abbildung 11: Listeria Agar Selektiv-Supplement

3.2.2.5.5 Blutplatten

- Blutagar (Columbia Agar): bioMérieux; Zusatz von defibrinisiertem Hammelblut (5%); Artikelnummer: 43 041

3.2.2.5.6 ALOA - Agar

Hersteller: bioMérieux, Frankreich

Artikelnummer: 43 641

NOTERMANS et al. [1991] wendete als Erster das *plcA* Genprodukt PI-PLC für die Detektion von *L.monocytogenes* an. Die Spaltung durch PI-PLC produzieren wasserunlösliche Fettsäuren rund um die Kolonien mit klaren, lichtundurchlässigen hofähnlichen Zonen. OTTAVIANI et al. [1997] kombinierte dieses Detektionssystem mit der Detektion der β -D-glucosidase Aktivität von *Listeria spp.*, indem das chromogene Substrat 5-bromo-4-chloro-3-indoxyl- β -glucopyranoside verwendet wurde. Das Medium, welches beide Substrate beinhaltet heißt „Agar Listeria according to Ottaviani and Agosti“ (ALOA) [REISSBRODT, 2004]. Abkürzung: OAA

Mit dem ALOA-Medium ist es möglich *L.monocytogenes* und *L.ivanovii* eindeutig gegen andere *Listerien* Arten zu unterscheiden. Der Nährboden ist gelb gefärbt und leicht trüb.

Zusammensetzung des ALOA-Agars (g/l):

Fleischpepton	18
Caseinpepton	6
Hefeextrakt	10
Natriumpyruvat	2
Glucose	2
Magnesiumglycerophosphat	1
Natriumchlorid	5
Lithiumchlorid	10

Magnesiumsulfat	0,5
Dinatriumhydrogenphosphat	2,5
X-Glucosid (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- D-glucopyranosid)	0,05
Ceftazidim	20 mg
Nalidixinsäure	20 mg
Polymyxin B	76700 U
Amphotericin B	10 mg
L- α -Phosphatidylinositol	2
Agar	5

pH 7,2 $\pm$ 0,2

Das virulente PI-PLC wird von *L.monocytogenes* und *L.ivanovii* gebildet und die Aktivität der PI-PLC dann durch den Abbau von L- α -Phosphatidylinositol nachgewiesen, welches sich durch die Ausbildung eines trüben Hofes rund um die Kolonien äußert. β -D-Glucosidase wird von den gesamten *Listerien* gebildet und spaltet das im Nährboden enthaltene chromogene X-Glucosid. Somit erscheinen die Kolonien auf dem Agar blau. Bei den blauen Kolonien mit trüber Hofbildung kann es sich sowohl um *L.monocytogenes* als auch um *L.ivanovii* handeln.

BECKER et al. [2006] haben in einer Studie 2 selektive chromogene Nährböden, ALOA und RAPID`*L.monocytogenes* für den Nachweis von *L.monocytogenes* in Lebensmittel mit einer kulturellen Methode entsprechend der EN DIN 11290-01 und -02 Protokollen (gemäß § 35LMBG) verglichen. Insgesamt wurden 310 vorgepackte RTA-Produkte, hauptsächlich kaltgeräucherter Lachs auf *L.monocytogenes* untersucht, welcher in 52 Lachsproben gefunden wurde. Unter Verwendung der zwei chromogenen Nährböden wurden 50 Lebensmittelproben als positiv bewertet, verglichen mit Referenzmethoden wurden keine falsch-positiven Ergebnisse geliefert. Bei der kulturellen Methode gemäß EN DIN 11290-01 gab es 12 positive Ergebnisse aus 130 Wurstproben für

L.monocytogenes. Auf dem chromogenen RAPID`L.monocytogenes Medium waren diese 12 Wurstproben ebenfalls positiv, auf dem ALOA Medium war nur ein falsch negatives Ergebnis zu verzeichnen. Beide chromogene Nährmedien erlauben vor allem eine schnelle und spezifische Detektion von *L.monocytogenes* innerhalb von 24 Stunden. Auch der visuelle Nachweis von *L.monocytogenes* und anderen *Listeria spp.* gestaltete sich unter der Verwendung chromogener Nährmedien wesentlich einfacher [BECKER et al., 2006].

GREENWOOD et al. [2005] beurteilten in einer Studie die Effizienz chromogener Nährmedien, ALOA und Rapid`L.mono Agar, verglichen mit Oxford Agar für die Auszählung und den Nachweis von *Listeria* Spezies in Lebensmittel. Aus 63 Proben wurden *Listeria* Arten isoliert und in Gegensatz zum Oxford Agar war der Nachweis von *Listeria* Kolonien auf den chromogenen Nährmedien nach 24 Stunden Inkubation genau so effizient wie nach 48 Stunden. Hinsichtlich der Gewinnung von *L.monocytogenes* auf den drei beschriebenen Nährmedien gab es keinen signifikanten Unterschied, hingegen war die Gewinnung von anderen *Listeria* Arten signifikant schlechter auf Rapid`L.mono verglichen mit Oxford und ALOA Agarplatten. Die Resultate zeigten, dass bei der Verwendung chromogener Nährmedien eine Identifikation von *L.monocytogenes* nach 24 stündiger Inkubation möglich ist, verglichen mit drei bis vier Tagen bei der Verwendung des Oxford Agars. Anzumerken ist, dass der schlechte Nachweis von anderen Arten als *L.monocytogenes* auf Rapid`L.mono einen wesentlichen Nachteil darstellt. In dieser Studie wird auch darauf hingewiesen, dass sie neue Informationen bezüglich der Isolation anderer Arten als *L.monocytogenes* unter Verwendung chromogener Nährmedien liefert. Es ist insofern von wichtiger Relevanz, da apathogene *Listeria* Arten als Marker für das Vorhandensein von *L.monocytogenes* angesehen werden können und dies erlaubt präventive Maßnahmen zu setzen, um dies zu verhindern [GREENWOOD et al., 2005].

LONCAREVIC et al. [2008] organisierten eine kollaborative Studie um die Effizienz der verbesserten NMKL Methode No.136 „*Listeria monocytogenes*, detection and enumeration in foods“ zu erläutern. ALOA Medium wurde in dieser verbesserten Methode miteinbezogen um die Sensitivität und Spezifität zu verbessern und auch die

Analysezeit zu verkürzen. Die Effizienz von ALOA One Day (von AES), Listeria Chromogenic Agar (von Lab M), Chromogenic Listeria Agar Plates (von Oxoid) und *L.monocytogenes* Blutagar Medium LMBA (von Lab M) wurden getestet. Drei Lebensmittelgruppen mit 24 Proben wurden daraufhin zum Test herangezogen. Zunächst wurde der erste Anreicherungsschritt mit Fraser ($\frac{1}{2}$) und danach in einem zweiten Anreicherungsschritt mit Voll-Fraser durchgeführt. Je höher das Beimpfungslevel war, desto besser war der Nachweis für *L.monocytogenes*. Die verbesserte NMKL Methode No. 136 liefert somit exzellente Ergebnisse in der Detektion von *L.monocytogenes* in Lebensmittel und wird zu Analyse von *L.monocytogenes* in Lebensmittel empfohlen. Auch die Arbeitszeit, sowie die Arbeitsintensität konnte ebenfalls vermindert werden [LONCAREVIC et al., 2008].

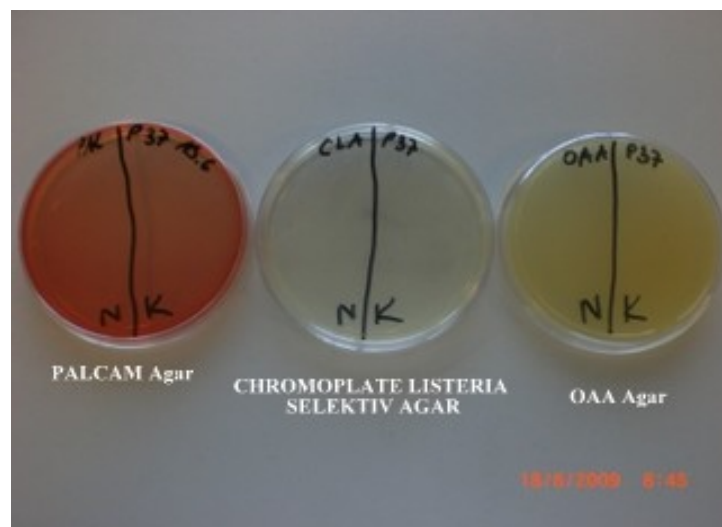


Abbildung 12: Nährböden von links nach rechts:
PALCAM Agar, Chromoplate Listeria Selektiv Agar,
OAA Agar. Aussehen der Platten ohne Bakterien.

PALCAM Agar sowie Chromoplate Listeria Selektiv Agar (Basis) wurden selber gegossen, OAA wurde von der Firma bioMérieux geliefert.

Beschriftung der Platten:

- „PAL“ = PALCAM
- „CLA“ = Chromoplate Listeria Selektiv Agar

- „OAA“

Teilung der Platten in zwei Hälften: „N“ = Native Probe, „K“ = Kontaminierte Probe
 „P 37“ = Probennummer

3.2.3 Verwendete Nährböden und Geräte

Zur Untersuchung der Lebensmittelproben wurden folgende Nährböden und Geräte verwendet:

- Ottaviani Agosti ready-to-use agar plates (bioMérieux) – Abkürzung: OAA
- Chromoplate Listeria agar (Merck) – Abkürzung: CLA
- PALCAM Agar (Merck)
- Blutagar (Columbia Agar)
- Stomacher Lab-Blender 400; Seward Laboratory, London, Model No. BA6021
- Stomachersäcke
- Waage
- Sterile Wattestäbchen
- Impföse
- Gasbrenner
- Aqua dest.
- Steriles Besteck
- Gram-Färbung-Utensilien
- 250ml Glasflaschen
- 1l Glasflaschen
- leere Epprouvettenröhrchen
- Epprouvettenständer
- 1ml, 10ml, 50ml Pipetten
- Paläusball
- Eppendorf Pipetten
- Glasspatel

- Plastikpipette
- Flächendesinfektionsflasche
- Brutschrank
- Lichtmikroskop

3.2.4 Probenteilung

Die Lebensmittelproben wurden jeweils in 4 Teile zu je 25g aufgeteilt:

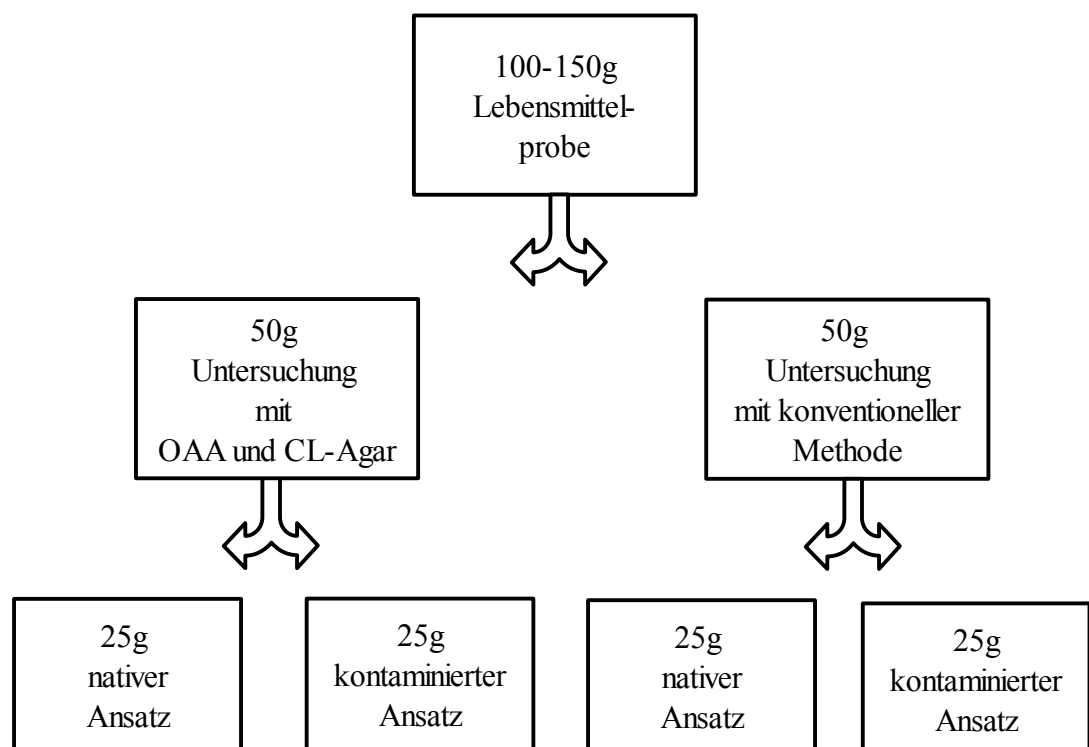


Abbildung 13: Schema der Teilung der Lebensmittelproben

Jeweils zwei von diesen vier Teilen wurde mit OAA und Chromoplate Listeria Agar untersucht, wobei ein Teil nativ belassen wurde und der zweite Teil kontaminiert wurde.

Die restlichen zwei Teile wurden nach der konventionellen Methode untersucht, bei der ebenfalls ein Teil nativ belassen und der andere Teil kontaminiert wurde.

3.2.5 Kontamination mit Referenzstämmen

Ein Teil der Proben wurde mit bekannten und definierten Referenzstämmen in der

ersten Anreicherungsstufe kontaminiert, um bessere Vergleichsmöglichkeiten zwischen den verwendeten unterschiedlichen Nährböden und Methoden zu erzielen.

3.2.5.1 Referenzstämme

Folgende Referenzstämme wurden verwendet:



Abbildung 14: ATCC7644

L.monocytogenes



Abbildung 15: ATCC5579

L.monocytogenes



Abbildung 16: DSM20600

L.monocytogenes

Die Referenzstämme Punkt 1-3 wurde freundlicherweise von Prof. Schoder, Veterinärmedizinischen Universität Wien, zur Verfügung gestellt.

3.2.5.2 Kontaminationsvorgang

Die verwendeten oben genannten Referenzstämme wurden zu aller erst auf einem kollektiven Medium wie Columbia Agar ausgestrichen und für 24 Stunden bei 37° Celsius inkubiert.

Der nächste Schritt beinhaltete die Herstellung einer Keimsuspension:

Zwei bis drei sichtbare Einzelkolonien der unterschiedlichen Stämme wurden vorsichtig mit einer Öse entnommen und in 7 ml Verdünnungsmedium gelöst und gut geschüttelt.

Anschließend wurden 1,25ml (=1250µl) mit einer automatischen Pipette zu dem zu kontaminierenden Probenansatz „K“ gegeben.

Die Kontamination erfolgte nur auf der Stufe der ersten Voranreicherung:

- Fraser - Anreicherungsbouillon (½)

3.2.5.3 Erstellen einer Verdünnungsreihe

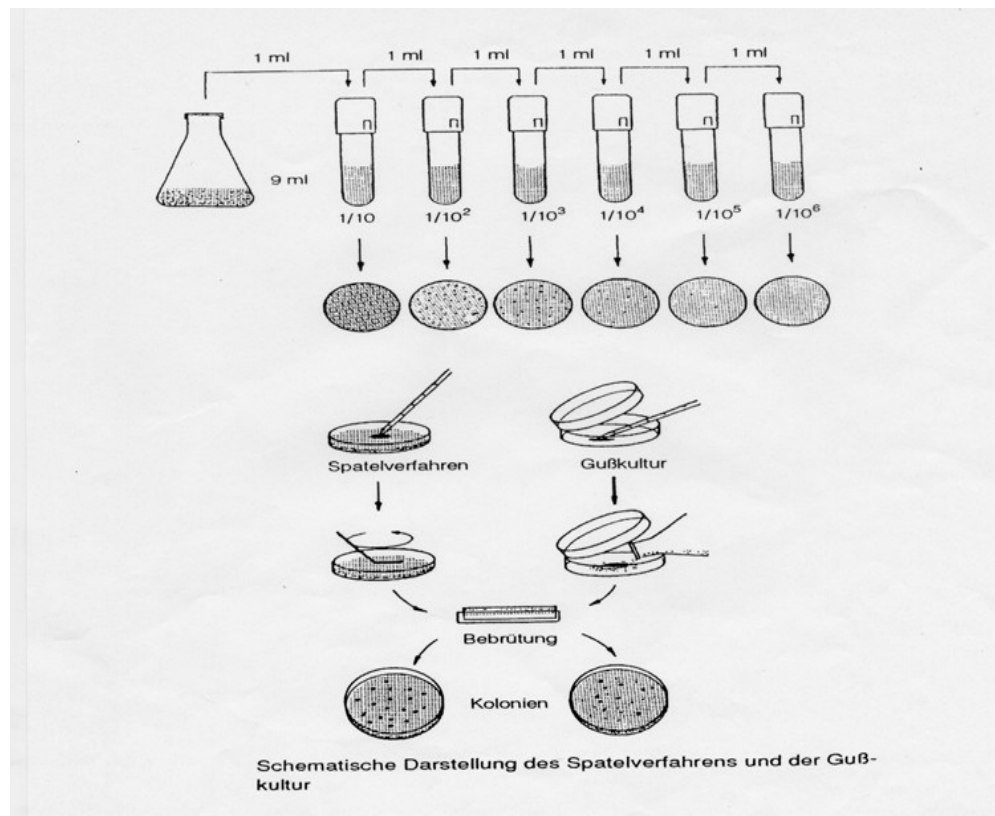


Abbildung 17: Verdünnungsreihe

Bei Untersuchungen von Lebensmittel muss stets eine Verdünnungsreihe angelegt werden, um die Keimzahl zu bestimmen.

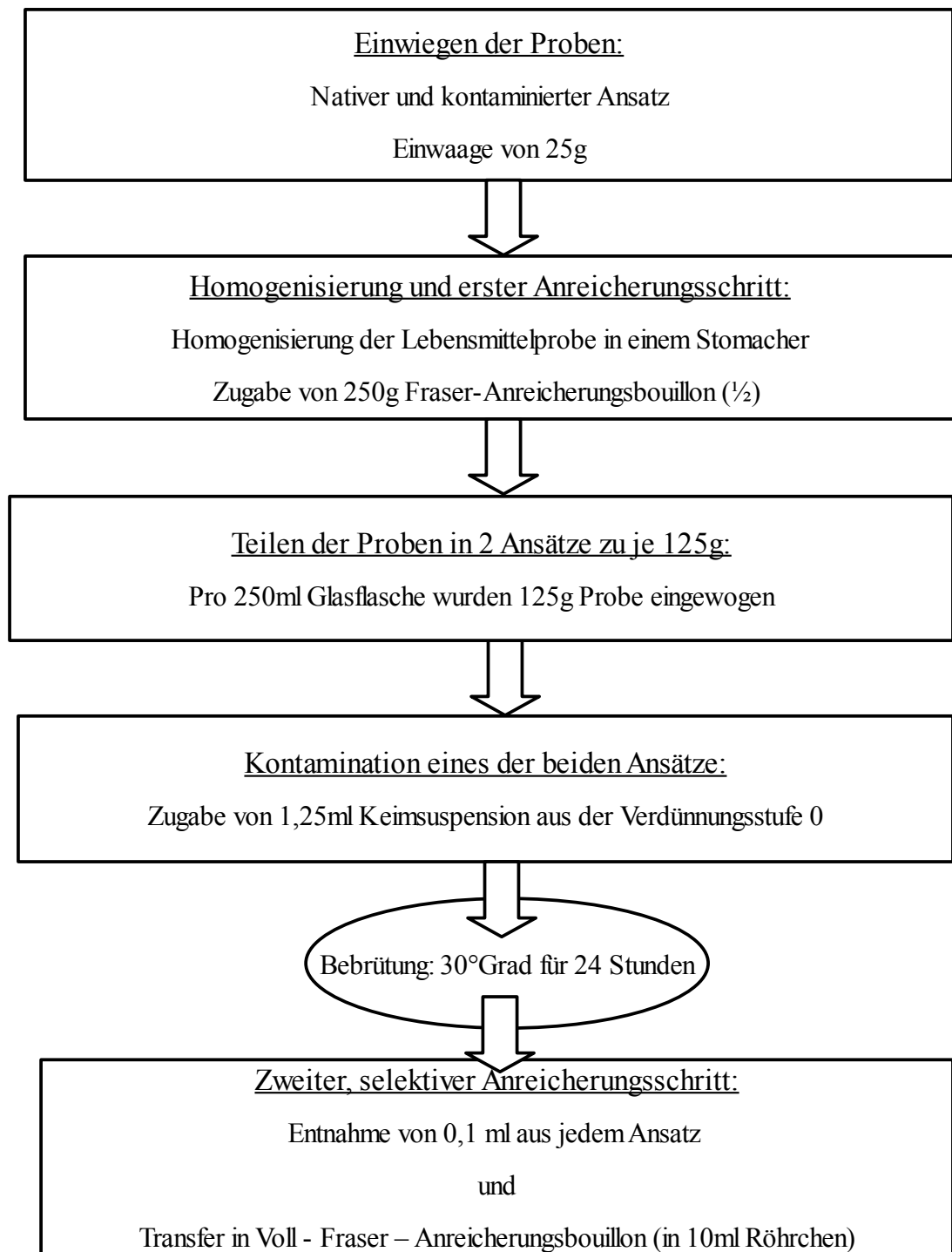
Stufe 0 wurde vor Anlegen der Verdünnungsreihe unter Verwendung einer Öse mit 2-3 Kolonien von *Listeria monocytogenes* (Blutagar) versetzt und gut geschüttelt. Dann wurde jeweils 1ml in das nächste Röhrchen pipettiert, bis Stufe 5.

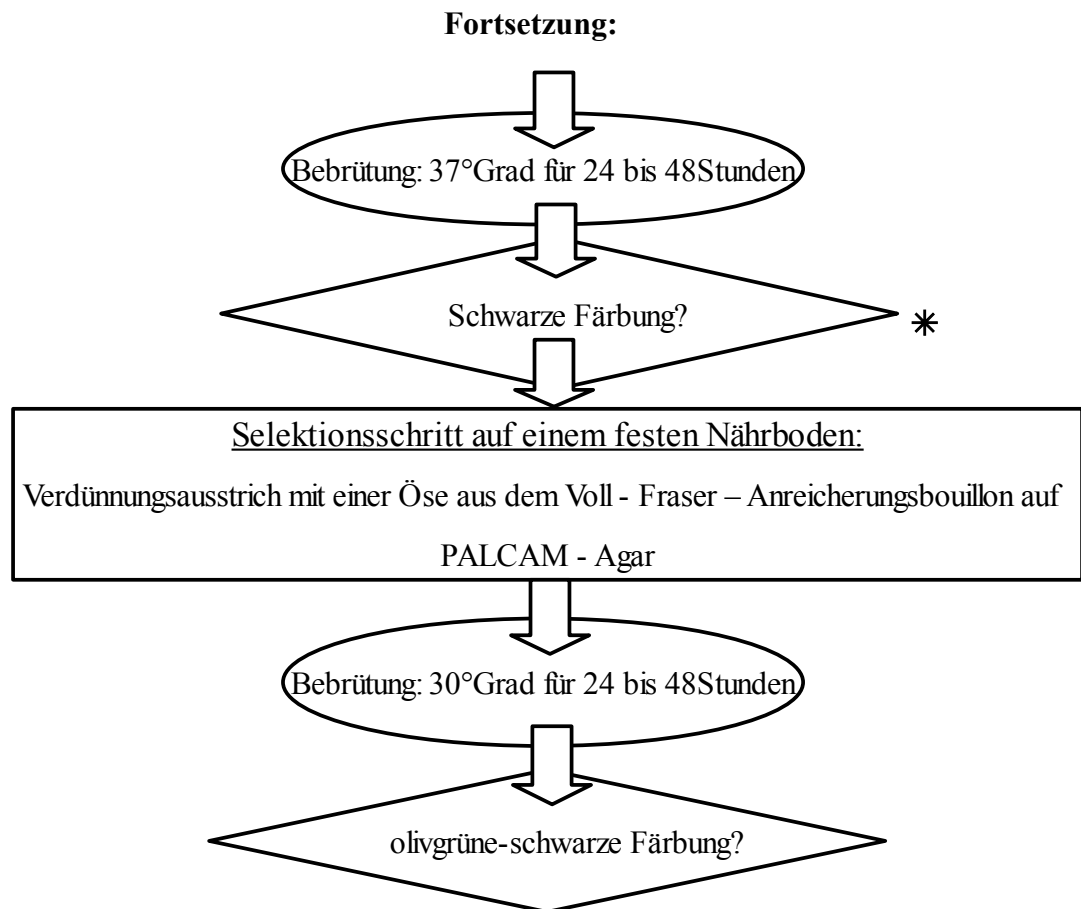
0,1ml von Stufe 3, Stufe 4 und Stufe 5 wurde auf einem Columbia Agar pipettiert, mit einem Glasspatel gut verteilt und bei 37° Celsius für 24 Stunden inkubiert. Es zeigte sich im Verlauf der Probenuntersuchungen, dass ein Ausspateln von Stufe 0, Stufe 1 und Stufe 2 nicht nötig war, da die Kolonien nicht auszählbar waren.

Nach der Inkubation wurden die Kolonien ausgezählt, dokumentiert und ausgerechnet.

3.2.6 Konventionelle Methode

3.2.6.1 Untersuchung der Lebensmittelprobe – grafischer Überblick





***:** Die olivgrüne-schwarze Färbung nach Bebrütung des Voll-Fraser-Anreicherungsbouillons gibt keinen Aufschluss darüber, ob die Probe bereits positiv oder negativ zu bewerten ist. Eine Schwarzfärbung des bearbeiteten Voll-Fraser-Anreicherungsbouillons gibt Aufschluss darüber, dass Äsculin hydrolisiert wurde, jedoch hydrolisieren auch *Enterokokken* Äsculin. Deshalb müssen beide Probenansätze, auch wenn eines der beiden negativ erscheint, auf Agarplatten ausgestrichen werden, um sie exakt beurteilen zu können.

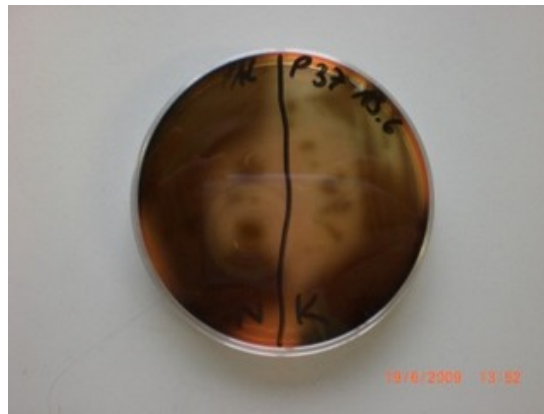
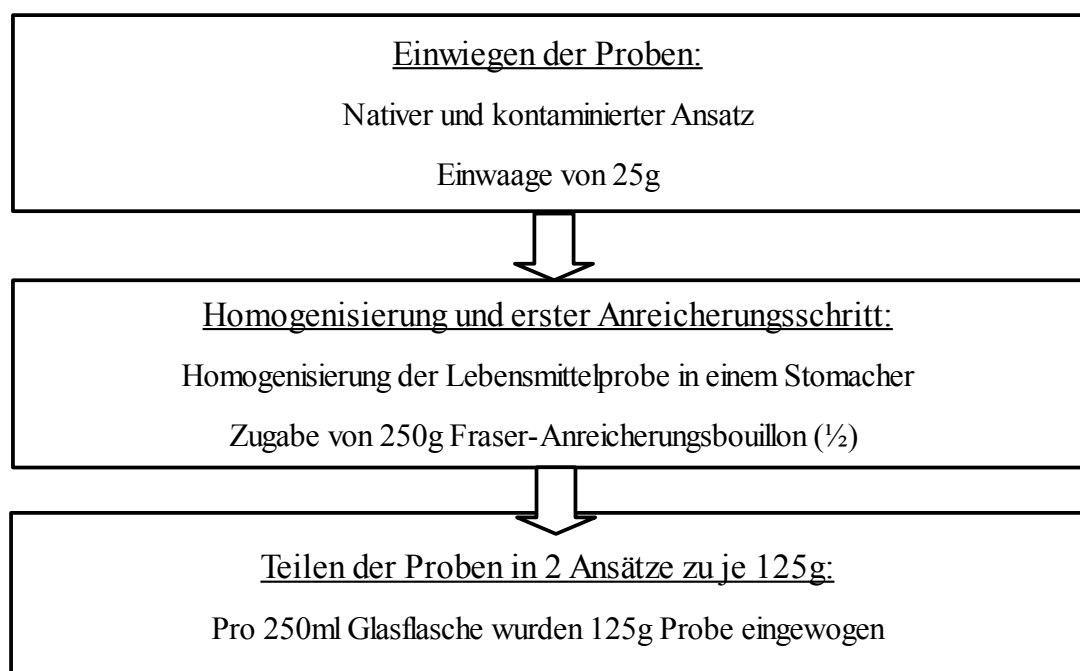


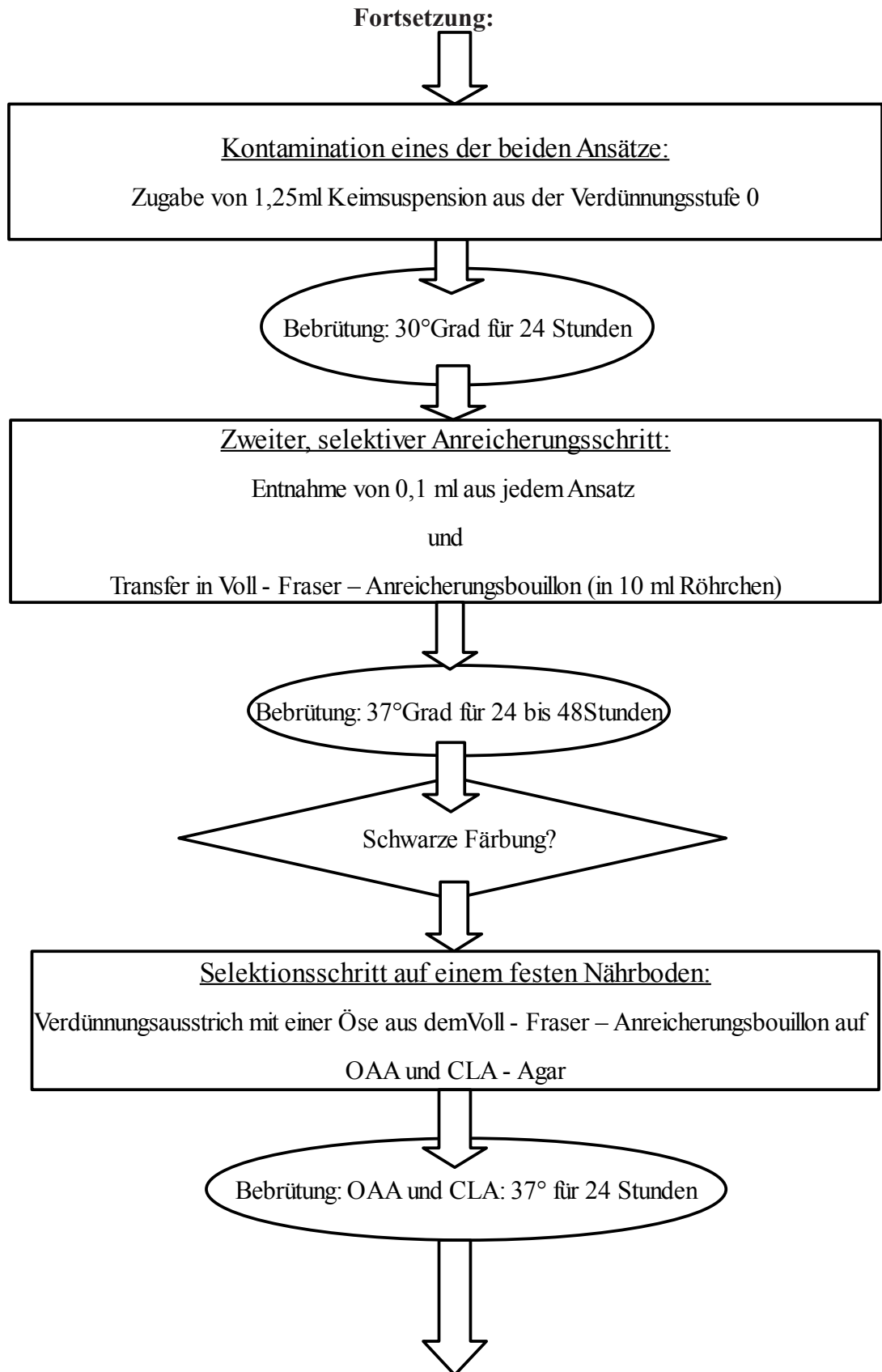
Abbildung 18: Falsch positiv
erscheinende Lebensmittelprobe auf
PALCAM Agar

Linke Agarseite: „N“ = falsch positiv

Rechte Agarseite: „K“ = richtig positiv (absichtlich kontaminierte Probe)

3.2.6.2 Die Methode mit Ottaviani Agosti ready-to-use agar plates und Chromoplate *Listeria* agar – grafischer Überblick





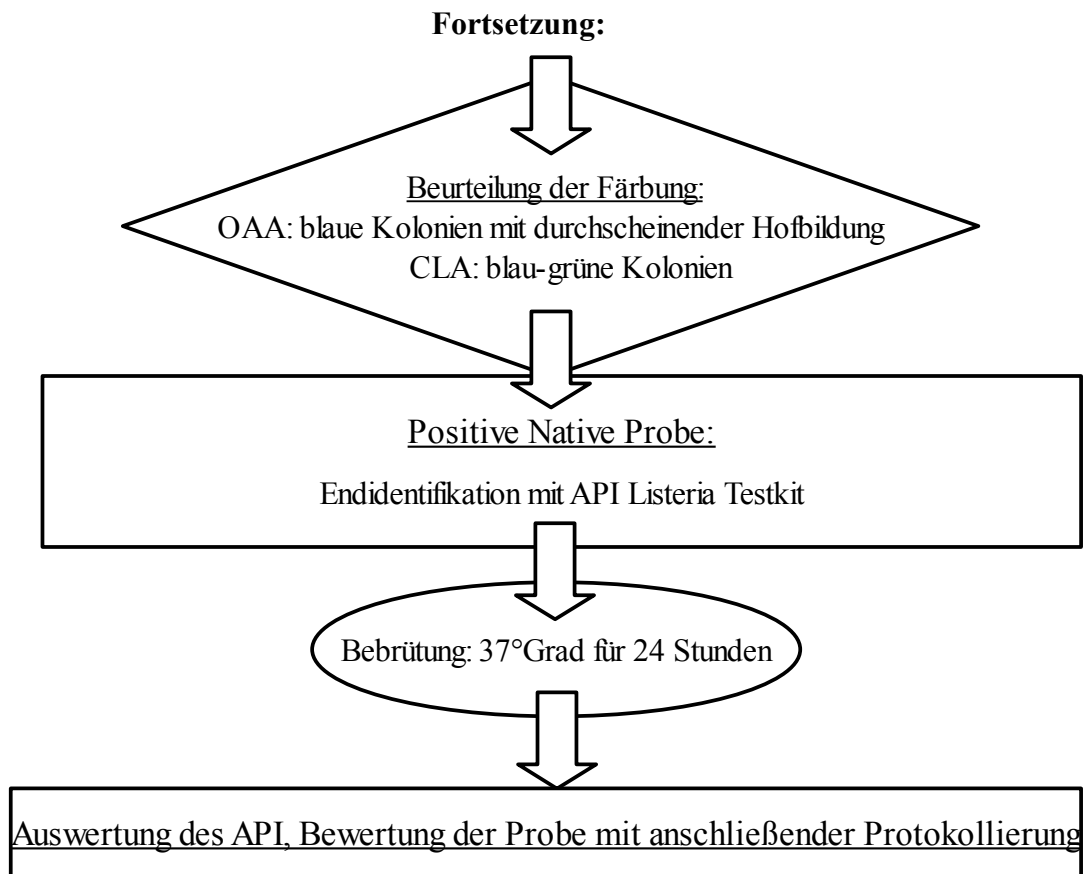


Abbildung 19: Falsch positiv

erscheinende Lebensmittelprobe auf OAA

Linke Agarseite: „N“ = falsch positiv mit leicht trüber Hofbildung

Rechte Agarseite: „K“ = richtig positiv mit deutlich sichtbarer Trübung um den Hof
(absichtlich kontaminierte Lebensmittelprobe)

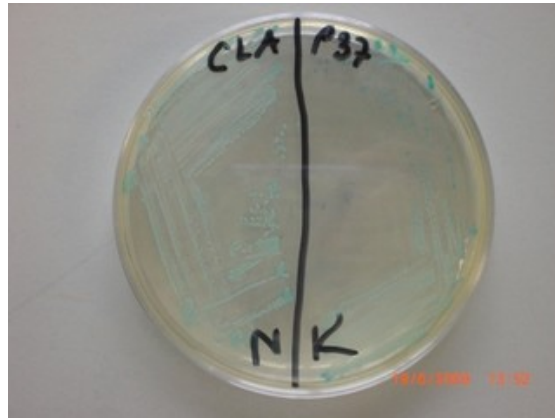


Abbildung 20: Falsch positiv
erscheinende Lebensmittelprobe auf CLA

Rechte Agarseite: „N“ = falsch positiv (blau-grüne Kolonien)

Linke Agarseite: „K“ = richtig positiv (absichtlich kontaminierte Probe)

3.2.6.3 API Listeria Identifikationssystem

Im Zuge der konventionellen Methoden wird für gewöhnlich zur Endidentifikation das Testkit „API Listeria 10 300“ von der Firma bioMérieux verwendet. Es ist ein standardisiertes System zur Identifizierung von *Listeria Species* anhand von minimierten Reaktionen und einer Datenbasis (Identifizierungssoftware *apiweb*TM). Dieses System ist für die in vitro Diagnostik geeignet.

In solch einer Verpackung befinden sich 10 Inkubationswannen, 10 API Listeria Streifen, 10 Ampullen API Suspension Medium 2 ml, 1 Ampulle ZYM B Reagenz, 10 Ergebnisblätter und 1 Arbeitsanleitung.

ZYM B Reagenz besteht aus:

Fast Blue BB (aktive Substanz)	0,12 g
Methanol	40 ml
Dimethylsulfoxid (DMSO)	60 ml

Das Reagenz ist leicht entzündlich und giftig.



Abbildung 21: ZYM B Reagenz

Prinzip:

API Listeria besteht aus 10 Mikroröhrchen, welche dehydrierte Substrate zum Nachweis von Enzymaktivität oder Kohlenhydratfermentation enthalten. Während der Inkubation entstehen Stoffwechselprodukte, welche Farbumschläge, entweder direkt oder nach Zugabe der Reagenzien (Reagenz: ZYM B), bewirken. Nach einer Inkubation von 24 Stunden bei 37° Celsius wird der Streifen visuell mit Hilfe einer beiliegenden Ablesetabelle ausgewertet [„Arbeitsanleitung zu API Listeria“; Firma bioMérieux].

Arbeitsanleitung:

1. Herstellung einer Keimsuspension

Von den hämolysierend-positiven Blutplatten werden einige typische Einzelkolonien mit Hilfe eines Wattestäbchens entnommen und mit dem beiliegenden 2 ml Suspensionsmedium aufgeschwemmt. Es sollte sich eher um junge Kolonien (18-24 Stunden) handeln.

2. Vorbereitung des Streifens

Zu Herstellung einer feuchten Kammer wird in die Inkubationswanne ungefähr 2-3 ml destilliertes Wasser eingefüllt und anschließend wird der Streifen mit den Mikroröhrchen vorsichtig hineingelegt.

3. Beimpfen des Streifens

Mit einer Plastikpipette wird nun nach der Arbeitsanleitung die hergestellte Keimsuspension in die Mikroröhrchen pipettiert. Man sollte vorsichtig arbeiten, damit

keine Luftblasen in die Mikroröhrchen gelangen. Danach wird die Inkubationswanne mit dem Deckel geschlossen und bei 37° Celsius für 18-24 Stunden in einer aeroben Atmosphäre inkubiert.

4. Ablesen des Streifens

Die Reagenzien werden hinzugegeben und innerhalb von 3 Minuten müssen die Reaktionen mittels einer beiliegenden Ablesetabelle abgelesen werden, da später Farbveränderungen auftreten können. Die Reaktionen werden auf einem beiliegenden Ergebnisblatt notiert und die Identifizierung erfolgt mit Hilfe eines numerischen Profils. Die abschließende Identifizierung erhält man durch Nachschlagen in der Profilliste.



Abbildung 22: API Listeria Testkit nach 24 stündiger Bebrütung und Zugabe von ZYM B Reagenz



Abbildung 23: API Listeria Ergebnisblatt

4. Ergebnisse

4.1 Auswertung der Lebensmitteluntersuchungen

4.1.1 Probenverteilung

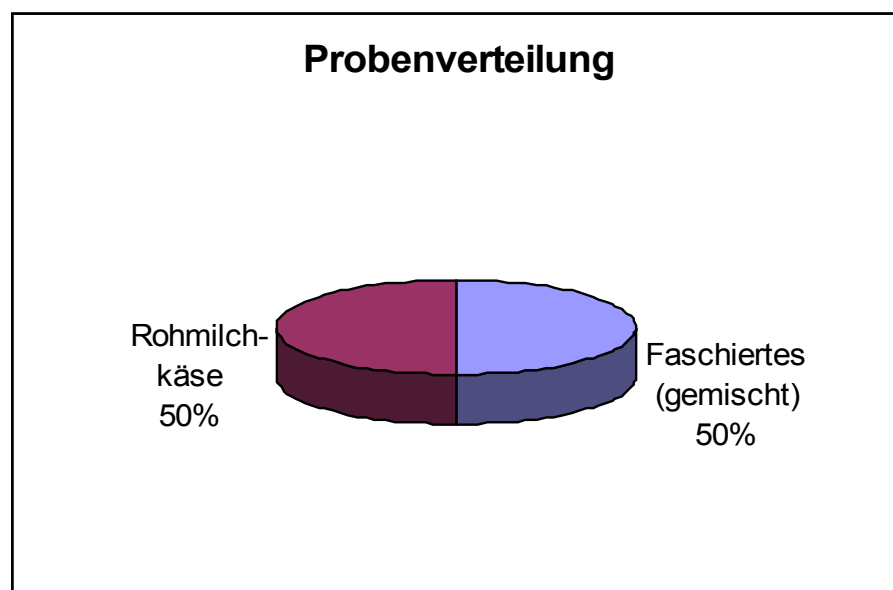


Abbildung 24: Probenverteilung in Prozent (%)

Insgesamt 50 Lebensmittelproben wurden auf das Vorhandensein von *Listeria monocytogenes* qualitativ untersucht. Es handelte sich hierbei zu 50% (n=25) um Rohmilchkäse und zu 50% (n=25) um gemischtes faschiertes Fleisch. Das gemischte faschierte Fleisch bestand aus gemischtem faschierten Rindfleisch und aus gemischtem faschierten Schweinefleisch. Eine untersuchte Probe wurde dann als positiv beurteilt, wenn *Listeria monocytogenes* auf mindestens einem Nährmedium identifiziert werden konnte. Insgesamt wurden 36 richtig negative und 14 falsch positive Proben ausgewertet. Von den insgesamt 25 Rohmilchkäseproben wurden 24% als richtig negativ beurteilt und 1% als falsch positiv beurteilt. Es gab 0% richtig positive und 0% falsch negative Rohmilchkäseproben.

4.1.2 Probenbeurteilung

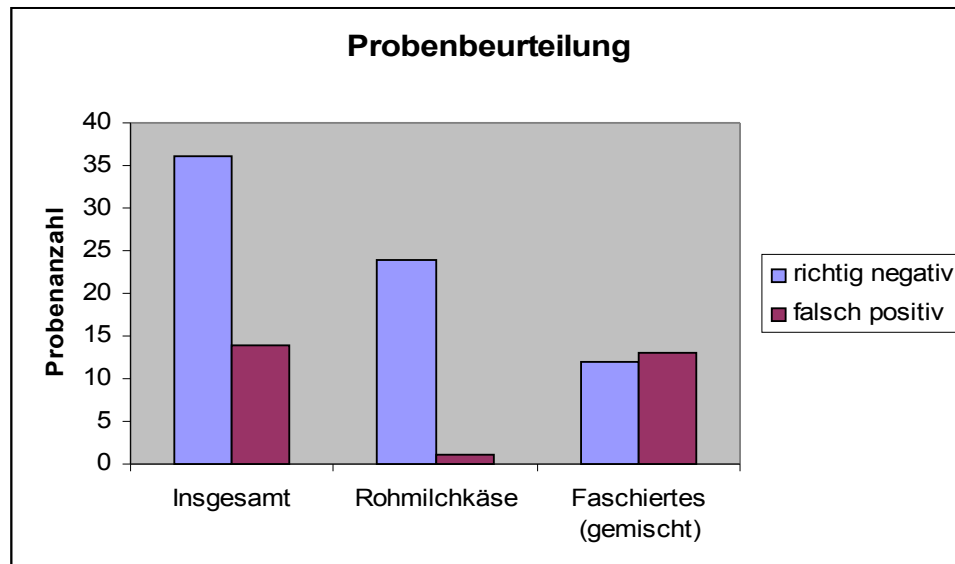


Abbildung 25: Probenbeurteilung der 50 Lebensmittelproben auf das Vorkommen von *Listeria monocytogenes*

Die verschieden verwendeten Nährmedien zeigten unterschiedliche Zuverlässigkeit beim Nachweis von *Listeria monocytogenes*.

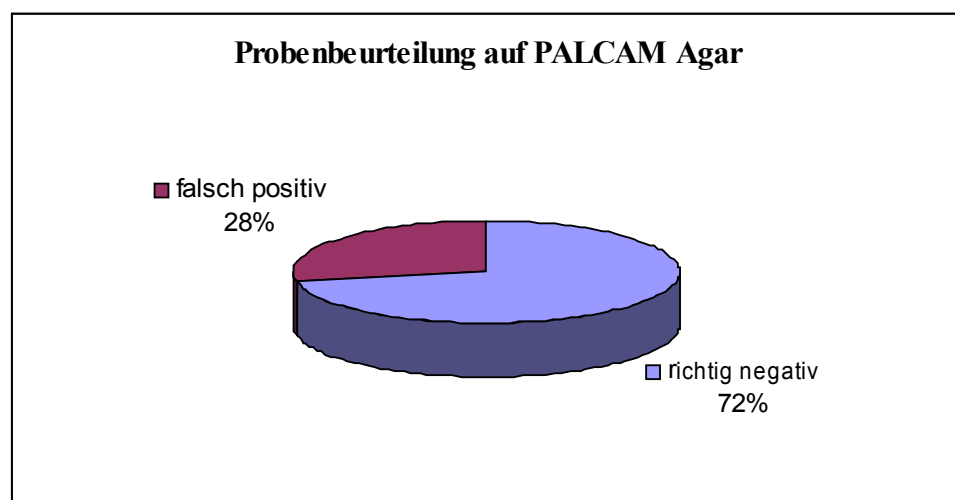


Abbildung 26: Beurteilung der Proben auf PALCAM Agar

Auf PALCAM Agar wurde der Mittelwert der falsch positiven und richtig negativen KBE auf 25 mit einer Standardabweichung von gerundet 15,6 berechnet.

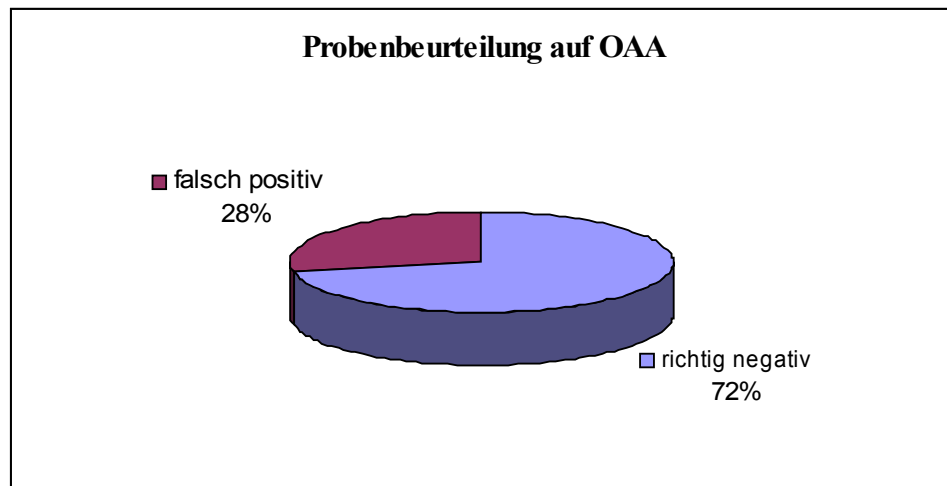


Abbildung 27: Beurteilung der Proben auf OAA

Auf OAA wurde der Mittelwert der falsch positiven und richtig negativen KBE auf 25 mit einer Standardabweichung von gerundet 15,6 berechnet.

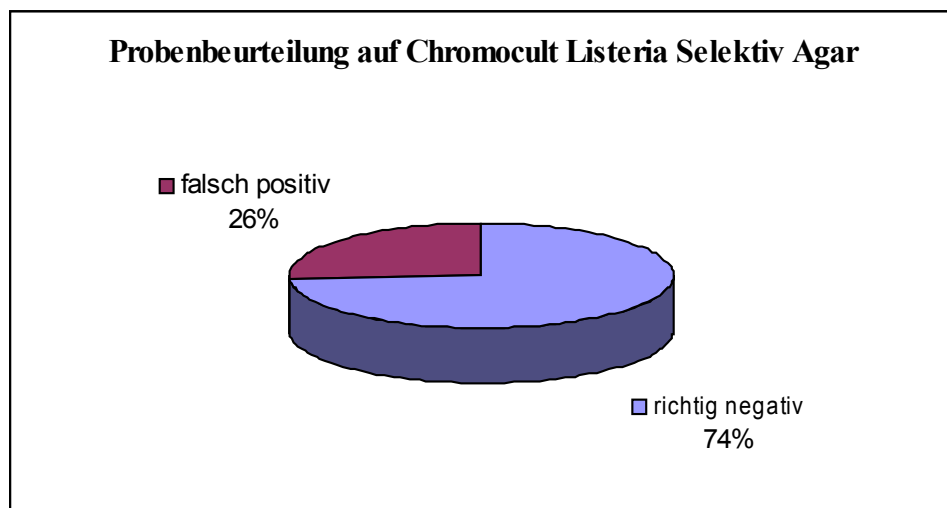


Abbildung 28: Beurteilung der Proben auf Chromoplate Listeria Selektiv Agar

Auf Chromoplate Listeria Selektiv Agar wurde der Mittelwert der falsch positiven und richtig negativen KBE auf 25 mit einer Standardabweichung von 16,97 berechnet (auf 2 Dezimalstellen gerundet).

4.1.3 Auswertung der nativen Lebensmittelproben

4.1.3.1 Gesamtauswertung

Bei den Untersuchungen der Lebensmittelproben konnte zwischen der konventionellen Methode und der Methode nach Ottaviani Agosti ready-to-use agar plates und Chromoplate Listeria Agar nicht all zu große Unterschiede festgestellt werden.

Die konventionelle Methode wurde mit PALCAM Agar durchgeführt und zeigte bei 72% (n=36) ein richtig negatives Ergebnis. Bei 28% (n=14) wurde das Ergebnis als falsch positiv bewertet. Es gab weder richtig positive noch falsch negative Lebensmittelproben, weswegen auch keine Ergebnisse vorliegen.

	Richtig positiv	Falsch positiv	Richtig negativ	Falsch negativ
Konv. - Methode (PALCAM)	0	14,00%	36,00%	0

Von den 14 falsch positiven Kolonien wurden drei als grampositive Stäbchen, 13 als grampositive Kokken (*Mikrokokken*), eins als grampositive *Diplokokken* und eins als *Bacillus cereus* identifiziert. Es waren teilweise in einer Probe verschiedene Bakterienarten angesiedelt.

Aufgrund dieser Ergebnisse ergibt sich für PALCAM Agar eine Sensitivität von 0%, eine Spezifität von 72% und eine Effizienz von 72%.

Bei der Methode nach Ottaviani Agosti ready-to-use agar plates und Chromoplate Listeria Agar gab es bei den Untersuchungen der Lebensmittelproben nur geringe Unterschiede. Wie auch bei der konventionellen Methode wurde bei der Methode nach Ottaviani Agosti ready-to-use agar plates 72% (n=36) ein richtig negatives Ergebnis und

bei 28% (n=14) ein falsch positives Ergebnis erzielt.

Bei der Methode nach Chromoplate Listeria Agar wurden 74% (n=37) der getesteten Lebensmittelproben als richtig negativ bewertet und bei 26% (n=13) waren die Ergebnisse falsch positiv. Ebenfalls bei diesen durchgeführten Methoden gab es weder richtig positive noch falsch negative Ergebnisse.

	Richtig positiv	Falsch positiv	Richtig negativ	Falsch negativ
Chromoplate Listeria Agar	0	13,00%	37,00%	0

Wie auch bei PALCAM Agar und Ottaviani Agosti ready-to-use agar plates wurden bei Chromoplate Listeria Agar bei den 13 falsch positive Kolonien 3 als grampositive Stäbchen, 13 als grampositive Kokken (*Mikrokokken*), 1 als grampositive *Diplokokken* und 1 als *Bacillus cereus* identifiziert. Auch hier waren teilweise in einer Probe verschiedene Bakterienarten angesiedelt.

Aus diesen Ergebnissen berechnet sich eine Sensitivität von 0%, eine Spezifität von 74% und eine Effizienz von 74%.

4.1.3.2 Rohmilchkäse

Bei der konventionellen Methode wie auch bei Ottaviani Agosti ready-to-use agar plates konnten von den insgesamt 25 getesteten Lebensmittel lediglich 4% (n=1) als falsch positiv bewertet werden. Bei 96% (n=24) der Proben handelte es sich um richtig negatives Ergebnis.

	Richtig positiv	Falsch positiv	Richtig negativ	Falsch negativ
Konv. - Methode (PALCAM)	0	1,00%	24,00%	0

Bei der Verwendung von Chromoplate Listeria Agar gab es zu 100% (n=25) ein richtig negatives Ergebnis. 0% (n=0) der Proben gaben ein falsch positives, falsch negatives

oder richtig positives Ergebnis.

	Richtig positiv	Falsch positiv	Richtig negativ	Falsch negativ
Chromoplate Listeria Agar	0	0	25,00%	0

4.1.3.3 Gemischtes Faschiertes

Insgesamt wurden 25 native Fleischproben auf das Vorhandensein von *Listeria monocytogenes* untersucht. Bei der konventionellen Methode sowie auch bei Ottaviani Agosti ready-to-use agar plates und Chromoplate Listeria Agar zeigten 52% (n=13) ein falsch positives und 48% (n=12) ein richtig negatives Ergebnis. Es konnte bei den getesteten Fleischproben kein *Listeria monocytogenes* gefunden werden, somit gab es keine richtig positiven und keine falsch negativen Ergebnisse.

4.1.4 Auswertung der absichtlich kontaminierten Lebensmittelproben

Bei 100% (n=50) aller durchgeführten Lebensmitteluntersuchungen konnte bei der absichtlichen Kontamination mit *Listeria monocytogenes* ein richtig positives Ergebnis erzielt werden. Da in den nativen Lebensmittelproben *Listeria monocytogenes* nicht nachgewiesen werden konnte, wurde ein API Listeria mit einer kontaminierten Lebensmittelprobe durchgeführt.

	Richtig positiv	Falsch positiv	Richtig negativ	Falsch negativ
Gesamt- auswertung	50,00%	0	0	0

4.1.5 Auswertung der Referenzstämme

4.1.5.1 Erscheinungsbild von *Listeria monocytogenes* auf den verschiedenen Nährmedien

- **PALCAM Agar**

Die getesteten *Listeria monocytogenes* - Stämme zeigten nach 24 stündiger Bebrütung bei 30° Celsius die für sie typische Morphologie sowie Färbung. In allen absichtlich kontaminierten Lebensmittelproben konnte aufgrund der Anreicherung mit Glucose im PALCAM Agar *Listeria monocytogenes* wachsen. Aufgrund der für *Listerien* typischen Äsculinhydrolyse mit der Bildung von schwarz-braunem Eisen (III)-äsculetin wurde der Nährboden schwarz gefärbt und die *Listerien* Kolonien erschienen in einem grün-grauen Farbton.

Eine weitere Bebrütung für 24 Stunden zeigte keine starke Veränderung im Wachstum.

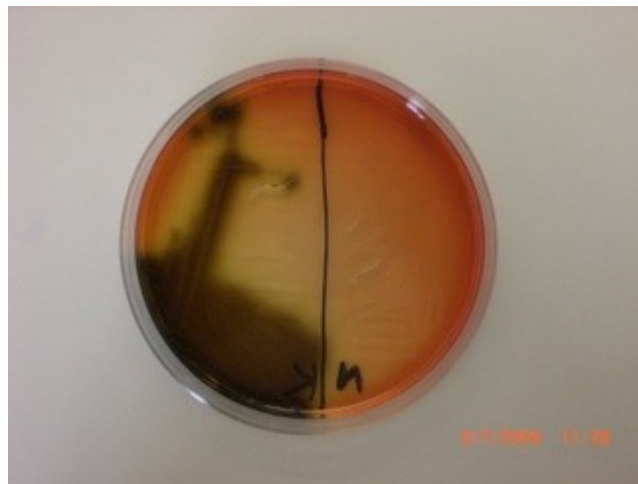


Abbildung 29: *Listeria monocytogenes* auf PALCAM Agar

„K“ = Kontamination

„N“ = Nativ

- OAA

Bei allen 50 durchgeführten Lebensmitteluntersuchungen mit absichtlicher Kontamination mit *Listeria monocytogenes* konnte auf OAA das typische Erscheinungsbild sowie Färbung und opaquer Hofbildung nachgewiesen werden.

Nach 24 stündiger Bebrütung bei 37° Celsius färbten sich die Kolonien blau-grün (türkis) und wiesen eine deutliche Hofbildung auf. Wurde der Nährboden weitere 24 Stunden bebrütet, überlappten sich teilweise die Höfe miteinander, sodass es schwierig war die typischen Höfe zu erkennen. Die Durchführung einer Identifizierung war demnach nicht mehr eindeutig möglich, da die Hofbildung ein äußerst wichtiges Erscheinungsmerkmal darstellt. Auch einige andere grampositiven Bakterien zeigten auf diesem Agar türkise Kolonien mit typischer Hofbildung.



Abbildung 30: *Listeria monocytogenes* auf OAA

„K“ = Kontamination

„N“ = Nativ

- **Chromoplate Listeria Selektiv Agar**

Listeria monocytogenes erschien nach 24 stündiger Bebrütung bei 37° Celsius als helltürkise Kolonien mit einem undurchsichtigen Hof auf dem Nährboden. Teilweise waren die Kolonien schwach gewachsen, weswegen sich eine weitere 24 stündige Bebrütung bewährte. Andere grampositive Bakterien, wie *Mikrokokken*, wuchsen ebenfalls auf dem Nährboden blau-grün.



Abbildung 31: *Listeria monocytogenes* auf Chromoplate Listeria Selektiv Agar

4.2 Auswertung der Wiederfindungsraten

Um die Wiederfindungsraten zwischen den unterschiedlichen Nährmedien herauszufinden und auszuwerten, wurde eine Verdünnungsreihe angelegt und jeweils 0,1 ml von Stufe 3 bis Stufe 5 mittels Oberflächenspatelverfahren auf den verschiedenen Medien verteilt. Nach den jeweiligen Inkubationszeiten beinhaltete der nächste Schritt die Nährmedien auszuwerten.

Als Referenzmedium diente Columbia Agar (Blutagar).

4.2.1 Wiederfindungsrate mit ATCC5579

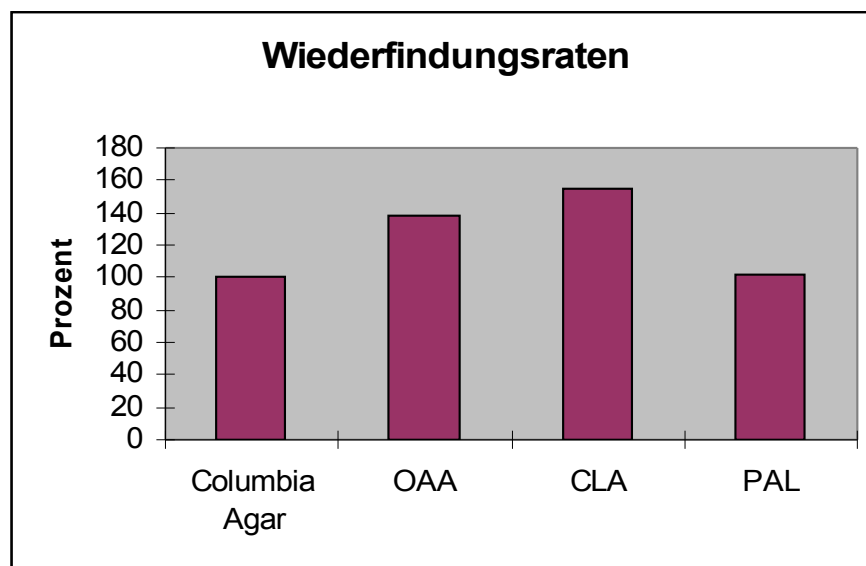


Abbildung 32: Prozentuelle Angabe der Wiederfindungsraten von ATCC5579 auf den diversen Nährmedien in Bezug auf Columbia Agar

Die für die Wiederfindungsrate relevanten Kolonien wurden bei OAA, Chromoplate Listeria Selektiv Agar und Columbia Agar nach 24 Stunden ausgezählt. PALCAM Agar konnte erst nach 48 Stunden ausgewertet werden, da zu wenig Wachstum herrschte, um

die Kolonien zu zählen. Im Vergleich zu Columbia Agar ($n=100\%$; KBE: $146,3 \times 10^5$) zeigte OAA eine Wiederfindung von $138,1\%$ (KBE: 202×10^5), Chromoplate Listeria Selektiv Agar $154,5\%$ (KBE: 226×10^5) und PALCAM $102,3\%$ (KBE: $149,7 \times 10^5$).

Aufgrund dieser Ergebnisse geht hervor, dass die Wiederfindungsrate auf OAA, Chromoplate Listeria Selektiv Agar sowie PALCAM Agar bedeutend besser ist als auf Columbia Agar (=Kollektiv), da diese speziellen Nährmedien Nährstoffe beinhalten, die das Wachstum von *Listerien* fördern. Im Durchschnitt ergibt sich aus den Werten eine Wiederfindungsrate von $131,6\%$.

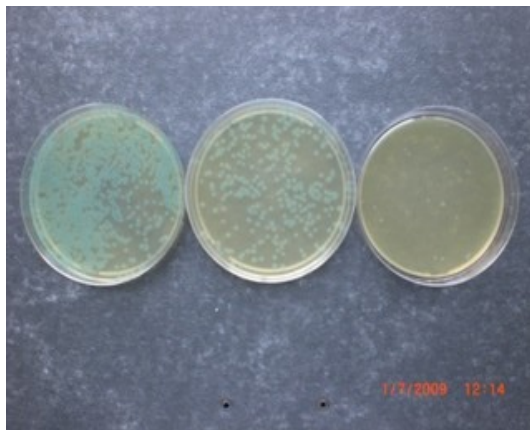


Abbildung 33: Wiederfindungsrate OAA



Abbildung 34: Wiederfindungsrate Blutagar



Abbildung 35: Wiederfindungsrate PALCAM

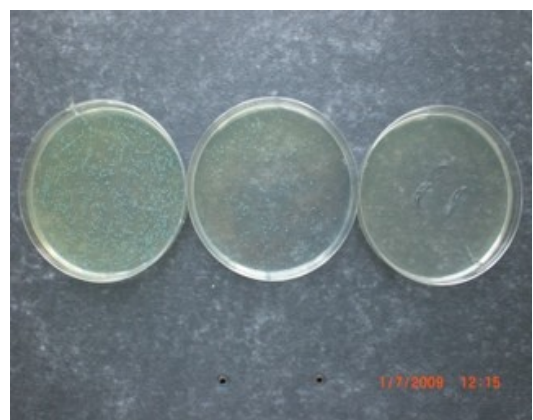


Abbildung 36: Wiederfindungsrate CLA

4.2.2 Wiederfindungsrate mit ATCC7644

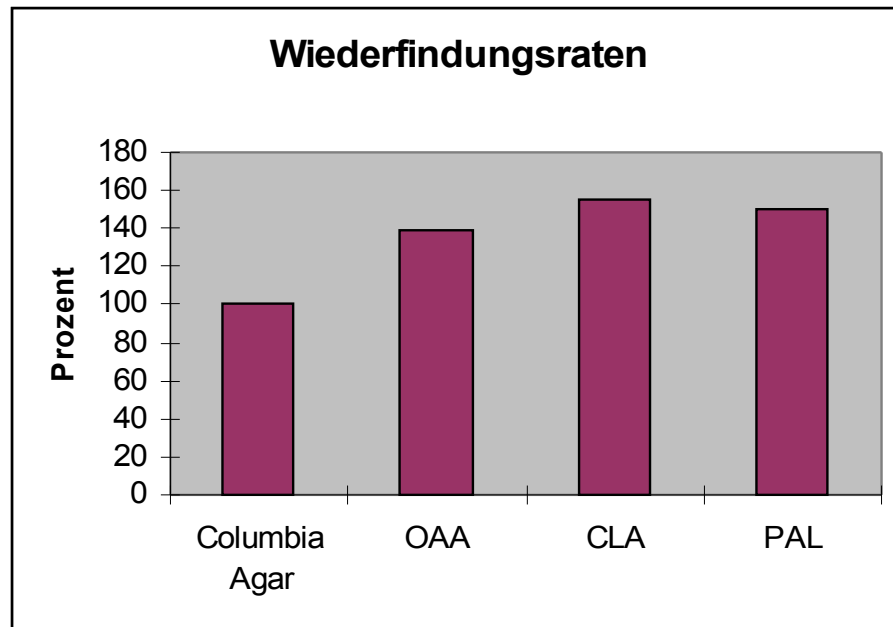


Abbildung 37: Prozentuelle Angabe der Wiederfindungsraten von ATCC7644 auf den diversen Nährmedien in Bezug auf Columbia Agar

Die für die Wiederfindungsraten auszuzählenden Kolonien konnten bei Columbia Agar, OAA und Chromoplate *Listeria* Selektiv Agar bereits nach 24 Stunden Bebrütung ausgewertet werden, PALCAM Agar musste weitere 24 Stunden bebrütet werden, da die Kolonien für eine Auszählung zu schwach gewachsen waren, um sie auswerten zu können.

OAA zeigte im Vergleich zu Columbia Agar ($n=100\%$, KBE: $164,3 \times 10^5$) eine Wiederfindung von $139,5\%$ (KBE: $229,2 \times 10^5$), Chromoplate *Listeria* Selektiv Agar $155,3\%$ (KBE: $255,2 \times 10^5$) und PALCAM $150,8\%$ (KBE: $247,7 \times 10^5$).

Auch bei diesem *Listeria monocytogenes* Stamm herrschte auf den speziellen Nährmedien ein deutlich besseres Wachstum als auf dem Kollektivmedium, aufgrund der spezifischen für *L.monocytogenes* wachstumsfördernden Inhaltsstoffen.

Im Durchschnitt ergibt sich hier aus den verschiedenen Werten eine Wiederfindungsrate von $148,5\%$.

4.2.3 Wiederfindungsrate mit DSM20600

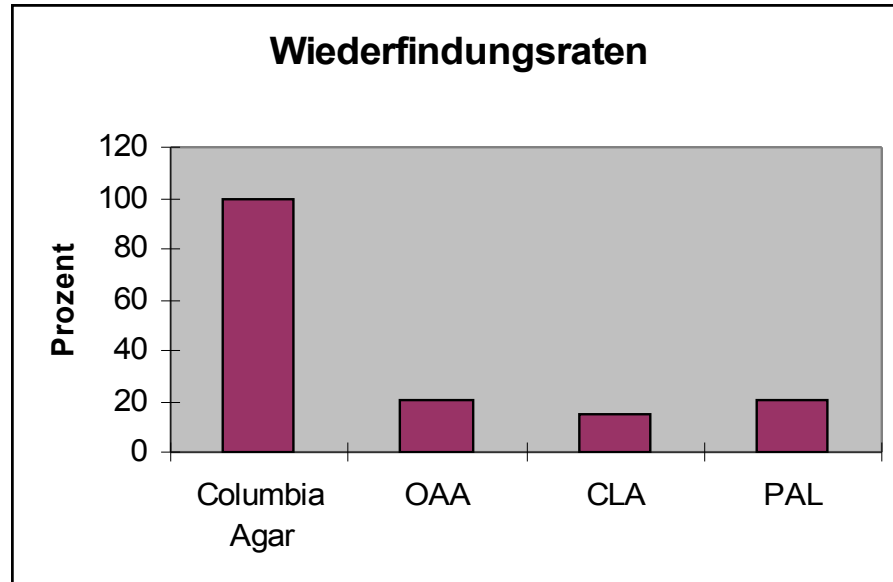


Abbildung 38: Prozentuelle Angabe der Wiederfindungsraten von DSM20600 auf den diversen Nährmedien in Bezug auf Columbia Agar

Aus Abbildung 46 ist deutlich erkennbar, dass hier die Wiederfindungsrate stark unter dem Kollektivmedium ($n=100\%$) liegt.

OAA zeigt im Vergleich zu Columbia Agar (KBE: $80,1 \times 10^5$) eine Wiederfindungsrate von 20,7% (KBE: $16,6 \times 10^5$), Chromoplate Listeria Selektiv Agar 15,2% (KBE: $12,2 \times 10^5$) und PALCAM 20,2% (KBE: $16,2 \times 10^5$).

Es zeigt sich durchschnittlich aus diesen Werten eine Wiederfindungsrate von 18,7%.

DSM20600 zeigte generell während der 50 Probenaufbereitungen ein eher schlechtes Wachstum.

5. Diskussion

Chromogene Nährmedien sind besonders wichtig für mikrobiologische Detektionen pathogener Mikroorganismen.

In dieser Arbeit wurden insgesamt 50 Lebensmittelproben auf das Vorhandensein von *Listeria monocytogenes* untersucht. Es wurde ein Vergleich zwischen konventioneller Methode, unter Verwendung von PALCAM Agar und der Methode nach Ottaviani Agosti ready-to-use agar plates und Chromoplate Listeria Agar hergestellt.

Die konventionelle Methode stützt sich beim Nachweis von *Listeria monocytogenes* auf biochemische Eigenschaften. Da allerdings diese bestimmten Eigenschaften auch einer Reihe von anderen Bakterien zugeschrieben wird und nicht nur einem Einzigen, kann es relativ oft zu falsch positiven Ergebnissen kommen. Beim Nachweis von *Listeria monocytogenes* besteht oft eine Beeinflussung durch *Enterokokken* oder *Bacillen*, die auf PALCAM Agar ebenfalls eine β -Glucosidase Aktivität aufweisen.

Dies war auch in der erfolgten Untersuchung der Fall. Es wurden insgesamt 14 falsch positive Ergebnisse erzielt, aber keine der Proben war richtig positiv. 36 der untersuchten Proben waren richtig negativ. ALOA Medien zeigten in verschiedenen Studien eine relativ hohe Sensitivität, in dieser Arbeit lag sie aufgrund der ausschließlich falsch positiven Ergebnissen bei 0%.

Zum exakten Vergleich wurde bei der Durchführung der Probenaufbereitungen stets eine native und eine kontaminierte Probe untersucht, um bessere Vergleichsmöglichkeiten zu bekommen.

ALOA Medien zeigten auf der kontaminierten Seite der Platte bereits nach 24 stündiger Bebrütung das typische Erscheinungsbild von *Listeria monocytogenes* mit türkisen Kolonien und opaquer Hofbildung. Nach weiteren 24 Stunden Bebrütung überlappten sich allerdings die Höfe. Bei der Untersuchung und Auswertung der Wiederfindungsrate wies das Nährmedium bei ATCC5579 im Vergleich zu Columbia Agar (n=100%) eine Wiederfindung von 138,1% auf, welches ein deutlich besseres und genaueres Ergebnis darstellt. Bei ATCC7644 betrug die Wiederfindungsrate im Vergleich zu Columbia Agar

(n=100%) 138,5%. Auch dieser Referenzstamm zeigte auf ALOA Medien ein wesentlich genaueres Ergebnis. Nur bei DSM20600 lag die Wiederfindungsrate im Vergleich zum Kollektivmedium (n=100%) nur 20,7%. Höchstwahrscheinlich ist dieser Wert auf die Schwäche des Referenzstammes zurückzuführen. Bei diesem chromogenen Nährmedium kam es nie zu einer Änderung der Eigenfarbe des Agars. Allerdings wuchsen oft grampositive Bakterien wie bsp. *Mikrokokken* auf dem Medium, nach Durchführung einer Gramfärbung konnten sie allerdings schnell von *Listeria monocytogenes* unterschieden werden.

Chromoplate Listeria Selektiv Agar zeigte ebenfalls nach 24 Stunden Bebrütung auf der kontaminierten Seite der Platte ein deutliches, typisches Wachstum von *Listeria monocytogenes*. Die Kolonien erschienen in helltürkis ohne Hofbildung. Die Kolonien waren allerdings anfangs klein und manchmal undeutlich zu sehen, weswegen die Platte für weitere 24 Stunden bebrütet wurde. Da es bei diesem Medium keine Hofbildung gibt und es somit auch zu keiner Überlappung kommen kann, ist es besonders beim Auszählen der Kolonien besonders einfach. Bezüglich der Wiederfindungsrate konnte festgestellt werden, dass im Vergleich zu Columbia Agar (n=100%) bei ATCC5579 eine Wiederfindung von 154,5%, bei ATCC7644 155,3% und bei DSM20600 nur 15,2%. DSM20600 zeigte demnach sehr geringe Wachstumsintensität innerhalb der dezimalen Verdünnungsschritte, da seine Wiederfindung stark unter der des Kollektivmediums lag.

PALCAM Agar musste selbst gegossen werden, wodurch manchmal der Nährboden anfangs zu dünn/wenig gegossen wurde. Aus dem Grund kam es beim fraktionierten Ausstreichen einige male zu Rissen im Agar. Die Bakterien wiesen aber dennoch ein natürliches Wachstum auf. Seine Wiederfindungsrate zeichnet sich im Vergleich zu Columbia Agar, außer bei DSM2060 mit 20,2%, durch eine stets höhere Wachstumsintensität aus.

Daraus geht hervor, dass zwei der verwendeten Referenzstämmen ein sehr gutes und deutliches Wachstum aufzeigten, DSM20600 wuchs oft sehr klein und schwach. Bei der Kontamination der Lebensmittel konnte er dennoch einwandfrei identifiziert werden.

Abschließend geht aus der vorgelegten Untersuchung hervor, dass die verwendeten chromogenen Medien alle eine ausgezeichnete Wiederfindungsrate aufwiesen und

verlässliche und deutliche Ergebnisse brachten.

Sie sind damit sehr gut geeignet in die konventionelle Untersuchung miteinbezogen zu werden. ALOA wird auch in einer Studie als erstes Medium in den neuen ISO Standardmethoden empfohlen [REISSBRODT, 2004].

6. Zusammenfassung

50 Lebensmittelproben bestehend aus 25 Rohmilchkäseproben und 25 gemischtem Faschierten-Proben wurden auf das Vorhandensein von *Listeria monocytogenes* untersucht.

Um das Anwuchsverhalten zu evaluieren konnten zwei verschiedene chromogene Nährmedien wie Chromoplate Listeria Selektiv Agar (CLA) und Ottaviani Agosti ready-to-use agar plates (OAA) im Vergleich zum konventionellen PALCAM Agar verwendet werden.

Zur Beurteilung wurden bei allen drei Nährmedien die Wiederfindungsraten herangezogen. Als Referenzmedium diente Columbia Agar.

Bei keinen der untersuchten Lebensmittelproben wuchs *L.monocytogenes* an.

36 Proben wurden als richtig negativ und 14 Proben als falsch positive Proben bewertet.

Falsch positive Ergebnisse traten bei allen drei Medien durch das Wachstum von anderen grampositiven Mikroorganismen wie *Mikrokokken*, Stäbchen oder *Bacillen* auf.

Die Wiederfindungsraten aller drei getesteten Nährmedien erbrachten deutliche und genaue Ergebnisse, außer bei DSM20600 lagen sie allesamt über der von Columbia Agar.

OAA zeigte bei ATCC5579 eine Wiederfindungsrate von 138,1% und bei ATCC7644 138,5%, Chromoplate Listeria Selektiv Agar bei ATCC5579 154,5% und ATCC7644 155,3%, während PALCAM Agar bei ATCC5579 102,3% und ATCC7644 150,8% aufwies.

Die ausgetesteten Nährböden verhielten sich gleichartiges bzw. zeigten ein zuverlässiges und gut vergleichbares Ergebnis.

Zusammenfassend kann somit ausgesagt werden, dass sich alle geprüften Nährmedien wie Chromoplate Listeria Selektiv Agar, Ottaviani Agosti ready-to-use agar plates und PALCAM Agar zur Identifizierung von *Listeria monocytogenes* gut geeignet sind.

7. Summary

50 food samples consisting of 25 raw milk cheese samples and 25 mixed minced meat samples were explored to the existence of *Listeria monocytogenes*.

To evaluate the fouling behavior two different chromogenic plating media, Chromoplate Listeria Selective Plate (CLA) and Ottaviani Agosti ready-to-use agar plates (OAA), were used and compared to the conventional used PALCAM plate.

In all three plating media the recovery rate had been adducted for estimation. As reference medium Columbia plate was pulled up.

L.monocytogenes grew in no tested food sample.

36 samples were assessed right negative and 14 samples false positive.

False positive results appeared in all three media as a consequence of growth of different grampositive microorganisms just as *micrococoids*, rods or *bacills*.

In all three tested plating media the recovery rate provided explicit and exact results, aside from DSM20600 they all lay beyond Columbia plate.

OAA demonstrated at ATCC5579 a recovery rate of 138,1% and at ATCC7644 138,5%, Chromoplate Listeria Selective plate at ATCC5579 154,5% and ATCC7644 155,3%, whereas PALCAM plate showed at ATCC5579 102,3% and ATCC7644 150,8%.

All tested plating media behaved similiar alternatively indicated a reliable and comparable result.

In summary it can be said that all analyzed plating media like Chromoplate Listeria Selective plate, Ottaviani Agosti ready-to-use agar plates und PALCAM plate are adequate for idenfication of *Listeria monocytogenes*.

8. Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen

Abbildungen

Nummer	Titel	Seite
Abb. 1	Ätiologie und Pathogenese der Listeriose bei Schafen	13
Abb. 2	Schematic representation of the regulation and activities of LLO during infection	15
Abb. 3	Age and sex distribution of listeriosis cases, Germany, 2001–2005	18
Abb. 4	Seasonal distribution of human cases of listeriosis in the European Union in 2005 and 2006	19
Abb. 5	Human cases of listeriosis reported in Europe in 1999-2006	20
Abb. 6	<i>L.monocytogenes</i> in ready-to-eat products and meat preparations of bovine meat, 2006	35
Abb. 7	Detection systems of <i>Listeria spp.</i> plating media	42
Abb. 8	Fraser-Listeria-Selektiv-Anreicherungsbouillon	46
Abb. 9	Fraser-Listeria-Selektivsupplement	47
Abb. 10	PALCAM-Listeria-Selektivsupplement nach van Netten et al.	50
Abb. 11	Listeria Agar Selektiv-Supplement	52
Abb. 12	PALCAM Agar, Chromoplate Listera Selektiv Agar, OAA	56
Abb. 13	Schema der Teilung der Lebensmittelproben	58
Abb. 14	ATCC7644 <i>L.monocytogenes</i>	59
Abb. 15	ATCC5579 <i>L.monocytogenes</i>	59
Abb. 16	DSM20600 <i>L.monocytogenes</i>	59
Abb. 17	Schema der Verdünnungsreihe	61

Abb. 18	Falsch positiv erscheinende Lebensmittelprobe auf PALCAM Agar	64
Abb. 19	Falsch positiv erscheinende Lebensmittelprobe auf OAA	66
Abb. 20	Falsch positiv erscheinende Lebensmittelprobe auf CLA	67
Abb. 21	ZYM B Reagenz	68
Abb. 22	API Listeria Testkit	69
Abb. 23	API Listeria Ergebnisblatt	69
Abb. 24	Probenverteilung in Prozent (%)	70
Abb. 25	Probenbeurteilung der 50 Lebensmittelproben auf das Vorkommen von <i>Listeria monocytogenes</i>	71
Abb. 26	Beurteilung der Proben auf PALCAM Agar	71
Abb. 27	Beurteilung der Proben auf OAA	72
Abb. 28	Beurteilung der Proben auf Chromoplate Listeria Selektiv Agar	72
Abb. 29	<i>Listeria monocytogenes</i> auf PALCAM Agar	76
Abb. 30	<i>Listeria monocytogenes</i> auf OAA	77
Abb. 31	<i>Listeria monocytogenes</i> auf Chromoplate Listeria Selektiv Agar	78
Abb. 32	Wiederfindungsraten von ATCC5579	79
Abb. 33	Wiederfindungsrate Blutagar (ATCC5579)	80
Abb. 34	Wiederfindungsrate OAA (ATCC5579)	80
Abb. 35	Wiederfindungsrate von CLA (ATCC5579)	80
Abb. 36	Wiederfindungsrate von PALCAM (ATCC5579)	80
Abb. 37	Prozentuelle Angabe der Wiederfindungsraten von ATCC7644	81
Abb. 38	Prozentuelle Angabe der Wiederfindungsraten von DSM20600	82

Tabellen

Nummer	Titel	Seite
Tab. 1	Überlebenszeiten von <i>Listeria monocytogenes</i> in Lebensmittel bei unterschiedlichen Lagerungstemperaturen	6
Tab. 2	<i>Listeria monocytogenes</i> outbreak	21
Tab. 3	Verpackter Räucherlachs	33

9. Anhang

Verwendete Abkürzungen

bsp.	Beispiel
etc.	Et ceterea
u.s.w.	Und so weiter
ca.	zirka
µm	Mikrometer
<i>L. monocytogenes</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>
h	Stunde(n)
MPa	Megapascal
kDa	kiloDalton
kg	Kilogramm
g	Gramm
LLO	ListeriolysinO
Ca ²⁺	Calcium
EU	Europäische Union
KBE	Kolonien bildende Einheiten
ml	Milliliter
L	Liter
mm ³	Kubikmillimeter
HIV	Human immunodeficiency virus
UV	Ultraviolett
MJ	Megajoule
cm ²	Quadratzentimeter
nm	Nanometer
RTE	ready-to-eat
HACCP	Hazard Analysis and Critical Control Points
MMA	Modified McBride Agar

LPM	Lithium chloride Phenylethanol Moxalactam Plating Agar
LEB	Listeria Enrichment Broth
EB	Enrichment Broth
FDA	Food and Drug Administration
USA	United States of America
USDA	US Department of Agriculture
ISO	International Organisation of Standardization
LMBA	<i>Listeria monocytogenes</i> blood agar
spp.	species pluralis
Fa.	Familie
Corp.	Corporation
PCR	Polymerase Chain Reaction
Inc.	Incorporated
CAMP	Christi-Atkins-Munch-Petersen
H ₂ S	Schwefelwasserstoff
ALOA	Agar Listeria according to Ottaviani and Agosti
LMBG	Lebensmittel Bundesgesetz
NMKL	Nordic Committee on Food Analysis
µl	Mikroliter
u.a.	Unter anderem
GIT	Gastrointestinaltrakt

Verwendete Rechnungen

Sensitivität (%) = richtig positiv x 100/richtig positiv + falsch negativ

Spezifität (%) = richtig negativ x 100/richtig negativ + falsch positiv

Effizienz (%) = (richtig positiv + richtig negativ) x 100/Probenanzahl

10. Literatur

ANONYMOUS 1 (2009): *Listeria monocytogenes* outbreak.

Internet: http://www.phac-aspc.gc.ca/alert-alerte/listeria/listeria_2009-eng.php

(Stand: 01.10.2009), Public Health Agency of Canada

ANONYMOUS 2 (2006): Epidemiologisches Bulletin: Zur Situation bei wichtigen Infektionskrankheiten in Deutschland:

Internet: http://www.rki.de/cln_091/nn_468498/DE/Content/Infekt/EpidBull/Archiv/2006/49__06.templateId=raw.property=publicationFile.pdf/49_06.pdf (Stand: 30.01.2009),

Robert Koch Institut, Nr.49

ANONYMOUS 3: 62653 LPM Agar (Lithium chloride Phenylethanol Moxalactam Plating Agar; Listeria LPM Agar). Fluka Analytical.

Internet: <http://www.sigmaaldrich.com/etc/medialib/docs/Fluka/Datasheet/62653dat.Par.0001.File.tmp/62653dat.pdf> (Stand: 07.03.09)

ANONYMOUS 4: 75977 PALCAM Listeria Selective Agar (Listeria identification Agar (PALCAM)). Fluka Analytical.

Internet: <http://www.sigmaaldrich.com/etc/medialib/docs/Fluka/Datasheet/75977dat.Par.0001.File.tmp/75977dat.pdf> (Stand: 11.03.09)

ANONYMOUS 5 (2008): Chapter 2.9.7. *Listeria monocytogenes*. OIE Terrestrial Manual. Internet: http://www.oie.int/eng/Normes/mmanual/2008/pdf/2.09.07_LISTERIA_MONO.pdf (Stand: 13.03.09)

ATANASSOVA V., REICH F., KLEIN G. (2008): Microbiological quality of sushi from sushi bars and retailers. Journal of Food Protection **71**(4):860-4

BECKER B., SCHULER S., LOHNEIS M., SABROWSKI A., CURTIS G.D.W., HOLZAPFEL W.H. (2006): Comparison of two chromogenic media for the detection of *Listeria monocytogenes* with the plating media recommended by EN/DIN 11290-1. International Journal of Food Microbiology 109 127–131

- BIERBAUM G.** (1999): Antibiotische Peptide – Lantibiotika. Internet: <http://www.p-e-g.org/publikationen/ctj/0699/204-209.PDF> (Stand: 11.01. 2009), Chemotherapie Journal, Heft 6, Bonn
- BILLE J., CATIMEL B., BANNERMAN E., JACQUET C., YERSIN M.N., CANIAUX I., MONGET D., ROCOURT J.** (1992): API Listeria, a new and promising one-day system to identify *Listeria* isolates. Applied and Environmental Microbiology **58**(6): 1857–18
- BHUNIA A.K.** (2008): Foodborne Microbial Pathogens. Springer Verlag, New York
- BRUGÈRE-PICOUX J.** (2008): Ovine Listeriosis. Volume 76, Issues 1-2, Pages 12-20
- BUBERTA A. Dr.** (2006): *Listerien*. Hygiene Report, Deutschland
- BÜLTE M.** (2008): Pathogene Mikroorganismen: *Listeria monocytogenes*. Band I: Vorkommen, Erkrankungsformen und Diagnostik. Behr's Verlag, Hamburg
- CATALDO G., CONTE MP., CHIARINI F., SEGANTI L., AMMENDOLIA MG., SUPERTI F., LOGNHI C.** (2007): Acid adaptation and survival of *Listeria monocytogenes* in Italian-style soft cheeses. Journal of Applied Microbiology **103**(1):185-93
- CLIVER D.O., RIEMANN H.P.** (2002): Foodborne Diseases. 2nd Edition. Food Science and Technology, International Series. USA
- CONE LA., SOMERO MS., QURESHI FJ., KERKAR S., BYRD RG., HIRSCHBERG JM., GAUTO AR.** (2008): Unusual infections due to *Listeria monocytogenes* in the Southern California Desert. International Journal of Infectious Diseases **12**(6):578-581
- CORRY E.L., CURTIS G. D. W., BAIRD R.M.** (1995): Culture Media for Food Microbiology. Elsevier
- De VALK H., JACQUET C., GOULET V., VAILLANT V., PERRA A., SIMON F., DESENCLOS JC., MARTIN P.** (2005): Surveillance of listeria infections in Europe. Eurosurveillance, Volume 10, Issue 10
- DENNIS S.M.** (1993): Listeriosis (circling disease, silage sickness). In: J.L. Howard,

Editor, *Current Veterinary Therapy – Food Animal Practice* (3rd ed.), Saunders, Philadelphia, pp. 580–583.

DENNY J. and Mc LAUCHLIN J. (2008): Human *Listeria monocytogenes* infections in Europe - an opportunity for improved European surveillance. *Eurosurveillance*, Volume 13, Issue 13

DONELLY C.W. and BAIGENT G.J.(1986): Method for flow cytometric detection of *Listeria monocytogenes* in milk. *Applied and Environmental Microbiology* **52(4)**: 689–695

EFSA (European Food Safety Authority) (2006): The Community Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents, Antimicrobial resistance and Foodborne outbreaks in the European Union in 2006. 130, 2-352

FIELD D., CONNOR PM., COTTER PD., HILL C., ROSS RP. (2008): The generation of nisin variants with enhanced activity against specific gram-positive pathogens. *Molecular Microbiology* **69(1)**:218-30

FIRSTENBERG-EDEN R. und SHELEF L.A. (2000): A new rapid automated method for the detection of *Listeria* from environmental swabs and sponges. *International Journal of Food Microbiology* **56(2-3)**:231-7

FLEMING D.W., COCHI S.L., MacDONALDK.L., BRONDUM J., HAYES P.S., PLIKAYTIS B.D., HOLMES M.B., AUDURIER A., BROOME C.V., REINGOLD A.L. (1985): Pasteurized milk as a vehicle of infection in an outbreak of listeriosis. *The New England Journal of Medicine* **312(7)**:404-7

GAHAN C.G., O'DRISCOLL B., HILL C.(1996): Acid adaptation of *Listeria monocytogenes* can enhance survival in acidic foods and during milk fermentation. *Applied and Environmental Microbiology* **62(9)**:3128-32

GRAY M.L., KILLINGER A.H. (1926): *Listeria monocytogenes* and listeric infections. *Bacteriological Review* **30**: 309-382

GREENWOOD M., WILLIS C., DOSWELL P., ALLEN G., PATHAK K. (2005): Evaluation of chromogenic media for the detection of *Listeria* species in food. *Journal*

of Applied Microbiology 99, 1340–1345

HANDRICK W., SCHWEDE I., BERTHOLD F. (2005): Die Listeriose – Eine Übersicht. Ärztliches Labor Dr.Berthold & Kollegen , Frankfurt (Oder)

HEIPHA Dr. Müller GmbH. Fraser – Anreicherungsbouillon (½) (Artikel Nummer: 575225).Internet:http://www.heipha.de/db/files/575225-2-0306_Halb-Fraser-Bouillon.pdf (Stand: 17.03.09)

HENRY B.S. (1933): Dissociation in the genus *Brucell*. The Journal of Infectious Diseases **52**: 374-402

HITCHENS A.D. (2002): Detection and Enumeration of *Listeria monocytogenes* in Foods. Chapter 10. Bacteriological Analytical Manual *Online*. Internet: <http://www.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-10.html#authors> (Stand: 13.03.09)

HÜLPHERS G. (1911): Lefvernekros hos kanin orsakad af en ej förut beskrifven bakterie. Sven. Vet. Tidskr. **16**:265-273. Reprinted: 1959, Medlemsbl. Sverge Vet. Förb. **11** (Suppl.):10-16.

ICMSF (1996): Microorganism in foods 5. Microbiological specification for of food pathogens. *Listeria monocytogenes*. Pages 141-182, Blackie Academic & Professional, UK

KALOREY D.R., WARKE S.R., KURKURE N.V., RAWOOL D.B., BARBUDDHE S.B. (2008): *Listeria species* in bovine raw milk: A large survey of Central India. Volume 19, Issue 2, Pages 109-112

KNOX K., FISHER B., ALLEN N., HARVEY E., HARRIS T., FOLEY K., NABRESKI D., WALL M. (2007): Outbreak of *Listeria monocytogenes* infections associated with pasteurized milk from a local dairy—Massachusetts. Centers for Disease Control and Prevention (CDC), MMWR Morb Mortal Wkly. Rep.

KOCH J. und STARK K. (2006): Significant increase of listeriosis in Germany - Epidemiological patterns 2001-2005. Eurosurveillance, Volume 11, Issue 6

KRÄMER J. (2007): Lebensmittel-Mikrobiologie. 5. korrigierte und neu bearbeitete Auflage. Ulmer Verlag, Stuttgart

LEE W.H. and McCLAIN D. (1986): Improved *Listeria monocytogenes* selective agar. Applied and Environmental Microbiology **52**:1215-1217

LEVIDIOTOU S., CHARALABOPOULOS K., VRIONI G., CHAIDOS A., POLYSOIDIS K. BOURANTAS K., STEFANO D. (2004): Fatal meningitis due to *Listeria monocytogenes* in elderly patients with underlying malignancy. International Journal of Clinical Practice **58(3)**:292-6

LIANOU A. und SOFOS J.N. (2007): A review of the incidence and transmission of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat products in retail and food service environments. Journal of Food Protection **70(9)**:2172-98

LONCAREVIC S., OKLAND M., SEHIC E., NORLI H.S., JOHANSSON T. (2008): Validation of NMKL method No. 136 - *Listeria monocytogenes*, detection and enumeration in foods and feed. International Journal of Food Microbiology **124** 154–163

LOVETT J. (1988): Isolation and identification of *Listeria monocytogenes* in dairy products. Journal - Association of Official Analytical Chemists **71**:658-660

LUND, B. M. (2000): Freezing. In: The Microbiological Safety and Quality of Food, Volume I (eds B. M. Lund, T. C. Baird-Parker and G. W. Gould). Aspen, Gaithersburg, MD, USA, pp. 122-145

McBRIDE, M.E. and GIRARD K.F. (1960): A selective medium for the isolation of *Listeria monocytogenes* from mixed bacterial populations. Journal of Laboratory and Clinical Medicine **55**:153-157

MAIJALA R., LYYTIKÄINEN O., JOHANSSON T. (2001): Exposure of *Listeria monocytogenes* within an epidemic caused by butter in Finland. International Journal of Food Microbiology **70**: 97-109

MATAK K.E., CHUREY J.J., WOROBO R.W., SUMNER S.S., HOVINGH E., HACKNEY C.R., PIERSON M.D. (2005): Efficacy of UV light for the reduction of *Listeria monocytogenes* in goat's milk. Journal of Food Protection **68(10)**:2212-6

MURRAY E.G.D., WEBB R.A., SWANN H.B.R. (1926): A disease of rabbits

characterized by a large mononuclear leucocytosis caused by a hitherto undescribed bacillus *Bacterium monocytogenes* (n.sp.), Journal of Pathology and Bacteriology **29**, pp. 407–439.

NORIEGA L.M.R., IBÁÑES S., GONZÁLEZ P.A., YAMAMOTO M.G., ASTUDILLO J.D., GONZÁLEZ M.V., RIVEROS R.K., FERNANDO L.G., MARCOTTI A.S., PÉREZ J.G., THOMPSON L.M., DAZA F.P. ESPINOSA M.I., PINOCHET C.V., y PABLO A.V.C. (2008): *Listeria monocytogenes*: Report of a rise in pregnant women and literature review. Review Chile Infections **25 (5)**: 342-349

NOTERMANS S.H., DUFRENNE J., LEIMEISTER-WÄCHTER M., DOMANN E., CHAKRABORTY T. (1991): Phosphatidylinositol-specific phospholipase C activity as a marker to distinguish between pathogenic and nonpathogenic *Listeria* species. Applied and Environmental Microbiology **57**, 2666-2670

OLASUPO NA., FITZGERALD DJ., NARBAD A., GASSON MJ. (2004): Inhibition of *Bacillus subtilis* and *Listeria innocua* by nisin in combination with some naturally occurring organic compounds. Journal of Food Protection **67(3)**:596-600.

ORTEGA V.M.E., CREGO E.A., CUESTA L.F., MILLÁN O.G., GONZÁLEZ L.J.M. (2000): Listeriosis: an infrequent infection in patients with HIV. Annals of International Medicine **17(12)**:649-51

PATIL AB., NADIGER S., CHANDRASEKHAR MR., HALESH LH., KUMAR M. (2007): *Listeria monocytogenes* meningitis: an uncommon opportunistic infection in HIV/AIDS. Indian Journal of Pathology and Microbiology **50(3)**:671-3

PIRIE J.H.H. (1940): *Listeria*: change of name for a genus of bacteria. Nature **145**:264

REBUFFO C.A., SCHMITT J., WENNING M., VON STETTEN F., SCHERER S. (2006): Reliable and Rapid Identification of *Listeria monocytogenes* and *Listeria Species* by Artificial Neural Network-Based Fourier Transform Infrared Spectroscopy. Applied and Environmental Microbiology **72(2)**: 994–1000.

REISSBRODT R. (2004): New chromogenic plating media for detection and enumeration of pathogenic *Listeria spp.* - an overview. International Journal of Food Microbiology **95** 1-9

- RITZ M., JUGIAU F., FEDERIGHI M., CHAPLEAU N., DE LAMBALLERIE M.** (2008): Effects of high pressure, subzero temperature, and pH on survival of *Listeria monocytogenes* in buffer and smoked salmon. *Journal of Food Protection* **71(8)**:1612-8.
- RORVIK L.M.** (2000): *Listeria monocytogenes* in the smoked salmon industry. *International Journal of Food Microbiology* **62(3)**:183-90
- RYSER E.T., MARTH E.H.** (2007): *Listeria*, Listeriosis and Food Safety. Food Science and Technology, Marcel Dekker Inc.
- SANG Y., BLECHA F.** (2008): Antimicrobial peptides and bacteriocins: alternatives to traditional antibiotics. *Animal Health Research Reviews* Nov **5**:1-9.
- SANTOS G. and LABBÉ R.G.** (2001): Guide to foodborne Pathogens. Wiley Verlag, New York
- SCHMIDT R.H., RODRICK G.E.** (2003): Food Safety Handbook. John Wiley & Sons, Inc. USA
- SCHNUPF P., PORTNOY D.A.** (2007): Listeriolysin O: a phagosome-specific lysin. *Microbes and Infection*. Volume 9, Issue 10, Pages 1176-1187
- SCHÖFFL H.** (2005): Verpackter Räucherlachs. Arbeiterkammer Wien. September, 62
- SIRAGUSA G.R., ELPHINSTONE L.A., WIESE P.L., HAEFNER S.M., JOHNSON M.G.** (1990): Petite colony formation by *Listeria monocytogenes* and *Listeria species* grown on Esculin-containing agar. *Canadian Journal of Microbiology* **36(10)**:697-703
- VAN NETTEN P., VAN DE VEN A., PERALES I., MOSSEL D.A.** (1988): A selective and diagnostic medium for use in the enumeration of *Listeria spp.* in foods. *International Journal of Food Microbiology* **6(3)**:187-98
- VARDAR-ÜNLÜ G., ÜNLÜ M., BAKICI M.Z.** (1998): Incidence of *Listeria spp.* From Raw Milk in Sivas. *Turkish Journal of Medical Sciences* **28**:389-392
- WAGNER M., AUER B., TRITTEMEL C., HEIN I., SCHODER D.** (2007): Survey on the *Listeria* contamination of ready-to-eat food products and household environments in Vienna, Austria. *Zoonoses Public Health*. **54(1)**:16-22.

WEWALKA G. (2008): Nationale Referenzzentrale für Listeriose.

Internet:http://www.bmgfj.gv.at/cms/site/attachments/4/4/2/CH0954/CMS1237532053435/jb_listerien_2008_02.02.09_b.pdf

11. Lebenslauf

Angaben zur Person

Geburtsdatum und -ort	30. November 1982, Wien
Familienstand	Ledig
Staatsangehörigkeit	Österreich
Muttersprache	Deutsch
Eltern	Prim. Univ. Prof. Dr. Felix Lintner; Arzt Christa Lintner, diplomierte Kosmetikerin; Hausfrau

Ausbildung

01.10.2002 – 11.2009	Ernährungswissenschaften Universität Wien • Spezialisierung auf Ernährung und Umwelt • Diplomarbeitsthema: Der Vergleich verschiedener chromogener Nährmedien für den Nachweis von <i>Listeria monocytogenes</i> in Lebensmittel unter Verwendung von Chromoplate <i>Listeria</i> Selektiv Agar, PALCAM Agar sowie Ottaviani Agosti ready-to-use agar plates.
2002	Matura
1998 – 2002	Bundesgymnasium Amerlingstraße 6, 1060 Wien
1993 – 1998	Bundesgymnasium und –realgymnasium Rainergasse 39, 1050 Wien

Beruflicher Werdegang

Langfristige Beschäftigung:

Facultas Buchhandels AG	Shopassistent (seit 2004, geringfügig beschäftigt) • Verkauf und Beratung für Studierende der Ernährungswissenschaften und Pharmazie
02.2008 – 02.2010	Tutorin am Klinischen Institut für Hygiene und medizinische Mikrobiologie (MedUni Wien). • Grundkurs für Mikrobiologie und Hygiene sowie Wahlfach Wasser,-Lebensmittel,-und Betriebshygiene (Ernährungswissenschaften). Geblockt Dezember und Februar, 1 Woche.
<u>Praktika:</u>	
16.02-22.02.2009	Praktikantin, 24. Tagung der Gesellschaft für Umwelt und Mutationsforschung „Lifestyle und DNA-Stabilität“ • Abwicklung, Organisation, Mithilfe am Ablauf
August 2008	Ferialpraktikantin, STAUD'S GmbH. • Produktion
17.09.-30.09.2007	Praktikantin, Klinischen Institut für Hygiene und medizinische Mikrobiologie bei Prof. Manafi (Abteilung für Lebensmittelhygiene), MedUni Wien. • Wasseruntersuchung • Küchenuntersuchung: Oberflächenabklatsch, Händeabklatsch, Lebensmitteluntersuchung • Erneuerung der Stammsammlung
September 2006	Ferialpraktikantin, Sozialmedizinisches Zentrum Sophienspital. • Mithilfe bei einer Diätologin

- Einsichtnahme im Ablauf der Essensvorbereitung,-
verteilung und -zubereitung.

Juli 2003

Ferialpraktikantin, Naturhistorisches Museum -
anthropologische Abteilung.

- Ordnungsarbeiten in der osteologischen
Sammlung
- anthropologische Befundaufnahme
- EDV-Mäßige Erfassung von anthropologischen
Befunden

Weiterbildungen

Juli 2000

Sprachaufenthalt in England

Weitere Qualifikationen

Fremdsprachen

Englisch in Wort und Schrift

Französisch Maturaniveau

Führerschein

Führerschein Klasse B

EDV Kenntnisse

Microsoft Windows

OpenOffice

Microsoft Office