



universität
wien

DIPLOMARBEIT

Vergleichende Gegenüberstellung qualitativer Methoden zur Detektion und Identifizierung von Listerien in Räucherlachserzeugnissen

angestrebter akademischer Grad

Magistra der Naturwissenschaften (Mag. rer. nat.)

Verfasserin:	Ebersdorfer Isolde
Matrikel-Nummer:	0006212
Studienrichtung (lt. Studienblatt):	A 474 Ernährungswissenschaften
Betreuer:	o.Univ.-Prof. Dr. I. Elmadfa

Wien, Oktober 2009

Danksagungen

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen Personen bedanken, die mich während des Studiums begleitet und zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Univ. Prof. DI Dr. Wolfgang Kneifel, der mir die Durchführung der Diplomarbeit ermöglicht hat, und Frau DI Marija Zunabovic, für die Betreuung und Unterstützung bei der Erstellung dieser Arbeit.

Meinen Eltern möchte ich danken für die Unterstützung in all den Jahren.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung / Fragestellung	1
2. Literaturübersicht	2
2.1 Die Gattung <i>Listeria</i>	2
2.1.1 Taxonomie	2
2.1.2 Eigenschaften	2
2.2 Listeriose	3
2.2.1 Epidemiologie	3
2.2.2 Klinische Manifestationen	4
2.2.3 Pathogenitätsmechanismen und Virulenzfaktoren	5
2.3 Vorkommen von <i>Listeria monocytogenes</i> in Lebensmitteln	6
2.3.1 Räucherlachs	7
2.3.2 Gesetzliche Vorgaben über mikrobiologische Grenzwerte für <i>L. monocytogenes</i> in Räucherlachs	8
2.4 Nachweismethoden für Listerien in Lebensmitteln	9
2.4.1 Kulturelle Nachweismethoden	14
2.4.1.1 Anreicherung	14
2.4.1.2 Feste Selektivmedien	14
2.4.1.3 Leistungsfähigkeit	14
2.4.1.4 Probleme bei der Anreicherung und Detektion von <i>Listeria</i>	14
2.4.1.5 Bestätigungstests	14
2.4.2 Immunologische Nachweismethoden	20
2.4.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	21
2.4.3.1 Molecular Beacons	22
2.4.3.2 Probleme bei der PCR	24
2.4.3.3 Anreicherung der Lebensmittelproben vor der PCR	25
2.5 Vergleich qualitativer Methoden	26
2.5.1 Leistungsparameter und Berechnung der Abweichung	26
2.5.2 Probleme des Methodenvergleiches	28

2.5.3	Verbesserungspotenzial der Methodvalidierung	30
3.	Material	31
3.1	Probenmaterial.....	31
3.1.1	Lachs- und Umweltproben	31
3.1.2	<i>Listeria</i> - Referenzstämme	32
3.2	Nährmedien.....	33
3.2.1	Selektive Anreicherungs-nährmedien.....	33
3.2.2	Feste Nährmedien.....	34
3.2.3	Nährmedien für die Stammsammlung.....	35
3.3	Reagenzien zur Charakterisierung der Stämme	36
3.4	VIDAS® <i>Listeria</i> Duo (LDUO)	37
3.5	Materialien für die Real-time PCR.....	38
3.5.1	iQ-Check™ <i>Listeria monocytogenes</i> Kit (Bio-Rad)	38
3.5.2	Gentra Puregene Yeast/Bact. Kit (Qiagen, Hilden, Germany)	39
3.6	API® <i>Listeria</i> (Biomérieux, Marcy L'Etoile, France).....	40
3.7	Technische Geräte	40
3.8	Verbrauchsmaterialien	41
4.	Methoden.....	42
4.1	Überblick über verwendete Nachweismethoden	42
4.2	Bestätigung der <i>L. monocytogenes</i> - Isolate	43
4.3	Probenaufbereitung und Codierung	44
4.4	Durchführung der EN ISO 11290-1	45
4.5	VIDAS® LDUO.....	46
4.5.1	Testprinzip	46
4.5.2	Durchführung des VIDAS® LDUO assays	47
4.6	Aufbewahrung der Kulturen	49
4.6.1	Schrägagarkulturen.....	49

4.6.2	Gefrierkulturen	50
4.7	DNA-Extraktionsverfahren.....	50
4.7.1	DNA-Extraktion – Gentra Puregene Yeast/Bact. Kit.....	51
4.7.2	DNA-Extraktion - iQ-Check™ <i>Listeria monocytogenes</i> Kit.....	51
4.8	Real-time PCR	52
4.8.1	Testprinzip.....	52
4.8.2	Herstellung des PCR Mix	52
4.8.3	Real-time PCR Thermoprotokoll	54
4.9	Statistische Auswertung des Methodenvergleichs	56
5.	Ergebnisse	57
5.1	Auswertung der präsumtiven <i>L. monocytogenes</i> Isolate	57
5.1.1	Charakterisierung und Identifizierung der Stämme	57
5.1.2	Erscheinungsbild der <i>Listeria</i> -Stämme auf verschiedenen Medien und im Mikroskop	61
5.2	Auswertung der Untersuchung von 63 Lachsproben.....	63
5.2.1	Ergebnisse der EN ISO 11290-1	63
5.2.1.1	Probenanreicherungen	63
5.2.1.2	Bestätigung der positiven Proben und Ident. der Isolate	63
5.2.2	Ergebnisse des VIDAS® LDUO	67
5.2.2.1	Messung der Proben im mini-VIDAS® Gerät	67
5.2.2.2	Bestätigung der präsumtiven <i>L. monocytogenes</i> -Proben	67
5.2.2.3	Bestätigung der präsumtiven <i>Listeria</i> spp.-Proben	69
5.2.3	Ergebnisse des iQ-Check™ <i>L. monocytogenes</i> Kits.....	71
5.3	Methodenvergleich von EN ISO 11290-1, VIDAS® LDUO und iQ- Check® <i>L. monocytogenes</i> Kit.....	73
5.3.1	Vergleich von EN ISO 11290-1 und VIDAS® LDUO.....	75
5.3.1.1	Berechnung der abweichenden Ergebnisse	78
5.3.2	Vergleich von EN ISO 11290-1 und iQ-Check™ <i>L. monocytogenes</i> Kit.....	79
5.3.2.1	Berechnung der abweichenden Ergebnisse	81

6. Diskussion	82
6.1 Diskussion zur Bestätigung der Testergebnisse	82
6.1.1 OCLA – selektives Nährmedium	82
6.1.2 Oxidase/Katalasetest und Gramfärbung	83
6.1.3 Hämolysetest	84
6.1.4 API® <i>Listeria</i>	84
6.1.5 Real-time PCR	85
6.2 Diskussion zum Methodenvergleich von VIDAS® LDUO und EN ISO 11290-1	87
6.3 Diskussion zum Methodenvergleich von iQ-Check™ <i>L. mono.</i> Kit und EN ISO 11290-1	88
6.4 Belastung der Lachsproben mit <i>Listerien</i>	90
7. Schlussbetrachtung	91
8. Zusammenfassung	96
9. Summary	97
10. Literaturverzeichnis	98
11. Anhang	110
11.1 Ursprung der <i>Listeria</i> Isolate	110

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Hofbildung von <i>L. monocytogenes</i> auf ALOA	15
Abb. 2: Typische <i>Listeria</i> -Kolonien auf PALCAM-Agar	16
Abb. 3: β -Lysin Disc und sichelförmige Hämolysezone	19
Abb. 4: Hämolyse verschiedener <i>Listeria</i> -Referenzstämmen	19
Abb. 5: Funktionsprinzip eines Molecular Beacon	23
Abb. 6: Schematische Darstellung der Nachweismethoden	42
Abb. 7: mini-VIDAS®	47
Abb. 8: Funktionsprinzip VIDAS®	47
Abb. 9: Amplifikationskurven <i>L. monocytogenes</i>	55
Abb. 10: Erscheinungsbild von <i>L. monocytogenes</i> mit opakem Hof auf OCLA	61
Abb. 11: Erscheinungsbild von <i>L. monocytogens</i> auf PALCAM-Agar	61
Abb. 12: β -Hämolytische und nicht hämolytische <i>Listeria</i> -Stämme	62
Abb. 13: Gram-positive <i>L. monocytogenes</i> bei 100facher Vergrößerung im Mikroskop	62
Abb. 14: Faktoren die das Kontaminationsrisiko innerhalb einer Charge beeinflussen	90

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Virulenzassoziierte Proteine und kodierende Gene im Virulenzgencluster von <i>L. monocytogenes</i>	5
Tab. 2: Lebensmittelsicherheitskriterien nach VO(EG) 2073/2005 über mikrobiologische Kriterien für <i>L. monocytogenes</i> in Räucherlachs	9
Tab. 3: Handelsübliche qualitative Kits bzw. Medien zur Detektion/Identifikation von <i>Listeria</i> spp	11
Tab. 4: Leistungsfähigkeit der EN ISO 11290-1	16
Tab. 5: Tests zur Differenzierung der <i>Listeria</i> -Spezies	19
Tab. 6: Leistungsfähigkeit des VIDAS® LDUO assays laut AFNOR Validierung	20
Tab. 7: Leistungsfähigkeit von VIDAS®-assays bei unterschiedlichen Lebensmittelproben	21
Tab. 8: PCR-Ablauf in 3 Schritten	22
Tab. 9: Leistungsfähigkeit des iQ-Check™ <i>L.monocytogenes</i> Kits laut AFNOR Validierung	24
Tab. 10: Testparameter beim Methodenvergleich	27
Tab. 11: Tests für die Beurteilung abweichender Ergebnisse	27
Tab. 12: <i>Listeria</i> - Referenzstämme	32
Tab. 13: Selektive Anreicherungs Nährmedien	33
Tab. 14: Selbst hergestellte Zusätze und ihr Anteil in 1 L Halbfraser bzw. Fraser-Bouillon	34
Tab. 15: Nährmedien zur Bestätigung von <i>L. monocytogenes</i> bzw. <i>Listeria</i> spp.	34
Tab. 16: Nährmedien für die Stammsammlung	35
Tab. 17: Reagenzien zur Charakterisierung der Stämme	36
Tab. 18: Zusammensetzung des VIDAS® <i>Listeria</i> DUO assays	37
Tab. 19: VIDAS® <i>Listeria</i> DUO Reagenzriegel	38
Tab. 20: Zusammensetzung des iQ-Check™ <i>L. monocytogenes</i> Kits	38
Tab. 21: Zusammensetzung des API® <i>Listeria</i> - Kits	40
Tab. 22: Beschriftungsschema am Beispiel der Proben aus der Charge B	45
Tab. 23 Grenzwerte und Interpretation der VIDAS® LDUO Ergebnisse	48

Tab. 24: Überblick über die Anwendung der DNA-Extraktionsmethoden	50
Tab. 25: PCR-Mix Calculation Guide	52
Tab. 26: PCR Thermoprotokoll	54
Tab. 27: Kriterien der Kontrollen für eine valide PCR-Reaktion	54
Tab. 28: Interpretation der Probenergebnisse	55
Tab. 29: Bestätigung von im VIDAS® LMO positiven <i>L. monocytogenes</i> Isolaten	59
Tab. 30: Bestätigung der präsumptiv positiven Proben mit der EN ISO 11290-1	65
Tab. 31: Bestätigung von im VIDAS® LDUO <i>L. monocytogenes</i> -positiven Isolaten	69
Tab. 32: Bestätigung von im VIDAS® LDUO <i>Listeria</i> spp-positiven Isolaten	70
Tab. 33: Positive Lachsproben in der Real-time PCR (iQ-Check™ LMO)	71
Tab. 34: Überblick der Ergebnisse von VIDAS® LDUO, iQ-Check™ LMO und ISO 11290-1	73
Tab. 35: Vergleich des Nachweises von <i>L. monocytogenes</i> mit VIDAS® und ISO 11290-1	76
Tab. 36: Vergleich des Nachweises von <i>Listeria</i> spp mit VIDAS® und ISO 11290-1	76
Tab. 37: Leistungsfähigkeit des VIDAS® LDUO assays nach Eigenuntersuchung	78
Tab. 38: M-Werte für Y Abweichungen ($6 \leq Y \leq 22$)	78
Tab. 39: Vergleich des Nachweises von <i>L. monocytogenes</i> mit iQ-Check und ISO 11290-1	80
Tab. 40: Leistungsfähigkeit des iQ-Check™ nach Eigenuntersuchung	81
Tab. 41: Anzahl der <i>L. monocytogenes</i> -positiven Proben Lachsproben	90
Tab. 42: Gegenüberstellung der wichtigsten Ergebnisse der einzelnen Methoden	90

Abkürzungsverzeichnis

ALOA	Agar Listeria nach Ottaviani Agosti
Amd.	Amendment
AOAC	Association for Analytical Chemists
AFNOR	Association Française de Normalisation
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
ELFA	Enzyme-Linked Fluorescent Assay
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
IDF	International Dairy Federation
ISO	International Organization for Standardization
KBE	keimbildende Einheiten
NaCl	Natriumchlorid
NMKL	Nordic Committee on Food Analysis
OCLA	Oxoid Chromogenic Listeria Agar
PCR	Polymerasekettenreaktion
PC-PLC	Phosphatidylcholin-Phospholipase C
PI-PLC	Phosphatidylinositol-Phospholipase C
RTE	“Ready-to-eat”
UHQ	ultra high quality

1. Einleitung / Fragestellung

L. monocytogenes kommt vor allem in sogenannten „Ready-to-eat“ - Lebensmitteln vor und stellt aufgrund seiner Wachstumsfähigkeit bei niedrigen Temperaturen eine Gefahr für die menschliche Gesundheit dar [RAMASWAMY et al., 2007]. Kaltgeräucherter Lachs als verzehrsfertiges Produkt ist sporadisch mit diesem Keim belastet und wird als Risikolebensmittel für humane Listeriose angesehen [RØRVIK, 2000]. Listerieninfektionen treten zwar relativ selten auf, jedoch ist die Mortalität von ca. 30% bei bestimmten Risikogruppen sehr hoch [RAMASWAMY et al., 2007].

Kulturelle Methoden zum Nachweis von *L. monocytogenes* in Lebensmitteln sind sehr zeitaufwändig, da Anreicherungsschritte erforderlich sind um die üblicherweise geringe Keimzahl nachzuweisen. Das Referenzverfahren ISO 11290-1 beansprucht mehr als fünf Tage, um ein positives Ergebnis zu bestätigen. Die Lebensmittelindustrie hat erhebliches Interesse an schnellen, sensitiven, spezifischen, einfachen und automatisierten Detektionsmethoden, um im Fall von positiven Ergebnissen rechtzeitig zu reagieren [CHURCHILL et al., 2006]. Schnellmethoden, wie Immunoassays oder DNA basierende Methoden weisen höhere Sensitivitäten und Spezifitäten als gängige kulturelle Methoden auf. Der hohe Automatisierungsgrad einiger Schnellmethoden erleichtert die Anwendung in der Routineanalyse. Die praktische Anwendung ist aber oft eine finanzielle und materielle Herausforderung und erfordert geschultes Personal zur Durchführung [NORTON, 2002].

Ziel dieser Arbeit ist es, zwei Schnellmethoden (Real-time PCR–iQ-Check™ *L.monocytogenes* Kit, Bio-Rad und VIDAS® - Immunoassay, Biomérieux) mit der kulturellen Referenzmethode ISO 11290-1 zu vergleichen. Der Vergleich soll Aufschluss über die Anwendbarkeit der beiden Alternativmethoden für den industriellen Nachweis von *L. monocytogenes* in Räucherlachs geben, wobei die Problematik der Vergleichbarkeit qualitativer Methoden aufgezeigt und erörtert werden soll.

2. Literaturübersicht

2.1 Die Gattung *Listeria*

2.1.1 Taxonomie

Die Gattung *Listeria* wird der Familie „*Listeriaceae*“, der Ordnung „*Bacillales*“, der Klasse „*Bacilli*“ und dem Phylum „*Firmicutes*“ zugeordnet und umfasst 6 Spezies: *L. monocytogenes*, *L. ivanovii*, *L. innocua*, *L. welshimeri*, *L. seeligeri* und *L. grayi* [ANONYM 1, 2006]. Aufgrund von Nachuntersuchungen mittels 16S rRNA Sequenzanalyse wurden sie als eine Spezies, *L. grayi* reklassifiziert [ROCOURT und BUCHRIESER, 2007]. Erst kürzlich wurden 4 Isolate einer neuen *Listeria*-Spezies, *L. marthii* aus Erdboden- und abgestandenen Wasserproben des Finger Lakes National Forest, New York, USA isoliert. DNA-DNA Hybridisierungsstudien ergaben, dass alle 4 Isolate derselben Spezies angehören. Durch 16S rRNA Sequenzanalyse konnte die phylogenetische Verwandtschaft zu *L. monocytogenes* und *L. innocua* bestätigt werden [GRAVES et al., 2009].

2.1.2 Eigenschaften

Listerien sind nicht sporenbildende, Gram-positive, mikroaerophile, Oxidase-negative und Katalase-positive Stäbchen, welche im Mikroskop einen Durchmesser von 0,5µm und bis zu 2,5µm Länge erreichen. In älteren Kulturen erscheinen sie häufig als längliche Zellen, (bis ca. 10µm) die oft als gramnegativ erscheinen. Durch eine peritriche Begeißelung sind sie bei 25°C beweglich, bei 35°C jedoch unbeweglich [BÜLTE, 2008a].

Der Wachstumsbereich von Listerien ist zwischen pH 4,3 und 9,6 und die optimale Vermehrungstemperatur liegt zwischen 30 und 37°C.

Dennoch können sie in einem Temperaturbereich zwischen 0,4 und 45°C wachsen, d.h. der Keim ist in der Lage, sich bei Kühlschranktemperaturen zu vermehren [CHAN und WIEDMANN, 2009].

L. monocytogenes ist der bedeutendste human- und tierpathogene Stamm, während Infektionen mit *L. ivanovii* nur bei Tieren, speziell bei Schafen vorkommen. In zwei Fällen wird von Erkrankungen durch *L. ivanovii* beim Menschen berichtet, und ein Fall von Humanlisteriose durch *L. seeligeri* ist bekannt [McLAUCHLIN et al., 2004].

2.2 Listeriose

2.2.1 Epidemiologie

Eine Infektion durch Listerien wird als Listeriose bezeichnet und kann sowohl in epidemischer Form, meistens jedoch in sporadischer Form auftreten. Obwohl die Erkrankung selten vorkommt, ist die Sterblichkeitsrate mit durchschnittlich 30% bei Risikopatienten sehr hoch [FABER und PETERKIN, 1991; RAMASWAMY et al., 2007]. Im Jahr 2008 lag die Inzidenz von Listeriose in Österreich bei rund 0,38/100.000 Einwohner, d.h. 31 registrierte Listeriosefälle. Die Lethalität lag bei 19% im Jahr 2008. Zwischen 1996 und 2007 lag die Inzidenz bei 0,1 und 0,25/100.000 Einwohner, in westeuropäischen Staaten bei 0,2 bis 0,9/100.000 Einwohner [ANONYM 2, 2008].

Der Ausbruch von invasiver Listeriose ist abhängig von der Empfindlichkeit einzelner Personen, aber auch von der Virulenz und Anzahl der aufgenommenen Keime [SCHUCHAT et al., 1991]. Schwangere, Neugeborene, Personen über 60 Jahre, sowie immunsupprimierte Menschen (z.B. Krebspatienten, Diabetiker, AIDS-Kranke) stellen wesentliche Risikogruppen für Listeriose dar. Das Risiko, an Listeriose zu erkranken, ist bei Schwangeren 20 mal höher, bei HIV-Infizierten um das 300fache höher als bei gesunden Menschen [BORTOLUSSI, 2008]. 95% der Erkrankungen werden nachweislich von den *L. monocytogenes* Serotypen 1/2a, 1/2b und 4b ausgelöst. Obwohl am häufigsten die Serotypen 1/2a, 1/2b und 1/2c aus Lebensmitteln isoliert werden, ist Serotyp 4b für die Mehrheit der Listerioseausbrüche verantwortlich. In einer dänischen Studie war die Sterblichkeitsrate bei Patienten mit einer Serotyp 4

Infektion um 10 % höher als bei Patienten, die mit dem Serotyp 1/2 infiziert waren, was auf eine erhöhte Virulenz von Serotyp 4 – Stämmen hindeutet [SWAMINATHAN und GERNER-SMIDT, 2007].

Die minimale Infektionsdosis ist nicht bekannt, wobei diese bei gesunden Menschen auf 10 – 100 Mio. KBE und bei Risikogruppen auf nur 0,1 – 10 Mio. KBE geschätzt wird [BORTOLUSSI, 2008; FARBER und PETERKIN, 1991].

2.2.2 Klinische Manifestationen

Listeriose manifestiert sich bei Erwachsenen häufig durch Infektionen des Zentralnervensystems, wie Meningitis und Meningoenzephalitis, da es dem Erreger gelingt, die Blut-Hirn-Schranke zu überwinden. Rhombenenzephalitis und Gehirnabszesse kommen jedoch seltener vor [SCHUCHAT et al. 1991; DREVETS und BRONZE, 2008].

Bei Schwangeren treten üblicherweise keine typischen Symptome auf. *L. monocytogenes* kann jedoch die Plazentabarriere überwinden und den Fötus angreifen. [VÁZQUEZ-BOLAND et al., 2001]. Bei der sogenannten „early-onset“ neonatalen Listeriose wird der Fötus in der Gebärmutter infiziert und äußert sich kurz nach der Geburt hauptsächlich durch Sepsis. Seltener kommt Granulomatosis infantiseptica vor, wobei Abszesse und Granulome in verschiedenen Organen auftreten [PAINTER und SLUTSKER, 2007]. Die Folgen sind oft Abortus oder Totgeburt. Die späte neonatale Listeriose entwickelt sich erst 1 bis 8 Wochen nach der Geburt und kommt wesentlich seltener vor. Eine Infektion entsteht vermutlich durch Aspiration kontaminierter Exsudate der Mutter oder aber auch durch das Krankenhauspersonal [VÁZQUEZ-BOLAND et al., 2001].

Gesunde Menschen entwickeln oft eine listerielle Gastroenteritis, die sich durch Symptome wie Durchfall, Fieber und Unterleibsschmerzen äußert. Die Krankheit klingt jedoch von selbst wieder ab und die meisten Patienten brauchen keine Antibiotikatherapie [DREVETS und BRONZE, 2008].

2.2.3 Pathogenitätsmechanismen und Virulenzfaktoren

Listeria monocytogenes kann einerseits in Makrophagen überleben, andererseits besitzt der Keim die Fähigkeit, in nicht-phagocytierende Zellen einzudringen und sich in ihnen zu vermehren [COSSART, 2007].

Nachdem die Bakterien in die Zelle eingedrungen sind, befinden sie sich in einer Vakuole. Von dort entkommen sie in das Cytoplasma, wo es zu einer starken Vermehrung kommt. Durch die Polymerisation von Aktin entstehen Filamente und eine Fortbewegung des Erregers im Cytoplasma wird möglich. Durch die Bildung von Ausstülpungen an der Plasmamembran können die Bakterien die Nachbarzelle befallen und sich auf diesem Weg von Zelle zu Zelle verbreiten. Für die Schritte des Infektionsprozesses sind bestimmte Gene verantwortlich [COSSART und TOLEDO-ARANA, 2008], die oft auch beim Nachweis von Listerien in PCR Reaktionen amplifiziert werden. Diese Gene (Tab. 1) sind im sogenannten Virulenzcluster lokalisiert, der sich innerhalb der Spezies unterscheidet. Die Virulenzfaktoren sind in die vier Schritte der Zellinfektionszykluses involviert. Der Eintritt von *L. monocytogenes* in die Epithelzelle wird von Internalin A und B gesteuert. Listeriolysin O (LLO), plc-A und plc-B sind an der Auflösung der primären Vakuole beteiligt. Die Beweglichkeit in der Zelle durch das Protein ActA gesteuert. An der Ausbreitung von Zelle zu Zelle ist das Protein ActA, LLO und Metalloprotease (Mpl), welche plc-B aktiviert, beteiligt. Der Transkriptionsregulator PrfA kontrolliert die Expression der Virulenzfaktoren [ANONYM 1, 2006].

Tab. 1: Virulenzassoziierte Proteine und kodierende Gene im Virulenzgencluster von *L. monocytogenes* [LIU, 2006]

Protein	Gen
Virulenzregulator PrfA	<i>prfA</i>
Phosphatidylinositol-Phospholipase C (PI-PLC)	<i>plcA</i>
Porenbildendes Toxin Listeriolysin O (LLO)	<i>hly</i>
Metalloprotease Mpl	<i>mpl</i>
Oberflächenprotein ActA	<i>actA</i>
Phosphatidylcholin-Phospholipase C (PC-PLC)	<i>plcB</i>

Ein weiterer Pathogenitätsfaktor ist das *iap*-Gen. Es codiert das p60 Protein und obwohl es in allen *Listeria* Spezies vorkommt gibt es dennoch Unterschiede des Gens zwischen den Spezies [BUBERT et al., 1992].

Neue virulenzspezifische Gene, die für mutmaßliche Transkriptionsregulatoren (z.B. *Imo0833*), vermeintliche Internaline (z.B. *Imo2821*) und unbekannte Proteine (z.B. *Imo0834*) kodieren, wurden identifiziert, um die Virulenz und Pathogenität von *L. monocytogenes* besser bestimmen zu können. Das *Imo2821* Gen wurde nur in virulenten, nicht aber in avirulenten *L. monocytogenes* - Stämmen gefunden und kann somit zur Differenzierung hinsichtlich der Virulenzfähigkeit eingesetzt werden [LIU et al., 2007].

2.3 Vorkommen von *Listeria monocytogenes* in Lebensmitteln

„Ready to eat“ (RTE) - Lebensmittel werden vom Erzeuger oder Hersteller zum unmittelbaren menschlichen Verzehr bestimmt, ohne dass eine weitere Erhitzung oder Verarbeitung zur Abtötung von Mikroorganismen erforderlich ist. [ANONYM 4, 2005]. Eine Untersuchungreihe in Wien ergab, dass Fisch und Meerestiere mit 19,4% von 93 untersuchten Proben aus Supermärkten am häufigsten mit *L. monocytogenes* kontaminiert waren. Auch in rohen Fleischwürsten (6,3% von 144 Proben), Weichkäse (5,5% von 200 Proben) und Kochwürsten/Patés (4,5% von 112 Proben) konnte der Keim nachgewiesen werden [WAGNER et al., 2007].

2.3.1 Räucherlachs

Kaltgeräucherter Lachs gehört zur Gruppe der Risikolebensmittel für humane Listeriose [RØRVIK, 2000]. In Finnland wurde von 5 Listeriosefällen berichtet, die auf den Konsum von stark kontaminierter (10^5 KBE/g) kaltgeräucherter Regenbogenforelle zurückzuführen waren. Zuvor hat man auch in Schweden einige Fälle mit dem Konsum von kaltgeräucherter und „gravad“ Regenbogenforelle assoziiert [MIETTINEN et al., 1999; ERICSSON et al., 1997]. Laut Community Summary Reports on Trends and Sources of Zoonoses in the EU in 2004, 2005 and 2006 sind zwischen 0% und 30% der Fischprodukte in der EU mit *L. monocytogenes* kontaminiert. Die Prävalenz einer Keimzahl von über 100 KBE/g Lebensmittel liegt zwischen 0% und 1,8% und kann bei Fischprodukten bis zu 20% betragen [ANONYM 3, 2007].

Roher Lachs stellt keine Hauptkontaminationsquelle dar, da die Kontamination erst bei der Verarbeitung entsteht. Es besteht die Gefahr, dass sich der Keim in Schlachtbetrieben ansiedelt und über die dadurch kontaminierte Rohware weiter in die Räucherkammern eingeschleppt wird. Der Keim kann aber auch über Transportfahrzeuge, Geräte, Verpackungsmaterialien oder durch den Menschen in die Räucheranlagen eingebracht werden [RØRVIK, 2000]. Andere Verarbeitungsschritte solcher Produkte, wie das Trockensalzen und Injektieren der Lake, sowie Phenolgehalte im Rauch (19-27 ppm) haben einen hemmenden Effekt auf *L. monocytogenes*, können den Keim aber nicht eliminieren [PORSBY et al., 2008]. Es wurde weiters beobachtet, dass das Injektieren von rezirkulierender Lake (Lakebehälter, Injektor) ein hohes Risiko mit sich birgt. Lakeinjektionsmaschinen, Enthäuter und Slicer sind Geräte, die schwer zu reinigen und desinfizieren sind, und weiters ein leichtes Anhaften an Fließbändern ermöglichen (Biofilm). Das Hauptziel für den Hersteller ist es daher, die Besiedelung der Arbeitsumgebung mit *L. monocytogenes* zu verhindern, um damit eine Ausbreitung auf das Produkt zu vermeiden. Um dieses zu gewährleisten, müssen unter Anderem laufende Hygienekontrollmaßnahmen und ein gültiges HACCP-Konzept eingeführt werden [RØRVIK, 2000].

Räucherlachs wird oft vakuumverpackt, um eine längere Haltbarkeit zu erzielen. Das Produkt wird demzufolge lange im Kühlschrank gelagert. Während der Lagerung kann sich *L. monocytogenes* beträchtlich vermehren, wobei die Wachstumsgeschwindigkeit bei 8-10°C höher liegt, als bei 4°C [RØRVIK, 2000; PEIRIS et al., 2009]. In Lagerversuchen mit natürlich kontaminiertem Räucherlachs konnte im Vergleich zu künstlich kontaminierten Fischprodukten ein deutlich langsames Wachstum verzeichnet werden [DALGAARD und JØRGENSEN, 1998]. Natürlich kontaminierter Lachs kann dennoch nach langer Lagerung beim Verzehr bereits stark belastet sein. Abgesehen von der richtigen Lagerungstemperatur sollte daher auch die Haltbarkeitsdauer im Kühlschrank kürzer sein als üblicherweise von den Herstellern festgelegt. Das Einfrieren ist für den Konsumenten weniger attraktiv, würde aber das Wachstum von *L. monocytogenes* verhindern [RØRVIK, 2000; PEIRIS et al., 2009].

2.3.2 Gesetzliche Vorgaben über mikrobiologische Grenzwerte für *L. monocytogenes* in Räucherlachs

Die VO(EG) 2073/2005 über mikrobiologische Kriterien für Lebensmittel ist Grundlage für die in der EU geltenden Bestimmungen.

Lebensmittelunternehmer müssen sicherstellen, dass die mikrobiologischen Kriterien eingehalten werden und erforderlichenfalls Untersuchungen durchführen, um die Einhaltung dieser Kriterien während der gesamten Haltbarkeitsdauer zu überprüfen [ANONYM 4, 2005].

Kaltgeräucherter Lachs zählt zu den verzehrfertigen Lebensmitteln, die die Vermehrung von *L. monocytogenes* begünstigen [BÜLTE, 2008b]. Um die Einhaltung der Lebensmittelsicherheitskriterien (Tab. 2) während der gesamten Haltbarkeitsdauer des Erzeugnisses zu überprüfen, sollte der Lebensmittelunternehmer die chemisch-physikalischen Merkmale des Produkts, wie pH-Wert, a_w -Wert, Salzgehalt, Konzentration der Konservierungsmittel und Art des Verpackungsmaterials spezifizieren. Lager- und Verarbeitungsbedingungen, Kontaminationsmöglichkeiten und die geplante Haltbarkeitsdauer sind zu berücksichtigen [ANONYM 4, 2005].

Tab. 2: Lebensmittelsicherheitskriterien nach VO(EG) 2073/2005 über mikrobiologische Kriterien für *L. monocytogenes* in Räucherlachs [ANONYM 4, 2005]

Probenahmeplan		Grenzwert	Analytische Referenzmethode	Stufe, für die das Kriterium gilt
n ¹⁾	c ²⁾			
5	0	100 KBE/g	EN/ISO 11290-2	In Verkehr gebrachte Erzeugnisse während der Haltbarkeitsdauer
5	0	In 25g nicht nachweisbar	EN/ISO 11290-1	Bevor das Lebensmittel die unmittelbare Kontrolle des Lebensmittelunternehmers der es hergestellt hat, verlassen hat

1) n = Anzahl der Probeneinheiten der Stichprobe

2) c = Anzahl der Probeneinheiten die den Grenzwert übersteigen dürfen

Bevor das Produkt die unmittelbare Kontrolle des Lebensmittelunternehmers verlässt, soll in 5 Proben einer Stichprobe von je 25g *L. monocytogenes* nicht nachweisbar sein. In Verkehr gebrachte Erzeugnisse dürfen in den 5 Proben 100 KBE/g nicht überschreiten. Bei unbefriedigenden Ergebnissen ist das Erzeugnis vom Markt zu nehmen oder es muss sogar eine Rückholaktion durchgeführt werden [ANONYM 4, 2005].

2.4 Nachweismethoden für Listerien in Lebensmitteln

Kulturelle Methoden gelten als der „gold standard“ beim Vergleich mit anderen Nachweismethoden und dienen als Referenzmethode für die Validierung von neuen Technologien [JANZTEN et al., 2006; GASANOV et al., 2005]. Weltweit werden ISO 11290 Standards als häufigste Referenzmethoden zur Detektion von Listerien in Lebensmitteln eingesetzt. Kulturelle Methoden basieren auf zwei Anreicherungs-schritten, der Isolierung und Bestätigung der Mikroorganismen. Die Sensitivität dieser Methoden ist für gewöhnlich sehr hoch [JANZTEN et al., 2006].

Da konventionelle Methoden sehr zeit- und arbeitsintensiv sind, hat man sogenannte Schnellmethoden entwickelt, die für die Lebensmittelindustrie einsetzbar sind [BEUMER und HAZELEGER, 2003]. Diese Methoden sind zwar weniger zeitaufwendig, benötigen aber dennoch wirksame Anreicherungsschritte, um den Zielorganismus detektieren zu können [DUPONT und AUGUSTIN, 2009]. Einige Immunoassay - Methoden, basierend auf Antikörpern spezifisch für *L. monocytogenes*, werden in der Lebensmitteluntersuchung schon seit vielen Jahren eingesetzt und sind als handelsübliche Kits erhältlich. Sie sind bekannt für ihre Einfachheit, Sensitivität und Genauigkeit. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay – Methoden (ELISA) sind am weitesten verbreitet und eignen sich sehr gut für komplexe Matrices, wie z. B. Lebensmittel. In der Lebensmittelindustrie gewinnen molekulare Nachweismethoden, wie DNA – Hybridisierung und Polymerasekettenreaktion (PCR) an Beliebtheit. Diese haben den Vorteil, dass sie auf Unterschieden innerhalb des Genoms, aber nicht auf Antigenen und Enzymen basieren. Sie können innerhalb des gleichen Zeitrahmens wie Immunoassay – Methoden durchgeführt werden und sind sehr präzise, sensitiv und spezifisch. Die kostenintensive Ausstattung und die Voraussetzung von geschultem Personal sind als nachteilig zu beurteilen [GASANOV et al., 2005].

Zahlreiche Kits werden für den qualitativen Nachweis und die Identifizierung von *L. monocytogenes* und *Listeria* spp. vermarktet (Tab 3). Einige wurden bereits von Kontrollbehörden wie der Association of Analytical Chemists (AOAC) und der Association Française de Normalisation (AFNOR) validiert.

Tab. 3: Handelsübliche qualitative Kits bzw. Medien zur Detektion/Identifikation von Listerien

Methode	Prinzip	Kit-Name	Hersteller
KULTURELL	Indicator-broth/ Swab - Test	PDX-LIB <i>Listeria</i>	Paradigm Diagnostics, St.Paul, MN, USA
	Nutrient-Media Film	3M Petrifilm™ Environmental <i>Listeria</i> Plate	3M Microbiology, St.Paul, MN, USA
	Chromogenic Media	ALOA one Day	AES Chemunex, Bruz, France
	Chromogenic Media	Rapid L.Mono Rapid <i>Listeria</i> spp. Agar	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
	Chromogenic Media	BBL™ Chromagar™ <i>Listeria</i>	BD Diagnostics, Franklin Lakes, USA
	Chromogenic Media	Chromagar™ <i>Listeria</i>	Chromagar, Paris, France
	Chromogenic Media	Ottaviani Agosti Agar	Biomérieux, Marcy L'Etoile, France
	Chromogenic Media	Compass <i>Listeria</i> Agar	Biokar Diagnostics, Beauvais C., France
	Chromogenic Media	Oxoid Chromogenic <i>Listeria</i> Agar (OCLA)	Oxoid, Hampshire, UK
	Chromogenic Media + Biochem. Reakt.	<i>Listeria</i> Precis™	
IMMUNOASSAY	ELFA ¹	VIDAS® <i>Listeria</i> (LIS) VIDAS® <i>Listeria</i> Xpress (LSX) VIDAS® LMOII VIDAS® <i>Listeria</i> DUO (LDUO)	Biomérieux, Marcy L'Etoile, France
	ELISA ²	TECRA® <i>Listeria</i> Visual Immunoassay (VIA™)	TECRA International, French Forests, Australia
	ELISA	Transia® Plate <i>Listeria</i> / <i>Listeria monocytogenes</i>	BioControl Systems, Bellevue, WA, USA

Methode	Prinzip	Kit-Name	Hersteller
IMMUNOASSAY	EIA ³	Assurance EIA [®] for <i>Listeria</i>	BioControl Systems, Bellevue, WA, USA
	VIP ⁴	VIP [®] for <i>Listeria</i>	BioControl Systems, Bellevue, WA, USA
	Immuno-Magnetic Chemiluminescence	PDX-IMC <i>Listeria</i>	Paradigm Diagnostics, St.Paul, MN, USA
	Immuno- chromatography	RapidCheck [®] for <i>Listeria</i> species	Strategic Diagnostics, Newark, Delaware,US
		DuPont [™] Lateral flow System <i>Listeria</i>	DuPont Qualicon, Wilmington, USA
		Singlepath [®] <i>Listeria</i>	EMD Chemicals, Gibbstown, NJ
		Reveal [®] <i>Listeria</i> One Step	Neogen, Lansing, MI, USA
		Oxoid <i>Listeria</i> Rapid Test	Oxoid, Hampshire, UK
BIOCHEMISCH	Biochemical Identification	API [®] <i>Listeria</i>	Biomérieux, Marcy L'Etoile,France
		Microbact [™] <i>Listeria</i> 12L	Oxoid, Hampshire, UK
		MICROGEN [™] <i>Listeria</i> ID	Microgen Bioproducts, Camberelly,Surrey,UK
		TECRA [®] <i>Listeria</i> Biochemical ID Test System	TECRA International, French Forests, Australia
	Carbon source substrates	MicroLog System	Biolog, Hayward CA, USA
	Fatty acid patterns	Sherlock Microbial Identification System	Microbial ID, Newark, DE, USA
	Aminopeptidase detection	Oxoid Biochemical Identification System (O.B.I.S.)-mono	Oxoid, Hampshire, UK
MOLEKULAR	DNA/RNA Hybridisation	LUMIPROBE 24 <i>Listeria</i> <i>monocytogenes</i>	Europrobe, Lyon, France
	DNA-Hybridisation Probe- based	Gene-Trak [®] <i>Listeria</i> /L. <i>mono.</i> Gene-Trak [®] <i>Listeria</i> DLP Assay	Neogen, Lansing, MI, USA
	DNA-Hybridisation Probe- based	GeneQuence [®] for <i>Listeria/Listeria</i> <i>monocytogenes</i>	Neogen, Lansing, MI, USA
	DNA-Hybridisation Probe- based	AccuProbe [®] <i>Listeria mono.</i> Culture Identification Test	Gen-Probe, SanDiego, USA

Methode	Prinzip	Kit-Name	Hersteller
MOLEKULAR	IMS sample prep., Probe detection	Assurance GDS™ <i>Listeria</i> spp./ <i>Listeria monocytogenes</i>	BioControl Systems, Bellevue, WA, USA
	Gel-based PCR	foodproof <i>Listeria</i> Genus Detection System foodproof <i>Listeria monocytogenes</i> Detection System	Biotecon Diagnostics, Potsdam, Germany
	PCR-ELISA	foodproof <i>Listeria monocytogenes</i> Detection System	Biotecon Diagnostics, Potsdam, Germany
	RT-PCR ⁵	BAX® Reverse Transcriptase PCR (8 hour <i>Listeria</i> Assay)	DuPont Qualicon, Wilmington, USA
	Real-time PCR	BAX® System PCR <i>Listeria</i> BAX® System PCR <i>Listeria</i> 24E BAX® System PCR <i>Listeria mono</i> BAX® System PCR <i>L.mono24E</i>	
	Real-time PCR	iQ-Check <i>Listeria</i> spp. Kit iQ-Check <i>Listeria monocytogenes</i> II Kit	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
	Real-time PCR	LightCycler® foodproof <i>Listeria</i> Genus Detection Kit LightCycler® foodproof <i>Listeria</i> <i>monocytogenes</i> Detection Kit	Roche Diagnostics, Indianapolis, USA Biotecon Diagnostics, Potsdam, Germany
	Real-time PCR	GeneDisc <i>Listeria monocytogenes</i>	GeneSystems, Bruz, France
	Real-time PCR	R.A.P.I.D. LT Food Security System for <i>Listeria</i> Detection	Idaho Technology, Salt Lake City, USA
	Real-time PCR	ADIAFOOD Rapid Pathogen Detection System <i>Listeria</i> spp./ <i>L. monocytogenes</i>	AES Chemunex, Bruz, France
	Real-time PCR	WARNEX rapid pathogen detection system for <i>Listeria</i> / <i>Listeria monocytogenes</i>	AES Chemunex, Bruz, France
	Real-time PCR	TaqMan® <i>Listeria monocytogenes</i> Detection Kit	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA

1 Enzyme-linked fluorescent assay; 2 Enzyme-linked immunosorbent assay;

3 Enzyme Immunoassay; 4 Visual Immunoprecipitate Assay; 5 Reverse-Transcriptase PCR

2.4.1 Kulturelle Nachweismethoden

Die **EN ISO 11290-1:1996 + Amd.1:2004** ist ein horizontales Verfahren für den qualitativen Nachweis von *L. monocytogenes* in Lebensmitteln und Futtermitteln [ANONYM 5, 2005].

2.4.1.1 Anreicherung

Für die erste Anreicherung ist **Halbfraser-Bouillon** mit verminderten Konzentrationen an selektiven Agentien vorgeschrieben. Die zweite Anreicherung in **Fraser-Bouillon** enthält die vollständige vorgeschriebene Konzentration der Zusätze. Die Bouillon enthält Äskulin und Ammoniumeisen(III)-citrat. Alle *Listeria* spp. können Äskulin hydrolysieren. Eisenionen reagieren mit dem Produkt der Äskulinspaltung zu einem Komplex, der sich durch ein schwarzes Präzipitat bemerkbar macht. Somit deuten schwarz gefärbte Anreicherungen nach Bebrütung auf das Vorkommen von Listerien hin [FRASER und SPERBER, 1988]. Der selektive Zusatz Acriflavin inhibiert grampositive Kokken, Nalidixinsäure inhibiert gramnegative Mikroorganismen und durch Cycloheximid wird das Wachstum von Hefen und Schimmelpilzen gehemmt. [BEUMER und HAZELEGER, 2003].

2.4.1.2 Feste Selektivmedien

Das chromogene Selektivmedium **Agar Listeria nach Ottaviani und Agosti (ALOA)** wird im Amendment 1 (2004) der EN ISO 11290-1: 1996 vorgeschrieben. ALOA (AES Laboratoire, Comburg, France; Biolife, Milan, Italy) ermöglicht es, *L. monocytogenes* von anderen nicht-pathogenen *Listeria* spp. zu unterscheiden. Die Selektivität beruht auf Lithiumchlorid, Ceftazidim, Polymyxin B, Nalidixinsäure und Cycloheximid. Das Enzym β -Glucosidase ist in allen *Listeria*-Spezies enthalten und wird durch das im Medium enthaltene chromogene Substrat X-Glucosid sichtbar gemacht. Des weiteren ist im Agar das Substrat Phosphatitylinositol enthalten, wodurch das Enzym Phosphatidylinositol-Phospholipase C (PI-PLC) (siehe Virulenzfaktoren, Kapitel 2.2.3), welches nur in *L. monocytogenes* und in einigen Stämmen *L. ivanovii* enthalten ist, detektiert wird. Durch die Kombination beider Substrate bildet *L.*

monocytogenes blau-grüne Kolonien, umgeben von einem opaken Hof (Abb. 1), während *Listeria* spp. keinen solchen entwickeln. Nach Angaben des Herstellers kann *L. monocytogenes* nach Inkubation von 24 ± 2 h bei 37°C auch in Gegenwart einer Mischkultur detektiert werden. Studien haben jedoch gezeigt, dass die meisten *L. monocytogenes* – Stämme mehr als 24 ± 2 h brauchen, um einen Hof zu bilden. Um Fehlinterpretationen zu vermeiden, wird eine Anreicherung von weiteren 24 ± 2 h empfohlen [BECKER et al., 2006; STESSL et al., 2009].

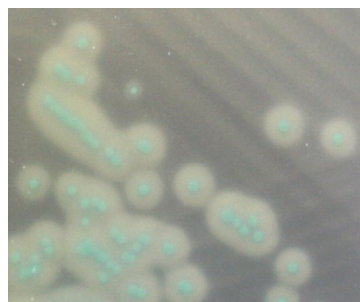


Abb. 1: Hofbildung von *L. monocytogenes* auf ALOA

Oxoid Chromogenic Listeria Agar (OCLA: Oxoid, Hampshire, UK) hat eine ähnliche Zusammensetzung wie ALOA. Statt Phosphatidylinositol wird jedoch bei OCLA Sojalecithin zugesetzt, welches Phosphatidylcholin-Phospholipase C (PC-PLC) detektiert. Auch hier erscheinen pathogene *L. ivanovii* mit Hof, da diese auch das Enzym PC-PLC besitzen.

WILLIS et al. (2006) stellten fest, dass OCLA eine gleichwertige Wiederfindungsrate hat wie ALOA und, dass das kostengünstigere Sojalecithin eine passende Alternative zu Phosphatidylinositol ist.

OCLA könnte daher als Alternative für ALOA in die Standardmethode aufgenommen werden [WILLIS et al., 2006].

Zur Ergänzung von ALOA wird in der EN ISO 11290-1 ein beliebiges anderes Selektivmedium vorgeschlagen, Oxford- oder PALCAM-Agar.

Auf **Oxford-Agar** zeigen die meisten Listerienstämme nach 24h schwarze Kolonien, umgeben von einem schwarzen Hof. Nach 48h bilden die Kolonien

eingesunkene Zentren aus. Die Färbung erfolgt nach dem Prinzip des Äskulin-Ammonium Eisen(III)-citrat-Indikatorsystems [CURTIS et al., 1989].

PALCAM-Agar nach VAN NETTEN et al. (1989) basiert auf Columbia-Agar und enthält neben Lithiumchlorid, Acriflavin, Ceftazidim und Polymyxin B ebenfalls Äskulin und Ammonium Eisen(III)-citrat und nach 24h erscheinen *Listerien* als graugrüne 1mm große Kolonien, die nach 48h ein eingesunkenes Zentrum mit schwarzem Hof ausbilden (Abb. 2). Zur Differenzierung von Mannitol-fermentierenden Stämmen wie Enterokokken und Staphylokokken, wurde Mannitol und der pH-Indikator Phenolrot zugefügt, wodurch diese Kolonien gelblich erscheinen. Weder Oxford- noch PALCAM-Agar kann *L. monocytogenes* von *Listeria* spp. unterscheiden.



Abb. 2: Typische *Listeria*-Kolonien auf PALCAM-Agar

2.4.1.3 Leistungsfähigkeit

Die EN ISO 11290-1 wurde im EU-finanzierten Projekt SMT4-CT96-2098 validiert. Die untersuchten Lebensmittelproben (Frischkäse, faschiertes Rindfleisch und getrocknetes Eipulver) waren ausschließlich künstlich kontaminiert (Tab. 4) [SCOTTER et al., 2001].

Tab. 4: Leistungsfähigkeit der EN ISO 11290-1

Probe	Sensitivität	Spezifität	Innokulation	Referenz
Käse, Fleisch, Eipulver	85,6%	97,4%	5-100 KBE/25g	SCOTTER et al. (2001)

2.4.1.4 Probleme bei der Anreicherung und Detektion von *Listeria*

L. monocytogenes kommt in Lebensmitteln oft nur in sehr geringer Keimzahl, gemeinsam mit einer heterogenen Begleitflora vor und folglich kann eine Detektion erschwert werden. Durch das zweistufige Anreicherungssystem der EN ISO 11290-1 werden die pathogenen Zielkeime selektiert und konzentriert, wobei nicht nur *L. monocytogenes*, sondern alle *Listeria* spp. darin vermehrungsfähig sind [ORAVCOVÁ et al., 2008].

In Lebensmitteln kommen oft Mischkulturen von *L. monocytogenes* und *L. innocua* vor und es wurde ein schnelleres Wachstum von *L. innocua* in selektiver Anreicherungsbouillon festgestellt [MacDONALD und SUTHERLAND, 1994]. Dies kann damit erklärt werden, dass die Generationszeit von *L. monocytogenes* durch Steigerung der Acriflavinkonzentration beeinträchtigt wird, jedoch kaum Effekte bei *L. innocua* aufgetreten sind [BEUMER und HAZELEGER, 2003]. Nachdem *L. innocua* die Fähigkeit haben kann, *L. monocytogenes* während der Anreicherung zu überwachsen, wird der Zielkeim maskiert und folglich führt ein niedriges Verhältnis von *L. monocytogenes* im Vergleich zu *L. innocua* zu falsch negativen Ergebnissen. [PETRAN und SWANSON, 1993; CURIALE und LEWUS, 1994]. Es kann also die Möglichkeit nicht ausgeschlossen werden, dass bei alleinigem Nachweis nicht-pathogener Spezies auch *L. monocytogenes* enthalten ist [GREENWOOD et al., 2005]. Chromogene Medien stellten sich gegenüber Oxford- bzw. PALCAM-Agar als überlegen heraus und in einigen Fällen konnten beide Keime, *L. monocytogenes* und *L. innocua* gleichzeitig auf dem chromogenen Nährboden identifiziert werden [GREENWOOD et al., 2005; VLAEMYNCK et al., 2000]. Eine aktuelle Studie von ORAVCOVÁ et al. (2008) hat gezeigt, dass eine Menge von 8×10^3 *L. monocytogenes* in Gegenwart von 2×10^3 *L. innocua* pro 10 g Lachsscheiben auf ALOA Agar nicht nachweisbar war und somit könnte die Methode nicht ausreichen, um 10^0 *L. monocytogenes* in Anwesenheit von mehr als 10^0 *L. innocua* pro Probe zu detektieren.

Die AFNOR hat ein Protokoll zur Detektion von *Listeria* mit nur einem Anreicherungsschritt und dem Selektivmedium ALOA erstellt [GREENWOOD et al., 2005], um den Zeitaufwand der Methode zu verkürzen. GNANOU BESSE et al. (2005) untersuchten das Verhalten von Listerien in natürlich kontaminierten Lebensmitteln wie z.B. in kaltgeräuchertem Lachs und fanden heraus, dass bereits nach 24stündiger Halbfraser-Anreicherung eine maximale Wiederbelebung von *L. monocytogenes* und *Listeria* spp. erreicht worden ist. Des weiteren beurteilen die Autoren eine 24-stündige Anreicherung in Fraser-Bouillon anstatt der in der EN ISO 11290-1 vorgeschriebenen 48h als völlig ausreichend, um Listerien nachzuweisen und schlagen eine Verkürzung der Fraser-Anreicherung vor.

Eine alleinige Anreicherung in Halbfraser-Bouillon könnte problematisch hinsichtlich Selektivität in Gegenwart von Begleitflora sein, und obwohl ähnliche Wiederfindungsraten von *L. monocytogenes* nach erster und zweiter Anreicherung beobachtet wurden [ORAVCOVÁ et al., 2008; GREENWOOD et al., 2005], ist eine zweite Anreicherung wichtig, um andere *Listeria*-Spezies detektieren zu können und um Begleitflora zu eliminieren [GREENWOOD et al., 2005].

Andererseits wäre für die Wiederbelebung von teilweise geschädigten *L. monocytogenes*-Zellen in Lebensmitteln eine alleinige Anreicherung in Fraser-Bouillon nicht anwendbar [ORAVCOVÁ et al., 2008]. Selektive Agentien können auf gestresste bzw. geschädigte Zellen eine hemmende Wirkung haben, weshalb Halbfraser-Bouillon nur die halbe Konzentration an Zusätzen enthält. Zellwachstum und Wiederbelebung wird auch durch die große Pufferkapazität des Mediums erreicht [GASANOV et al., 2005].

2.4.1.5 Bestätigungstests

Zur Bestätigung des Genus *Listeria* müssen verdächtige Kolonien geprüft werden (Gram-positiv, Katalase-positiv, Oxidase-negativ und bei 28°C beweglich bzw. bei 37°C nicht beweglich). Auch durch Zuckerfermentation kann zwischen einzelnen *Listeria*-Spezies unterschieden werden. Schnelle biochemische Tests wie API® *Listeria* (Biomérieux) oder Microbact™ *Listeria* dienen der Identifikation der *Listeria*-Spezies [GASANOV et al., 2005]. Anhand der

Tab. 5: Tests zur Differenzierung der *Listeria*-Spezies¹

Spezies	Hämolyse ²	PI-PLC ³	Säureproduktion		CAMP-Test	
			Rhamnose	Xylose	<i>S.aureus</i>	<i>R.equi</i>
<i>L.monocytogenes</i>	+	+	+	-	+	-
<i>L. ivanovii</i>	+	+	-	+	-	+
<i>L. seeligeri</i>	(+) ⁵	-	-	+	(+)	-
<i>L. innocua</i>	-	-	V ⁴	-	-	-
<i>L. welshimeri</i>	-	-	V	+	-	-
<i>L. grayi</i>	-	-	V	-	-	-

[JANTZEN et al., 2006; ANONYM 5, 2005].² Schafblutagar.³ ALOA.⁴ unterschiedliche Reaktion.⁵ schwache Reaktion

2.4.2 Immunologische Nachweismethoden

Immunologische Methoden basieren auf der Reaktion des bakteriellen Antigens mit dem zugehörigen Antikörper [NOTERMANS und WERNARS, 1991].

Verwendete Antikörper richten sich z.B. gegen das in *L. monocytogenes* vorkommende p60 Protein. Mit monoklonalen Antikörpern ist es möglich, speziell *L. monocytogenes* nachzuweisen. Die Spezifität der Antikörper ist verantwortlich für den Erfolg des Immunoassays [JANTZEN et al., 2006]

Für den Nachweis pathogener Keime in Lebensmitteln wird als häufigste immunologische Methode der ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) verwendet. Die Nachweisgrenze liegt zwischen 10^3 - 10^5 KBE/ml und eine Anreicherung ist daher erforderlich. Man unterscheidet verschiedene ELISA Testformate, wie den direkten ELISA, Sandwich-ELISA und den kompetitiven ELISA. Bei der ELFA-Technik (Enzyme-Linked Fluorescent Assay) werden die Antikörper fluoreszenzmarkiert, wodurch der ELISA eine höhere Sensitivität erreicht. Dadurch entfällt der letzte Schritt einer kolorimetrischen Reaktion und in weiterer Folge wird die Nachweisdauer verkürzt. Durch die Fluoreszenzmarkierung entsteht allerdings ein höherer Kostenaufwand des Tests [CHURCHILL et al., 2006].

Der **VIDAS® LDUO assay** (Biomérieux) arbeitet mit der ELFA-Technik und ermöglicht den gleichzeitigen und differenzierten Nachweis von *L. monocytogenes* und *Listeria spp.* Er wurde durch die AFNOR in Bezug auf die EN ISO 11290-1/A1 gemäß dem EN ISO 16140 Standard validiert (Tab. 6), wobei 466 Produktproben (Fleisch-, Gemüse-, Milch-, Fisch- und Umweltproben) untersucht worden sind [ANONYM 6, 2006].

Tab. 6: Leistungsfähigkeit des VIDAS® LDUO assays laut AFNOR Validierung

	<i>Listeria spp.</i>	<i>L. monocytogenes</i>
Relative Richtigkeit %	92,2	93,7
Relative Spezifität %	87,7	92,1
Relative Sensitivität %	94,1	95,7
LOD₅₀¹	0,3 – 2,5 Zellen/25g	

¹ Jener Kontaminationsgrad, bei dem eine positive Detektion in 50% der Fälle möglich ist

Weitere Tests sind der VIDAS® *Listeria monocytogenes* II (LMOII), welcher nur *L. monocytogenes* detektiert, der VIDAS® *Listeria* (LIS) zum Nachweis von *Listeria* spp. und der *Listeria* Xpress assay (LSX) für die Detektion von *Listeria* spp. innerhalb von 30 Stunden.

Derzeit existieren noch keine weiteren Studien zum VIDAS® LDUO assay, es gibt aber bereits Erfahrungswerte zur Leistungsfähigkeit von anderen VIDAS® assays (Tab. 7).

Tab. 7: Leistungsfähigkeit von VIDAS®-assays bei unterschiedlichen Lebensmittelproben

VIDAS	Probe	Spez. %	Sens. %	Nachweis	Referenz
LMO	Umwelt- u. Fischproben	96,0	73,0	qualitativer Nachweis	VAZ-VELHO et al. (2000)
LMO 2	Milchpulver	96,4	98,9	100-10000 KBE/25g	ROLA et al.(2006)
LIS	Rohes Gemüse, Fleisch, Fisch, Milchprodukte	97,0	98,1	10 ⁴ - 10 ⁵ KBE/ml	SEWELL et al. (2003)

2.4.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Mit der PCR können spezifische Sequenzen der Ziel-DNA eines Organismus, z.B. *Listeria monocytogenes* schnell und einfach amplifiziert werden. Um die PCR-Produkte sichtbar zu machen, werden diese sehr häufig auf ein Agarosegel aufgetragen, mittels Elektrophorese aufgetrennt und anschließend mit Ethidiumbromid gefärbt. Das Gel kann danach im UV-Licht bearbeitet werden [FAIRCHILD et al., 2006].

Zur Amplifikation der DNA werden Oligonukleotidprimer, die komplementär zu den Enden einer definierten Sequenz der DNA-Matrize sind, benötigt. Weitere Komponenten sind eine hitzestabile DNA-Polymerase, die vier dNTPs (dGTP, dATP, dCTP und dTTP) und ein Puffer [NEWTON und GRAHAM, 1994].

Die PCR läuft in 3 Schritten ab, der Denaturierung des DNA-Doppelstranges, dem Annealing und der Elongation (Tab. 8).

Tab. 8: PCR-Ablauf in 3 Schritten

Schritt 1: Denaturierung des DNA-Doppelstranges	Durch Erhitzen auf 95-100°C wird die DNA in ihre Einzelstränge überführt.
Schritt 2: Annealing	Nach einer Abkühlung auf 37-65°C binden die Primer an die denaturierte Matrize.
Schritt 3: Elongation	Die Primer werden durch eine hitzestabile DNA-Polymerase bei 72°C verlängert.

Die PCR wird in einem Thermocycler durchgeführt, ein Gerät das für einen zyklischen Temperaturwechsel sorgt. Der Zyklus wird in der Regel 20- bis 40mal wiederholt und damit entstehen Kopien der ursprünglichen Zielregion [NEWTON und GRAHAM, 1994]. Das häufigste Gen im PCR-Nachweis ist das *hlyA*-Gen, aber auch das *iap*-Gen und *inlB* können Zielgene sein [CHURCHILL et al., 2006].

Während bei der konventionellen PCR noch ein zusätzlicher Schritt der Detektion mittels Gelelektrophorese erforderlich ist, kann bei der **Real-time PCR** der Nachweis des Amplikons während des Amplifikationsvorganges in Echtzeit beobachtet werden. Dies geschieht durch Markierung der Primer, Oligonukleotidsonden oder der Amplikons mit Fluoreszenzmolekülen. Das Fluoreszenzsignal steigt mit der Zunahme des Amplikons an [MACKAY, 2004]. Am häufigsten wird der DNA-bindende Farbstoff SYBR Green I verwendet. Bei der TaqMan PCR bindet eine interne fluoreszenzfarbstoffmarkierte Oligosonde an die Zielsequenz. Fortgeschrittene Methoden sind die Amplikondetektion mit Hybridisierungssonden und Molecular Beacons [FAIRCHILD et al., 2006].

2.4.3.1 Molecular Beacons

Molecular Beacons sind fluoreszenzmarkierte Oligonukleotide und bestehen aus drei Teilen: (1) einem Loop, das an die Zielsequenz bindet; (2) einem Stamm, der irreversibel während des Bindungsprozesses dissoziiert; (3) einem Fluoreszenzfarbstoff am 5' Ende und einem Quencher am 3' Ende.

Im freien Zustand liegen Molecular Beacons in Form einer Haarnadelstruktur vor, wobei Fluoreszenz- und Quenchergruppe sehr nah zusammenstehen. In diesem Zustand wird die emittierte Fluoreszenz durch die Quenchergruppe absorbiert. Binden nun Molecular Beacons an die Zielsequenz, wird ein hybridisierter Doppelstrang gebildet, und Fluoreszenzfarbstoff und Quencher werden getrennt. Das emittierte Fluoreszenzsignal ist proportional zur Konzentration des PCR-Produkts [LI et al., 2008].

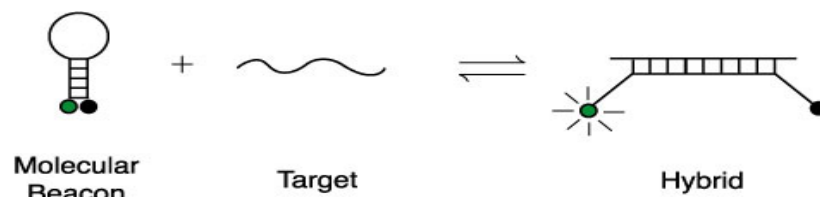


Abb. 5: Funktionsprinzip eines Molecular Beacon

Es ist bekannt, dass *L. monocytogenes* in natürlich kontaminierten Lebensmitteln von keiner Methode in allen Fällen detektiert werden kann [VAZ-VELHO et al., 2000]. Handelsübliche Real-time PCR Systeme erbringen die gleiche oder sogar bessere Leistung als kulturelle Methoden [Navas et al., 2006]. Alle kommerziell erhältlichen Real-time PCR Kits beruhen auf einem qualitativen Nachweis. Quantitative Real-time PCR Methoden für *L. monocytogenes* wurden bereits entwickelt und eignen sich gut für die Routineanalytik [JANZTEN et al., 2006]. Aufgrund der notwendigen Anreicherungsschritte und der Unfähigkeit der PCR, zwischen toten und lebendigen Zellen zu unterscheiden, können sich diese jedoch schwer durchsetzen [MALORNY et al., 2003].

Der **iQ-Check™ *Listeria monocytogenes* Kit** (Bio-Rad Laboratories) ist ein Real-time PCR Kit für den Nachweis von *L. monocytogenes* in Lebensmitteln. Er wurde von der AFNOR in Bezug auf die EN ISO 11290-1/A1 gemäß dem EN ISO 16140 Standard validiert (Tab. 9). 343 Produktproben wurden getestet (Fleisch-, Milch-, Fisch-, Gemüse- und Umweltproben), wobei pro Kategorie ungefähr 50% positiv und 50% negativ waren. 24% der Proben waren künstlich kontaminiert, 76% natürlich kontaminiert [ANONYM 8, 2005].

Tab. 9: Leistungsfähigkeit des iQ-Check™ *L.monocytogenes* Kits laut AFNOR Validierung

Relative Richtigkeit %	98,3
Relative Spezifität %	98,9
Relative Sensitivität %	97,5
LOD ₅₀ ¹	0,2-1,6 Zellen/25g

¹ Jener Kontaminationsgrad, bei dem eine positive Detektion in 50% der Fälle möglich ist

Bei einer Untersuchung von Melonen und gemischtem Salat mit dem iQ-Check™ *Listeria monocytogenes* Kit (Bio-Rad Laboratories) konnte der Keim auch bei einem niedrigen Kontaminationsgrad von 4 KBE/25g nachgewiesen werden. Der Kit hat alle *L. monocytogenes* Isolate von anderen *Listeria* spp. unterschieden [LIMING et al, 2004].

2.4.3.2 Probleme bei der PCR

PCR-basierende Methoden sollten einen Keimgehalt von 1 KBE/25g Lebensmittel nachweisen können. Die Sensitivität wird jedoch beeinflusst von niedrigen Kontaminationsgraden, ungleicher Verteilung der Keime in der Matrix (nichtrepräsentative Probe), hohes Probenvolumen im Vergleich zum eigentlichen Reaktionsvolumen und der PCR-Inhibition durch Komponenten in der Lebensmittelmatrix [NORTON, 2002].

In Räucherlachs sind phenolische Komponenten die wahrscheinlichsten PCR-Inhibitoren, aber auch Cresole und Aldehyde können inhibierend wirken [SIMON et al., 1996]. Fette, Proteine und Inhaltsstoffe der Fraser-Bouillon wie Äskulin, Gallensalzen und Acriflavin können ebenfalls eine PCR-Reaktion hemmen. Die PCR toleriert nur 0,0001% der verwendeten Ammonium Eisen-citrat-Konzentration, was einer 50-fachen Verdünnung der Fraser-Bouillon entspricht [ROSSEN et al., 1992]. Ein weiterer Schwachpunkt der PCR ist, dass jene nicht zwischen toten und lebensfähigen Mikroorganismen unterscheiden kann und deswegen der Nachweis toter Zellen zu falsch-positiven Ergebnissen führt [NORTON, 2002].

Eine Anreicherung der Proben vor der PCR hat den Vorteil, dass durch die Verdünnung das Risiko falsch-positiver Ergebnisse durch tote Zellen minimiert wird [KACLÍKOVÁ et al., 2003] und eine PCR-Inhibition durch Lebensmittelbestandteile verhindert wird [NIEDERHAUSER et al., 1992]. Eine Verminderung der Inhibition und damit eine Steigerung der Sensitivität kann auch durch verbesserte DNA-Reinigungstechniken, durch Filtration, immunomagnetischer Separation und Zellkonzentration erreicht werden [NORTON, 2002].

2.4.3.3 Anreicherung der Lebensmittelproben vor der PCR

Der direkte PCR-Nachweis von *L. monocytogenes* aus Lebensmitteln gestaltet sich schwierig aufgrund der ungleichmäßigen Keimverteilung in der Matrix und der meist niedrigen Keimzahlen [GOLDSTEYN T. et al., 1991]. Um niedrige Keimzahlen in Lebensmitteln detektieren zu können, sind Anreicherungs-schritte vor der Durchführung der PCR notwendig [NORTON, 2002].

Viele Untersuchungen wurden nur mit künstlich kontaminierten Lebensmittelproben durchgeführt, ohne die Anreicherungsprotokolle auf natürlich kontaminierte Proben abzustimmen. Man hat jedoch festgestellt, dass eine Übertragung solcher Protokolle auf natürlich kontaminierte Proben problematisch ist, da in diesen Proben die Bakterien eine geringere Lebensfähigkeit haben [NIEDERHAUSER et al., 1992; CANDRIAN, 1995].

NAVAS et al. (2006) haben beobachtet, dass die Sensitivität der Real-time PCR durch die Art der Anreicherung beeinflusst wird. Nach erster Anreicherung (24h) lag die Detektionsrate bei 37%, nach 2. Anreicherung (24h) bei 70%, was bedeutet, dass verbesserte Anreicherungsbedingungen zu einer höheren Sensitivität der Untersuchung beitragen.

In einigen Studien konnte bei der Untersuchung von Lebensmittelproben mittels Real-time PCR ein modifiziertes Anreicherungsprotokoll der ISO 11290-1 von 26h (24h Halbfraser, 4h Fraser) schnellere Ergebnisse erzielen [O'GRADY et al., 2008; 2009].

2.5 Vergleich qualitativer Methoden

Bevor eine alternative Methode von Lebensmittelherstellern genutzt werden kann, muss sie durch eine Validierung auf ihre technische Leistungsfähigkeit geprüft werden. Es müssen vergleichbare Ergebnisse zur jeweiligen Standardmethode erzielt werden, und der Endverbraucher des Kits hat dadurch die Sicherheit, dass die neue Methode einen gewünschten Keim auch nachweisen kann [DEBEVERE und UYTENDAELE, 2003].

Standardisierungsorganisationen wie AOAC, AFNOR, IDF, NMKL, etc. haben, sehr zum Nachteil der Hersteller, unterschiedliche Validierungsschemata entwickelt. Eine Vereinheitlichung dieser Schemata ist daher notwendig [DEBEVERE und UYTENDAELE, 2003].

Die **ISO 16140:2003 Microbiology of food and animal feeding stuffs – Protocol for the validation of alternative methods** beinhaltet technische Protokolle für die Validierung qualitativer und quantitativer Methoden. Das Dokument beschreibt den Validierungsablauf bestehend aus "Comparison study" und "Inter-laboratory study" [ANONYM 7, 2003], und wird vor allem in Europa angewendet.

Die AOAC International hat „Guidelines for Validation of Qualitative and Quantitative Food Microbiological Official Methods of Analysis“ entwickelt, welche die Schritte im Validierungsablauf beschreiben. Die Richtlinien sollen auch eine Initiative zur Harmonisierung von Validierungsmethoden mit der ISO 16140 sein [FELDSINE et al., 2002].

2.5.1 Leistungsparameter und Berechnung der Abweichung

Anhand von Testparametern wird die alternative Methode mit der Referenzmethode verglichen. Abweichende Ergebnisse werden mit dem McNemar Test beurteilt und auf statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Methoden überprüft [ANONYM 7, 2003].

Tab. 10: Testparameter beim Methodenvergleich [ANONYM 7, 2003; FELDSINE et al., 2002]

Parameter	Berechnung	Beschreibung
Relative Richtigkeit (AC)	$AC = \frac{(PA + NA)}{N} \times 100\%$	Grad der Übereinstimmung zwischen Referenzmethode und Alternativmethode
Relative Sensitivität (SE)	$SE = \frac{PA}{N_+} \times 100\%$	Die alternative Methode detektiert den Analyten als positiv wenn er auch von der Referenzmethode positiv erkannt wurde
Relative Spezifität (SP)	$SP = \frac{NA}{N_-} \times 100\%$	Die alternative Methode detektiert den Analyten als negativ wenn er auch von der Referenzmethode negativ erkannt wurde
Falsch-Positiv Rate (pf+)	$pf+ = 100 - SP$	Alternative Methode zeigt positives, Referenzmethode ein negatives Ergebnis
Falsch-Negativ Rate (pf-)	$pf- = 100 - SE$	Alternative Methode zeigt negatives, Referenzmethode ein positives Ergebnis
Relatives Detektionslimit	Kleinste Anzahl an kultivierbaren Mikroorganismen die in 50% der Fälle detektiert werden kann.	

Tab. 11: Tests für die Beurteilung abweichender Ergebnisse [ANONYM 7, 2003]

$(PD + ND = Y) < 6$	$6 \leq (PD + ND = Y) \leq 22$	$(PD + ND = Y) > 22$
Kein Test erforderlich	Binomialgesetz: Wenn $m \leq M$ für (Y), dann sind die 2 Methoden unterschiedlich bei $\alpha < 0,05$	Mc Nemar test: $\chi^2 = \frac{(PD - ND)^2}{PD + ND}$ Wenn $\chi^2 > 3,841$, dann sind Methoden unterschiedlich bei $\alpha < 0,05$

PA = Anzahl der positiven Übereinstimmungen der Methoden

NA = Anzahl der negativen Übereinstimmungen der Methoden

PD = Anzahl der positiven Abweichungen

ND = Anzahl der negativen Abweichungen

N_+ = Anzahl der positiven Proben mit der Referenzmethode (PA + ND)

N_- = Anzahl der negativen Proben mit der Referenzmethode (NA + PD)

N = gesamte Anzahl der Proben (PA + NA + PD + ND)

2.5.2 Probleme des Methodenvergleiches

Die Referenzmethode wird bei einem Methodenvergleich immer als richtig angesehen. Produziert nun die alternative Methode ein positives Ergebnis, die Referenzmethode jedoch ein negatives, so wird das Ergebnis der alternativen Methode automatisch als „falsch positiv“ beurteilt. Alle kontaminierten Proben sollten daher von der Referenzmethode als richtig positiv erkannt werden [DEBEVERE und UYTENDAELE, 2003]. Diese Annahme kann jedoch zu Schwierigkeiten im Methodenvergleich führen, da einige Studien [PETRAN und SWANSON, 1993; CURIALE und LEWUS, 1994; ORAVCOVÁ et al., 2008] falsch negative Ergebnisse bei kulturellen Methoden belegen. Dabei spielen immer wieder Probleme bei der Anreicherung bzw. die Zusammensetzung und Begleitflora in der Lebensmittelmatrix eine große Rolle. Ob ein Anreicherungsmedium effektiv ist, hängt sehr stark von der Art des Lebensmittels, der Keimzahl an *L. monocytogenes* bzw. deren Zustand und von anderen Kontaminanten ab [CHURCHILL et al., 2006].

Beim Methodenvergleich wird angeraten, die gleichen Anreicherungsprotokolle, und ein und die selbe Probe für Referenzmethode und Schnellmethode zu verwenden und diese erst nach dem Anreicherungsschritt zu teilen, um dann das jeweilige Methodenprotokoll fortzuführen. Ist dies aufgrund unterschiedlicher Protokolle nicht möglich, so müssen aus einer Probe gepaarte Portionen hergestellt werden [ANONYM 7, 2003; BEUMER und HAZELEGER, 2003].

Die Herstellung gepaarter (oder gedritelter) Portionen aus einer Probe gestaltet sich jedoch schwierig, da beide (oder alle drei) Portionen den gleichen Keimgehalt aufweisen sollten, um einen repräsentativen Methodenvergleich zu erzielen. Aufgrund der niedrigen Keimzahl, speziell beim Vergleich von Nachweismethoden für pathogene Keime, wird nahe am Detektionslimit getestet und damit sind Unterschiede zwischen Methoden (von Referenzmethode und Alternativmethode) sehr wahrscheinlich [DEBEVERE und UYTENDAELE, 2003]. LAPPI et al. (2004) haben bei der Untersuchung natürlich kontaminierter Räucherlachsproben eine ungleichmäßige Keimverteilung von *L.*

monocytogenes innerhalb einer Probe (4 Portionen à 25g) festgestellt. Keine der positiven Proben wies einen Keimgehalt von >100 KBE/g auf, und durch den geringen Kontaminationsgrad gestaltete sich eine homogene Keimverteilung in den 25g-Portionen schwierig.

Beim Vergleich von Methoden sind Proben mit einem niedrigeren Keimgehalt (natürlich kontaminierte Proben) zu bevorzugen, um die Leistungsfähigkeit von Schnellmethoden unter realistischen Bedingungen herauszufinden. Schnellmethoden erzielen bei hohen Keimzahlen in den Proben meistens positive Ergebnisse [BEUMER und HAZELEGER, 2003]. Sind keine natürlich kontaminierten Proben verfügbar, so ist auch eine künstliche Kontamination erlaubt. Es sollten jedoch nicht mehr als 80% der Proben künstlich kontaminiert sein. Die Keimmenge sollte jedoch der von natürlich kontaminierten Proben ähnlich sein und die Mikroorganismen sollten, so wie in natürlich kontaminierten Proben auch, entsprechendem Stress ausgesetzt werden (z.B. Gefrierstress) [DEBEVERE und UYTENDAELE, 2003].

Ein Problem bei bereits validierten Methoden stellt oft die Anwendbarkeit auf unterschiedliche Lebensmittel dar. Wurde eine Methode zum Nachweis von *L. monocytogenes* z.B. für geräucherten Lachs validiert, heißt das nicht automatisch, dass diese Methode den Keim auch in gefrorenem Fisch oder Paté nachweisen kann. Im Validierungsbericht müssen zwar alle getesteten Lebensmittel aufscheinen, dem Endverbraucher des validierten Kits wird jedoch empfohlen, eine „in-house“ Validierung mit der eigens erzeugten Lebensmittelmatrix durchzuführen [DEBEVERE und UYTENDAELE, 2003].

Da PCR und kulturelle Methoden auf unterschiedlichen Prinzipien basieren, ist ein Vergleich oft schwer möglich. Bei kulturellen Methoden können Bakterien im Fall von Stress oder Beeinträchtigung oft nicht auf den Nährmedien isoliert werden. Die PCR arbeitet mit der Amplifikation von DNA, und hat den Vorteil dass auch lebensfähige, nicht kultivierbare Mikroorganismen detektiert werden können. Dennoch kommen bei der PCR manchmal falsch positive Ergebnisse vor. Die positiven Ergebnisse können mit kulturellen Methoden bestätigt

werden, die Sensitivität ist aber meistens suboptimal [HOORFAR und COOK, 2003].

2.5.3 Verbesserungspotenzial der Methodenvvalidierung

Der Trend in der Methodenvvalidierung geht Richtung ISO 16140. Es handelt sich hierbei um einen Europäischen und gleichzeitig Internationalen Standard, mit dem Ziel, eine einheitliche Grundlage für die Validierung alternativer mikrobiologischer Methoden zwischen den Zertifizierungsorganisationen zu schaffen. [BETTS, 2005]. Um diese Einheit zu erreichen, ist der Dialog zwischen den beteiligten internationalen Organisationen von großer Bedeutung [DEBEVERE und UYTENDAELE, 2005].

Die AOAC International hat im Jahr 2006 einen Task Force Report on Best Practices for Microbiological Methodology herausgegeben. Das Ziel der Task Force war es, technische und statistische Probleme der AOAC Guidelines und ISO 16140 aufzugreifen und Verbesserungsvorschläge zu machen. 4 Arbeitsgruppen beschäftigten sich mit Detektionslimits, Matrixerweiterung, Probennahme, und Statistik. Die Empfehlungen der Task Force sollen auch einen Input für die derzeitige Überarbeitung der EN ISO 16140 geben [ANONYM 9, 2006].

Bei der Überarbeitung der ISO 16140 durch die ISO/TC 34/SC 9/WG 3 wirken 25 Teilnehmer aus 15 verschiedenen Ländern/Organisationen mit. In den letzten Jahren konnten bereits Fortschritte in den einzelnen Arbeitsgruppen erzielt werden, aber die vollständige Überarbeitung der ISO 16140 wird wohl einen längeren Zeitrahmen und Geduld von den Anwendern erfordern [ANONYM 10, 2008].

3. Material

3.1 Probenmaterial

3.1.1 Lachs- und Umweltproben

In dieser Studie werden verschiedene Rohlachs- bzw. Räucherlachsproben auf das Vorhandensein von *L. monocytogenes* bzw. *Listeria spp.* untersucht.

Isolierte *L. monocytogenes*-Stämme aus Lachs- und Umweltproben (siehe Anhang) werden charakterisiert und bestätigt.

Die Umweltproben stammen aus einem Betrieb in Österreich und wurden vom Grundwasser, von Schuhen der Mitarbeiter aus der Slicerabteilung und von Handschuhen der Mitarbeiter entnommen.

Die Lachsproben stammen aus Betrieben in Österreich, Dänemark, den Niederlanden und Polen, wobei es sich um RTE- Räucherlachsproduktproben und Lachsproben handelt, die während der Verarbeitung gezogen wurden.

Des weiteren sollen auch diverse Räucherlachs-Handelsproben aus österreichischen Supermärkten untersucht werden.

Die Proben sind vakuumverpackt und in „Goldtrays“ mit transparenter Folie, bei einer durchschnittlichen Packungsgröße von 100-500g.

Die Lagerung der Lachsproben erfolgt bei -20°C im Tiefkühlschrank.

3.1.2 *Listeria* - Referenzstämme

Die *Listeria*-Referenzstämme (Tab. 12) werden als Kontrolle für die Hämolysereaktion eingesetzt und dienen als Positivkontrollen in der Real-time PCR.

Tab. 12: *Listeria* - Referenzstämme

Nummer	Gattung	Spezies	Herkunft	Händler
ATCC 7644	<i>Listeria</i>	<i>monocytogenes</i>	Mensch	Mecconti
ATCC 15313	<i>Listeria</i>	<i>monocytogenes</i>	Hase, England	Mecconti
ATCC 19111	<i>Listeria</i>	<i>monocytogenes</i>	Geflügel, England	Mecconti
ATCC 19115	<i>Listeria</i>	<i>monocytogenes</i>	Mensch	Mecconti
ATCC 13932	<i>Listeria</i>	<i>monocytogenes</i>	Spinalflüssigkeit (Kind mit Meningitis) Deutschland	Doenitz Prolab
ATCC BAA-751	<i>Listeria</i>	<i>monocytogenes</i>		Doenitz Prolab
ATCC 19112	<i>Listeria</i>	<i>monocytogenes</i>	Spinalflüssigkeit, Mensch, Schottland	Doenitz Prolab
ATCC 19114	<i>Listeria</i>	<i>monocytogenes</i>	Gewebe Tier 1931 (Ruminant brain)	Doenitz Prolab
ATCC 19118	<i>Listeria</i>	<i>monocytogenes</i>	Huhn, England	Doenitz Prolab
NCTC 11994	<i>Listeria</i>	<i>monocytogenes</i>	Weichkäse	BCCM
SLR 2249 Cornell University	<i>Listeria</i>	<i>monocytogenes</i>		Doenitz Prolab
NCTC 10890	<i>Listeria</i>	<i>monocytogenes</i>		Doenitz Prolab
NCTC 13726	<i>Listeria</i>	<i>monocytogenes</i>		Doenitz Prolab
ATCC 33090	<i>Listeria</i>	<i>innocua</i>	Rinderhirn, Deutschland	BCCM
ATCC 19119	<i>Listeria</i>	<i>ivanovii</i>	Schaf, Bulgarien	BCCM
DSM 12491	<i>Listeria</i>	<i>ivanovii</i> <i>subsp. londoniensis</i>	Lebensmittel	DSMZ
DSM 20750	<i>Listeria</i>	<i>ivanovii</i> <i>subsp. ivanovii</i>	Schaf	DSMZ
DSM 20601	<i>Listeria</i>	<i>grayi</i>	Chinchilla Faeces	DSMZ
ATCC 25401	<i>Listeria</i>	<i>grayi</i>		Doenitz Prolab
ATCC 700545	<i>Listeria</i>	<i>grayi</i>		Doenitz Prolab
DSM 20650	<i>Listeria</i>	<i>welshimeri</i>	Verrottende Pflanzen	DSMZ
DSM 20751	<i>Listeria</i>	<i>seeligeri</i>	Erdboden	DSMZ

3.2 Nährmedien

- Fraser-*Listeria*-Selektiv-Anreicherungsbouillon-Basis (Merck KgaA, Darmst., Germ.)
- Fraser *Listeria* Supplement (Merck KgaA, Darmstadt, Germany)
- Nalidixinsäure-Natriumsalz (Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Germany)
- Natriumhydroxid Plätzchen (Merck KgaA, Darmstadt, Germany)
- Acriflavin (Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Germany)
- Ammonium Eisen(III)-citrat (Sigma-Aldrich KgaA, Darmstadt, Germany)
- *Listeria* Xpress Bouillon (LXB) Fläschchen à 225 ml, Röhrchen à 6 ml (Biomérieux S.A., Marcy L'Etoile, France)
- LX-T Röhrchen à 6 ml (Biomérieux S.A., Marcy L'Etoile, France)
- Chromogenic *Listeria* Agar Base (Oxoid Ltd., Hampshire, UK)
- Chromogenic *Listeria* Selektiv Supplement (Oxoid Ltd., Hampshire, UK)
- Chromogenic *Listeria* Differential Supplement (Oxoid Ltd., Hampshire, UK)
- PALCAM Agar Basis (Oxoid Ltd., Hampshire, UK)
- PALCAM – Selektivsupplement (Oxoid Ltd., Hampshire, UK)
- Columbia Agar mit 5% Hammelblut (Biomérieux S.A., Marcy L'Etoile, France)
- Caseinpepton Sojamehlpepton Agar (CASO) (Merck KgaA, Darmstadt, Germany)
- Nährbouillon (Merck KgaA, Darmstadt, Germany)
- Brain Heart Infusion (Oxoid Ltd., Hampshire, UK)

3.2.1 Selektive Anreicherungs-nährmedien

In Tab. 13 werden die verwendeten Anreicherungsmedien für die einzelnen Nachweismethoden dargestellt.

Tab. 13: Selektive Anreicherungs-nährmedien

Anreicherungsmedium	Verwendung
Halbfraser-Bouillon	Horizontalmethode Real-time PCR
Fraser-Bouillon	Horizontalmethode
<i>Listeria</i> Xpress Bouillon (LXB) Fläschchen à 225 ml LX-T Röhrchen à 6 ml	VIDAS® LDUO assay

Zubereitung der Fraser-*Listeria*-Selektiv-Anreicherungs-Basis:

55 g Fraser-*Listeria*-Selektiv-Anreicherungsbouillon-Basis werden in 1 L Aqua dest. durch Erhitzen aufgelöst und bei 121°C 15min autoklaviert.

Die Zusätze für die Halb-Fraser- und Fraser-Bouillon werden in Form von fertigen Supplementen zugesetzt (Fraser *Listeria* Supplement) und später aus Kostengründen selbst hergestellt (Tab. 14).

Sie werden der auf 50°C abgekühlten, autoklavierten Bouillon zugesetzt.

Tab. 14: Selbst hergestellte Zusätze und ihr Anteil in 1 L Halbfraser bzw. Fraser-Bouillon in Anlehnung an ISO 11290-1 Anhang B

Zusatz	Zubereitung	1 L Halb-Fraser	1 L Fraser
Nalidixinsäure-Natriumsalz-Lösung	Nalidixinsäure-Natriumsalz 0,1 g NaOH (0,5M) 10,0 ml	1 ml	2 ml
Acriflavin-Hydrochlorid-Lösung	Acriflavin-Hydrochlorid 0,25 g UHQ-Wasser 100,0 ml	5 ml	10 ml
Ammonium Eisen (III)-citrat-Lösung	Ammonium Eisen(III)-citrat 5,0 g UHQ-Wasser 100,0 ml	10 ml	10 ml

Die Lösungen werden bei 4°C gelagert.

3.2.2 Feste Nährmedien

In Tab. 15 werden die festen Nährmedien und ihr Verwendungszweck dargestellt.

Tab. 15: Feste Nährmedien

Nährmedium	Verwendung
Oxoid Chromogenic <i>Listeria</i> Agar (OCLA)	Bestätigung positiver Proben von VIDAS® und ISO 11290-1
PALCAM Agar	Bestätigung positiver Proben von VIDAS® und ISO 11290-1
Columbia Agar mit 5% Hammelblut (fertiger Nährboden)	Bestätigung der Hämolyse

Zubereitung von Oxoid Chromogenic Listeria Agar (OCLA):

34,5 g Chromogenic *Listeria* Agar Base werden in 480 ml Aqua dest. durch Erhitzen gelöst und bei 121°C 15 min autoklaviert.

Das Chromogenic *Listeria* Selektiv Supplement wird in 2 ml sterilem Aqua dest. gelöst und der auf 50°C abgekühlten Nährbodenbasis zugefügt. Anschließend wird das Chromogenic *Listeria* Differential Supplement zugefügt.

Zubereitung von PALCAM Agar:

34,5 g Palcam Agar Basis werden in 500 ml Aqua dest. durch Erhitzen gelöst und bei 121°C 15 min autoklaviert.

Das Palcam-Selektivsupplement wird in 2 ml sterilem Aqua dest. gelöst und der auf 50°C abgekühlten Nährbodenbasis zugefügt.

3.2.3 Nährmedien für die Stammsammlung

In Tab. 16 werden Nährmedien, die für die Herstellung der Stammsammlung benötigt werden, dargestellt.

Tab. 16: Nährmedien für die Stammsammlung

Nährmedium	Verwendung
Caseinpepton Sojamehlpepton Agar (CASO Agar)	Schrägagarröhrchen
Nährbouillon	Anreicherung für die Gefrierkulturen
Brain Heart Infusion	Anreicherung für die DNA-Extraktion

Zubereitung von Caso Agar:

40 g Caso Agar werden in 1 L Aqua dest. suspendiert und zum Kochen gebracht. Danach wird bei 121°C 15min autoklaviert.

Schrägagarröhrchen:

Anschließend wurden je 5 ml Agar mit Hilfe einer sterilen Pipette in sterile 10 ml Plastikröhrchen mit Schraubverschluss gefüllt und bis zur Erstarrung horizontal (schräg) gelagert. Danach kamen die Röhrchen für 2-3 Stunden in den

Trockenschrank bei 37°C um Bildung von Kondenswasser zu vermeiden.. Die Lagerung der fest verschlossenen Schrägagarröhrchen erfolgte bei 4°C im Kühlraum.

Zubereitung der Nährbouillon:

25 g Nährbouillon werden in 1 L Aqua dest. suspendiert und zum Kochen gebracht. Danach wird bei 121°C 15min autoklaviert.

Zubereitung der Brain Heart Infusion:

37 g Brain Heart Infusion werden in 1 L Aqua dest. suspendiert und zum kochen gebrafcht. Danach wird bei 121°C 15min autoklaviert.

3.3 Reagenzien zur Charakterisierung der Stämme

In Tab. 17 werden Reagenzien, die für Katalase/Oxidasetest und Gramfärbung benötigt werden, aufgelistet.

Tab. 17: Reagenzien zur Charakterisierung der Stämme

Reagenz	Hersteller	Verwendung
Wasserstoffperoxid 30% purum Verdünnung mit Aqua dest. auf 3%	Laba Feinchemie AG, Fischamend, Austria	Katalasetest
Bactident Oxidase Teststreifen	Merck KgaA, Darmstadt, Germany	Oxidasetest
Kristallviolettlösung Lugols Lösung stabilisiert Safraninlösung Ethanol 96,1%; unvergällt	Merck KgaA, Darmstadt, Germany	Gramfärbung

3.4 VIDAS® *Listeria* Duo (LDUO)

(Biomérieux, Marcy L'Etoile, France)

In Tab. 18 werden die einzelnen Bestandteile des VIDAS® *Listeria* DUO assays dargestellt. Tab. 19 zeigt die Inhaltsstoffe des Reagenzienriegels. Die Lagerung des VIDAS® -assays erfolgt bei 4°C.

Tab. 18: Zusammensetzung des VIDAS® *Listeria* DUO assays

Bestandteil	ID	Anmerkung
LDUO Reagenzienriegel	STR	Gebrauchsfertig
LDUO Festphasen-rezeptoren	SPR	Gebrauchsfertig. Die Festphasenrezeptoren sind mit spezifischen Antikörpern beschichtet, die gegen <i>L. monocytogenes</i> Antigen und <i>Listeria</i> Geißelantigen gerichtet sind.
LDUO Standard (<i>Listeria monocytogenes</i>)	S1	Gebrauchsfertig. Gereinigtes <i>L. monocytogenes</i> Antigen + Konservierungsmittel + Proteinstabilisator.
LDUO Standard (<i>Listeria</i>)	S2	Gebrauchsfertig. Gereinigtes <i>Listeria</i> Antigen + Konservierungsmittel + Proteinstabilisator.
LDUO Positivkontrolle (<i>Listeria monocytogenes</i>)	C1	Gebrauchsfertig. Gereinigtes <i>L. monocytogenes</i> Antigen + Konservierungsmittel + Proteinstabilisator.
Negativkontrolle	C2	Gebrauchsfertig. TRIS NaCl Puffer (150 mmol/l) – Tween pH 7,6 + Konservierungsmittel.
LDUO Positivkontrolle (<i>Listeria</i>)	C3	Gebrauchsfertig. Gereinigtes <i>Listeria</i> Antigen + Konservierungsmittel + Proteinstabilisator.
MLE Karte (Master lot Entry)		Karte mit den für die Testkalibration erforderlichen Master Lot Daten.

Tab. 19: VIDAS® *Listeria* DUO Reagenzriegel

Küvetten	Reagenzien
1	Probenküvette: 500 µl Anreicherungsbouillon
2	Konjugat (400 µl): mit Alkalischer Phosphatase markierte Anti- <i>Listeria monocytogenes</i> IgG Antikörper + Proteinstabilisator + Konservierungsmittel.
3	Vorwaschpuffer (600µl): NaCl Puffer – Tween + Konservierungsmittel + Proteinstabilisator
4	Konjugat (400 µl): mit Alkalischer Phosphatase markierte Anti- <i>Listeria</i> IgG Antikörper + Proteinstabilisator + Konservierungsmittel.
5 – 6 – 7 – 8 – 9	Waschpuffer (600 µl): NaCl Puffer – Tween + Konservierungsmittel.
10	Messküvette mit Substrat (300 µl): 4 Methyl-umbelliferyl-Phosphat (0,6 mmol/l) + Diethanolamin (DEA) (0,62 mol/l bzw. 6,6%, pH 9,2) + Konservierungsmittel.

3.5 Materialien für die Real-time PCR

3.5.1 iQ-Check™ *Listeria monocytogenes* Kit

(Bio-Rad, Munich, Germany)

Der Kit enthält gebrauchsfertige PCR Reagenzien wie DNA Primer, eine *Listeria monocytogenes* spezifische DNA-Sonde, DNA-Polymerase und Nukleotide (Tab. 20). Die Lagerung des Kits erfolgt bei 4° C.

Tab. 20: Zusammensetzung des iQ-Check™ *L. monocytogenes* Kits

Referenz ID	Reagenz
A	Lysisreagenz (DNA Extraktion)
B	Fluoreszierende Sonde
C	Amplifikationsmix
D	PCR Negativkontrolle
E	PCR Positivkontrolle

3.5.2 Gentra Puregene Yeast/Bact. Kit (Qiagen, Hilden, Germany)

Da das Lysisreagenz des iQ-Check™ *Listeria monocytogenes* Kits nicht ausreichte um die DNA aus allen Proben zu extrahieren, wurde zusätzlich der Gentra Puregene Yeast/Bact. Kit von QIAGEN verwendet.

Zusammensetzung des Gentra Puregene Kits:

- Cell Suspension Solution
- Lytic Enzyme Solution
- Cell Lysis Solution
- RNase A Solution
- Protein Precipitation Solution
- DNA Hydration Solution

Die Lagerung der Cell Suspension Solution, Cell Lysis Solution, Protein Precipitation Solution und DNA Hydration Solution erfolgt bei Raumtemperatur. Lytic Enzyme Solution und Rnase A Solution werden bei 4°C gelagert.

Zusätzlich benötigte Lösungen:

- 2-Propanol (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Germany)
- Ethanol absolut zur Analyse (Merck KgaA, Darmstadt, Germany)

Der Ethanol wird auf 70% mit sterilem UHQ-Wasser verdünnt.

3.6 API[®] *Listeria* (Biomérieux, Marcy L'Etoile, France)

Die Bestandteile des API[®] *Listeria*-Kits sind in Tab. 21 dargestellt.

Inkubationswannen und Ergebnisblätter sind in der Testpackung enthalten.

Tab. 21: Zusammensetzung des API[®] *Listeria* - Kits

Bestandteil	Anmerkung
API Teststreifen	Tests: DIM, ESC, αMAN, DARL, XYL, RHA, MDG, RIB, G1P, TAG
API Suspension Medium	Demineralisiertes Wasser
Zym B Reagenz	Fast Blue BB (aktive Substanz) 0,12 g Methanol 40 ml Dimethylsulfoxid (DMSO) 60 ml

3.7 Technische Geräte

- Brutschrank BD 53 (Binder GmbH, Tuttlingen, Germany)
- Cell disruptor Vortex Genie[™] (Scientific Industries INC., New York, USA)
- Centrifuge Eppendorf 5810 (Eppendorf AG, Hamburg, Germany)
- Heizblock
- HQ 5 Anlage (Rewa, Gladbeck, Germany)
- Kamera für Mikroskop Olympus Model DP 12-2
(Olympus Europa Holding GmbH, Hamburg, Germany)
- Klimaraum 30°C (York International GmbH, Austria)
- Kühlblock für PCR Mix
- Kühlraum 4°C (York International GmbH, Austria)
- Laminar flow (Jouan Inc., Winchester, USA)
- Laminar flow klein
- Magnetrührer IKA[®] Color Squid (IKA Werke GmbH & CO KG, Staufen, Germany)
- Magnetrührer mit Heizplatte IKA RCT basic
(IKA Werke GmbH & CO KG, Staufen, Germany)
- mini-VIDAS[®] (Biomérieux S.A., Marcy l'Étoile, France)

- Mikroskop Olympus BX41 (Olympus Europa Holding GmbH, Hamburg, Germany)
- Objektträger (Menzel GmbH, Braunschweig, Germany)
- Pipetierhilfe Cellmate™ (Matrix Technologies Inc., Maumee, USA)
- Pipetten Eppendorf Research® (Eppendorf AG, Hamburg, Germany)
- Reagenzglasschüttler IKA® MS2 Minishaker
(IKA Werke GmbH & CO KG, Staufen, Germany)
- Real-time Thermal Cycler Rotor-Gene™ 3000 (Corbett Research)
- Rotor-Gene Analysis Software V4.7 (Corbett Research)
- Stomacher® 400 (Seward, London, UK)
- Tiefkühlschrank -20°C
- Trockenheizblock VIDAS® Heat & Go (Biomérieux S.A., Marcy l'Etoile, France)
- Tischautoklav CertoClav® (CertoClav Sterilizer GmbH, Traun, Austria)
- Waage Sartorius GP 4102 (Sartorius AG, Göttingen, Germany)
- Wasserbad Medingen W 22 (Medingen GmbH, Dresden, Germany)
- Wasserbad Typ WB 20 (P-D Industriegesellschaft mbH, Dresden, Germany)

3.8 Verbrauchsmaterialien

- Safe-Lock Tubes 1,5 ml (Eppendorf AG, Hamburg, Germany)
- Micro- centrifugetubes 2 ml (VWR®)
- Eppis 0,2 ml
- Eppis 0,5 ml
- Pipettenspitzen epT.I.P.S. Standard 2-200 µl; 50-1000 µl (Eppendorf, H., German.)
- Safe Seal – Tips® professional 10 µl, 100 µl, 1000 µl
(Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, Germany)
- Sterilpipetten FALCON 5 ml, 10 ml (Becton Dickinson Ltd., Oxford, UK)
- Einweg Impfösen steril (Greiner Bio-One, Frickenhausen, Germany)
- Petrischalen aus Polystyrol (Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Germany)
- Greiner Röhrchen 15 ml (Greiner Bio-One, Frickenhausen, Germany)
- Stomacherbeutel mit Filter
- Sterile Filter 0,22 µm (GE Water and Process Technologies, Trevose, USA)
- Einwegspritzen 5 ml, 10 ml Terumo® Syringe (Terumo Europe, Leuven, Belgium)
- Handdesinfektionsmittel Skinman Soft N (Ecolab GmbH, Wien, Austria)

4. Methoden

4.1 Überblick über verwendete Nachweismethoden

Es sollen 85 bereits auf OCLA-Platten isolierte *L. monocytogenes* Stämme (aus Lachs- und Umweltproben), welche im Vorfeld schon mit dem VIDAS® LMO Assay nachgewiesen wurden, in Anlehnung an die ISO 11290-1 charakterisiert und mit API® *Listeria* und Real-time PCR bestätigt werden (Abb. 6).

63 Lachsproben werden nach EN ISO 11290-1 (Referenzmethode), mit dem VIDAS®-LDUO Assay und der Real-time PCR auf *Listeria monocytogenes* bzw. *Listeria* spp. untersucht und die Leistungsfähigkeit der Methoden verglichen (Abb. 6).

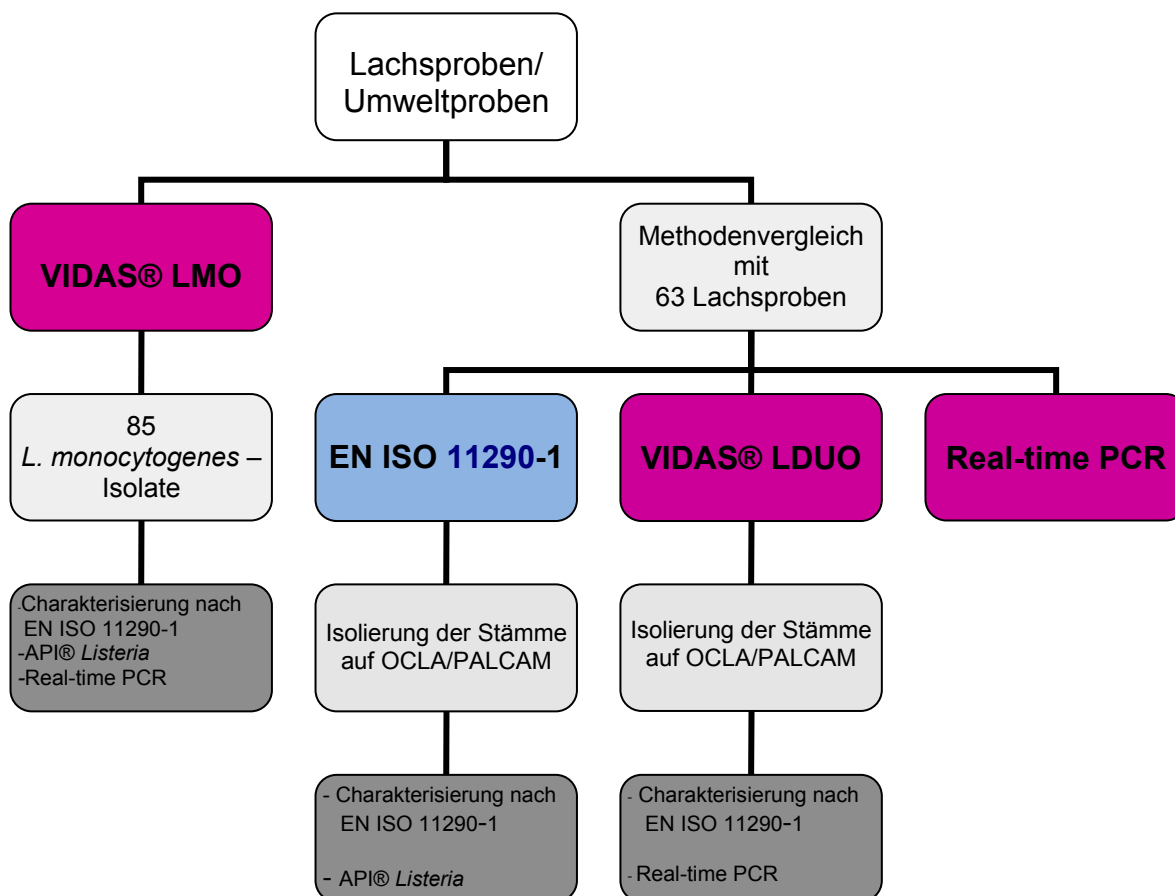


Abb. 6: Schematische Darstellung der Nachweismethoden

4.2 Bestätigung der *L. monocytogenes* - Isolate

Im VIDAS® LMO wurden bereits 85 Stämme als *L. monocytogenes* detektiert und auf OCLA-Platten isoliert. Zur Wiederbelebung der Kulturen werden die Stämme erneut auf frischen OCLA- und PALCAM-Nährböden ausgestrichen. Nach einer Inkubationszeit von 48h bei 37°C wird die Morphologie der Kolonien auf beiden Medien beurteilt und auf das Vorhandensein von charakteristischen Merkmalen, wie zum Beispiel Hofbildung (PC-PLC Aktivität) auf OCLA untersucht.

Beim **Katalasetest** wird eine typische Kolonie auf einen Objektträger übertragen und in einem Tropfen 3%iger H₂O₂-Lösung suspendiert. *Listeria* spp. reagieren mit Bildung von Gasblasen und sind katalase-positiv.

Für die **Gramfärbung** wird ebenfalls eine typische Kolonie herangezogen und auf einem Objektträger in sterilem Aqua dest. suspendiert. Der Objektträger wird 3mal zur Hitzefixierung kurz durch die Bunsenbrennerflamme gezogen. Das Präparat wird für 30sec in Kristallviolettlösung getaucht, 5sec mit Wasser gespült, 30sec in Lugol'sche Lösung getaucht, 5sec mit Wasser gespült, 10sec in Ethanol entfärbt trocken lassen. Danach wird für 10sec mit Safraninlösung gegengefärbt und mit Wasser abgespült. Die Färbung wird bei 100facher Vergrößerung (Ölimmersion) im Mikroskop betrachtet. *Listeria* spp. sind gram-positive, kurze Stäbchen.

Zusätzlich wird der **Oxidasetest** durchgeführt, indem eine Kolonie mit der Impflohe auf der Reaktionszone des Oxidase-Teststreifens verteilt wird. *Listeria* spp. sind oxidase-negativ und zeigen keine Blaufärbung.

Zur Bestimmung der **Hämolyse-Reaktion** wird die verdächtige Kolonie mit Hilfe einer Impfnadel in die Fläche des Blutagars gestochen. Die Agarfläche wurde davor gut getrocknet. Gleichzeitig werden positive und negative *Listeria*-Referenzstämme (Kapitel 3.1.2) getestet um die Hämolysebildung zu vergleichen. Die Platten werden bei 35°C 24h inkubiert und im hellen Licht untersucht. *L. monocytogenes* zeigt enge, klare, helle Zonen von β -Hämolyse, *L. ivanovii* zeigt im Allgemeinen breite, klar gezeichnete Zonen von β -Hämolyse. *L. innocua* zeigt keine klar gezeichneten Zonen um den Einstich.

Zur genauen Identifizierung werden die Stämme mit dem **API® *Listeria*** Test untersucht. Dafür werden die Stämme auf Blutagar ausgestrichen und bei 35°C für 24 h inkubiert. Mit einer sterilen Impföse wird die Kultur entnommen und im API® Suspension Medium suspendiert.

Die Feuchthaltekammern der Inkubationswannen werden mit Aqua dest. gefüllt und darauf der Teststreifen positioniert. Die Bakteriensuspension wird nach Angaben des Herstellers in die Mikroröhrchen des Streifens pipettiert.

Die Inkubationswanne wird abgedeckt und bei 37°C für 24 h inkubiert.

Nach der Inkubation werden die Ergebnisse nach Angaben des Herstellers abgelesen und ins Ergebnisblatt eingetragen.

Eine weitere Bestätigung der *L. monocytogenes* Stämme erfolgt mit Hilfe einer **Real-time PCR** Methode (siehe Kapitel 4.7 und 4.8).

4.3 Probenaufbereitung und Codierung

Die Lachsproben werden im Mixer zerkleinert, um eine gleichmäßige und homogene Masse zu erhalten. Aus einer Probe werden pro Nachweismethode (Real-time PCR, VIDAS® und ISO 11290-1) zwei mal 25 g - Einheiten eingewogen. Aus organisatorischen Gründen werden die Proben im Tiefkühlschrank bei -20°C aufbewahrt.

Jede Nachweismethode wird in 2 Ansätzen ausgeführt (Doppelbestimmung!).

Die Beschriftung der 63 Lachsproben erfolgt nach einem bestimmten Schema, wobei die Buchstaben A-Z sowie AA-TT jeweils für die Charge einer Probe stehen, danach folgt eine Zahl welche für die Probennummer innerhalb einer Charge steht und am Ende steht eine Zahl, welche den ersten und zweiten Ansatz innerhalb einer Untersuchungsmethode kennzeichnet.

Tab. 22: Beschriftungsschema am Beispiel der Proben aus der Charge E

Charge E	VIDAS® LDUO		Real-time PCR		ISO 11290-1	
	1. Ansatz	2. Ansatz	1. Ansatz	2. Ansatz	1. Ansatz	2. Ansatz
Probe 1	E1.1	E1.2	E1.3	E1.4	E1.5	E1.6
Probe 2	E2.1	E2.2	E2.3	E2.4	E2.5	E2.6
Probe 3	E3.1	E3.2	E3.3	E3.4	E3.5	E3.6

4.4 Durchführung der EN ISO 11290-1

Die Lachsproben werden über Nacht bei 4°C aufgetaut.

25 g Lachsprobe und 225 ml Halb-Fraser Bouillon werden in einem Stomacherbeutel mit Filter eingewogen. Danach wird die Probe im Stomacher für 1 min homogenisiert und der Beutel mit Klammer verschlossen.

Nach einer Inkubation von 24 h bei 30°C werden je 10 ml der Anreicherungen in sterile Röhrchen mit Schraubverschluss gefüllt. Aus diesem Aliquot wird ein fraktionierter Ausstrich auf OCLA- und PALCAM- Platten angelegt und diese für 48 h bei 37°C bebrütet.

100 µl der ersten Anreicherung werden in 10 ml Fraser Bouillon überführt und für 48 h bei 37°C inkubiert. Diese 2. Anreicherung wird ebenfalls auf OCLA- und PALCAM-Platten fraktioniert ausgestrichen.

Aus ökonomischen Gründen werden die Platten geviertelt.

Die Anreicherungen werden in 10 ml Röhrchen bei -20°C aufbewahrt.

Bestätigung der Stämme:

Typische Kolonien werden erneut auf OCLA-Platten ausgestrichen (diesmal wird für jeden Stamm eine ganze Platte verwendet) und für 48h bei 37°C ± 1°C inkubiert.

Die Stämme werden wie in Kapitel 4.2 nach ihrer Morphologie charakterisiert und auf Hofbildung untersucht. Ebenso werden Oxidase-, Katalase-, Gramfärbung durchgeführt.

In der ISO 11290-1 ist der CAMP-Test zur Bestimmung der Hämolyseaktivität vorgeschrieben. Anstatt des CAMP-Tests erfolgt der **Hämolysetest** auf

Columbia-Schafblutagarplatten und mit darauf gelegten β -Lysin Discs (Remel, Lenexa, USA). Der reaktive Inhaltsstoff dieser Discs besteht aus *Staphylococcus aureus* gewonnenem β -Lysin. Dabei wird der β -Lysin Disc in die Mitte der Agarplatte positioniert und die frischen Keimsuspensionen sternförmig rund um den Disc mit bis zu 3mm Entfernung aufgetragen. *L. monocytogenes* sollte nach Bebrütung bei 35°C nach 24h eine sichelförmige Hämolysezone zeigen.

Identifizierung der Stämme:

Zur Identifizierung der Stämme wird der **API® *Listeria*** Test durchgeführt (wie in Kapitel 4.2).

4.5 VIDAS® LDUO

4.5.1 Testprinzip

Der VIDAS® (Vitek Immuno Diagnostic Assay System) LDUO assay ist ein enzymgebundener Fluoreszenzimmunoassay (ELFA) und wird mit dem automatisierten mini-VIDAS® - System (Abb. 7) durchgeführt. Er ermöglicht den gleichzeitigen qualitativen und differenzierten Nachweis von *L. monocytogenes* und *Listeria* spp. in Lebensmitteln und Umweltproben.

Der Reagenzienriegel beinhaltet Küvetten mit Testreagenzien und eine Probenküvette für die LX-Anreicherungsbouillon. Der Festphasenrezeptor (SPR®) fungiert als Festphase und Pipettiersystem, wobei die Innenseite des SPR mit *Anti-Listeria monocytogenes* Antikörpern sowie *Anti-Listeria* Antikörpern beschichtet ist.

Die Anreicherungsbouillon sowie die weiteren Testreagenzien werden vom SPR mehrfach aspiriert und wieder abgegeben. Zuerst binden die in der Probe vorhandenen Antigene an die Antikörper, die an der Innenseite des SPR haften. Nach einem Waschschriff binden die mit alkalischer Phosphatase markierten Antikörper (Testreagenzien) an die Antigene, welche an die Antikörper des SPR

gebunden sind (Abb. 8). Durch weitere Waschschr tte wird das ungebundene Konjugat entfernt und im letzten Nachweisschritt katalysiert das Enzymkonjugat die Hydrolyse des Substrats 4-Methyl-umbelliferyl-Phosphat in ein fluoreszierendes Produkt (4-Methyl-umbelliferon), dessen Fluoreszenz bei 450nm gemessen wird.



Abb. 7: mini-VIDAS®
(Biomérieux, <http://www.biomerieux.de>)

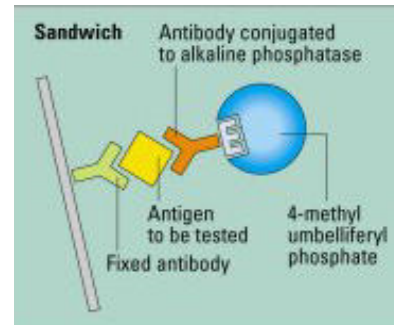


Abb. 8: Funktionsprinzip VIDAS®
(Biomérieux, <http://www.biomerieux.de>)

4.5.2 Durchführung des VIDAS® LDUO assays

(Von der AFNOR validiertes Protokoll N BIO-12/18-03/06)

Die Lachsproben (25 g – Einheiten) werden im Kühlhaus bei 4 C über Nacht aufgetaut und steril in Stomacherbeutel mit Filter überführt.

225 ml LX-Bouillon (fertig portionierte Fläschchen) werden zur 25g-Probe hinzugefügt, danach im Stomacher für 1min homogenisiert und der Beutel mit Klammer verschlossen.

Nach einer Inkubation von 24 h bei 30 C $\pm$ 1 C werden 100 Öl Homogenisat in 6 ml LX-Bouillon (fertig portionierte Röhrchen)  berf hrt und für weitere 24 h bei 30 C $\pm$ 1 C inkubiert.

Für jede Probe, Kontrolle oder Standard wird ein Reagenzienriegel und ein Festphasenrezeptor verwendet. Nach der Inkubation wird die zweite LX-Anreicherung im Vortex geschüttelt und 500 Öl in die Probenküvette des Reagenzienriegels übertragen. Die Standards, Positivkontrollen und Negativkontrollen werden ebenfalls in die Probenk vetten der Reagenzienriegel

pipettiert. Die Reagenzienriegel werden im VIDAS® Heat and Go für 5 ± 1 min erhitzt und danach bei Raumtemperatur für 10 min abgekühlt.

Vor dem Teststart müssen zuerst die chargenspezifischen Daten in das mini VIDAS® Gerät eingegeben und mit den mitgelieferten Standards S1 und S2 eine Kalibration durchgeführt werden. Die Standards müssen doppelt getestet werden und der Wert muss innerhalb des festgelegten RFV-Bereiches („Relative Fluorescence Value“) liegen.

Die Reagenzienriegel und Festphasenrezeptoren werden in das mini VIDAS® Gerät eingeführt, wobei zu beachten ist, dass die Farb- und Buchstabencodierung auf dem Festphasenrezeptor-Etikett mit der auf dem Reagenzienriegel übereinstimmt.

Die Messung beträgt ca. 127 min.

Ergebnisse und Interpretation:

Die Ergebnisse werden automatisch vom mini-VIDAS® Gerät ausgewertet. Für jeden Nachweis (*L. monocytogenes* und *Listeria* spp.) führt das Gerät zwei Fluoreszenzmessungen durch.

Die erste Messung ist eine Hintergrundmessung der Küvette und des Substrates, bevor der Festphasenrezeptor in das Substrat eintaucht.

Die zweite Messung erfolgt nach der Inkubation des Substrates mit dem im Festphasenrezeptor vorhandenen Enzym.

Aus der Differenz beider Messungen ergibt sich ein relativer Fluoreszenzwert (RFV). Sowohl für den Nachweis von *L. monocytogenes* als auch für *Listeria* spp. wird ein RFV ermittelt. Der Testwert wird aus der Differenz von dem jeweiligen RFV mit dem jeweiligen Standard S1 bzw S2 ermittelt.

Tab. 23 Grenzwerte und Interpretation der VIDAS® LDUO Ergebnisse

	Testwert	Interpretation
<i>L. monocytogenes</i> Nachweis	< 0,05	negativ
	≥ 0,05	POSITIV
<i>Listeria</i> spp. Nachweis	< 0,10	negativ
	≥ 0,05	POSITIV

Bestätigung der positiven VIDAS® Proben:

Zur Bestätigung der positiven Proben werden die positiven LX-Anreicherungen auf OCLA- und PALCAM- Platten fraktioniert ausgestrichen und bei $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ bis zu 48h inkubiert. Die Stämme werden wie in Kapitel 4.2 nach ihrer Morphologie charakterisiert und auf Hofbildung untersucht. Ebenso werden Oxidase-, Katalase-, Gramfärbung und Hämolysereaktion durchgeführt.

Des weiteren werden die auf OCLA isolierten Stämme mit der **Real-time PCR** bestätigt (siehe Kapitel 4.7 und 4.8).

4.6 Aufbewahrung der Kulturen

Alle aus Lachs/Umweltproben isolierten Listerienstämme (VIDAS®-LMO positiv), VIDAS®-LDUO positiven Listerienstämme sowie die *Listeria*-Referenzstämme werden auf Schrägagar ausgestrichen und bei 4 °C im Kühlraum gelagert. Gefrierkulturen werden ebenfalls hergestellt und diese bei -20 °C gelagert.

Aus dem ISO 11290-1 Referenzverfahren gewonnene Listerienstämme werden vorerst auf OCLA- bzw. PALCAM- Platten bei 4 °C im Kühlraum gelagert.

4.6.1 Schrägagarkulturen

Die *Listeria*-Referenzstämme werden in lyophilisierter Form als Swab (Doenitz Prolab) geliefert, werden im Suspensionsmedium suspendiert und auf Blutagarplatten kreisförmig aufgetragen. Mit steriler Impföse wird die Suspension von vier Seiten aus in Richtung Plattenmitte ausgestrichen, um Einzelkolonien zu erhalten. Die Blutplatten werden bei $30\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ für 24 h inkubiert.

Von den Blutplatten (Referenzstämme) sowie OCLA-Platten (isolierte Listerienstämme, VIDAS-positive Stämme) werden pro Stamm zwei Einzelkolonien entnommen und mit einer sterilen Impföse in 500 µl Nährbouillon

bei $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ für 24 h angereichert. Von der Keimsuspension wird eine Impföse auf Schrägagar ausgestrichen und bei $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 24 h inkubiert.

Die Schrägagarstämme werden bei 4°C im Kühlraum gelagert.

4.6.2 Gefrierkulturen

Jeder Stamm wird 2-fach eingefroren.

Zuerst erfolgt eine Wiederbelebung der Stämme in jeweils 1,5 ml Nährbouillon in 2,0 ml Eppis bei 37°C 24h.

Danach wird bei 15 000 g (d 11 884 rpm) 5 min zentrifugiert um ein Pellet zu erhalten. Der Überstand wird entfernt und das Pellet mit 1 ml physiologischer NaCl-Lösung gewaschen. Durch Vortexen wird das Pellet wieder resuspendiert und danach wieder bei 15 000 g 5 min zentrifugiert. Der Überstand wird wieder entfernt, 50 μl NaCl-Lösung hinzugefügt und anschließend bei -20°C eingefroren.

4.7 DNA-Extraktionsverfahren

Die DNA-Extraktionsmethoden sind in Tab. 24 dargestellt.

Tab. 24: Überblick über die Anwendung der DNA-Extraktionsmethoden

Probenmaterial	DNA-Extraktionsmethode
VIDAS LMO – pos. <i>L. mono</i> Stämme VIDAS LDUO –pos. <i>Listeria spp.</i> Stämme	Gentra Puregene Yeast/Bact. Kit (Qiagen)
75 Lachsproben	iQ-Check™ <i>Listeria monocytogenes</i> Kit Lysisreagenz (BioRad)
<i>Listeria</i> - Referenzstämme	DNA wurde zum Vergleich mit dem Qiagen- und dem Bio-Rad-Kit extrahiert.

4.7.1 DNA-Extraktion – Gentra Puregene Yeast/Bact. Kit

Zu Beginn werden Übernachtskulturen der VIDAS® LMO und LDUO-positiven Stämme und der *Listeria*-Referenzstämmen angelegt. Hierfür wird je eine Kolonie der Stämme in 2 ml Brain Heart Infusion suspendiert und bei $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ für 18h inkubiert.

Um einer Kontamination vorzubeugen werden als Pipettenspitzen ausschließlich Safe-Seal Tips (Biozym) verwendet und in der Laminar Flow gearbeitet. Die DNA-Extraktion erfolgt nach Protokoll des Herstellers (Quiagen, Hilden, Germany). Die DNA-Extrakte werden bei -20°C eingefroren.

4.7.2 DNA-Extraktion - iQ-Check™ *Listeria monocytogenes* Kit

Von den *Listeria*-Referenzstämmen werden Übernachtskulturen angelegt, wobei je eine Kolonie der Stämme in 2 ml Brain Heart Infusion suspendiert und bei $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ für 18 h inkubiert wird.

Die Lachsproben werden über Nacht bei 4°C aufgetaut.

25 g Lachsprobe und 225 ml Halb-Fraser Bouillon (Fläschchen) werden in einem Stomacherbeutel mit Filter eingewogen. Danach wird die Probe im Stomacher für 1 min homogenisiert und der Beutel mit Klammer verschlossen.

Nach einer Inkubation von 25 h bei 30°C werden je 1,5 ml aus der Voranreicherungsbouillon entnommen und in sterile 1,5 ml Safe-Lock Tubes übertragen.

Um einer Kontamination vorzubeugen wird auch hier mit Safe-Seal Tips (Biozym) und in der Laminar Flow gearbeitet. Die DNA-Extraktion erfolgt nach Protokoll des Herstellers (Bio-Rad, Munich, Germany).

4.8 Real-time PCR

4.8.1 Testprinzip

Der in dieser Studie eingesetzte iQ-Check™ *Listeria monocytogenes* Kit (Bio-Rad Laboratories) ist ein qualitativer Real-time PCR Kit, der auf der Detektion der Ziel-DNA (*L. monocytogenes*) durch Molecular Beacons basiert.

Das Fluorophor, welches an die Sonde gekoppelt ist, heißt Texasred.

Um eine PCR-Inhibition zu erkennen, ist eine „interne Kontrolle“ (Reportermolekül FAM) im Reaktionsmix enthalten. Diese wird gleichzeitig mit der Zielsequenz amplifiziert, jedoch von einer anderen Sonde detektiert.

4.8.2 Herstellung des PCR Mix

Der PCR-Mix besteht aus „Amplification Mix“ (Reagenz C) und den fluoreszenzmarkierten Sonden (Reagenz B). Er wird mit Hilfe des vom Hersteller angegebenen PCR-Mix Calculation Guide hergestellt (Tab.25).

Um den PCR-Mix kühl zu halten, wird er in einen Kühlblock gestellt.

Die Anzahl der zu analysierenden Proben und Kontrollen wird zusammengerechnet und aus der Tabelle die entsprechenden Volumina an Reagenz B und C entnommen. Bei jedem Real-time PCR Lauf werden eine Positiv- und Negativkontrolle (Reagenzien D und E) mitgemessen.

In einem Lauf werden maximal 36 DNA-Proben untersucht.

Tab. 25: PCR-Mix Calculation Guide

Anzahl an Proben und Kontrollen	Sonden Reagenz B (µl)	Amplifikationsmix Reagenz C (µl)
1	5	40
2	11	86
3	16	130
4	22	173
5	27	216
6	32	259
7	38	302

8	43	346
9	49	389
10	54	432
11	59	475
12	65	518
13	70	562
14	76	605
15	81	648
16	86	691
17	92	734
18	97	778
19	103	821
20	108	864
21	113	907
22	119	950
23	124	994
24	130	1000
25	135	1100
26	140	1100
27	146	1200
28	151	1200
29	157	1300
30	162	1300
31	167	1300
32	173	1400
33	178	1400
34	184	1500
35	189	1500
36	194	1600

45 µl des PCR Mix werden in sterile 0,2 ml Reaktionsgefäße vorgelegt. Es wird hier ebenfalls mit Kühlblöcken gearbeitet, um unspezifische Reaktionen zu vermeiden. Dazu werden 5 µl DNA-Probe bzw. Negativkontrolle oder Positivkontrolle gegeben. Anschließend werden die Gefäße im Rotor-Gene™ 3000 Thermocycler positioniert.

4.8.3 Real-time PCR Thermoprotokoll

Bevor der Lauf gestartet wird muss das Thermoprotokoll in den Computer eingegeben werden (Tab. 26).

Tab. 26: PCR Thermoprotokoll

Zyklus 1	Einmalig	50°C für 2 min
Zyklus 2	Einmalig	95°C für 10 min
Zyklus 3	50 Wiederholungen	95°C für 20 sec. (DNA-Denaturierung) 55°C für 20 sec. (Annealing der Sonden und Primer) – Detektion 72°C für 30 sec. (Verlängerung der DNA durch die Taq Polymerase)

Ergebnisse und Interpretation:

Die Ergebnisse werden nach Analyse der Ct-Werte jeder einzelnen Probe interpretiert.

Der Ct-Wert wird als jener PCR-Zyklus definiert ist, bei dem die Fluoreszenz, die durch das Amplikon erzeugt wird, die Hintergrundfluoreszenz signifikant übersteigt. Er ist proportional zur Anzahl an Zielkopien in der Probe [MACKAY, 2004].

Da in dieser Studie keine Quantifizierung der Proben erfolgt, werden die Ct-Werte (Threshold Cycles) manuell gesetzt, und zwar am Schnittpunkt an dem das Fluoreszenzsignal ansteigt (Abb. 9).

Bevor die Ergebnisse der Proben interpretiert werden, müssen Positiv- und Negativkontrolle überprüft werden (Tab. 27).

Tab. 27: Kriterien der Kontrollen für eine valide PCR-Reaktion

	Nachweis <i>L. monocytogenes</i> (Texas Red)	Nachweis Interne Kontrolle (FAM)
Negativkontrolle	Ct = kein Anstieg	30 < Ct < 40
Positivkontrolle	26 < Ct < 36	Nicht signifikant

Eine *L. monocytogenes*-positive Probe muss einen Ct-Wert > 10 für das Reportermolekül Texas Red aufweisen. Bei *L. monocytogenes*-negativen Proben ist kein Anstieg zu verzeichnen (Tab. 28).

Tab. 28: Interpretation der Probenergebnisse

Nachweis <i>L. monocytogenes</i> (Texas Red)	Nachweis Interne Kontrolle (FAM)	Interpretation
Ct ≥ 10	Nicht signifikant	POSITIV
Ct = kein Anstieg	Ct > 10	negativ
Ct = kein Anstieg	Ct = kein Anstieg	Inhibition

Eine typische Amplifikationskurve (*L. monocytogenes*-positive Probe) hat einen flachen Basisverlauf, gefolgt von einem steilen Anstieg der Fluoreszenz, danach flach im Plateau auslaufend (Abb. 9).

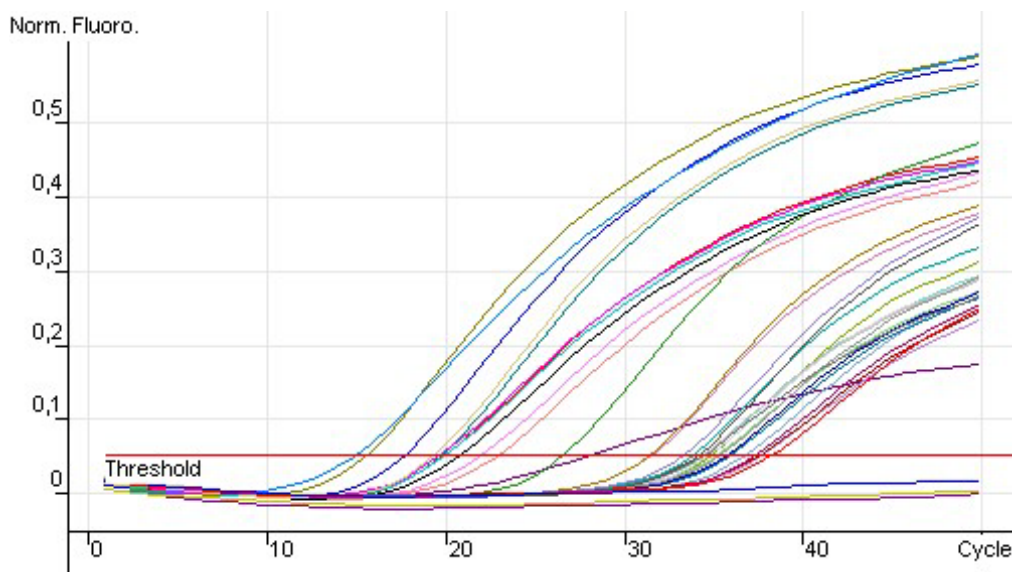


Abb. 9: Amplifikationskurven *L. monocytogenes* (Rotor-Gene Software V4.7, Corbett)

Bestätigung der positiven Proben:

Die Methode erfordert eine Bestätigung durch eine AFNOR validierte Methode.

4.9 Statistische Auswertung des Methodenvergleichs

Der Methodenvergleich wird anhand des Validierungsprotokolls der ISO 16140:2003 für qualitative Methoden statistisch ausgewertet.

Es werden die Leistungsparameter „Relative Richtigkeit“ (AC), „Relative Sensitivität“ (SE) und „Relative Spezifität“ (SP) der alternativen Methoden VIDAS® LDUO und iQ-Check™ *L. monocytogenes* Kit berechnet. Zur Beurteilung der Abweichungen zwischen den Methoden wird das Binomialgesetz oder der McNemar Test angewendet.

Die genauen Definitionen der einzelnen Leistungsparameter sowie deren Berechnungen werden im Kapitel 2.5.1 erläutert.

5. Ergebnisse

5.1 Auswertung der präsumtiven *L. monocytogenes* Isolate

Die 85 präsumtiven *L. monocytogenes* Isolate (VIDAS®-LMO positiv) werden auf OCLA- und PALCAM-Platten nach ihrer Morphologie und Hofbildung charakterisiert. Des Weiteren wird die Gramfärbung, Katalase/Oxidase-Aktivität und Hämolyseaktivität überprüft und eine Identifizierung mit dem API® *Listeria* durchgeführt. Die Stämme werden zusätzlich in der Real-time PCR bestätigt.

5.1.1 Charakterisierung und Identifizierung der Stämme

Auf OCLA zeigen präsumtive *Listeria*-Stämme nach 48h Inkubation bei 37°C typisch türkise, runde, glänzende Kolonien von 1 - 3mm Ø und typische *L. monocytogenes*-Kolonien sind von opaken Höfen umgeben. Auf PALCAM zeigen die Stämme typisch graugrüne, matte Kolonien von 0,5-1mm Ø mit eingesunkenem Zentrum. Um die Kolonien herum kann man die schwarzen Höfe (Äsculinhydrolyse) erkennen.

Alle 85 Isolate erweisen sich als Gram-positiv, Katalase-positiv und Oxidase-negativ. Davon können 56 Isolate als *L. monocytogenes* bestätigt werden (Tab. 29, rote Markierung). Alle 56 Isolate zeigen Hämolyse auf Blutagar, jedoch nur 41 zeigen Hofbildung auf OCLA (PC-PLC Aktivität).

Im API® werden 33 Isolate als *L. monocytogenes* identifiziert, des weiteren gibt es 20 zweifelhafte Profile mit Wahrscheinlichkeiten von 72,6% *L. welshimeri* und 20,9% *L. monocytogenes*. 1 Isolat (Nr 35) wird im API® trotz Hofbildung auf OCLA und Hämolyseaktivität als *L. innocua* identifiziert. Die ungenaue Identifizierung im API® ist vermutlich auf Mischkulturen zurückzuführen.

Die restlichen 29 Isolate (Tab. 29, graue Makierung) können nicht als *L. monocytogenes* bestätigt werden. Diese Isolate bilden keinen Hof auf OCLA aus und sind bis auf 2 Ausnahmen (Nr 75,91-) nicht hämolytisch. Im API® werden diese 29 Isolate als *L. innocua* bzw. *L. welshimeri* identifiziert.

Die Bestätigung der Isolate durch die Real-time PCR ergibt keine validen Ergebnisse, da die Negativprobe ein positives Fluoreszenzsignal erzeugt hat und daher mit Kreuzkontaminationen zu rechnen ist [MAURER, 2006].

Laut Hersteller des iQ-Check™ *L. monocytogenes* Kits gelten Ct-Werte ≥ 10 als positiv für *L. monocytogenes*.

Jene Isolate, die durch Hämolysebildung, PC-PLC Aktivität und/oder im API® als *L. monocytogenes* bestätigt werden können (Tab. 29, rote Makierung), erreichen in der Real-time PCR Ct-Werte zwischen 14 und 24. *Listeria monocytogenes* Referenzstämme (Tab. 12 Kap. 3.1.2) erreichen ebenfalls Ct-Werte zwischen 15 und 23. Das bedeutet, dass bereits ab dem 14./15. PCR-Zyklus ein Fluoreszenzanstieg zu verzeichnen ist und das Vorhandensein von *L. monocytogenes* bestätigt ist.

Jene *Listeria*-Isolate, die nicht als *L. monocytogenes* bestätigt werden können, sondern als *L. innocua* bzw. *L. welshimeri* (Tab. 29, graue Makierung), haben in der Real-time PCR Ct-Werte von 30 und höher. Das bedeutet, dass hier der Fluoreszenzanstieg viel später stattgefunden hat und demnach weniger *L. monocytogenes* DNA vorhanden ist, als bei den als *L. monocytogenes* bestätigten Isolaten. Der Ct-Wert korreliert mit der Ausgangs-DNA-Konzentration (je höher der Ct-Wert, desto geringer ist die Ausgangs-DNA). Die niedrige DNA-Konzentration von *L. monocytogenes* in den an sich als *L. innocua* bzw. *L. welshimeri* bestätigten Isolaten deutet auf eine Kontamination des Probenmaterials mit *L. monocytogenes*-DNA hin. Diese Isolate müssten daher erneut in der Real-time PCR oder mittels Sequenzierung untersucht werden. Eine Bestimmung der DNA-Konzentration der Probe durch Messung der Absorption im Spektrophotometer ist zu empfehlen..

Tab. 29: Bestätigung von im VIDAS® LMO positiven *L. monocytogenes* Isolaten

Isolat Nr	Ct-Wert	API® <i>Listeria</i> ¹	Hämolyse	PC-PLC ² OCLA
1	19,55	<i>L. monocytogenes</i> 98,6%	+	+
2	20,21	<i>L. monocytogenes</i> 98,6%	+	-
3	29,27	<i>L. innocua</i> 99,6%	-	-
4	36,74	<i>L. innocua</i> 99,6%	-	-
5	30,82	<i>L. welshimeri</i> 65,7%; <i>L. innocua</i> 34,1%	-	-
6	14,95	<i>L. welshimeri</i> 72,6%; <i>L. monocytogenes</i> 20,9%; <i>L. innocua</i> 6,2%	+	+
7	31,44	<i>L. welshimeri</i> 65,7%; <i>L. innocua</i> 34,1%	-	-
8	30,57	<i>L. innocua</i> 99,6%	-	-
9	35,34	<i>L. welshimeri</i> 65,7%; <i>L. innocua</i> 34,1%	-	-
10	32,53	<i>L. welshimeri</i> 65,7%; <i>L. innocua</i> 34,1%	-	-
11	37,10	<i>L. welshimeri</i> 65,7%; <i>L. innocua</i> 34,1%	-	-
12	21,35	<i>L. monocytogenes</i> 98,6%	+	-
13	35,32	<i>L. innocua</i> 99,6%	-	-
14	33,38	<i>L. innocua</i> 99,6%	-	-
15	32,61	<i>L. welshimeri</i> 65,7%; <i>L. innocua</i> 34,1%	-	-
16	20,41	<i>L. monocytogenes</i> 98,6%	+	-
17	20,60	<i>L. welshimeri</i> 72,6%; <i>L. monocytogenes</i> 20,9%; <i>L. innocua</i> 6,2%	+	-
18	19,74	<i>L. monocytogenes</i> 98,6%	+	-
19	21,49	<i>L. monocytogenes</i> 98,6%	+	-
20	20,62	<i>L. monocytogenes</i> 98,6%	+	+
21	35,11	<i>L. welshimeri</i> 65,7%; <i>L. innocua</i> 34,1%	-	-
22	22,58	<i>L. monocytogenes</i> 98,6%	+	-
23	21,50	<i>L. monocytogenes</i> 99,9%	+	-
24	16,89	<i>L. monocytogenes</i> 98,6%	+	+
25	18,57	<i>L. welshimeri</i> 72,6%; <i>L. monocytogenes</i> 20,9%; <i>L. innocua</i> 6,2%	+	+
26	15,38	<i>L. monocytogenes</i> 98,6%	+	+
27	17,06	<i>L. monocytogenes</i> 98,6%	+	+
28	29,27	<i>L. innocua</i> 99,6%	-	-
29	21,75	<i>L. monocytogenes</i> 99,9%	+	-
30	22,23	<i>L. monocytogenes</i> 98,6%	+	-
31	17,65	<i>L. monocytogenes</i> 98,6%	+	+
32	22,02	<i>L. welshimeri</i> 72,6%; <i>L. monocytogenes</i> 20,9%; <i>L. innocua</i> 6,2%	+	-
33	16,87	<i>L. welshimeri</i> 72,6%; <i>L. monocytogenes</i> 20,9%; <i>L. innocua</i> 6,2%	+	+
34	30,13	<i>L. welshimeri</i> 72,6%; <i>L. monocytogenes</i> 20,9%; <i>L. innocua</i> 6,2%	-	-
35	19,67	<i>L. innocua</i> 99,6%	+	+
36	21,55	<i>L. monocytogenes</i> 98,6%	+	+
38	17,93	<i>L. monocytogenes</i> 98,6%	+	+
39	31,76	<i>L. innocua</i> 99,6%	-	-
40	32,13	<i>L. innocua</i> 99,6%	-	-
41	18,48	<i>L. welshimeri</i> 72,6%; <i>L. monocytogenes</i> 20,9%; <i>L. innocua</i> 6,2%	+	+
42	33,98	<i>L. welshimeri</i> 65,7%; <i>L. innocua</i> 34,1%	-	-
43	33,67	<i>L. welshimeri</i> 65,7%; <i>L. innocua</i> 34,1%	-	-
44	34,03	<i>L. welshimeri</i> 65,7%; <i>L. innocua</i> 34,1%	-	-
44 kl.K	34,58	<i>L. welshimeri</i> 65,7%; <i>L. innocua</i> 34,1%	-	-
45	16,27	<i>L. monocytogenes</i> 99,9%	+	+
46	17,09	<i>L. welshimeri</i> 72,6%; <i>L. monocytogenes</i> 20,9%; <i>L. innocua</i> 6,2%	+	+

Fortsetzung Tab. 29:

Isolat Nr	Ct-Wert	API® <i>Listeria</i> ¹	Hämolyse	PC-PLC ² OCLA
47	16,02	<i>L. welshimeri</i> 72,6%; <i>L. monocytogenes</i> 20,9%; <i>L. innocua</i> 6,2%	+	+
48	31,05	<i>L. innocua</i> 99,6%	-	-
49	15,55	<i>L. monocytogenes</i> 99,9%	+	+
50	22,55	<i>L. welshimeri</i> 72,6%; <i>L. monocytogenes</i> 20,9%; <i>L. innocua</i> 6,2%	+	-
51	21,79	<i>L. welshimeri</i> 72,6%; <i>L. monocytogenes</i> 20,9%; <i>L. innocua</i> 6,2%	+	-
52+	31,54	<i>L. innocua</i> 99,6%	-	-
52-	30,42	<i>L. welshimeri</i> 65,7%; <i>L. innocua</i> 34,1%	-	-
69	21,60	<i>L. welshimeri</i> 72,6%; <i>L. monocytogenes</i> 20,9%; <i>L. innocua</i> 6,2%	+	+
70	19,43	<i>L. welshimeri</i> 72,6%; <i>L. monocytogenes</i> 20,9%; <i>L. innocua</i> 6,2%	+	+
72	22,25	<i>L. monocytogenes</i> 98,6%	+	+
72 h.K	21,62	<i>L. welshimeri</i> 72,6%; <i>L. monocytogenes</i> 20,9%; <i>L. innocua</i> 6,2%	+	+
74	21,24	Unzulässiges Profil	+	+
75	34,08	<i>L. welshimeri</i> 65,7%; <i>L. innocua</i> 34,1%	+	-
76	24,33	<i>L. welshimeri</i> 72,6%; <i>L. monocytogenes</i> 20,9%; <i>L. innocua</i> 6,2%	+	+
77	23,98	<i>L. welshimeri</i> 72,6%; <i>L. monocytogenes</i> 20,9%; <i>L. innocua</i> 6,2%	+	+
78_1	33,52	<i>L. welshimeri</i> 99,9%	-	-
78_2	32,69	<i>L. welshimeri</i> 99,9%	-	-
80	20,53	<i>L. welshimeri</i> 72,6%; <i>L. monocytogenes</i> 20,9%; <i>L. innocua</i> 6,2%	+	+
81	19,67	<i>L. monocytogenes</i> 99,9%	+	+
82	22,24	<i>L. monocytogenes</i> 98,6%	+	+
84	21,33	<i>L. welshimeri</i> 65,7%; <i>L. innocua</i> 34,1%	-	-
88	18,02	<i>L. welshimeri</i> 72,6%; <i>L. monocytogenes</i> 20,9%; <i>L. innocua</i> 6,2%	+	+
90	16,25	<i>L. monocytogenes</i> 98,6%	+	+
91+	16,58	Nicht durchgeführt	+	+
91-	38,19	<i>L. seeligeri</i> 94,2%; <i>L. ivanovii</i> 5,6%	+	-
93	15,49	<i>L. monocytogenes</i> 99,9%	+	+
93WMK	15,90	<i>L. monocytogenes</i> 98,6%	+	+
98	17,58	<i>L. welshimeri</i> 72,6%; <i>L. monocytogenes</i> 20,9%; <i>L. innocua</i> 6,2%	+	+
101	15,80	<i>L. monocytogenes</i> 99,9%	+	+
102	16,71	<i>L. monocytogenes</i> 99,9%	+	+
103	18,13	<i>L. welshimeri</i> 72,6%; <i>L. monocytogenes</i> 20,9%; <i>L. innocua</i> 6,2%	+	+
104	14,84	<i>L. monocytogenes</i> 98,6%	+	+
105	18,19	<i>L. monocytogenes</i> 99,9%	+	+
106	16,87	<i>L. monocytogenes</i> 99,9%	+	+
107	15,15	<i>L. welshimeri</i> 72,6%; <i>L. monocytogenes</i> 20,9%; <i>L. innocua</i> 6,2%	+	+
110	28,77	<i>L. welshimeri</i> 99,9%	-	-
111	17,85	<i>L. monocytogenes</i> 99,9%	+	+
112	17,96	<i>L. monocytogenes</i> 98,6%	+	+
115	16,54	<i>L. monocytogenes</i> 98,6%	+	+

¹ die Wahrscheinlichkeit der API® Ergebnisse wird in % angegeben; ² Hofbildung auf OCLA

5.1.2 Erscheinungsbild der *Listeria*-Stämme auf verschiedenen Medien und im Mikroskop

In Abb. 10 sind typische *L. monocytogenes* Kolonien mit opakem Hof (PC-PLC Aktivität) auf OCLA Nährmedium dargestellt.

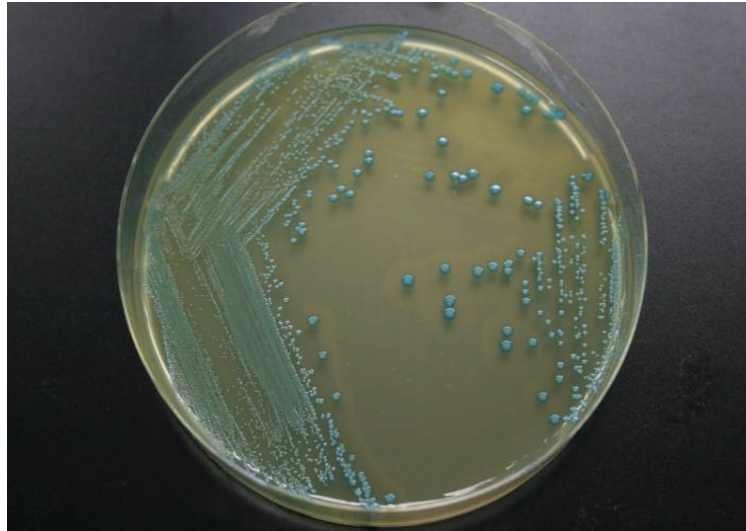


Abb. 10: Erscheinungsbild von *L. monocytogenes* mit opakem Hof auf OCLA

In Abb. 11 sind typische *L. monocytogenes* Kolonien mit schwarzem Hof (Äsculinhydrolyse) auf PALCAM Agar dargestellt.

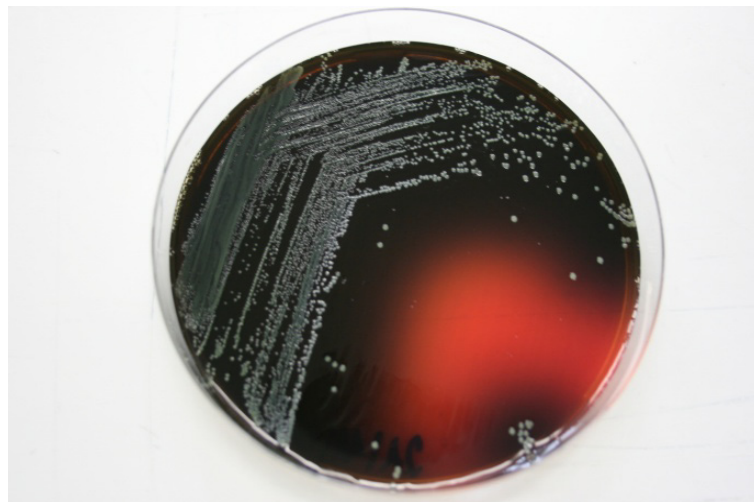


Abb. 11: Erscheinungsbild von *L. monocytogens* auf PALCAM-Agar

In Abb. 12 sind β -hämolytische und nicht hämolytische *Listeria*-Stämme auf Blutagar dargestellt.

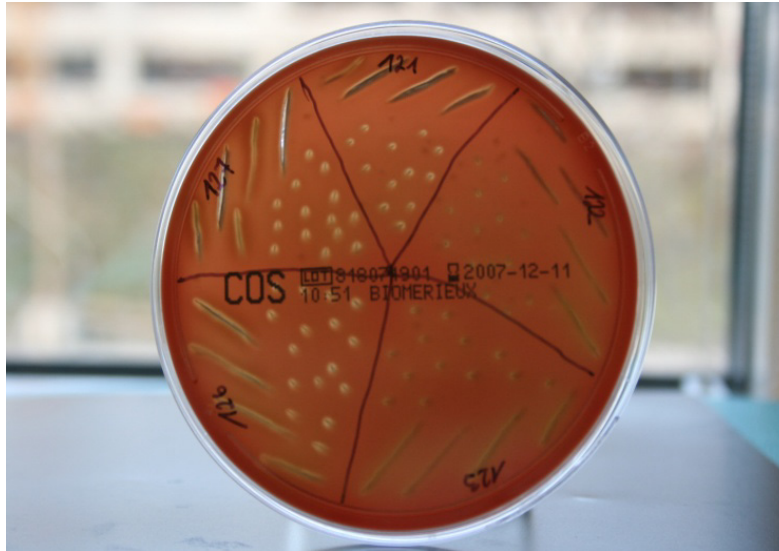


Abb. 12: β -Hämolytische und nicht hämolytische *Listeria*-Stämme

In Abb. 13 sind typische gram-positive *L. monocytogenes* Kolonien bei 100-facher Vergrößerung im Mikroskop dargestellt.

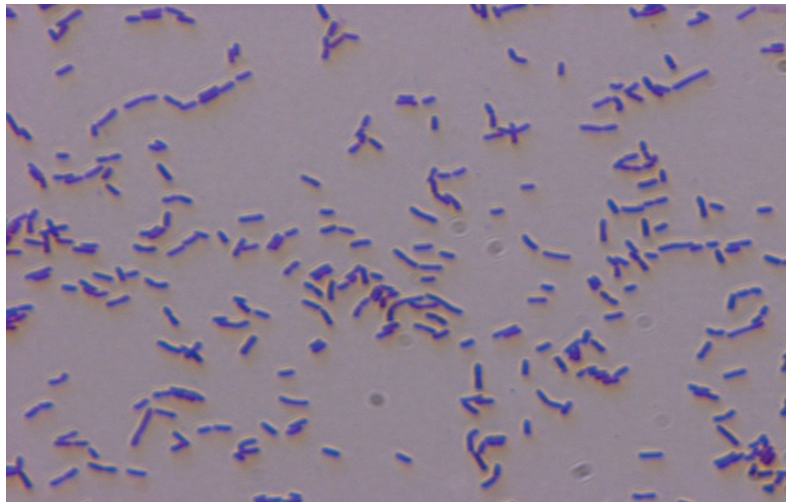


Abb. 13: Gram-positive *L. monocytogenes* bei 100facher Vergrößerung im Mikroskop

5.2 Auswertung der Untersuchung von 63 Lachsproben

5.2.1 Ergebnisse der EN ISO 11290-1

5.2.1.1 Probenanreicherungen

Nach einer 24stündigen Halbfraser-Anreicherung sind nicht alle *Listeria*-positiven Anreicherungen schwarz gefärbt, einige weisen nur eine leichte Graufärbung auf. Nach weiteren 48h Anreicherung in Fraser-Bouillon zeigen alle positiven Proben eine eindeutig schwarze Färbung. Die meisten negativen Proben sind nach Halbfraser- bzw. Fraseranreicherung nicht verfärbt und bleiben in ihrer ursprünglich gelblichen Farbe. Manche negativen Lachsproben färben sich dennoch schwarz in Fraser-Bouillon, weshalb allein durch die Schwarzfärbung kein Rückschluss auf das Vorhandensein von *Listeria* gezogen werden kann.

5.2.1.2 Bestätigung der positiven Proben und Identifizierung der Isolate

Die Probenanreicherungen werden auf OCLA- und PALCAM-Platten ausgestrichen und im Anschluss bestätigt. In manchen Fällen sind *Listeria*-Kolonien erst nach der 2. Anreicherung (Fraser) auf den Nährböden kultivierbar, während nach der 1. Anreicherung noch kein Wachstum zu verzeichnen ist (Tab. 30, k.w.).

Insgesamt werden 16 Lachsproben als *Listeria*-positiv bestätigt. Davon enthalten 13 Proben *L. monocytogenes*, während in 3 Proben (BB1, FF1, LL1) mit dem API® das Vorkommen von *L. seeligeri*, *L. welshimeri* und *L. innocua* bestätigt wird (Tab. 30).

Von den 16 *Listeria*-positiven Proben werden 35 *Listeria*-Isolate gewonnen. Diese erweisen sich alle als Gram-positiv, Katalase-positiv und Oxidase-negativ. Die Untersuchung der Hämolyseaktivität mit Hilfe der β -Lysin Discs (Remel, Lenexa, USA) erzielte keine brauchbaren Ergebnisse. 23 Isolate bilden opake Höfe auf OCLA (PC-PLC Aktivität) aus, wodurch das Vorhandensein von

L. monocytogenes bestätigt wird (Tab. 30, rote Makierung). Davon können 7 Isolate auch im API® als *L. monocytogenes* identifiziert werden. 12 Isolate weisen im API® ein zweifelhaftes Profil auf, mit einer Wahrscheinlichkeit von 72,6% *L. welshimeri* und 20,9% *L. monocytogenes*. 4 Isolate (I1.5, X4.6, S1.5₍₂₎ und X5.6₍₂₎) werden trotz positivem Hof auf OCLA, im API® als *L. innocua* bzw. als *L. welshimeri* erkannt. Die ungenaue Identifizierung im API® ist vermutlich auf Mischkulturen zurückzuführen.

12 Isolate bilden zwar türkise Kolonien, aber keinen opaken Hof auf OCLA und werden auch im API® als nicht-pathogene *Listeria* spp. identifiziert (Tab. 30, blaue Makierung).

Nachdem die API® Ergebnisse für eine zuverlässige Bestätigung von *L. monocytogenes* nicht aussagekräftig sind und es keine Ergebnisse zur Hämolyseaktivität gibt, werden alle *Listeria*-Isolate mit Hofbildung auf OCLA als *L. monocytogenes* gewertet (Tab. 30, rote Makierung).

Tab. 30: Bestätigung der präsumtiv positiven Proben nach EN ISO 11290-1

Probe	Ansatz/ Probe	Anreicherug	PC-PLC ¹ OCLA	ESC ² PALCAM	OX ³	KAT ⁴	Gram ⁵	API® <i>Listeria</i> ⁶
F1	F1.5	1	+	+	-	+	+	<i>L. mono.</i> 98,6%
		2	+	+	-	+	+	<i>L. mono.</i> 98,6%
		2	-	+	-	+	+	<i>L. innocua</i> 99,6%
F2	F2.6	1	k.W.	+	-	+	+	*****
		2	+	+	-	+	+	<i>L. welshimeri</i> 72,6% <i>L. mono.</i> 20,9% <i>L. innocua</i> 6,2%
I1	I1.5	1	-	+	-	+	+	<i>L. welshimeri</i> 72,6% <i>L. mono.</i> 20,9% <i>L. innocua</i> 6,2%
		2	+	+	-	+	+	<i>L. innocua</i> 99,6%
S1	S1.5	1	+	+	-	+	+	<i>L. welshimeri</i> 72,6% <i>L. mono.</i> 20,9% <i>L. innocua</i> 6,2%
		2	+	k.W.	-	+	+	<i>L. welshimeri</i> 65,7% <i>L. innocua</i> 34,1%
	S1.6	1	+	+	-	+	+	<i>L. mono.</i> 99,9%
		2	+	+	-	+	+	<i>L. mono.</i> 98,6%
W4	W4.6	1	k.W.	k.W.	*****	*****	*****	*****
		2	+	+	-	+	+	<i>L. welshimeri</i> 72,6% <i>L. mono.</i> 20,9% <i>L. innocua</i> 6,2%
X1	X1.6	1	+	+	-	+	+	<i>L. welshimeri</i> 72,6% <i>L. mono.</i> 20,9% <i>L. innocua</i> 6,2%
		2	+	+	-	+	+	<i>L. mono.</i> 98,6%
X3	X3.6	1	k.W.	k.W.	*****	*****	*****	*****
		2	+	+	-	+	+	<i>L. mono.</i> 98,6%
X4	X4.5	1	k.W.	k.W.	*****	*****	*****	*****
		2	+	+	-	+	+	<i>L. welshimeri</i> 72,6% <i>L. mono.</i> 20,9% <i>L. innocua</i> 6,2%
	X4.6	1	k.W.	k.W.	*****	*****	*****	*****
		2	+	+	-	+	+	<i>L. innocua</i> 99,6%
X5	X5.5	1	k.W.	k.W.	*****	*****	*****	*****
		2	+	+	-	+	+	<i>L. mono.</i> 98,6%
	X5.6	1	k.W.	k.W.	*****	*****	*****	*****
		2	+	+	-	+	+	<i>L. welshimeri</i> 65,7% <i>L. innocua</i> 34,1%

Fortsetzung Tab. 30:

Probe	Ansatz/ Probe	Anreicherung	PC-PLC OCLA ¹	ESC ² PALCAM	OX ³	KAT ⁴	Gram ⁵	API® <i>Listeria</i> ⁶
BB1	BB1.5	1	k.W.	k.W.	****	****	*****	*****
		2	-	+	-	+	+	<i>L. seeligeri</i> 94,2% <i>L. ivanovii</i> 5,6%
	BB1.6	1	-	k.W.	-	+	+	<i>L. welshimeri</i> 99,9%
		2	-	+	-	+	+	<i>L. welshimeri</i> 99,9%
EE1	EE1.5	1	-	+	-	+	+	<i>L. welshimeri</i> 65,7% <i>L. innocua</i> 34,1%
		2	+	+	-	+	+	<i>L. welshimeri</i> 72,6% <i>L. mono.</i> 20,9% <i>L. innocua</i> 6,2%
	EE1.6	1	+	+	-	+	+	<i>L. welshimeri</i> 72,6% <i>L. mono.</i> 20,9% <i>L. innocua</i> 6,2%
		2	+	+	-	+	+	<i>L. welshimeri</i> 72,6% <i>L. mono.</i> 20,9% <i>L. innocua</i> 6,2%
FF1	FF1.5	1	k.W.	k.W.	****	****	*****	*****
		2	-	+	-	+	+	<i>L. innocua</i> 99,6%
LL1	LL1.5	1	-	+	-	+	+	<i>L. welshimeri</i> 65,7% <i>L. innocua</i> 34,1%
		2	-	+	-	+	+	<i>L. welshimeri</i> 65,7% <i>L. innocua</i> 34,1%
	LL1.6	1	-	+	-	+	+	<i>L. innocua</i> 99,6%
		2	-	+	-	+	+	<i>L. innocua</i> 99,6%
MM1	MM1.6	1	-	+	-	+	+	<i>L. welshimeri</i> 72,6% <i>L. mono.</i> 20,9% <i>L. innocua</i> 6,2%
		2	+	+	-	+	+	<i>L. welshimeri</i> 72,6% <i>L. mono.</i> 20,9% <i>L. innocua</i> 6,2%
NN1	NN1.5	1	+	+	-	+	+	<i>L. welshimeri</i> 72,6% <i>L. mono.</i> 20,9% <i>L. innocua</i> 6,2%
		2	+	+	-	+	+	<i>L. welshimeri</i> 72,6% <i>L. mono.</i> 20,9% <i>L. innocua</i> 6,2%
PP1	PP1.6	1	+	+	-	+	+	<i>L. welshimeri</i> 72,6% <i>L. mono.</i> 20,9% <i>L. innocua</i> 6,2%
		2	k.W.		****	****	*****	*****

rote Makierung = *L. monocytogenes*; blaue Makierung = *Listeria* spp.; kW = kein Wachstum¹ Hofbildung auf OCLA; ² Äsculinhydrolyse (schwarzer Hof); ³ Oxidase; ⁴ Katalase; ⁵ Gramfärbung⁶ die Wahrscheinlichkeit der API® Ergebnisse wird in % angegeben

5.2.2 Ergebnisse des VIDAS® LDUO

5.2.2.1 Messung der Proben im mini-VIDAS® Gerät

Bei der Messung im mini-VIDAS® Gerät zeigen insgesamt 16 von 63 untersuchten Lachsproben ein positives Signal für *L. monocytogenes*, bei 4 Proben können ausschließlich *L. innocua* bzw. *L. welshimeri* detektiert werden.

5.2.2.2 Bestätigung der präsumtiven *L. monocytogenes*-Proben

Positive Ergebnisse im VIDAS® gelten als präsumtiv und müssen erst bestätigt werden. Negative VIDAS® Ergebnisse gelten als negativ und benötigen keine Bestätigung.

Von den 16 präsumtiv positiven Proben können 13 als *L. monocytogenes*-positiv bestätigt werden. Daraus ergeben sich 18 bestätigte *L. monocytogenes*-Isolate (Tab. 31, rote Makierung). Alle 18 Isolate sind Gram-positiv, Katalase-positiv und Oxidase-negativ. Sie bilden auf OCLA opake Höfe aus, zeigen auf Blutagar Hämolyseaktivität und werden im API® als *L. monocytogenes* eingestuft.

3 Proben mit positivem VIDAS®-Signal können nicht als *L. monocytogenes*-positiv bestätigt werden und sind daher falsch positiv. Daraus ergeben sich 4 nicht bestätigte Isolate (Tab. 31, graue Makierung). Sie zeigen weder Hofbildung auf OCLA, noch Hämolyseaktivität auf Blutagar und werden im API® als *L. innocua* bzw. *L. welshimeri* identifiziert. Diese Isolate (F1.1, F1.2, BB1.1, LL1.2) werden daher als *L. monocytogenes*-negativ gewertet.

Die Bestätigung der VIDAS®-positiven Proben in der Real-time PCR ergab auch hier aufgrund des positiven Signals der Negativprobe keine validen Ergebnisse.

Laut Hersteller gelten Ct-Werte > 10 als positiv für *L. monocytogenes*.

Jene Isolate, die durch Hämolysebildung, PC-PLC Aktivität und im API® als *L. monocytogenes* bestätigt werden können (Tab. 31, rote Makierung), erreichen in der Real-time PCR Ct-Werte zwischen 16 und 20. Die *Listeria monocytogenes* Referenzstämme (Tab. 12, Kap. 3.1.2) erreichen ebenfalls Ct-Werte zwischen 15 und 23. Das bedeutet, dass bereits ab dem 15./16. PCR-Zyklus ein Fluoreszenzanstieg zu verzeichnen ist und das Vorhandensein von *L. monocytogenes* bestätigt ist.

Jene *Listeria*-Isolate, die nicht als *L. monocytogenes* bestätigt werden konnten, sondern als *L. innocua* bzw. *L. welshimeri* (Tab. 31, graue Makierung), haben in der Real-time PCR Ct-Werte von über 30 (Ausnahme F1.1). Das bedeutet, dass hier der Fluoreszenzanstieg viel später stattgefunden hat als bei den als *L. monocytogenes* bestätigten Isolaten und demnach weniger *L. monocytogenes* DNA vorhanden ist, als bei den als *L. monocytogenes* bestätigten Isolaten. Der Ct-Wert korreliert mit der Ausgangs-DNA-Konzentration (je höher der Ct-Wert, desto geringer ist die Ausgangs-DNA). Die niedrige DNA-Konzentration von *L. monocytogenes* in den an sich als *L. innocua* bzw. *L. welshimeri* bestätigten Isolaten deutet auf eine Kontamination des Probenmaterials mit *L. monocytogenes*-DNA hin. Diese Isolate müssten daher erneut in der Real-time PCR oder mittels Sequenzierung untersucht werden. Eine Bestimmung der DNA-Konzentration der Probe durch Messung der Absorption im Spektrophotometer ist zu empfehlen.

Tab. 31: Bestätigung von im VIDAS® LDUO *L. monocytogenes*-positiven Isolaten

Isolat Nr.	Proben-ansatz	VIDAS® LDUO		Ct-Wert	API® <i>Listeria</i>	PC-PLC	Hämolyse
		<i>L. mono.</i>	<i>Listeria spp.</i>				
116	C1.1	+	+	16,36	Nicht durchgeführt	+	+
118	C2.2	+	+	17,70	<i>L. welshimeri</i> 72,6%; <i>L. mono.</i> 20,9%; <i>L. innocua</i> 6,2%	+	+
120	E3.1	+	+	19,16	<i>L. monocytogenes</i> 98,6%	+	+
121	E3.2	+	+	18,34	<i>L. monocytogenes</i> 98,6%	+	+
122	F1.1	+	+	25,86	<i>L. innocua</i> 99,6%	-	-
123	F1.2	+	+	37,13	<i>L. innocua</i> 99,6%	-	-
126	S1.1	+	+	16,75	<i>L. monocytogenes</i> 99,9%	+	+
127	S1.2	+	+	16,35	<i>L. grayi</i> 53,6%; <i>L. monocytogenes</i> 45,6%	+	+
130	W4.2	+	+	17,07	<i>L. monocytogenes</i> 98,6%	+	+
131	X2.1	+	+	20,55	<i>L. monocytogenes</i> 98,6%	+	+
132	X2.2	+	+	19,26	<i>L. monocytogenes</i> 99,9%	+	+
133	BB1.1	+	+	34,51	<i>L. welshimeri</i> 99,9%	-	-
135	EE1.1	+	+	16,91	nicht durchgeführt	+	+
136	EE1.2	+	+	18,50	<i>L. monocytogenes</i> 99,9%	+	+
138	X1.2	+	+	20,17	<i>L. monocytogenes</i> 98,6%	+	+
139	X3.1	+	+	19,13	<i>L. monocytogenes</i> 98,6%	+	+
141	X4.1	+	+	20,62	<i>L. monocytogenes</i> 99,9%	+	+
142	X4.2	+	+	20,15	<i>L. monocytogenes</i> 98,6%	+	+
143	X5.2	+	+	20,00	nicht durchgeführt	+	+
146	LL1.2	+	+	33,43	nicht durchgeführt	-	-
147	NN1.2	+	+	18,97	nicht durchgeführt	+	+
148	PP1.2	+	+	20,01	nicht durchgeführt	+	+

Rote Makierung = Bestätigung des VIDAS® LDUO für *L. monocytogenes*

Graue Makierung = falsch positives VIDAS® Signal (keine Bestätigung von *L. monocytogenes*)

5.2.2.3 Bestätigung der präsumtiven *Listeria* spp.-Proben:

Von 11 präsumtiven *Listeria* spp. Isolaten können 6 Isolate als solche bestätigt werden (Tab. 32, blaue Makierung). Diese Isolate haben keine PC-PLC Aktivität, keine Hämolyseaktivität (1 Ausnahme, Nr 137) und werden im API® als nicht-pathogene *Listeria* spp. identifiziert. 1 Isolat (Nr 140) wird bei den Bestätigungstests im API® auf OCLA und Blutagar eindeutig als *L. monocytogenes* identifiziert (falsch-negatives VIDAS® Signal). Laut Angaben des Herstellers des VIDAS® LDUO Kits (Biomérieux), ist die Sensitivität des *Listeria* spp. Nachweises leicht über der des *L. monocytogenes* Nachweises

und es kann daher in seltenen Fällen zu einem Vorfall wie bei Isolat 140 kommen, so dass im VIDAS® nur *Listeria* spp., bei den Bestätigungstests aber auch *L. monocytogenes* detektiert werden.

4 Isolate (H1.1/H1.2 und TT1.1/TT1.2) zeigen ein schwach positives VIDAS®-Signal für *Listeria* spp. und können auf keinem der beiden Nährmedien wachsen (Tab. 32, keine Makierung). Das VIDAS® Signal ist in diesen Fällen falsch-positiv und die Isolate werden als negativ gewertet.

In der Real-time PCR werden Ct-Werte von 30 und höher gemessen, obwohl VIDAS® und die Tests auf Blutagar, OCLA und im API® das Vorhandensein von *L. monocytogenes* nicht bestätigen (Tab. 32, blaue Makierung). Eine Kontamination mit *L. monocytogenes*-DNA ist daher auch hier nicht ausgeschlossen. Isolat Nr 140, das eindeutig als *L. monocytogenes* identifiziert wurde, weist auch in der Real-time PCR, ähnlich wie die *L. monocytogenes* Referenzstämme, einen Ct-Wert von 19,59 auf.

Tab. 32: Bestätigung von im VIDAS® LDUO *Listeria* spp.-positiven Isolaten

Isolat Nr.	Proben-ansatz	VIDAS® LDUO		Ct-Wert	API® <i>Listeria</i>	PC-PLC	Hämolyse
		<i>L. mono.</i>	<i>Listeria spp.</i>				
117	C2.1	-	+	29,19	<i>L. welshimeri</i> 99,9%	-	-
-	H1.1		+	xxxxxxx	xxxxxxxxxxxxxxxxxxx	Kein Wachstum	Kein Wachstum
-	H1.2		+	xxxxxxx	xxxxxxxxxxxxxxxxxxx	Kein Wachstum	Kein Wachstum
-	TT1.1		+	xxxxxxx	xxxxxxxxxxxxxxxxxxx	Kein Wachstum	Kein Wachstum
-	TT1.2		+	xxxxxxx	xxxxxxxxxxxxxxxxxxx	Kein Wachstum	Kein Wachstum
128	U1.1	-	+	33,52	<i>L. seeligeri</i> 94,2%; <i>L. ivanovii</i> 5,6%	-	-
129	U1.2	-	+	35,27	<i>L. ivanovii</i> 96,4%; <i>L. seeligeri</i> 3,2%	-	-
134	BB1.2	-	+	32,23	<i>L. welshimeri</i> 99,9%	-	-
137	T1.2	-	+	38,19	nicht durchgeführt	-	+
140	X3.2	-	+	19,59	<i>L. mono.</i> 99,9%	+	+
145	LL1.1	-	+	33,34	nicht durchgeführt	-	-

Blaue Makierung = Bestätigung des VIDAS® LDUO für *Listeria* spp.

Keine Makierung = Keine Bestätigung des VIDAS® LDUO da kein Wachstum auf OCLA

Graue Makierung = VIDAS® LDUO falsch negativ für *L. monocytogenes*

5.2.3 Ergebnisse des iQ-Check™ *L. monocytogenes* Kits

Mit dem iQ-Check™ *L. monocytogenes* Kit (Real-time PCR Kit) werden insgesamt 31 von 63 untersuchten Lachsproben positiv getestet. Daraus ergeben sich insgesamt 42 *L. monocytogenes*-positive Probenansätze (Tab. 33). Positive Ergebnisse gelten auch im iQ-Check™ als präsumtiv positiv für *L. monocytogenes* und müssen erst mit einer standardisierten klassischen Referenzmethode oder einer anderen AFNOR validierten Methode bestätigt werden. In dieser Studie gibt es keine auswertbaren Bestätigungsergebnisse für die iQ-Check™ Werte und deshalb werden die Ergebnisse der Real-time PCR direkt in den Methodenvergleich mit der ISO 11290-1 übernommen.

Die Ct-Werte betragen bei der Lachsprobenuntersuchung zwischen 36 und 39 (Tab. 33) und sind damit deutlich höher als bei den im VIDAS® LDUO positiven *L. monocytogenes* Isolaten (Tab. 31; Ct 16 – 20). Ct-Werte zwischen 36 und 39 bedeuten, dass wesentlich weniger Ziel-DNA in den Proben vorhanden ist, als bei den *L. monocytogenes* Isolaten mit Ct-Werten zwischen 16 und 20. Die Extraktion der DNA direkt aus den Lachsproben könnte eine geringere Konzentration der DNA ergeben, als die DNA-Extraktion aus den *L. monocytogenes* Isolaten. Es empfiehlt sich, eine Bestimmung der DNA-Konzentration durch Messung der Absorption im Spektrophotometer durchzuführen.

Tab. 33: Positive Proben in der Real-time PCR (iQ-Check™ *L. monocytogenes* Kit)

Probe	Ansatz/ Probe	iQ-Check™ LMO	
		Ergebnis	Ct-Wert
A1	A1.3	+	38,18
	A1.4	-	
C1	C1.3	+	35,56
	C1.4	+	38,17
C2	C2.3	+	38,22
	C2.4	-	
D2	D2.3	+	38,31
	D2.4	+	39,12
D3	D3.3	+	36,59
	D3.4	+	38,39
D4	D4.3	+	37,69
	D4.4	-	
E2	E2.3	-	
	E2.4	+	37,14
E3	E3.3	+	37,06
	E3.4	+	37,12

Fortsetzung Tab. 33

Probe	Ansatz/ Probe	iQ-Check™ LMO	
		Ergebnis	Ct-Wert
F1	F1.3	-	
	F1.4	+	36,99
F2	F2.3	-	
	F2.4	+	38,08
F3	F3.3	+	36,19
	F3.4	+	36,17
G2	G2.3	-	
	G2.4	+	37,01
H1	H1.3	+	36,40
	H1.4	+	35,93
H2	H2.3	-	
	H2.4	+	35,12
I1	I1.3	+	38,68
	I1.4	+	39,73
I2	I2.3	-	
	I2.4	+	38,64
J1	J1.3	+	38,87
	J1.4	-	
K1	K1.3	+	38,66
	K1.4	-	
M1	M1.3	+	39,52
	M1.4	+	38,78
N1	N1.3	+	38,07
	N1.4	+	39,58
O1	O1.3	+	36,80
	O1.4	-	
Q1	Q1.3	-	
	Q1.4	+	39,14
R1	R1.3	+	39,78
	R1.4	-	
S1	S1.3	+	38,19
	S1.4	-	
U1	U1.3	-	
	U1.4	+	37,54
X2	X2.3	-	
	X2.4	+	38,02
X4	X4.3	+	32,67
	X4.4	+	38,21
EE1	EE1.3	+	33,09
	EE1.4	+	33,61
GG1	GG1.3	-	
	GG1.4	+	39,07
LL1	LL1.3	-	
	LL1.4	+	38,49
QQ1	QQ1.3	+	38,57
	QQ1.4	-	

5.3 Methodenvergleich von EN ISO 11290-1, VIDAS® LDUO und iQ-Check® *L. monocytogenes* Kit

Tab. 34: Überblick der Ergebnisse von VIDAS® LDUO, iQ-Check™ LMO und ISO 11290-1

Probe	Ansatz/ Probe	VIDAS® LDUO		Ansatz/ Probe	iQ-Check™ <i>L. mono.</i>	Ansatz/ Probe	EN ISO 11290-1	
		<i>L. mono</i>	<i>Listeria spp.</i>				<i>L. mono.</i>	<i>Listeria spp.</i>
A1	A1.1	-	-	A1.3	+	A1.5	-	-
	A1.2	-	-	A1.4	-	A1.6	-	-
B1	B1.1	-	-	B1.3	-	B1.5	-	-
	B1.2	-	-	B1.4	-	B1.6	-	-
B3	B3.1	-	-	B3.3	-	B3.5	-	-
	B3.2	-	-	B3.4	-	B3.6	-	-
C1	C1.1	+	+	C1.3	+	C1.5	-	-
	C1.2	-	-	C1.4	+	C1.6	-	-
C2	C2.1	-	+	C2.3	+	C2.5	-	-
	C2.2	+	+	C2.4	-	C2.6	-	-
D2	D2.1	-	-	D2.3	+	D2.5	-	-
	D2.2	-	-	D2.4	+	D2.6	-	-
D3	D3.1	-	-	D3.3	+	D3.5	-	-
	D3.2	-	-	D3.4	+	D3.6	-	-
D4	D4.1	-	-	D4.3	+	D4.5	-	-
	D4.2	-	-	D4.4	-	D4.6	-	-
E1	E1.1	-	-	E1.3	-	E1.5	-	-
	E1.2	-	-	E1.4	-	E1.6	-	-
E2	E2.1	-	-	E2.3	-	E2.5	-	-
	E2.2	-	-	E2.4	+	E2.6	-	-
E3	E3.1	+	+	E3.3	+	E3.5	-	-
	E3.2	+	+	E3.4	+	E3.6	-	-
F1	F1.1	-	+	F1.3	-	F1.5	+	+
	F1.2	-	+	F1.4	+	F1.6	-	-
F2	F2.1	-	-	F2.3	-	F2.5	-	-
	F2.2	-	-	F2.4	+	F2.6	+	+
F3	F3.1	-	-	F3.3	+	F3.5	-	-
	F3.2	-	-	F3.4	+	F3.6	-	-
G1	G1.1	-	-	G1.3	-	G1.5	-	-
	G1.2	-	-	G1.4	-	G1.6	-	-
G2	G2.1	-	-	G2.3	-	G2.5	-	-
	G2.2	-	-	G2.4	+	G2.6	-	-
H1	H1.1	-	-	H1.3	+	H1.5	-	-
	H1.2	-	-	H1.4	+	H1.6	-	-
H2	H2.1	-	-	H2.3	-	H2.5	-	-
	H2.2	-	-	H2.4	+	H2.6	-	-
I1	I1.1	-	-	I1.3	+	I1.5	+	+
	I1.2	-	-	I1.4	+	I1.6	-	-
I2	I2.1	-	-	I2.3	-	I2.5	-	-
	I2.2	-	-	I2.4	+	I2.6	-	-
J1	J1.1	-	-	J1.3	+	J1.5	-	-
	J1.2	-	-	J1.4	-	J1.6	-	-
K1	K1.1	-	-	K1.3	+	K1.5	-	-
	K1.2	-	-	K1.4	-	K1.6	-	-

Fortsetzung Tab. 34:

Probe	Ansatz/ Probe	VIDAS® LDUO		Ansatz/ Probe	iQ-Check™ <i>L. mono.</i>	Ansatz/ Probe	EN ISO 11290-1	
		<i>L. mono</i>	<i>Listeria spp.</i>				<i>L. mono.</i>	<i>Listeria spp.</i>
L1	L1.1	-	-	L1.3	-	L1.5	-	-
	L1.2	-	-	L1.4	-	L1.6	-	-
M1	M1.1	-	-	M1.3	+	M1.5	-	-
	M1.2	-	-	M1.4	+	M1.6	-	-
N1	N1.1	-	-	N1.3	+	N1.5	-	-
	N1.2	-	-	N1.4	+	N1.6	-	-
O1	O1.1	-	-	O1.3	+	O1.5	-	-
	O1.2	-	-	O1.4	-	O1.6	-	-
P1	P1.1	-	-	P1.3	-	P1.5	-	-
	P1.2	-	-	P1.4	-	P1.6	-	-
Q1	Q1.1	-	-	Q1.3	-	Q1.5	-	-
	Q1.2	-	-	Q1.4	+	Q1.6	-	-
R1	R1.1	-	-	R1.3	+	R1.5	-	-
	R1.2	-	-	R1.4	-	R1.6	-	-
S1	S1.1	+	+	S1.3	+	S1.5	+	+
	S1.2	+	+	S1.4	-	S1.6	+	+
T1	T1.1	-	-	T1.3	-	T1.5	-	-
	T1.2	-	+	T1.4	-	T1.6	-	-
U1	U1.1	-	+	U1.3	-	U1.5	-	-
	U1.2	-	+	U1.4	+	U1.6	-	-
V1	V1.1	-	-	V1.3	-	V1.5	-	-
	V1.2	-	-	V1.4	-	V1.6	-	-
W1	W1.1	-	-	W1.3	-	W1.5	-	-
	W1.2	-	-	W1.4	-	W1.6	-	-
W2	W2.1	-	-	W2.3	-	W2.5	-	-
	W2.2	-	-	W2.4	-	W2.6	-	-
W3	W3.1	-	-	W3.3	-	W3.5	-	-
	W3.2	-	-	W3.4	-	W3.6	-	-
W4	W4.1	-	-	W4.3	-	W4.5	+	+
	W4.2	+	+	W4.4	-	W4.6	-	-
W5	W5.1	-	-	W5.3	-	W5.5	-	-
	W5.2	-	-	W5.4	-	W5.6	-	-
X1	X1.1	-	-	X1.3	-	X1.5	-	-
	X1.2	+	+	X1.4	-	X1.6	+	+
X2	X2.1	+	+	X2.3	-	X2.5	-	-
	X2.2	+	+	X2.4	+	X2.6	-	-
X3	X3.1	+	+	X3.3	-	X3.5	-	-
	X3.2	+	+	X3.4	-	X3.6	+	+
X4	X4.1	+	+	X4.3	+	X4.5	+	+
	X4.2	+	+	X4.4	+	X4.6	+	+
X5	X5.1	-	-	X5.3	-	X5.5	+	+
	X5.2	+	+	X5.4	-	X5.6	+	+
AA1	AA1.1	-	-	AA1.3	-	AA1.5	-	-
	AA1.2	-	-	AA1.4	-	AA1.6	-	-
BB1	BB1.1	-	+	BB1.3	-	BB1.5	-	+
	BB1.2	-	+	BB1.4	-	BB1.6	-	+
CC1	CC1.2	-	-	CC1.3	-	CC1.5	-	-
	CC1.3	-	-	CC1.4	-	CC1.6	-	-
DD1	DD1.1	-	-	DD1.3	-	DD1.5	-	-
	DD1.2	-	-	DD1.4	-	DD1.6	-	-
DD2	DD2.1	-	-	DD2.3	-	DD2.5	-	-
	DD2.2	-	-	DD2.4	-	DD2.6	-	-

Fortsetzung Tab. 34:

Probe	Ansatz/ Probe	VIDAS® LDUO		Ansatz/ Probe	iQ-Check™ <i>L. mono.</i>	Ansatz/ Probe	EN ISO 11290-1	
		<i>L. mono</i>	<i>Listeria spp.</i>				<i>L. mono.</i>	<i>Listeria spp.</i>
DD3	DD3.1	-	-	DD3.3	-	DD3.5	-	-
	DD3.2	-	-	DD3.4	-	DD3.6	-	-
EE1	EE1.1	+	+	EE1.3	+	EE1.5	+	+
	EE1.2	+	+	EE1.4	+	EE1.6	+	+
FF1	FF1.1	-	-	FF1.3	-	FF1.5	-	+
	FF1.2	-	-	FF1.4	-	FF1.6	-	-
GG1	GG1.1	-	-	GG1.3	-	GG1.5	-	-
	GG1.2	-	-	GG1.4	+	GG1.6	-	-
HH1	HH1.1	-	-	HH1.3	-	HH1.5	-	-
	HH1.2	-	-	HH1.4	-	HH1.6	-	-
II1	II1.1	-	-	II1.3	-	II1.5	-	-
	II1.2	-	-	II1.4	-	II1.6	-	-
LL1	LL1.1	-	+	LL1.3	-	LL1.5	-	+
	LL1.2	-	+	LL1.4	+	LL1.6	-	+
MM1	MM1.1	-	-	MM1.3	-	MM1.5	+	+
	MM1.2	-	-	MM1.4	-	MM1.6	-	-
NN1	NN1.1	-	-	NN1.3	-	NN1.5	+	+
	NN1.2	+	+	NN1.4	-	NN1.6	-	-
OO1	OO1.1	-	-	OO1.3	-	OO1.5	-	-
	OO1.2	-	-	OO1.4	-	OO1.6	-	-
PP1	PP1.1	-	-	PP1.3	-	PP1.5	-	-
	PP1.2	+	+	PP1.4	-	PP1.6	+	+
QQ1	QQ1.1	-	-	QQ1.3	+	QQ1.5	-	-
	QQ1.2	-	-	QQ1.4	-	QQ1.6	-	-
RR1	RR1.1	-	-	RR1.3	-	RR1.5	-	-
	RR1.2	-	-	RR1.4	-	RR1.6	-	-
SS1	SS1.1	-	-	SS1.3	-	SS1.5	-	-
	SS1.2	-	-	SS1.4	-	SS1.6	-	-
TT1	TT1.1	-	-	TT1.3	-	TT1.5	-	-
	TT1.2	-	-	TT1.4	-	TT1.6	-	-

5.3.1 Vergleich von EN ISO 11290-1 und VIDAS® LDUO

Aus den Vergleichstabellen (Tab. 35 u. 36) kann die Anzahl der positiven und negativen Übereinstimmungen der beiden Methoden, sowie auch die Anzahl der positiven und negativen Abweichungen entnommen werden.

Beide Methoden, VIDAS® LDUO und ISO 11290-1, können *L. monocytogenes* in 13 von 63 getesteten Proben nachweisen (Tab. 35).

Die Gattung *Listeria* spp. wird im VIDAS® LDUO in 18 Proben, von der ISO 11290-1 in 16 Proben nachgewiesen (Tab. 36).

Beim Nachweis der Spezies *L. monocytogenes* gibt es 4 falsch-positive VIDAS® Proben (C1, C2, E3, X2) (Tab. 35), bei der Gattung *Listeria* spp. sind 6 Proben falsch-positiv (C1, C2, E3, T1, U1, X2) (Tab. 36). Falsch-positiv bedeutet, dass diese Proben in der Referenzmethode ISO 11290-1 negativ sind. Diese Proben können nach der VIDAS® Messung auf OCLA, Blutagar und im API® eindeutig als *L. monocytogenes* bzw. *Listeria* spp. bestätigt werden (Tab. 31 u. 32) und sind daher laut ISO 16140:2003 **richtig positiv**.

Im VIDAS® LDUO werden je 4 falsch-negative Proben gemessen (F1, F2, I1, MM1 bei *L. monocytogenes*, Tab. 35 und F2, I1, FF1, MM1 bei *Listeria* spp., Tab. 36). Falsch-negativ bedeutet, dass diese Proben nach der ISO 11290-1 Methode als *Listeria* spp. bzw. als *L. monocytogenes*-positiv identifiziert worden sind. Für negative Ergebnisse der alternativen Methode (VIDAS®) sind keine Bestätigungstests vorgesehen.

Tab. 35: Vergleich des Nachweises von *L. monocytogenes* mit VIDAS® und ISO 11290-1

[ANONYM 5, 2005]

		VIDAS® LDUO Erhaltene Ergebnisse		Total
		positiv	negativ	
EN ISO 11290-1 Erwartete Ergebnisse	positiv	9	4	13
	negativ	4	46	50
Total		13	50	63

Tab. 36: Vergleich des Nachweises von *Listeria* spp. mit VIDAS® und ISO 11290-1

[ANONYM 5, 2005]

		VIDAS® LDUO Erhaltene Ergebnisse		Total
		positiv	negativ	
EN ISO 11290-1 Erwartete Ergebnisse	positiv	12	4	16
	negativ	6	41	47
Total		18	45	63

Die Leistungsparameter des VIDAS® LDUO, „Relative Richtigkeit“ (AC), „Relative Sensitivität“ (SE) und „Relative Spezifität“ (SP) werden anhand der Vergleichstabellen (Tab. 35 u. Tab. 36) berechnet.

Die Berechnungsformeln für die einzelnen Leistungsparameter sind in Kapitel 2.5.1, Tab. 10 dargestellt. Die Parameter werden getrennt für den Nachweis von *L. monocytogenes* und für *Listeria* spp. berechnet, da beide Nachweisverfahren eine Differenzierung von *L. monocytogenes* und *Listeria* spp. ermöglichen.

Für den VIDAS® LDUO ergeben sich **Sensitivitätswerte** von 69,2% für *L. monocytogenes* bzw. von 75% für die Gattung *Listeria* spp. (Tab. 37).

Von der Referenzmethode wird erwartet, dass diese alle kontaminierten Proben als positiv erkennt und damit eine Sensitivität von 100% hat. In dieser Studie ist es nicht der Fall, da die „falsch-positiven“ VIDAS® Proben in Wahrheit richtig positiv sind und die ISO 11290-1 diese nicht als positiv erkannt hat. Betrachtet man aber die zusätzlich richtig positiven VIDAS® Proben als „falsch-negativ“ in der Referenzmethode, so ergeben sich für die ISO 11290-1 Sensitivitätswerte von 69,2% für *L. monocytogenes* bzw. von 66,6% für die Gattung *Listeria* spp.

Bei der Berechnung der **Spezifität** der VIDAS® Methode stellt sich ein statistisches Problem. Aufgrund der „falsch-positiven“ Proben erhält der VIDAS® eine Spezifität von 92,0% für *L. monocytogenes* und 87,2% für *Listeria* spp. (Tab. 37). In Wahrheit sind dies aber richtig positiv bestätigte Proben.

Die Spezifität ist prinzipiell schwierig zu bestimmen, da in natürlich kontaminierten Proben die Keimverteilung meistens inhomogen ist [HÜBNER et al., 2002].

Die **relative Richtigkeit** beträgt 87,7% für *L. monocytogenes* und 81,1% für *Listeria* spp. (Tab. 37). Dies ist jedoch relativ zu sehen, da es sich bei den im VIDAS® „falsch-positiven“ Ergebnissen um bestätigte Listeriennachweise handelt und damit um zusätzlich positive Proben.

Die Richtigkeit steht immer in Relation zum definierten Standard und gibt an, bei wievielen Messungen das alte und neue Verfahren zum gleichen Ergebnis führen [HÜBNER et al., 2002].

Tab. 37: Leistungsfähigkeit des VIDAS® LDUO assays nach Eigenuntersuchung

Parameter	<i>L. monocytogenes</i>	<i>Listeria spp.</i>
Relative Richtigkeit (AC)	87,7 %	84,1 %
Relative Spezifität (SP)	92,0 %	87,2 %
Relative Sensitivität (SE)	69,2 %	75,0 %

5.3.1.1 Berechnung der abweichenden Ergebnisse

Die Anzahl der positiven (PD) und negativen Abweichungen (ND) in Bezug auf den Nachweis von *L. monocytogenes* beträgt $4+4 = 8$ (siehe Tab. 35), in Bezug auf den Nachweis von *Listeria spp.* beträgt diese $4+6 = 10$ (siehe Tab. 36). Die Abweichungen sind also in beiden Tabellen größer als 6 und kleiner als 22. Laut ISO 16140:2003 wird demnach das **Binomialgesetz** zur Beurteilung der abweichenden Ergebnisse herangezogen (siehe Kapitel 2.5.1, Tab. 11).

Die Summe von PD und ND wird als Y bezeichnet ($PD+ND = Y$).

Der kleinere Wert von PD und ND wird als m definiert.

Die M-Werte für Y Abweichungen ($6 \leq Y \leq 22$) werden in Tab. 38 dargestellt.

Ist $m \leq M$ für Y, so sind die beiden Methoden signifikant unterschiedlich bei $\alpha < 0,05$.

Tab. 38: M-Werte für Y Abweichungen ($6 \leq Y \leq 22$)

Abweichungen Y = PD + ND	6-8	9-11	12-14	15-16	17-19	20-22
M = Max(m) für $\alpha < 0,05$	0	1	2	3	4	5

Beim Nachweis von *L. monocytogenes* ergibt sich für PD und ND der gleiche Wert, also gilt für $m = 4$ und $Y = 8$

Beim Nachweis von *Listeria* spp. ergibt sich für PD = 6 und für ND = 4, also gilt für $m = 4$ und $Y = 10$

Vergleicht man nun die Werte m und M anhand von Tab. 38, so ergibt sich für den Nachweis von *L. monocytogenes* $m(4) > M(0)$ für $Y(8)$ und für den Nachweis von *Listeria* spp. $m(4) > M(1)$ für $Y(10)$.

Somit gibt es keinen signifikanten Unterschied zwischen der alternativen Methode VIDAS® LDUO und der Referenzmethode EN ISO 11290-1.

5.3.2 Vergleich von EN ISO 11290-1 und iQ-Check™

L. monocytogenes Kit

Aus der Vergleichstabelle (Tab. 39) kann die Anzahl der positiven und negativen Übereinstimmungen der beiden Methoden, sowie auch die Anzahl der positiven und negativen Abweichungen entnommen werden.

Die Spezies *L. monocytogenes* kann vom iQ-Check™ in 31 Proben und von der ISO 11290-1 in 13 von 63 Proben nachgewiesen werden (Tab. 39).

Beim Vergleich des iQ-Check™ mit der ISO 11290-1 gibt es 25 falsch-positive iQ-Check™ Proben, d.h. dass diese Proben in der ISO 11290-1 negativ sind (Tab. 39). Da die Bestätigungstests fehlen, kann nicht nachgewiesen werden ob in diesen Proben tatsächlich *L. monocytogenes* vorkommt oder nicht. Der VIDAS® LDUO dient jedoch als Anhaltspunkt für die Analyse der falsch-positiven iQ-Check™ Proben.

Des weiteren werden 7 falsch-negative iQ-Check™ Proben gemessen, d.h. dass diese Proben in der ISO 11290-1 *L. monocytogenes*-positiv sind (Tab. 39).

Tab. 39: Vergleich des Nachweises von *L. monocytogenes* mit iQ-Check und ISO 11290-1

		iQ-Check™ Erhaltene Ergebnisse		Total
		positiv	negativ	
EN ISO 11290-1 Erwartete Ergebnisse	positiv	6	7	13
	negativ	25	25	50
Total		31	32	63

Die Leistungsparameter des iQ-Check™ LMO Kits, „Relative Richtigkeit“ (AC), „Relative Sensitivität“ (SE) und „Relative Spezifität“ (SP) werden anhand der Vergleichstabelle (Tab. 39) berechnet.

Die Berechnungsformeln für die einzelnen Leistungsparameter sind in Kapitel 2.5.1, Tab. 10 dargestellt. Die Parameter werden ausschließlich für den Nachweis von *L. monocytogenes* berechnet, da der iQ-Check™ nur diesen pathogenen Keim detektieren kann.

Der iQ-Check™ *L. monocytogenes* Kit erhält in dieser Studie aufgrund der 7 falsch-negativen Proben eine **Sensitivität** von 46,2% (Tab. 40). Da aber zumindest 4 der 25 falsch-positiven iQ-Check™ Proben (C1, C2, E3, X2) auch im VIDAS® LDUO positiv sind (Tab. 34) und als *L. monocytogenes* bestätigt werden können, sind diese in der ISO 11290-1 falsch-negativ. Damit ist die Referenzmethode, wie auch beim Vergleich mit dem VIDAS® LDUO auch nicht zu 100% sensitiv. Die Sensitivität der Referenzmethode kann allerdings nicht berechnet werden, da die restlichen 21 falsch-positiven iQ-Check™ Proben nicht als positiv bestätigt sind.

Die **Spezifiät** des iQ-Check™ *L. monocytogenes* Kits von 50% (Tab. 40) ergibt sich aus der hohen Zahl an falsch-positiven Proben verglichen mit der ISO 11290-1.

Die **relative Richtigkeit** des iQ-Check™ *L. monocytogenes* Kits wird mit 49,2% berechnet (Tab. 40). Dies ist jedoch relativ zu sehen, da zumindest 4 von 25 falsch-positiven Proben als richtig positiv bestätigt sind. Für die restlichen 21 falsch-positiven Proben fehlen die Bestätigungstests.

Die Richtigkeit steht immer in Relation zum definierten Standard und gibt an, bei wievielen Messungen das alte und neue Verfahren zum gleichen Ergebnis führen [HÜBNER et al, 2002].

Tab. 40: Leistungsfähigkeit des iQ-Check™ nach Eigenuntersuchung

Relative Richtigkeit (AC)	49,2 %
Relative Spezifität (SP)	50,0 %
Relative Sensitivität (SE)	46,2 %

5.3.2.1 Berechnung der abweichenden Ergebnisse

Die Anzahl der positiven (PD) und negativen Abweichungen (ND) zwischen iQ-Check™ und ISO 11290-1 beträgt $7+25 = 32$ (siehe Tab. 39) und liegt damit höher als 22.

Laut ISO 16140:2003 wird demnach der **McNemar Test** (Chi-Quadrat Test, 1 Freiheitsgrad) zur Beurteilung der abweichenden Ergebnisse herangezogen (siehe Kapitel 2.5.1, Tab. 11).

$$PD + ND = Y; \quad |PD - ND| = d$$

Demnach ergibt sich für $Y = 32$ und für $d = 18$

Die Zahlen sind in folgende Formel einzusetzen:

$$\chi^2 = \frac{d^2}{Y} = 10,12$$

Ist $\chi^2 > 3,841$, so sind die beiden Methoden signifikant unterschiedlich bei $\alpha < 0,05$. In diesem Fall liegt χ^2 bei 10,12 – also weit über 3,841 und damit sind die Methoden EN ISO 11290-1 und iQ-Check™ signifikant unterschiedlich.

6. Diskussion

6.1 Diskussion zur Bestätigung der Testergebnisse

6.1.1 OCLA – selektives Nährmedium

Das selektive Nährmedium OCLA stellt sich für die Bestätigung präsumtiver Listerien als sehr zuverlässig heraus und es tritt nur selten Begleitflora in Form von weißen Kolonien auf. *L. monocytogenes* ist durch die opake Hofbildung auf dem Medium sehr leicht erkennbar. Auch *L. ivanovii* bildet opake Höfe auf OCLA aus, der Keim konnte jedoch im API® in keiner der untersuchten Lachsproben nachgewiesen werden. Die vom Hersteller angegebene Inkubationszeit von nur 24h reicht, wie auch BECKER et al. (2006) beobachteten, für eine aussagekräftige Interpretation der Ergebnisse nicht aus. Nach 24h Inkubation sind die blauen *Listeria*-Kolonien auf OCLA nur sehr klein gewachsen und bilden keine Höfe aus. Die Platten müssen daher insgesamt 48h bei 37°C inkubiert werden, um pathogene von nicht-pathogenen *Listeria* spp. unterscheiden zu können. Damit ist mit dem chromogenen Medium keine Zeiteinsparung gegenüber anderen *Listeria*-spezifischen Medien möglich.

Bei der Bestätigung der 85 präsumtiven *L. monocytogenes*-Isolate (VIDAS® LMO-positiv, Kapitel 5.1) bilden 21% der Isolate mit Hämolyseaktivität keinen Hof auf OCLA aus. Manche *L. monocytogenes* Stämme bilden stressbedingt keinen Hof aus. Einige Stämme von *L. monocytogenes* besitzen nur eine geringe PC-PLC-Aktivität, können aber trotzdem pathogen sein [ANONYM 5, 2005].

Bei der Bestätigung der im VIDAS® LDUO positiven Lachsproben (Kapitel 5.2.2) erweist sich das selektive Nährmedium OCLA als sehr zuverlässig. Die Ergebnisse für PC-PLC Aktivität stimmen mit jenen von Hämolyse und API® fast immer überein und sind daher sehr aussagekräftig.

In der Referenzmethode ISO 11290-1 ist der gleichzeitige Nachweis von pathogenen und nicht-pathogenen Listerien auf einer OCLA-Platte nur bei einer Probe (F1.5) gelungen. Hier werden aus der Fraser-Anreicherung (2. Anreicherung) auf einer Platte gleichzeitig Kolonien mit Hof (im API® als *L. monocytogenes* bestätigt) und ohne Hof (im API® als *L. innocua* bestätigt), isoliert. Ob diese Differenzierung funktioniert oder nicht, ist allerdings stark vom ursprünglichen Verhältnis *L. monocytogenes*/*L. innocua* in der Probe abhängig. *L. innocua* können *L. monocytogenes*-Kolonien überwachsen und infolgedessen kann es zu falsch negativen Ergebnissen kommen [PETRAN und SWANSON, 1993]. Aus 3 Proben (BB1, FF1, LL1) werden ausschließlich *Listeria* spp. (kein *L. monocytogenes*) isoliert und auch bestätigt. Ein Überwachsen von *L. monocytogenes* durch *L. innocua* wäre in diesen Fällen möglich. Dadurch, dass *L. monocytogenes* in manchen Fällen erst nach der 2. Anreicherung (Fraser) isoliert werden konnte, ist belegt, dass die 2. Anreicherung in Fraser unentbehrlich ist, um den pathogenen Keim zuverlässig detektieren zu können. Dennoch werden kürzere Anreicherungen angestrebt, um den pathogenen Keim innerhalb kürzester Zeit nachweisen zu können. GNANOU BESSE et al. (2005) schlagen eine Reduktion der Fraser-Anreicherung von 48h auf 24h vor. Hierfür bedarf es jedoch weiterer Studien mit natürlich kontaminierten Lachsproben.

6.1.2 Oxidase/Katalasetest und Gramfärbung

Oxidase-, Katalasetest und Gramfärbung erweisen sich als zuverlässige Methoden, um die Gattung *Listeria* zu bestätigen. Alle präsumtiven *Listeria*-Isolate sind Oxidase-negativ, Katalase-positiv und Gram-positiv.

6.1.3 Hämolysetest

Bei der Bestätigung der im VIDAS[®] positiven *Listeria*-Isolate (VIDAS[®] LMO und LDUO) ist der Hämolysetest durch Einimpfen der Kultur in die Fläche des Blutagars eine geeignete Methode, um *L. monocytogenes* zu bestätigen. Mit Hilfe der β -Lysin Discs (Remel, Lenexa, USA), die anstatt des CAMP-Tests verwendet wurden, konnten keine brauchbaren Ergebnisse hinsichtlich der Hämolyseaktivität erzielt werden. Es waren keine Hämolysezonen zu erkennen. SCOTTER et al. (2001) berichten ebenfalls von Schwierigkeiten bei der Interpretation des CAMP-Tests, da in den untersuchten Lebensmitteln sowohl *L. monocytogenes* als auch *L. innocua* vorhanden waren.

6.1.4 API[®] Listeria

API[®] Listeria erweist sich nur für die Bestätigung der im VIDAS[®] LDUO positiven *L. monocytogenes* Isolate als zuverlässig, da diese fast komplett mit den Ergebnissen von OCLA (PC-PLC Aktivität) und Hämolysetest übereinstimmen.

Bei der Bestätigung der 85 im VIDAS[®] LMO positiven Isolate können nur 61% der Isolate mit PC-PLC- und Hämolyseaktivität als *L. monocytogenes* bestätigt werden, bei der ISO 11290-1 sind dies nur 30,4%. Es treten sehr viele zweifelhafte Profile auf (zwischen 37% und 52,2% der untersuchten Isolate), bei denen nicht eindeutig festgestellt werden kann, um welche Spezies es sich handelt. Einige *L. monocytogenes*-Stämme weisen zwar Hofbildung auf OCLA und Hämolyse auf Blutagar auf, werden aber im API[®] als *L. innocua* identifiziert. Hinsichtlich der Bestätigung nicht-pathogener *Listeria* spp. ist der API[®] zuverlässig. Alle Isolate ohne Hofbildung auf OCLA können als nicht-pathogene *Listeria* spp. bestätigt werden.

Obwohl BILLE et al. (1992) den Anteil an falschen Identifizierungen im API[®] *Listeria* mit nur 3% angibt, so konnten AZNAR und ELIZAQUIVEL (2008) ebenfalls nur 67,3% der Isolate mit dem API[®] richtig identifizieren und die Anzahl an zweifelhaften Profilen war mit 14% auch sehr hoch.

6.1.5 Real-time PCR

Die präsumtiven *L. monocytogenes* Isolate, nachgewiesen im VIDAS® LMO Kit, (Kapitel 5.1) und die präsumtiven *Listeria*-Isolate des VIDAS® LDUO Kits (Kapitel 5.2.2) sollen durch eine Real-time PCR Methode bestätigt werden.

Jene VIDAS®-positiven Isolate, die auch auf OCLA, Blutagar oder im API® als *L. monocytogenes* bestätigt werden konnten, weisen in der Real-time PCR Ct-Werte zwischen 14 und 24 auf.

Allerdings haben jene Proben mit falsch-positivem VIDAS® Signal (nicht als *L. monocytogenes* bestätigt) in der Real-time PCR Ct-Werte von 30 und höher.

Eine Kontamination des DNA-Materials mit *L. monocytogenes*-DNA würde die hohen Ct-Werte über 30 und die damit verbundene geringe DNA-Konzentration erklären. Ein Überwachsen des Zielkeims durch *L. innocua* könnte ebenfalls zu einer geringeren *L. monocytogenes*-DNA Konzentration und den damit verbundenen hohen Ct-Werten über 30 geführt haben. Es empfiehlt sich daher, die DNA-Konzentration der Proben durch Messung der Absorption im Spektrophotometer zu bestimmen.

Die Kontamination könnte bereits bei der DNA-Extraktion entstanden sein, welche in der Laminar Flow durchgeführt wurde. Die Reaktionsgefäße haben zwar alle einen Sicherheitsverschluss, werden aber fast randvoll (2ml Tubes) mit der Listerienanreicherung gefüllt. Nach der Zentrifugation und Pelletbildung muss der Überstand abpipetiert werden, wobei jedes Reaktionsgefäß dabei geöffnet werden muss. Durch die randvolle Füllung der Reaktionsgefäße kann es leicht vorkommen, dass ein Tropfen Anreicherungsbouillon beim Öffnen des Reaktionsgefäßes auf den Handschuh gelangt und dadurch das nächste Reaktionsgefäß beim Öffnen des Deckels kontaminiert wird. Diese Art von Kreuzkontamination ist besonders problematisch, weil sie durch die PCR-Kontrollen nicht aufgedeckt werden kann. Da ein wiederholtes Testen wieder zu falsch-positiven Ergebnissen führen würde, müsste die gesamte DNA-Extraktion

wiederholt werden, was mit hohen Kosten und Zeitaufwand verbunden wäre [SANCHEZ, 2006].

Die Kontamination der Negativprobe könnte aus einer Unachtsamkeit beim Pipettenspitzenwechsel zustandegekommen sein.

Eine Kontamination des Mastermix kann ausgeschlossen werden, da dieser immer in Abwesenheit von DNA-Material hergestellt und in die PCR-Reaktionsgefäße vorgelegt wurde.

Nach Angaben des Herstellers (Bio-Rad) ist der iQ-Check™ *L. monocytogenes* Kit speziell für die Untersuchung von Lebensmittelproben entwickelt und ist nicht für die DNA-Extraktion aus *Listeria*-Isolaten validiert. Der Kit ist sehr sensitiv und kann bereits wenige Zellen *L. monocytogenes* detektieren.

6.2 Diskussion zum Methodenvergleich von VIDAS® LDUO und EN ISO 11290-1

Die Abweichungen betreffend, sind die beiden Methoden VIDAS® und ISO 11290-1 **nicht signifikant unterschiedlich** (siehe Kapitel 5.3.1.1). Das bedeutet, dass keine der beiden Methoden als besser oder schlechter einzustufen ist.

SILBERNAGEL et al. (2004) vergleichen den VIDAS® LMO 2 mit der kulturellen Methode hinsichtlich der Detektion von *L. monocytogenes* in Lebensmitteln und finden ebenfalls keinen statistischen Unterschied zwischen den beiden Methoden. Auch GANGAR et al. (2000) verzeichnen keinen signifikanten Unterschied zwischen dem VIDAS® LIS und der kulturellen Methode bei rohem gefrorenem Fisch und weisen auf eine zufällige Verteilung der Keime in den Probenportionen hin. Die Innokulationsversuche von GANGAR et al. (2000) zeigen, dass bei höheren Innokulationslevels sowohl VIDAS® als auch kulturelle Methode wesentlich mehr Proben als positiv erkennen, als bei niedrigen Innokulationslevels.

Die Sensitivität des VIDAS® LDUO ist mit 69,2% für den Nachweis von *L. monocytogenes* sehr niedrig. Wenn man aber bedenkt, dass auch die Referenzmethode 4 richtig positive VIDAS® Proben nicht erkannt hat, ist auch diese nur zu 69,2% sensitiv. In der Literatur ist die Sensitivität der ISO 11290-1 mit 85% [SCOTTER et al., 2001] und die des VIDAS® LDUO mit 94,1% [ANONYM 6, 2006] angegeben. Dadurch dass in dieser Studie beide Methoden eine gleich niedrige Sensitivität aufweisen, liegt wahrscheinlich eine inhomogene Keimverteilung zwischen den 25g-Aliquoten der Proben vor (pro Probe ein Aliquot für den VIDAS® und eines für die ISO 11290-1). Die niedrige Keimzahl in natürlich kontaminierten Lachsproben macht eine gleichmäßige Aufteilung der Probe schwierig, weshalb unterschiedliche Ergebnisse zwischen den Methoden sehr wahrscheinlich sind [DEBEVERE und UYTENDAELE, 2003].

VAZ-VELHO et al. (2000) erhalten bei der Untersuchung natürlich kontaminierter Lachsproben mit dem VIDAS® LMO eine ähnlich niedrige Sensitivität von 73% und beziehen sich auf den hohen Anteil inhibierender Begleitflora in Gegenwart niedriger Mengen *L. monocytogenes* in den Fischprodukten. Die Sensitivität der Referenzmethode geben die Autoren mit 100% an, obwohl der Keim speziell in natürlich kontaminierten Lebensmitteln von keiner Methode vollständig detektiert werden kann.

6.3 Diskussion zum Methodenvergleich von iQ-Check™ *L. mono.* Kit und EN ISO 11290-1

Die Abweichungen betreffend, sind die beiden Methoden iQ-Check™ *L. monocytogenes* Kit und ISO 11290-1 **signifikant unterschiedlich** (siehe Kapitel 5.3.2.1). Der iQ-Check™ testet 49% der Proben *L. monocytogenes*-positiv, in der ISO 11290-1 sind nur 21% der Proben positiv.

NETSCHAJEW et al. (2009) untersuchen das Vorkommen von *L. monocytogenes* in vakuumverpackten Fleischerzeugnissen und vergleichen dafür ebenfalls den iQ-Check™ *L. monocytogenes* Kit mit der kulturellen Methode (angepasste ISO 11290). Im iQ-Check™ waren 64% der Proben *L. monocytogenes*-positiv, in der kulturellen Methode waren nur 6% der Proben positiv.

Die Sensitivität des iQ-Check™ *L. monocytogenes* Kits ist mit 46,2% sehr gering (7 falsch-negative Proben). Umgekehrt hat aber auch die Referenzmethode 4 richtig positiv bestätigte iQ-Check™ Proben nicht positiv erkannt. In diesem Fall könnte eine inhomogene Keimverteilung zwischen den 25g-Aliquoten/Probe vorliegen. Eine andere Möglichkeit für falsch-negative iQ-Check™ Ergebnisse wäre, dass die Nachweisgrenze für *L. monocytogenes* nach der 24h Anreicherung im Halbfraser nicht erreicht wurde. Laut NAVAS et al. (2006) beeinflusst die Art der Anreicherung die Sensitivität der Real-time

PCR. BECKER und SCHULER (2007) haben beobachtet, dass die Anzahl der falsch-negativen Ergebnisse beim iQ-Check™ *L. monocytogenes* Kit (Bio-Rad, Munich, Germany) durch eine Anreicherung von 48h anstatt von 24h im Vorfeld der DNA-Extraktion minimiert werden kann. Eine PCR-Inhibition kann ausgeschlossen werden, da die Interne Amplifikationskontrolle des Kits funktioniert hat.

Die Spezifität des iQ-Check™ *L. monocytogenes* Kits wird mit 50% berechnet. Es sind zwar nur 4 falsch-positive Proben sicher richtig positiv, weil diese auch im VIDAS® LDUO als *L. monocytogenes* bestätigt werden konnten. Man kann jedoch davon ausgehen dass es sich bei den restlichen 21 falsch-positiven Proben auch um richtig positive handelt, da NETSCHAJEW et al. (2009) mit dem iQ-Check™ ebenfalls wesentlich mehr *L. monocytogenes*-positive Proben detektieren kann als mit der kulturellen Methode.

Für falsch-positive Proben in der PCR kann es verschiedene Ursachen geben. Eine davon ist, dass die PCR lebendes von totem Zellmaterial nicht unterscheiden kann [NORTON, 2002]. Nachdem die Proben im Vorfeld der PCR angereichert und damit verdünnt worden sind, sollte das Risiko für falsch-positive Ergebnisse durch tote Zellen eigentlich geringer sein [KACLÍKOVÁ et al., 2003]. Eine weitere Ursache für falsch-positive Proben besteht darin, dass die PCR auch lebensfähige, aber nicht kultivierbare Mikroorganismen erkennen kann. Dies ist vorallem bei gestressten bzw. geschädigten Zellen der Fall [MAURER, 2006].

6.4 Belastung der Lachsproben mit Listerien

Von 63 untersuchten Lachsproben sind insgesamt 39 Proben (61,9%) *L. monocytogenes*-positiv (Tab. 41).

Tab. 41: Anzahl der *L. monocytogenes*-positiven Lachsproben

Probenanzahl gesamt	Positive Proben in			Positive Proben gesamt
	VIDAS® LDUO	Real-time PCR	ISO 11290-1	
63	13	31	13	39

Die 63 Lachsproben sind aus 41 Chargen entnommen. Davon sind 26 Chargen (63% der untersuchten Chargen) mit *L. monocytogenes* kontaminiert.

Pro Charge wurden jeweils 1-5 Lachsproben getestet. Nicht alle Proben innerhalb einer Charge enthalten *Listeria* spp. Die Wahrscheinlichkeit, dass der Keim in einer Charge gefunden wird, steigt mit der Anzahl der getesteten Proben innerhalb einer Charge.

Es gibt verschiedene Faktoren, die das Risiko für die Kontamination einzelner Produktpackungen (Proben) mit *L. monocytogenes* innerhalb einer Charge steigern bzw. minimieren können. Einige davon sind in Abb. 14 dargestellt.

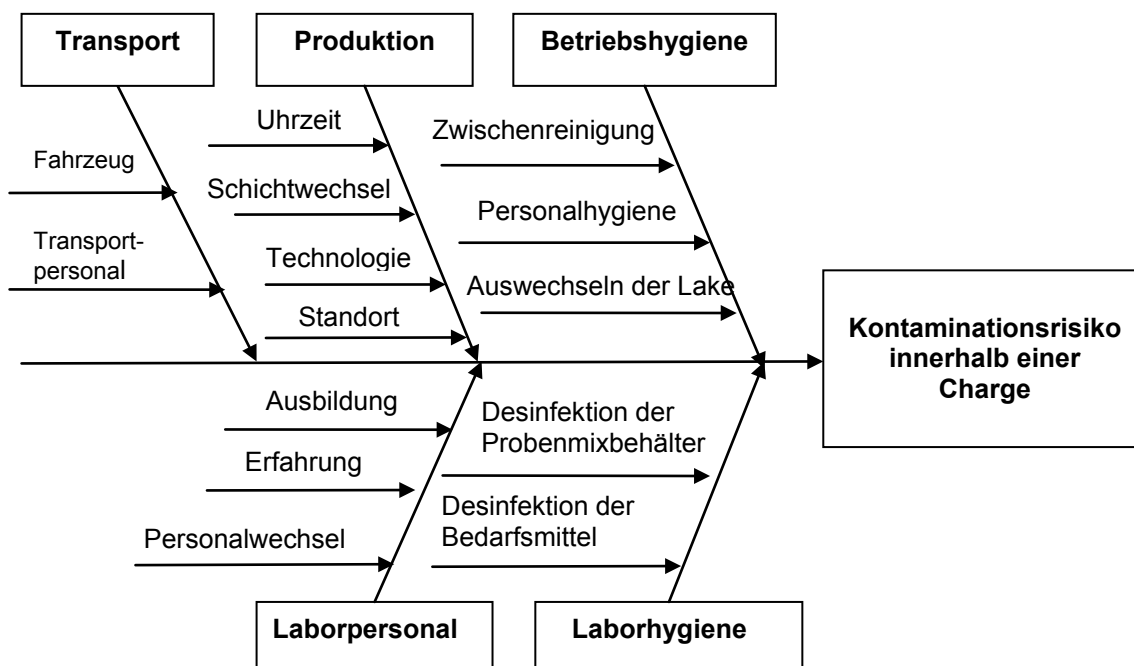


Abb. 14: Faktoren die das Kontaminationsrisiko innerhalb einer Charge beeinflussen

7. Schlussbetrachtung

Laut dieser Studie sind 61,9% der untersuchten Räucherlachsprodukte mit *L. monocytogenes* kontaminiert. Das Risiko einer Kontamination im Herstellungsbetrieb ist damit sehr hoch.

Bevor der Räucherlachs die unmittelbare Kontrolle des Lebensmittelunternehmers verlässt, darf *L. monocytogenes* in 5 mal 25g Proben nicht nachweisbar sein. Der Hersteller muss außerdem gewährleisten, dass während der gesamten Haltbarkeitsdauer ein Grenzwert von 100 KBE/g bei in Verkehr gebrachten Erzeugnissen nicht überschritten wird [ANONYM 4, 2005]. Durch diese Lebensmittelsicherheitskriterien nach VO(EG) 2073/2005 werden hohe Anforderungen an die Sensitivität und Spezifität einer Nachweismethode gestellt.

Die Ergebnisse der Studie beweisen, dass die Untersuchung natürlich kontaminierter Lachsproben eine Herausforderung für alle Detektionsmethoden (ISO 11290-1, VIDAS[®] LDUO - Biomérieux und iQ-Check[™] *Listeria monocytogenes* Kit - Bio-Rad) darstellt. Bei allen Methoden werden falsch-negative Ergebnisse dokumentiert, die von der zu vergleichenden Methode positiv erkannt und bestätigt werden können. Beim Vergleich VIDAS[®] LDUO/ISO 11290-1 haben beide Methoden eine Falsch-negativ-Rate von 30,8%. Beim Vergleich iQ-Check[™] *Listeria monocytogenes* Kit/ISO 11290-1 sind 53,8% falsch-negativ im iQ-Check[™] (7 Proben falsch-negativ), dennoch können zumindest 4 von 25 falsch-positiven iQ-Check[™] Proben als richtig positiv bestätigt werden, und sind daher nach ISO 11290-1 falsch-negativ.

Die niedrige Sensitivität und die damit verbundene hohe Falsch-Negativ-Rate bei den Nachweismethoden könnte durch die Probenahme verursacht worden sein. Jede Probe (mind. 150g) wurde in einem sterilisierten Mixgerät zu einer Lachspaste homogenisiert. Diese wurde in 3 Probenaliquote zu je 50g (3 Methoden) aufgeteilt und jedes Aliquot wurde nochmals geteilt zu 2 x 25g (jede Methode in Doppelbestimmung). Bei besonders niedriger Keimbelastung in der

150g-Probe ist es trotz Homogenisierung unmöglich, diese in 3 gleichwertige 50g-Aliquote aufzuteilen. Befindet sich der Keim beispielsweise nur in zwei 50g-Aliquoten einer positiven Probe, so wird die Probe von der 3. Methode automatisch als falsch-negativ gemessen.

Um das Risiko falsch-negativer Messergebnisse durch ungleiche Keimverteilung in den Proben zu minimieren, könnte man bei der Methodvalidierung von einer 375g-Probe ausgehen und diese in 3 Einheiten zu je 125g pro Nachweismethode teilen, so dass jede Methode 5 mal 25g-Aliquote der Probe misst. Dieser Vorschlag der Probenahme wäre jedoch mit höherem Material- bzw. Kostenaufwand verbunden.

Es wird empfohlen, ein und dieselbe Probe für Referenzmethode und Alternativmethode zu verwenden, um die nachfolgenden Methodenschritte auf Basis ein und derselben Probenanreicherung durchführen zu können. [ANONYM 7, 2003; BEUMER und HAZELEGER, 2003]. Beim Vergleich von ISO 11290-1 und iQ-Check™ *L. monocytogenes* Kit sollte die Untersuchung auf diese Weise erfolgen, da beide Verfahren den 1. Anreicherungsschritt in Halbfraser-Bouillon vorschreiben. Beim Vergleich von ISO 11290-1 und VIDAS® LDUO muss die Probe jedoch geteilt werden, da VIDAS® LDUO eine andere Anreicherungslösung als die Referenzmethode verwendet. Muss die Probe geteilt werden, so schlägt ISO 16140:2003 vor, die doppelte Probenmenge mit derselben Menge an Wasser oder einem geeignetem Verdünnungsmedium zu homogenisieren. Danach wird die Probe in zwei Portionen (für Referenz- bzw. Alternativmethode) geteilt, wobei es bei der 1. selektiven Anreicherung zu beachten gilt, den Verdünnungseffekt (ca. 10%) der homogenisierten Probe zu kompensieren.

Fazit – VIDAS® LDUO vs. ISO 11290-1

Der VIDAS® LDUO stellt sich bei der Untersuchung natürlich kontaminierter Lachsproben als eine der Referenzmethode ISO 11290-1 gleichwertige Alternativmethode heraus. Beide Methoden können in 13 von 63 Proben *L. monocytogenes* nachweisen. Der VIDAS® LDUO hat den Vorteil einer kürzeren Anreicherungszeit (48h) gegenüber der ISO 11290-1 mit insgesamt 72h. Des weiteren kann der VIDAS® LDUO zwischen *L. monocytogenes* und anderen *Listeria* spp. unterscheiden. Dies ist insofern interessant, da das Vorhanden sein von nicht-pathogenen *Listeria* spp. (im speziellen *L. innocua*) auf eine Maskierung von *L. monocytogenes* hindeuten könnte. Dennoch wird nach der VIDAS® Messung eine Bestätigung der präsumtiv positiven Proben vorgeschrieben. Dafür müssen weitere 48h aufgewendet werden, da die Kolonien selbst auf OCLA-Platten nach 24h noch nicht aussagekräftig sind. Bei der Bestätigung besteht die Gefahr, dass trotz *L. monocytogenes*-positivem VIDAS® Signal, auf OCLA nur *L. innocua* wachsen und *L. monocytogenes* maskiert wird. Dies könnte zu falsch-negativen Ergebnissen führen. Andererseits kann durch Bestätigung eines *Listeria* spp. positiven VIDAS® Signals in manchen Fällen doch noch das Vorhandensein von *L. monocytogenes* aufgedeckt werden.

Die kürzere Anreicherungszeit im Vorfeld der Untersuchung, sowie die sofortige Unterscheidung von *L. monocytogenes* und *Listeria* spp. machen den VIDAS® LDUO zu einer attraktiven Nachweismethode für Hersteller von Räucherlachsprodukten. Anhand dieser Studie kann VIDAS® LDUO als eine der ISO 11290-1 gleichwertigen Methode an jene Lebensmittelhersteller empfohlen werden, die ihr Qualitätskontrollsystem schneller und effizienter gestalten möchten.

Auch in der ISO 11290-1 werden auf dem OCLA-Medium *L. monocytogenes* von nicht-pathogenen *Listeria* spp. unterschieden, in dem Bewusstsein, dass *L. monocytogenes* bereits in der Fraseranreicherung von *L. innocua* überwachsen werden kann und infolgedessen auf OCLA maskiert wird. Durch eine Verkürzung der 2. Fraseranreicherung von 48h auf 24h wäre die ISO 11290-1

attraktiver für die industrielle Lebensmitteluntersuchung, diese müsste aber in weiteren Studien mit natürlich kontaminierten Lachsproben untersucht werden. Ein Weglassen der Fraseranreicherung kann durch diese Studienergebnisse nicht unterstützt werden.

Fazit – iQ-Check™ *Listeria monocytogenes* Kit vs. ISO 11290-1

Die Ergebnisse des iQ-Check™ *Listeria monocytogenes* Kits beweisen, dass dieser wesentlich mehr positive Proben detektieren kann als die ISO 11290-1. Die 7 falsch-negativen iQ-Check™ Proben (53,8%) sind als problematisch zu betrachten, denen gegenüber aber wieder mindestens 4 von der ISO 11290-1 falsch-negativ erkannte Proben stehen. Es ist in diesem Fall schwer, die Sensitivitäten der beiden Methoden zu vergleichen, da im iQ-Check™ insgesamt 25 zusätzlich positive Proben gemessen werden. Nimmt man diese 25 zusätzlichen Proben als richtig positiv an, so wäre die Sensitivität des iQ-Checks™ höher als jene der ISO 11290-1. Bei derart unterschiedlichen Methoden wie bei Real-time PCR und kultureller Methode ist es besonders wichtig zu gewährleisten, dass die Keime in den Probenportionen homogen verteilt sind, da sonst die tatsächlichen Messfehler nicht erkannt werden. Es ist aber auch möglich, dass die 24h Anreicherung im Vorfeld der PCR für natürlich kontaminierte Lachsproben nicht ausreicht, um wenige geschädigte Zellen wiederzubeleben. Sind zu wenig Zellen in der Anreicherungsbouillon, so kann die DNA-Extraktion nicht erfolgreich durchgeführt werden, und die Probe wird in der Real-time PCR negativ gemessen. Die Verwendung einer und derselben Probenanreicherung für beide Methoden und ein zusätzlicher 24h Anreicherungsschritt in Fraser-Bouillon im Vorfeld der PCR könnte die Sensitivität des iQ-Check™ *L. monocytogenes* Kits verbessern und einen zuverlässigeren Methodenvergleich mit der ISO 11290-1 ermöglichen. Die „falsch-positiven“ iQ-Check™ Ergebnisse verglichen mit der ISO 11290-1 können durchaus als richtig eingeschätzt werden, da auch NETSCHAJEW et al. (2009) mit dem iQ-Check™ *L. monocytogenes* Kit 64% der untersuchten Fleischproben positiv nachweisen konnten und mit der kulturellen Methode nur 6% der Proben.

Einem Hersteller von Lachsprodukten wird angeraten, mit dem iQ-Check™ *L. monocytogenes* Kit und der ISO 11290-1 eine in-house Validierung durchzuführen, und von ein und derselben Probenanreicherung bei den Methoden auszugehen. Sollten dann noch falsch-negative Ergebnisse auftreten, wäre ein zusätzlicher Anreicherungsschritt von 24h in Fraser-Bouillon empfehlenswert. Dies würde jedoch die Anwendbarkeit in der Lebensmittelindustrie beeinträchtigen.

In Tab. 42 werden die wichtigsten Ergebnisse der einzelnen Nachweismethoden von *L. monocytogenes* zusammengefasst.

Tab. 42: Gegenüberstellung der wichtigsten Ergebniss der einzelnen Methoden

	VIDAS® LDUO	iQ™-Check	ISO 11290-1
Relative Richtigkeit	87,7 %	49,2 %	
Relative Sensitivität	69,2 %	46,2 %	Mit 100% angenommen
Relative Spezifität	92,0 %	50,0 %	Mit 100% angenommen
Positive Proben (<i>L. monocytogenes</i>)	13	31	13

8. Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde die kulturelle Referenzmethode ISO 11290-1 mit dem Immunoassay VIDAS[®] LDUO (Biomérieux, Marcy L'Etoile, France) und dem Real-time PCR Kit iQ-Check[™] *L. monocytogenes* Kit (Bio-Rad, Munich, Germany) in Bezug auf den Nachweis von *L. monocytogenes* in natürlich kontaminiertem Roh- und Räucherlachs verglichen.

Die ISO 11290-1 beinhaltet eine 2-stufige Anreicherung der 25g Lachsproben in Halbraser- (24h, 30°C) und Fraser-Bouillon (48h, 37°C) und anschließendem Ausstrich auf OCLA- und PALCAM-Platten. Die Kolonien wurden mittels Gramfärbung, Oxidase/Katalasetest auf das Vorhandensein von *Listeria* spp., und mittels CAMP-Test (β -Lysin Discs) und API[®] Listeria auf *L. monocytogenes* bestätigt. Der Untersuchung im VIDAS[®] LDUO ging eine 2-stufige Anreicherung der Proben in LX-Bouillon voraus (2 mal 24h, 30°C). Die Bestätigung der präsumtiven *Listeria*-Isolate erfolgte in Anlehnung an die ISO 11290-1 und Messung in der Real-time PCR (iQ-Check[™]). Für die Untersuchung der Lachsproben in der Real-time PCR wurden diese 24h bei 30°C in Halbfraser-Bouillon angereichert und anschließend die DNA aus der Anreicherung extrahiert. Die Messung erfolgte im Rotor-Gene[™] 3000 Thermocycler (Corbett).

Der Methodenvergleich war vermutlich wegen der niedrigen Keimzahlen und der inhomogenen Keimverteilung in den Probenaliquoten schwierig und äußerte sich in niedrigen Sensitivitätswerten. Der VIDAS[®] LDUO stellte sich als eine der ISO 11290-1 gleichwertige Nachweismethode für *L. monocytogenes* in Räucherlachsproben heraus und hat eine Sensitivität von 69,2% und eine Spezifität von 92,0%. Der iQ-Check[™] *L. monocytogenes* Kit hat eine Sensitivität von 46,2% und eine Spezifität von 50% im Vergleich zur ISO 11290-1. Dennoch werden mit dem iQ-Check[™] 25 zusätzlich positive Proben gemessen. Eine andere Ursache für die niedrige Sensitivität des iQ-Check[™] könnte die eventuell zu kurze Probenanreicherung sein. Eine erneute Validierung unter Verwendung der gleichen Probenanreicherung für Referenzmethode und iQ-Check[™] und eventuell zusätzlicher 24h Anreicherung der Proben in Fraser-Bouillon vor der DNA-Extraktion wäre sinnvoll.

9. Summary

In this work, the detectability of *L. monocytogenes* in naturally contaminated raw and smoked salmon was investigated by comparing methods according to ISO 11290-1, VIDAS® LDUO (Biomérieux, Marcy L'Etoile, France) and iQ-Check™ *L. monocytogenes* Kit (Bio-Rad, Munich, Germany).

The ISO 11290-1 comprises a two-step enrichment step in Half-Fraser (24h, 30°C) and Fraser-Broth (48h, 37°C) with subsequent plating on OCLA and PALCAM media. Gram staining and catalase/oxidase testing were carried out in order to select *Listeria* spp. CAMP-test (β -Lysin Discs) and API® *Listeria* were performed to confirm the species *L. monocytogenes*. For the VIDAS® LDUO, LX-broth was used for the analysis after a two-step 24h incubation at 30°C. Confirmation of presumptive *Listeria* colonies was performed according to ISO 11290-1 and in real-time PCR (iQ-Check™ *L. monocytogenes* Kit). For the real-time PCR, salmon samples were enriched in Half-Fraser-broth (24h, 30°C) and DNA was extracted directly from the broth. Real-time PCR was carried out in the Rotor gene™ 3000 (Corbett).

The comparison of methods was very challenging, presumably due to low numbers of *L. monocytogenes* and inhomogeneous distribution within the salmon samples. Hence, only low sensitivity rates could be obtained. VIDAS® LDUO has turned out to be equivalent to the standard method ISO 11290-1, with a sensitivity of 69,2% and a specificity of 92,0%. The iQ-Check™ *L. monocytogenes* Kit had a sensitivity of 46,2% and a specificity of 50%. Nevertheless, 25 positive samples were detected additionally by the iQ-Check™, those who haven't been detected by ISO 11290-1. Another reason for the low sensitivity of the iQ-Check™ could be a too short enrichment time in Half-Fraser. It is suggested to perform a revalidation with the same sample enrichment for the reference method and the iQ-Check™ *L. monocytogenes* Kit and, if necessary, to use an additional enrichment step of 24h at 30°C in Fraser-broth.

10. Literaturverzeichnis

ANONYM 1. KHELEF N., LECUIT M., BUCHRIESER C., CABANES D., DUSSURGET O., COSSART P. *Listeria monocytogenes* and the Genus *Listeria*. In: The Prokaryotes – A Handbook on the Biology of Bacteria (DWORKIN M.) Springer, New York; 2006 4:404-476

ANONYM 2. Nationale Referenzzentrale für Listeriose, AGES Medizinische Mikrobiologie und Hygiene 1096 Wien; Jahresbericht 2008
http://www.bmgfj.gv.at/cms/site/attachments/4/4/2/CH0954/CMS1237532053435/jb_listerien_2008_02.02.09_b.pdfJahresbericht 2008

ANONYM 3. Scientific Opinion of the Panel on Biological Hazards, Request for updating the former SCVPH opinion on *Listeria monocytogenes* risk related to ready-to-eat foods and scientific advice on different levels of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods and the related risk for human illness. The EFSA Journal 2007; 599, 1-42

ANONYM 4. Verordnung (EG) Nr. 2073/2005 der Kommission vom 15. November 2005 über mikrobiologische Kriterien für Lebensmittel. Amtsblatt der Europäischen Union; L338/1-L 338/26

ANONYM 5. ÖNORM EN ISO 11290-1 Ausgabe: 2005-02-01, Mikrobiologie von Lebensmitteln und Futtermitteln – Horizontales Verfahren für den Nachweis und die Zählung von *Listeria monocytogenes*. Teil 1, 2005

ANONYM 6. AFNOR Validation certificate (BIO-12/18-03/06) for the alternative analysis method VIDAS LDUO, 2006

ANONYM 7. ISO 16140 Ausgabe: 2003-05-01, Microbiology of food and animal feeding stuffs – Protocoll for the validation of alternative methods, 2003

ANONYM 8. AFNOR validation following ISO 16140 of IQ-Check *Listeria monocytogenes* method, Summary Report, 2005

ANONMY 9. AOAC INTERNATIONAL Presidential Task Force on Best Practices for Microbiological Methodology, Task Force Report 8-7-06, 2006

ANONYM 10. A successful event: AFNOR Validation Symposium, Brussels, June 19, 2008

AZNAR R., ELIZAQUIVEL P. Reliability of *Listeria monocytogenes* Identification by Specific PCR Assessed by Phenotypic and Genotypic Techniques. Food analytical methods 2008; 1: 243-251

BECKER B., SCHULER S., LOHNEIS M., SABROWSKI A., CURTIS G.D.W., HOLZAPFEL W.H. 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 2006; 109: 127-131

BECKER B., SCHULER S. Schnelldiagnose von *Listeria monocytogenes* in Fleischzeugnissen. Fleischwirtschaft 2007; 7: 103-106

BETTS R. A European approach to validation and certification of rapid microbiological methods (van Amerongen A., Barug D., Wageningen Academic Publishers, Wageningen, Netherlands 2005; 31-38

BEUMER R.R., HAZELEGER W.C. *Listeria monocytogenes*: diagnostic problems. FEMS Immunology and Medical Microbiology 2003; 35: 191-197

BILLE J., CATIMEL B., BANNERMAN E., JACQUET C., YERSIN M.N., CANIAUX I., MONGET D., ROCOURT J. API *Listeria*, a New and Promising One-Day System To Identify *Listeria* Isolates. Applied and Environmental Microbiology 1992; 58: 1857-1860

BORTOLUSSI R. Listeriosis: a primer. Canadian Medical Association Journal 2008; 179: 795-797

BUBERT A., KÖHLER S., GOEBEL W. The Homologous and Heterologous Regions within the *iap* Gene Allow Genus- and Species- Specific Identification of *Listeria* spp. by Polymerase Chain Reaction. Applied and Environmental Microbiology 1992; 58: 2625-2632

BÜLTE M. *Listeria monocytogenes* Band I: Vorkommen, Erkrankungsformen und Diagnostik, B. Behr's Verlag, Hamburg, 2008a, Seiten

BÜLTE M. *Listeria monocytogenes* Band II: Überlebensfähigkeit, Präventionsstrategien und Lebensmittelsicherheit, B. Behr's Verlag, Hamburg, 2008b, Seiten

CANDRIAN U. Polymerase chain reaction in food microbiology. Journal of Microbiological Methods 1995; 23: 89-103

CHAN Y.C., WIEDMANN M. Physiology and Genetics of *Listeria monocytogenes* Survival and Growth at cold temperatures. Critical Reviews in Food Science and Nutrition 2009; 49: 237-253

CHURCHILL R.L.T., LEE H., HALL J.C. Detection of *Listeria monocytogenes* and the toxin listeriolysin O in food. Journal of Microbiological Methods 2006; 64: 141-170

COSSART P. Listeriology (1926-2007): the rise of a model pathogen. Microbes and Infection 2007; 9: 1143-1146

COSSART P., TOLEDO-ARANA A. *Listeria monocytogenes*, a unique model in infection biology: an overview. Microbes and Infection 2008; 10: 1041-1050

CURIALE M.S., LEWUS C. Detection of *Listeria monocytogenes* in samples containing *Listeria innocua*. Journal of Food Protection 1994; 57: 1048-1051

CURTIS G.D.W., MITCHELL R.G., KING A.F., GRIFFIN E.J. A selective differential medium for the isolation of *Listeria monocytogenes*. Letters in Applied Microbiology 1989; 8: 95-98

DALGAARD P., JØRGENSEN L.V. Predicted and observed growth of *Listeria monocytogenes* in seafood challenge tests and in naturally contaminated cold-smoked salmon. International Journal of Food Microbiology 1998; 40: 105-115

DEBEVERE J., UYTENDAELE M. Validating detection techniques. In: Detecting pathogens in food (McMeekin T.A.). Woodhead Publishing Limited, Cambridge, 2003; 69-92

DREVETS D.A., BRONZE M.S. *Listeria monocytogenes*: epidemiology, human disease, and mechanisms of brain invasions. FEMS Immunology and Medical Microbiology 2008; 53: 151-165

DUARTE G., VAZ-VELHO M., CAPELL C., GIBBS P. Efficiency of four secondary enrichment protocols in differentiation and isolation of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes* from smoked fish processing chains. International Journal of Food Microbiology 1999; 52: 163-168

DUPONT C., AUGUSTIN J-C. Influence of stress on single cell lag time and growth probability of *Listeria monocytogenes* in half Fraser broth. Applied Environmental microbiology; published online ahead of print on 20 March 2009

ERICSSON H., EKLÖW A., DANIELSSON-THAM M.-L., LONCAREVIC S., MENTZING L.O., PERSSON I., UNNERSTAD H., THAM W. An Outbreak of Listeriosis Suspected to Have Been Caused by Rainbow Trout. Journal of Clinical Microbiology 1997; 35: 2904-2907

FAIRCHILD A, LEE M.D., MAURER J.J. PCR Basis. In: PCR Methods in Foods (Maurer J.). Springer Science and Business Media, New York, 2006; 1-25

FARBER J.M., PETERKIN P.I. *Listeria monocytogenes*, a Food-Borne Pathogen. Microbiological Reviews 1991; 55: 476-511

FELDSINE P., ABEYTA C., ANDREWS W.H. AOAC INTERNATIONAL Methods Committee Guidelines for Validation of Qualitative and Quantitative Food Microbiological Official Methods of Analysis. Journal of AOAC International 2002; 85: 1187-1200

FRASER J.A., SPERBER W.H. Rapid detection of *Listeria* spp. in food and environmental samples by esculin hydrolysis. Journal of Food Protection 1988; 51: 762-765

GANGAR V., CURIALE M.S., D'ONORIO A., SCHULTZ A. VIDAS® Enzyme-Linked Immunofluorescent Assay for Detection of *Listeria* in Foods: Collaborative Study. Journal of AOAC International 2000; 83: 903-918

GASANOV U., HUGHES D., HANSBRO P.M. Methods for the isolation and identification of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes*: a review. FEMS Microbiology Reviews 2005; 29: 851-875

GOLDSTEYN THOMAS E.J., KING R.K., BURCHAK J., GANNON V.P.J. Sensitive and Specific Detection of *Listeria monocytogenes* in Milk and Ground Beef with the Polymerase Chain Reaction. Applied and Environmental Microbiology 1991; 57: 2576-2580

GNANOU BESSE N., AUDINET N., KÉROUANTON A., COLIN P., KALMOKOFF M. Evolution of *Listeria* populations in food samples undergoing enrichment culturing. International Journal of Food Microbiology 2005; 104: 123-134

GRAVES L.M., HELSEL L.O., STEIGERWALT A.G., MOREY R.E., DANESHVAR M.I., ROOF S.E., ORSI R.H., FORTES E.D., MILLILO S.R., den BAKKER H.C., WIEDMANN M., SWAMINATHAN B., SAUDERS B.D. *Listeria marthii* sp. nov., isolated from the natural environment, Finger Lakes National Forest. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 2009; 11: Published online ahead of Print on 10 August 2009 <http://ijs.sgmjournals.org/cgi/content/abstract/ijs.0.014118-0v1>

GREENWOOD M., WILLIS C., DOSWELL P., ALLEN G., PATHAK K. Evaluation of chromogenic media for the detection of *Listeria species* in food. Journal of Applied Microbiology 2005; 99: 1340-1345

HOORFAR J., COOK N. Critical Aspects of Standardization of PCR. In: PCR Detection of Microbial Pathogens (Sachse, K.; Frey, J.). Humana Press, Totowa, New Jersey, 2003; 51-64

HÜBNER P., GAUTSCH S., JEMMI T. In house-Validierung mikrobiologischer Prüfverfahren. Mitteilungen aus Lebensmitteluntersuchung und Hygiene 2002; 93: 118-139

JANZTEN M.M., NAVAS J., CORUJO A., MORENO R., LÓPEZ V., MARTINEZ-SUÁREZ J.V. Review. Specific detection of *Listeria monocytogenes* in foods using commercial methods: from chromogenic media to real-time PCR. Spanish Journal of Agricultural Research 2006; 4: 235-247

KACLÍKOVÁ E., PANGALLO D., DRAHOVSKÁ H., ORAVCOVÁ K., KUČHTA T. Detection of *Listeria monocytogenes* in food, equivalent to EN ISO 11290-1 or ISO 10560, by a three-days polymerase chain reaction-based method. Food Control 2003; 14: 175-179

LAPPI V.R., HO A., GALL K., WIEDMANN M. Prevalence and Growth of *Listeria* on Naturally Contaminated Smoked Salmon over 28 Days of Storage at 4°C. Journal of Food Protection 2004; 67: 1022-1026

LI Y., ZHOU X., YE D. Molecular beacons: An optimal multifunctional biological probe. Biochemical and Biophysical Research Communications 2008; 373: 457-461

LIMING S.H., ZHANG Y., MENG J., BHAGWAT A.A. Detection of *Listeria monocytogenes* in Fresh Produce Usin Molecular Beacon-Real-time PCR Technology. Journal of Food Science 2004; 69: M240-M245

LIU D. Identification, subtyping and virulence determination of *Listeria monocytognes*, an important foodborne pathogen. Journal of Medical Microbiology 2006; 55: 645-659

LIU D., LAWRENCE M.L., AINSWORTH A.J., AUSTIN F.W. Toward an improved laboratory definition of *Listeria monocytogenes* virulence. International Journal of Food Microbiology 2007; 118: 101-115

MACAY I.M. Real-time PCR in the microbiology laboratory. Clinical Microbiology and Infection 2004; 10: 190-212

MacDONALD F., SUTHERLAND A.D. Important differences between the generation times of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* in two *Listeria* enrichment broths. Journal of Dairy Research 1994; 61: 433-436

MALORNY B., TASSIOS P.T., RADSTRÖM P., COOK N., WAGNER M., HOORFAR J. Standardization of diagnostic PCR for the detection of food pathogens. International Journal of Food Microbiology 2003; 83: 39-48

MAURER J.J. The Mythology of PCR: A Warning to the Wise. In: PCR Methods in Foods (Maurer J.). Springer Science and Business Media, New York, 2006; 27-40

McLAUCHLIN J., MITCHELL R.T., SMERDON W.J., JEWELL K. *Listeria monocytogenes* and listeriosis: a review of hazard characterisation for use in microbiological risk assessment of foods. International Journal of Food Microbiology 2004; 92: 15-33

MIETTINEN M.K., SIITONEN A., HEISKANEN P., HAAJANEN H., BJÖRKROTH K.J., KORKEALA H.J. Molecular Epidemiology of an Outbreak of Febrile Gastroenteritis Caused by *Listeria monocytogenes* in Cold-Smoked Rainbow Trout. Journal of Clinical Microbiology 1999; 37: 2358-2360

NETSCHAJEW A., FREDRIKSSON-AHOMAA M., SPERNER B., STOLLE A. Detection of *Listeria monocytogenes* in vacuum-packed meat products using real-time PCR, Immunoassay and culturing. Archiv für Lebensmittelhygiene 2009; 60: 12-17

NEWTON C.R., GRAHAM A. PCR, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford, 1994, 20-29

NIEDERHAUSER C., CANDRIAN U., HÖFELEIN C., JERMINI M., BÜHLER H.P., LÜTHY J. Use of polymerase chain reaction for detection of *Listeria monocytogenes* in food. Applied Environmental Microbiology 1992; 58: 1564-1568

NOTERMANS S., WERNARS K. Immunological methods for detection of foodborne pathogens and their toxins. International Journal of Food Microbiology 1991; 12: 91-102

O'GRADY J., SEDANO-BALBÁS S., MAHER M., SMITH T., BARRY T. Rapid real-time PCR detection of *Listeria monocytogenes* in enriched food samples based on the *ssrA* gene, a novel diagnostic target. Food Microbiology 2008; 25: 75-84

O'GRADY J. RUTTLEDGE M., SEDANO-BALBÁS S., SMITH T.J., BARRY T. MAHER M. Rapid detection of *Listeria monocytogenes* in food using culture enrichment combined with real-time PCR. Food Microbiology 2009; 26: 4-7

ORAVCOVÁ K., TRNČÍKOVÁ T., KUČHTA T., KACLÍKOVÁ E. Limitation in the detection of *Listeria monocytogenes* in food in the presence of competing *Listeria innocua*. Journal of Applied Microbiology 2008; 104: 429-437

PAINTER J., SLUTSKER L. Listeriosis in Humans. In: Listeria, Listeriosis, and Food Safety 3rd edition (Ryser E.T, Marth E.H.). Taylor & Francis Group, Boca Raton, 2007; 88

PEIRIS I.P., LOPEZ-VALLADARES G., PARIHAR V.S., HELMERSSON S., BARBUDDHE S., THAM W., DANIELSSON-THAM M. Gravad (Gravlax) and cold-smoked salmon, still a potential source of listeriosis. Journal of foodservice 2009; 20: 15-20

PETTRAN R.L., SWANSON K.M.J. Simultaneous growth of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua*. Journal of Food Protection 1993; 56: 616-618

PORSBY C.H., FONNESBECH VOGEL B., MOHR M., GRAM L. Influence of processing steps in cold-smoked salmon production on survival and growth of persistent and presumed non-persistent *Listeria monocytogenes*. International Journal of Food Microbiology 2008; 122: 287-295

RAMASWAMY V., CRESENCE V.M., REJITHA J.S., LEKSHMI M.U., DHARSANA K.S., PRASAD S.P., VIJILA H.M. *Listeria* – review of epidemiology and pathogenesis. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection* 2007; 40: 4-13

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

ROCOURT J., BUCHRIESER C. The Genus *Listeria* and *Listeria monocytogenes*: Phylogenetic position, Taxonomy and Identification. In: *Listeria, Listeriosis, and Food Safety 3rd edition* (Ryser E.T, Marth E.H.). Taylor & Francis Group, Boca Raton, 2007; 1-20

ROLA J.G., KORPYSA-DZIRBA W., WOJTÓN B. Detection of *Listeria monocytogenes* in Powdered Milk by VIDAS LMO 2 – Collaborative Study. *Journal of Rapid Methods & Automation in Microbiology* 2006; 14: 362-368

RØRVIK M.L. *Listeria monocytogenes* in the smoked salmon industry. *International Journal of Food Microbiology* 2000; 62: 183-190

SANCHEZ S. Making PCR a Normal Routine of the Food Microbiology Lab. In: *PCR Methods in Foods* (Maurer J.). Springer Science and Business Media, New York, 2006; 51-68

SCHUCHAT A., SWAMINATHAN B., BROOME C.V. Epidemiology of Human Listeriosis. *Clinical Microbiology Reviews* 1991; 4: 169-183

SCOTTER S.L., LANGTON S., LOMBARD B., SCHULTEN S., NAGELKERKE N., IN'T VELD P.H., ROLLIER P., LAHELLEC C. Validation of ISO method 11290 Part 1 – Detection of *Listeria monocytogenes* in foods. *International Journal of Food Microbiology* 2001; 62: 295-306

SEWELL A.M., WARBURTON D.W., BOVILLE A., DALEY E.F., MULLEN K. The development of an efficient and rapid enzyme linked fluorescent assay method for the detection of *Listeria* spp. from foods. International Journal of Food Microbiology 2003; 81: 123-129

SILBERNAGEL K.M., CARVER CH.N., JECHOREK R.P., JOHNSON R.L. Evaluation of VIDAS *Listeria monocytogenes* II (LMO2) Immunoassay Method for the Detection of *Listeria monocytogenes* in Foods: Collaborative Study. Journal of AOAC International 2004; 87: 1123-1132

SIMON M.C., GRAY D.I., COOK N. DNA Extraction and PCR Methods for the Detection of *Listeria monocytogenes* in Cold-Smoked Salmon. Applied and Environmental Microbiology 1996; 62: 822-824

STESSL B., LUF W., WAGNER M., SCHODER D. Performance testing of six chromogenic ALOA-type media for the detection of *Listeria monocytogenes*. Journal of Applied Microbiology 2009; 106: 651-659

SWAMINATHAN B., GERNER-SMIDT P. The epidemiology of human listeriosis. Microbes and Infection 2007; 9: 1236-1243

VÁZQUEZ-BOLAND J.A., KUHN M., BERCHE P., CHAKRABORTY T., DOMÍNGUEZ-BERNAL G., GOEBEL W., GONZÁLEZ-ZORN B., WEHLAND J., KREFT J. *Listeria* Pathogenesis and Molecular Virulent Determinants. Clinical Microbiology Reviews 2001; 14: 584-640

VAZ-VELHO M., DUARTE G., GIBBS P. Evaluation of mini-VIDAS rapid test for detection of *Listeria monocytogenes* from production lines of fresh to cold-smoked fish. Journal of Microbiological Methods 2000; 40: 147-151

VLAEMYNCK G., LAFARGE V., SCOTTER S. Improvement of the detection of *Listeria monocytogenes* by the application of ALOA, a diagnostic, choromogenic isolation medium. Journal of Applied Microbiology 2000; 88: 430-441

WAGNER M., AUER B., TRITTREMMEL C., HEIN I., SCHODER D. Survey on the *Listeria* Contamination of Ready-to-Eat Food Products and Household Environments in Vienna, Austria. Zoonoses and Public Health 2007; 54: 16-22

WILLIS C., BAALHAM T., GREENWOOD M., PRESLAND F. Evaluation of a new chromogenic agar for the detection of *Listeria* in food. Journal of Applied Microbiology 2006; 101: 711-717

11. Anhang

11.1 Ursprung der *Listeria* Isolate

Isolat Nr.	Ursprung
1	Grundwasser aus Betrieb Austria
2	Grundwasser aus Betrieb Austria
3	Grundwasser aus Betrieb Austria
4	Grundwasser aus Betrieb Austria
5	Räucherlachs (Ready to eat) Betrieb Austria
6	Räucherlachs (Ready to eat) Betrieb Austria
7	Räucherlachs (Ready to eat) Betrieb Austria
8	Räucherlachs (Ready to eat) Betrieb Austria
9	Räucherlachs (Ready to eat) Betrieb Austria
10	Räucherlachs (Ready to eat) Betrieb Austria
11	Räucherlachs (Ready to eat) Betrieb Austria
12	Räucherlachs (Ready to eat) Betrieb Austria
13	Räucherlachs (Ready to eat) Betrieb Austria
14	Räucherlachs (Ready to eat) Betrieb Austria
15	Räucherlachs (Ready to eat) Betrieb Austria
16	Räucherlachs (Ready to eat) Betrieb Austria
17	Räucherlachs (Ready to eat) Betrieb Austria
18	Räucherlachs (Ready to eat) Betrieb Austria
19	Räucherlachs (Ready to eat) Betrieb Austria
20	Räucherlachs (Ready to eat) Betrieb Austria
21	Räucherlachs (Verarbeitung) Betrieb Austria
22	Räucherlachs (Verarbeitung) Betrieb Austria
23	Räucherlachs (Verarbeitung) Betrieb Austria
24	Räucherlachs (Verarbeitung) Betrieb Austria
25	Räucherlachs (Verarbeitung) Betrieb Austria
26	Räucherlachs (Verarbeitung) Betrieb Austria
27	Räucherlachs (Verarbeitung) Betrieb Austria
28	Räucherlachs (Verarbeitung) Betrieb Austria
29	Räucherlachs (Verarbeitung) Betrieb Austria
30	Räucherlachs (Verarbeitung) Betrieb Austria
31	Räucherlachs (Verarbeitung) Betrieb Austria
32	Räucherlachs (Verarbeitung) Betrieb Austria
33	Räucherlachs (Verarbeitung) Betrieb Austria
34	Räucherlachs (Verarbeitung) Betrieb Austria
35	Räucherlachs (Verarbeitung) Betrieb Austria
36	Räucherlachs (Verarbeitung) Betrieb Austria
38	Räucherlachs (Verarbeitung) Betrieb Austria
39	Räucherlachs (Verarbeitung) Betrieb Austria
40	Räucherlachs (Verarbeitung) Betrieb Austria
41	Räucherlachs (Verarbeitung) Betrieb Austria
42	Räucherlachs (Verarbeitung) Betrieb Austria
43	Räucherlachs (Verarbeitung) Betrieb Austria
44	Räucherlachs (Verarbeitung) Betrieb Austria

Isolat Nr.	Ursprung
44	Räucherlachs (Verarbeitung) Betrieb Austria
kl.K.	
45	Räucherlachs (Verarbeitung) Betrieb Austria
46	Räucherlachs (Verarbeitung) Betrieb Austria
47	Räucherlachs (Verarbeitung) Betrieb Austria
48	Räucherlachs (Verarbeitung) Betrieb Austria
49	Räucherlachs (Verarbeitung) Betrieb Austria
50	Räucherlachs (Verarbeitung) Betrieb Austria
51	Räucherlachs (Verarbeitung) Betrieb Austria
52-	Räucherlachs (Verarbeitung) Betrieb Austria
52+	Räucherlachs (Verarbeitung) Betrieb Austria
69	Räucherlachs (Supermarktprobe)
70	Räucherlachs (Supermarktprobe)
72	Räucherlachs (Supermarktprobe)
72 h.K.	Räucherlachs (Supermarktprobe)
74	Räucherlachs (Supermarktprobe)
75	Räucherlachs (Supermarktprobe)
76	Räucherlachs (Supermarktprobe)
77	Räucherlachs (Supermarktprobe)
78_1	Räucherlachs (Supermarktprobe)
78_2	Räucherlachs (Supermarktprobe)
80	Räucherlachs (Supermarktprobe)
81	Räucherlachs (Supermarktprobe)
82	Räucherlachs (Supermarktprobe)
84	Räucherlachs (Supermarktprobe)
88	Schuhe/ Slicerabteilung Betrieb Austria
90	Handschuhe Abstrich Betrieb Austria
91+	Räucherlachs (Verarbeitung) Betrieb Austria
91-	Räucherlachs (Verarbeitung) Betrieb Austria
93	Räucherlachs (Verarbeitung) Betrieb Austria
93	Räucherlachs (Verarbeitung) Betrieb Austria
WMK	
98	Räucherlachs (Verarbeitung) Betrieb Austria
101	roher Lachs (Verarbeitung) Betrieb NL - AT
102	roher Lachs (Verarbeitung) Betrieb NL - AT
103	roher Lachs (Verarbeitung) Betrieb NL - AT
104	roher Lachs (Verarbeitung) Betrieb NL - AT
105	Räucherlachs (Supermarktprobe)
106	roher Lachs (Verarbeitung) Betrieb NL - AT
107	roher Lachs (Verarbeitung) Betrieb NL - AT
110	Räucherlachs (Supermarktprobe)
111	Räucherlachs (aus Betrieb für Supermarkt)
112	Räucherlachs (aus Betrieb für Supermarkt)
115	undefinierte Probe
116	Gravad Lachs (Ready to eat) Betrieb Dänemark
117	Gravad Lachs (Ready to eat) Betrieb Dänemark
118	Gravad Lachs (Ready to eat) Betrieb Dänemark
120	Räucherlachs (Ready to eat) Betrieb Dänemark
121	Räucherlachs (Ready to eat) Betrieb Dänemark
122	Räucherlachs (Ready to eat) Betrieb Dänemark
123	Räucherlachs (Ready to eat) Betrieb Dänemark
126	Räucherlachs (Ready to eat) Betrieb Austria
127	Räucherlachs (Ready to eat) Betrieb Austria
128	Räucherlachs (Ready to eat) Betrieb Austria

Isolat Nr.	Ursprung
129	Räucherlachs (Ready to eat) Betrieb Austria
130	Räucherlachs (Ready to eat) Betrieb Austria
131	Räucherlachs (Ready to eat) Betrieb Polen
132	Räucherlachs (Ready to eat) Betrieb Polen
133	Räucherlachs (Verarbeitung) Betrieb Austria
134	Räucherlachs (Verarbeitung) Betrieb Austria
135	roher Lachs (Verarbeitung) Betrieb NL - AT
136	roher Lachs (Verarbeitung) Betrieb NL - AT
137	Räucherlachs (Ready to eat) Betrieb Austria
138	Räucherlachs (Ready to eat) Betrieb Polen
139	Räucherlachs (Ready to eat) Betrieb Polen
140	Räucherlachs (Ready to eat) Betrieb Polen
141	Räucherlachs (Ready to eat) Betrieb Polen
142	Räucherlachs (Ready to eat) Betrieb Polen
143	Räucherlachs (Ready to eat) Betrieb Polen
145	Räucherlachs (Ready to eat) Betrieb Dänemark
146	Räucherlachs (Ready to eat) Betrieb Dänemark
147	Räucherlachs (Ready to eat) Betrieb Dänemark
148	Räucherlachs (Ready to eat) Betrieb Dänemark

Curriculum Vitae

Name	Isolde Ebersdorfer
Nationalität	Österreich
Geburtsdatum	1. Mai 1981
Geburtsort	Eisenstadt, Österreich

Ausbildung

03 2001 - 09 2009	Ernährungswissenschaften - Life Science, Universität Wien
02 2006 - 06 2006	Auslandssemester an der University of Queensland, Australien
09 1995 - 06 2000	Höhere Bundeslehranstalt für Wirtschaft, Neusiedl/See
09 1991 - 07 1995	Gymnasium, Neusiedl/See
09 1987 - 07 1991	Volksschule St. Andrä/Zicksee

Berufliche Tätigkeit

07 2007-11 2008	AKA Technology GmbH (Mikrobiologische Wirkstoffprüfung von Bioziden)
-----------------	--

Praktika

02/03 2007	Wojnar's Wiener Leckerbissen Delikatessenerzeugung, GmbH (Qualitätskontrolle)
09-11 2006	Food Science Australia, Sydney (Mikrobiologie)
08 2004	Dept. f. LM-Wissenschaften und -technologie, BOKU Wien (Mikrobiologie und LM-Analytik)
04 2004	Hygieneinstitut, Uni Wien (Mikrobiologie)
07 2002	Institut für Hygiene und Technologie der Lebensmittel, München (Mikrobiologie, Chemie)