

Aus dem Department für Nutztiere und
öffentliches Gesundheitswesen in der Veterinärmedizin
der Veterinärmedizinischen Universität Wien
(Departmentsprecher: Univ.-Prof. Dr. med. vet. Michael HESS)
Institut für Lebensmittelsicherheit, Lebensmitteltechnologie
und öffentliches Gesundheitswesen in der Veterinärmedizin
Abteilung für Lebensmittelmikrobiologie

Kulturbasierter Nachweis von *Listeria monocytogenes* und *Salmonella* spp. in der Schweine-Schlachtkette

Diplomarbeit
zur Erlangung der Würde einer
MAGISTRA MEDICINAE VETERINARIAE
der Veterinärmedizinischen Universität Wien

Vorgelegt von
Svenja Fleischmann

Wien, im Oktober 2020

Betreuer/in

Dr. med. vet. Beatrix Steßl

Department für Nutztiere und öffentliches Gesundheitswesen in der Veterinärmedizin der Veterinärmedizinischen Universität Wien

Institut für Lebensmittelsicherheit, Lebensmitteltechnologie und öffentliches Gesundheitswesen in der Veterinärmedizin, Abteilung für Lebensmittelmikrobiologie

Begutachter/in

Ao.Univ.-Prof. Dipl.ECVPH Dr.med.vet. Peter Paulsen

Department für Nutztiere und öffentliches Gesundheitswesen in der Veterinärmedizin der Veterinärmedizinischen Universität Wien

Institut für Lebensmittelsicherheit, Lebensmitteltechnologie und öffentliches Gesundheitswesen in der Veterinärmedizin, Abteilung für Hygiene und Technologie von Lebensmitteln

ABKÜRZUNGEN

%	Prozent
°C	Grad Celsius
μl	Mikroliter
μM	Mikrometer
ADH	Arginin Dehydrolase
AM	Alternativmethode
API	Analytic Profile Index
a _w	Wasseraktivität
BHI	Brain Heart Infusion
bp	Basenpaare
BPW	Gepuffertes Peptonwasser
bzw.	beziehungsweise
CAMP	Christie-Atkins-Munch-Peterson
CCS	carcass-contact surface
CDC	US Center for Disease Control and Prevention
cgMLST	Core genome MLST
CRISPR	Clustered Regular Interspaced Short Palindromic Repeats
CT	Cluster type
D-Wert	durchschnittliche dezimale Reduktionszeit
DEPC	Diethylpyrocarbonate
DNA	Deoxyribonucleic acid
<i>E.</i>	<i>Escherichia</i>
ECDC	European Center for Disease Prevention and Control
EFSA	European Food Safety Authority
EG	Europäisches Gesetz
e.g.	Exempli gratia (zum Beispiel)
EHEC	Enterohämorrhagische <i>E. coli</i>
EU	Europäische Union
FDA	US Food and Drug Administration
FFoQSI	Feed and Food Quality Safety and Innovation
For	forward
g	Gramm
h	Stunde(n)
H ₂ S	Schwefelwasserstoff

HUS	Hämolytisch-urämisches Syndrom
IMS	Immunomagnetische Separation
ISO	Internationale Organisation für Standardisierung
KbE	Kolonie bildende Einheit(en)
kg	Kilogramm
L.	Listeria
LAMP	Loop-mediated isothermal amplification
LDC	Lysin Decarboxylase
LEE	Locus of enterocyte effacement
Log	Logarithmus
M	Mol
MALDI-TOF MS	matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry
mg	Milligramm
min	Minuten
MKTTn	Müller-Kauffmann Tetrathionate-Novobiocin Bouillon
ml	Milliliter
mM	Millimol
MLVA	Multiple Locus Variable-number Tandem Repeat Analysis
MLST	Multilocus Sequenz Typisierung
MRSV	modified semi-solid Rappaport-Vassiliadis
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NCCS	non-carcass contact surface
OD	Optic density
ODC	Ornithin Decarboxylase
ONT	Oxford Nanopore Technologies
PE	personalassozierte Proben
pH	pH-Wert
PCPLC	Phosphotidylcholin-Phospholipase C
PCR	Polymerase-Chain Reaction
PIPLC	Phosphotidylinositol-Phospholipase C
PrfA	Listeriolysin regulatory protein
RASFF	Rapid Alert System for Food and Feed
rcf	Relative centrifugal force
REV	revers
RFLP	Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus
RM	Referenzmethode
rRNA	Ribosomale Ribonucleic acid
RVS	<i>Rappaport-Vassiliadis</i> Anreicherung

S.	Salmonella
sec/sek	Sekunde(n)
SLB	Sample Loading Buffer
SNP	Single nucleotid polymorphismus
spp.	species pluralis
STEC	Shiga-Toxin bildende E. coli
TBE	Trishydroxymethylaminomethan-Borat-EDTA
Tris HCl	Trishydroxymethylaminomethan Hydrochlorid
TSA-Y	Trypton-Soja mit 6 % Hefe
u. a.	unter anderem
US	United States
μl	Mikroliter
μM	Mikromol
UV	Ultraviolett
V	Volt
VBNC	viable but not culturable
WGS	whole genome sequencing
z. B.	zum Beispiel
XLD	Xylose-Lysin-Desoxycholate-

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: RASFF Meldungen über lebensmittelbedingte Erkrankungen durch <i>Salmonella</i> und <i>Listeria monocytogenes</i> in Fleisch und Fleischprodukten außer Geflügelfleisch im Zeitrahmen 2010-2020.	16
Tabelle 2: Reihenfolge (1-5) der Top-5 <i>Salmonella</i> -Serovar Belastung bei Nutztieren und den assoziierten Lebensmitteln.....	18
Tabelle 3: Lebensmittelsicherheitskriterien (<i>Listeria monocytogenes</i> und <i>Salmonella</i>) & Prozesshygienekriterien (<i>Salmonella</i>) nach Verordnung EG Nr. 2073/2005.	22
Tabelle 4: Zusammensetzung des Brilliance <i>Listeria</i> Agars, modifizierter Listerien Agar nach Ottaviani und Agosti (ALOA Agar).	32
Tabelle 5: Zusammensetzung des Xylose-Lysine-Deoxycholate (XLD)-Agars.....	34
Tabelle 6: Auswertung <i>Enterobacteriaceae</i> API 20E (bioMerieux).	36
Tabelle 7: Primer für die Multiplex-PCR zur Listerien-Speziesidentifizierung (<i>iap</i> Gen).	38
Tabelle 8: Mastermixzusammensetzung für die Multiplex-PCR zur Listerien-Speziesidentifizierung (<i>iap</i> Gen)...	38
Tabelle 9: PCR-Cyclereinstellung für die Multiplex-PCR zur Listerien-Speziesidentifizierung (<i>iap</i> Gen).....	39
Tabelle 10: Mastermixzusammensetzung für die <i>invA</i> PCR.	40
Tabelle 11: PCR-Cyclereinstellung für Multiplex-PCR.	40
Tabelle 12: Primer für die Multiplex-PCR zur Serogroup-Differenzierung von <i>L. monocytogenes</i> (DOUMITH et al., 2004).	41
Tabelle 13: Zusammensetzung des Mastermix für die Multiplex-PCR zur Serogroup-Differenzierung von <i>L. monocytogenes</i>	42
Tabelle 14: PCR-Cyclereinstellung für Serovar-PCR.	42
Tabelle 15: Zusammensetzung des Enzymmixes für den <i>L. monocytogenes</i> Restriktionsverdau.....	44
Tabelle 16: Zusammensetzung des Enzymmixes für den <i>Salmonella</i> spp. Restriktionsverdau.	45
Tabelle 17: Probenahmeorte der <i>Listeria</i> spp. positiven Proben (Ort, Spezies, Probenanzahl).	50
Tabelle 18: <i>Listeria</i> spp. positive Wischproben nach ISO 11290-1.....	54
Tabelle 19: <i>L. monocytogenes</i> (tw. gemischt mit anderen Spezies) positive Wischproben nach ISO 11290-1. ...	57
Tabelle 20: <i>Salmonella</i> spp. positive Wischproben nach ISO 6579-1.....	59
Tabelle 21: <i>L. monocytogenes</i> Puls-Feld-Gelelektrophorese (PFGE) (n= 86) isoliert.	60

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Meldungen bezüglich pathogener Mikroorganismen in der Kategorie Fleisch und Fleischprodukte (außer Geflügelfleisch) laut RASFF Portal (Zeitrahmen 2010 - 2020).	19
Abbildung 2: Isolierung und Detektion von <i>L. monocytogenes</i> und <i>Listeria</i> spp. aus Wischproben (ISO 11290-1). Abkürzungen: ALOA, Agar <i>Listeria</i> nach Ottaviani und Agosti.	31
Abbildung 3: Isolierung und Detektion von <i>Salmonella</i> spp. aus Wischproben (ISO 6579).	33
Abbildung 4: Verteilung der am Schlachthof A gewonnenen Proben (Anzahl; Prozent).	46
Abbildung 5: Verteilung der Probenentnahme im Zerlegebetrieb B (Anzahl; Prozent).	47
Abbildung 6: Verteilung (Anzahl, Prozent) der Speziesergebnisse im Schlachthof A.	48
Abbildung 7: Verteilung (Anzahl, Prozent) der Speziesergebnisse im Zerlegebetrieb B.....	49

INHALT

1. EINLEITUNG	9
1.1. CHARACTERISTIKA VON <i>SALMONELLA</i> SPP.....	9
1.2. CHARACTERISTIKA VON <i>LISTERIA</i> SPP.....	11
1.3. RESERVOIR, INZIDENZ UND AUSBRÜCHE VERURSACHT DURCH <i>SALMONELLA</i> UND <i>LISTERIA MONOCYTOGENES</i>	13
1.4. VORKOMMEN VON <i>SALMONELLA</i> UND <i>LISTERIA</i> IN DER LEBENSMITTELPRODUKTION	18
1.5. GESETZLICHE GRUNDLAGEN	20
1.6. DIAGNOSTIK.....	24
1.7. ZIEL DER STUDIE.....	29
2. MATERIAL & METHODEN	29
2.1. GERÄTE UND MATERIALIEN	29
2.2. PROBENNAHME	30
2.3. MIKROBIOLOGISCHE UNTERSUCHUNG - <i>LISTERIA</i> SPP.....	31
2.4. MIKROBIOLOGISCHE UNTERSUCHUNG- <i>SALMONELLA</i> SPP.....	33
2.5. MOLEKULARBIOLOGISCHE CHARAKTERISIERUNG	36
2.5.1. EXTRAKTION DER BAKTERIELLEN DNA MIT CHELEX RESIN®	36
2.5.2. <i>LISTERIA</i> SPP. PCR SPEZIESBESTÄTIGUNG.....	37
2.5.3. <i>SALMONELLA</i> SPP. PCR BESTÄTIGUNG	39
2.5.4. <i>LISTERIA MONOCYTOGENES</i> SEROGROUP PCR	40
2.5.5. GELELEKTROPHORESE.....	42
2.5.6. SUBTYPISIERUNG VON <i>LISTERIA MONOCYTOGENES</i> UND <i>SALMONELLA</i> SPP. MITTELS PULS-FELD-GELELEKTROPHORESE (PFGE)	43
3. RESULTATE	46
3.1. <i>LISTERIA</i> SPP UND <i>L. MONOCYTOGENES</i> DETEKTION IN OBERFLÄCHENPROBEN	46
3.2. <i>SALMONELLA</i> SPP. DETEKTION IN OBERFLÄCHENPROBEN.....	59
3.3. SUPTYPISIERUNG MITTELS PULS-FELD-GELELEKTROPHORESE (PFGE)	59
4. DISKUSSION	62

5.	ZUSAMMENFASSUNG	68
6.	EXTENDED SUMMARY	70
7.	LITERATURVERZEICHNIS.....	72
8.	DANKSAGUNG	81
9.	APPENDIX	82

1. EINLEITUNG

1.1. CHARACTERISTIKA VON *SALMONELLA* SPP.

Der Genus *Salmonella*, repräsentiert durch gramnegative, fakultativ anaerobe Kurzstäbchen, gehört taxonomisch gesehen zur Familie der *Enterobacteriaceae*. Salmonellosis beim Menschen kann einerseits durch die Typhus- und Paratyphus-Erreger *Salmonella enterica* Serotyp Typhi bzw. Paratyphi A, B und C, andererseits auch durch nicht-typhoidale Salmonellen (NTS) ausgelöst werden. Typhus und Paratyphus gehen mit systemischen Infektionen unter Darmbeteiligung einher, während die Non-Typhi-Gruppe der Salmonellen Enteritiden verursachen (https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Merkblaetter/Ratgeber_Salmonellose.html); eingesehen am: 20.05.2020). Die Gattung *Salmonella* ist in nur zwei Spezies aufgeteilt: *Salmonella enterica* und *Salmonella bongori*, wobei *S. enterica* in sechs weitere Subspezies aufgespalten wird: *Salmonella enterica* subsp. *enterica*, *Salmonella enterica* subsp. *salamae*, *Salmonella enterica* subsp. *arizonae*, *Salmonella enterica* subsp. *diarizonae*, *Salmonella enterica* subsp. *houtenae*, und *Salmonella enterica* subsp. *indica* (TINDALL et al., 2005). Salmonellen werden nach dem Kauffmann-White-Schema anhand ihrer Oberflächenantigene (O= somatisch, H= Geißel- und Vi= Kapselantigene) in 2.610 Serotypen unterteilt (DIECKMANN und MALORNY, 2011a). Epidemiologen verwenden die Serotypisierung, um *Salmonella*-Ausbrüche zu erkennen und sie bis zu ihren Quellen zurückzufolgen.

Alle klinischen *Salmonella*-Stämme werden nicht nur serotypisiert, sondern auch mit molekularen Methoden subtypisiert. Whole Genome Sequencing wird heute als alternative Technik eingesetzt, um schnell und zuverlässig Serotyp-Informationen zu erhalten und Einzelnukleotid-Polymorphismen (SNP) innerhalb des Genoms zu erhalten (IBRAHIM und MORIN, 2018).

S. enterica serovar Typhimurum und Enteritidis sind die weltweit am häufigsten verbreiteten Generalisten, d. h. sie sind nicht an spezifische Wirte angepasst. Wirtsadaptierte Salmonellen wie *S. choleraesuis* (Schwein) und *S. dublin* (Rind) verursachen systemische Infektionen und können auch eine Erkrankung beim Menschen auslösen. *S. typhi* und *S. paratyphi* sind dagegen ausschließlich bei Humaninfektionen involviert (SANDERSON und NAIR, 2013). Die infektiöse Dosis beträgt weniger als 1000 Zellen und ist abhängig von Alter und Gesundheit des Wirts und der Pathogenität des Stammes

(<https://www.fda.gov/files/food/published/Bad-Bug-Book-2nd-Edition-%28PDF%29.pdf>; eingesehen am: 18.05.2020).

Das Wachstumsoptimum von Salmonellen liegt bei 37°C; es wurde jedoch ein Wachstum zwischen 2 und 4°C und sogar bis zu 54°C festgestellt (ADLEY und RYAN, 2016). Salmonellen können zwischen pH 4,0 - 9,0 überleben, das pH-Optimum liegt aber zwischen pH 6,5-7,5. Eine Wasseraktivität (a_w) von $\geq 0,94$ inhibiert die Vermehrung von Salmonellen (KRÄMER und PRANGE, 2016a). Der D-Wert bzw. die Dezimale Reduktionszeit ist ein Maß für die Hitzebeständigkeit von Mikroorganismen. Der D-Wert, bzw. die Dezimale Reduktionszeit von *Salmonella Typhimurium* DT 104 in Rindfleisch liegt bei 63 °C in der Zeit von $1,75 \pm 0,53$ min. Der D-Wert repräsentiert die Zeit, die bei einer definierten Temperatur benötigt wird, um die Ausgangs-Keimkonzentration um 90% bzw. auf ein Zehntel zu reduzieren (KRÄMER und PRANGE, 2016b; STEPHAN et al., 2014).

Zu den biochemischen Merkmalen, die zur Identifizierung von *Salmonellen* verwendet werden, gehören die Produktion von Schwefelwasserstoff (H_2S), die Decarboxylierung von Lysin und Ornithin sowie die Nihthydrolyse von Harnstoff (Urea) (<https://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/bam-chapter-5-salmonella>; eingesehen am: 20.05.2020). Salmonellen sind peritrich begeißelt und somit beweglich (Ausnahme *S. gallinarum* und *S. pullorum*) (SINELL, 2004).

Salmonellose ist nach Campylobacteriose die zweithäufigste humane gastrointestinale Infektion. Die EU-weit gemeldeten Salmonellose-Fälle lagen 2018 bei 91.857, das bedeutet 20,1 Fälle auf 100.000 Einwohner. Die meisten *Salmonella* bedingten Ausbrüche sind auf *S. Enteritidis* zurückzuführen, dabei waren Eier und Eiprodukte, Backwaren und gemischte Fertigprodukte die Quellen (EFSA und ECDC, 2019a). Grundsätzlich ist Geflügelfleisch am höchsten mit *Salmonella* belastet, daher sollten eine ausreichende Garzeit, –temperatur und rasche Kühlung (innerhalb von 2 h) durch die Konsumentin/den Konsumenten berücksichtigt werden (EFSA und ECDC, 2019b; <https://www.cdc.gov/features/salmonella-food/index.html>; eingesehen am: 28.05.2020).

Am häufigsten wird Salmonellose in Österreich durch *Salmonella enteritidis* und *Salmonella typhimurium* hervorgerufen, wohingegen *S. typhi* und *S. paratyphi* in Österreich nicht nachgewiesen werden (<https://www.ages.at/themen/krankheitserreger/salmonellen/>, eingesehen am: 13.04.2020).

Die häufigsten Serovare bei Humanerkrankungen waren 2018 EU-weit *S. enteritidis*, *S. typhimurium*, monophasische *S. typhimurium* (1,4,[5],12:i:-), *S. infantis* und *S. newport*. Die am häufigsten in Lebensmitteln und Tieren nachgewiesenen Serovare waren mit den Humanisolaten vergleichbar; statt *S. newport* war *S. derby* an fünfhäufigster Stelle (EFSA und ECDC, 2019c).

Salmonellen werden von Nutztieren besonders in der letzten Phase der Produktionskette, während des Transports und bei der Schlachtung ausgeschieden und führen potentiell zu einer Kreuzkontamination des Schlachtkörpers durch den Darmtrakt bei der Zerlegung (ALBA et al., 2020; MASSACCI et al., 2020).

Salmonellen können Gemüse und Obst an der Oberfläche bereits vor der Ernte kontaminieren und dann nach Waschen und Schneiden auf das Fruchtfleisch übertragen werden. Häufig werden Salmonellen bei Ausbrüchen mit Melonen, Papayas, Sprossen und auch Nüssen verbunden (<https://www.cdc.gov/salmonella/outbreaks.html>; eingesehen am: 02.06.2020).

Sowohl die Virulenz von *Salmonella* spp. als auch die Konstitution des Wirtes ist entscheidend dafür, ob eine Infektion zu einer Erkrankung führt. Das Vorhandensein von Virulenzfaktoren, d.h. Virulenzplasmide, Toxine, Fimbrien und Flagellen, beeinflussen dabei die Schwere der Erkrankung (ANDINO und HANNING, 2015; VAN ASTEN und VAN DIJK, 2005). Bei einer Aufnahme von kontaminierten Lebensmitteln oder Wasser kommt es in erster Linie zur Vermehrung im Dünndarm. Dort wird eine akute Schleimhautentzündung ausgelöst, indem Endo-, Entero- und Cytotoxine gebildet werden. In weiterer Folge kann es zu einer Bakteriämie kommen. Infektionssymptome (Durchfall, Magenkrämpfe und Fieber) treten in der Regel sechs Stunden bis sechs Tage nach dem Verzehr eines kontaminierten Lebensmittels auf. Im Normalfall klingen die Symptome auch ohne Antibiotikagabe innerhalb von 4-7 Tagen ab. Bei immunsupprimierten Menschen, wie älteren Leuten, Kleinkindern und Menschen mit Erkrankungen des Herz-Kreislauf- und Atmungssystems kann es zu Komplikationen wie Endocarditis und Polyarthritiden kommen (MASCELLINO, 2018; <https://www.cdc.gov/salmonella/index.html>; <https://www.ages.at/themen/krankheitserreger/salmonellen/>; eingesehen am: 02.06.2020).

1.2. CHARACTERISTIKA VON *LISTERIA* SPP.

Listerien sind grampositive, fakultativ anaerobe Kurzstäbchen, die durch ihre peritriche Begeißelung bei 25 °C beweglich sind. Das Wachstumsoptimum von Listerien ist 30-37 °C, wobei eine Vermehrung zwischen 1°C und 45°C möglich ist (PICHHARDT, 1998; WEBER, 2010). Listerien kommen ubiquitär vor, wobei bisher 22 Spezies und vier Subspezies beschrieben sind (<https://lpsn.dsmz.de/search?word=listeria>; eingesehen am: 02.06.2020). Der Genus *Listeria* gehört taxonomisch gesehen zum Phylum der Firmicutes und zur Familie der *Listeriaceae* (VOS et al., 2009).

L. monocytogenes, *L. ivanovii*, *L. innocua*, *L. seeligeri*, *L. welshimeri*, und *L. grayi* sind die sechs Spezies, die als sensu stricto (taxonomisch „im engeren Sinne“) beschrieben sind (LIAO et al., 2017;

SCHARDT et al., 2017). *L. monocytogenes* ist sowohl human- als auch tierpathogen, wohingegen *L. ivanovii* als tierpathogen beschrieben wird (DODD, 2017; MCVEY, 2013).

Aufgrund ihrer psychotrophen Fähigkeiten können Listerien sich bei Kühlschranktemperaturen vermehren und sie überleben zudem den Auftau-, Gefrier- und Trocknungsprozess. Listerien können bei einem Salzgehalt von 10 -20 % grundsätzlich überleben, aber vermehrungsfähig sind sie bei einem Salzgehalt unter 10%. Listerien werden bei 72 bis 75 °C inaktiviert (RYSER und MARTH, 2007a). Listerien-Wachstum ist möglich bis zu einem a_w -Wert von 0.92 und einem pH- Wert von 4.39 bis 9.4 (BELL und KYRIAKIDES, 2012).

Listerien können Biofilme auf diversen Oberflächen bilden und somit zu einer persistierenden Kontamination in Lebensmittel verarbeitenden Betrieben führen. Biofilme stellen aufgrund der starken antimikrobiellen Toleranz und des damit verbundenen höheren Risikos einer Lebensmittelkontamination ein ernsthaftes hygienisches Problem dar (ÁLVAREZ-ORDÓÑEZ und BRIANDET, 2016).

Wenn Reinigungs- und Desinfektionsmittel vor allem auf Basis von Wasserstoffperoxid oder quaternären Ammoniumverbindungen (QAV) eingesetzt werden, können Listerien in ein „viable but non-culturable“ (VBNC) Stadium übergehen und im mikrobiologischen Nachweis nicht mehr auf Nährmedien kultiviert werden (BRAUGE et al., 2020). In Multispezies-Biofilmen (*Pseudomonas aeruginosa*, *S. aureus* und *L. innocua*) waren die Organismen resistenter gegen drei Desinfektionsmittel (Alkylamin, Chlor und QAV-Basis) als ihre Pendants der einzelnen Spezies. Des Weiteren sind die Biofilmreife sowie die Umweltbedingungen, d.h. der Zugang zu Nährstoffen, in der Resistenzbildung entscheidend (KOCOT und OLSZEWSKA, 2020). *L. innocua*, eine apathogene *Listeria*-Spezies und Hygieneindikator, ist im Lebensmittel verarbeitenden Umfeld stärker verbreitet als *L. monocytogenes* und hat nachweislich einen Wachstumsvorteil in selektiven Anreicherungs- und Agarmedien (KASZONI-RÜCKERL et al., 2020a).

Im Jahr 2018 wurden EU-weit 2.549 bestätigte invasive Fälle von Listeriose gemeldet, was einer Melderate von 0,47 Fällen pro 100.000 Einwohner entspricht. Es erkrankten meist nur Menschen aus Risikogruppen, d. h. ältere Menschen, Kleinkinder, Schwangere und Immunsupprimierte. Listerieninfektionen häuften sich in der Altersgruppe über 64 Jahre, wobei die EU-weite Mortalität bei 15,6 % lag. Die Produktgruppen Fisch und Fischprodukte, Fleisch und Fleischprodukte sowie Milchprodukte sind am häufigsten Vehikel für Listeriose. 2018 waren Gemüse und Säfte, u. a. Tiefkühlgemüse, in lebensmittelassoziierte Ausbrüche involviert.

Über die Inkubationszeit der Listeriose liegen nur wenige Daten vor. Die Dauer reicht von drei bis 70 Tagen. GOULET et al. (2013) untersuchten die Inkubationszeiten im Zusammenhang mit invasiven

Listeriosen (ZNS Beteiligung, Bakteriämien und schwangerschaftsassozierte Fälle) und nicht-invasiven Formen mit Gastroenteritiden (sporadische Ausbrüche). Die Mediane Inkubationszeit lag bei 8 Tagen (Median 1-67 Tage). Da bei epidemiologischer Abklärung sowohl eine deskriptive Erhebung (Fragebogen über mögliche verzehrte Lebensmittel) als auch eine Typisierung der Patientenisolate stattfindet, sollte das Expositionsfenster von 14 Tagen vor der Diagnose für ZNS- und Bakteriämie-Fälle und von 6 Wochen für schwangerschaftsassozierte Listeriose gewählt werden.

Nach einer Vermehrung in den Darmepithelzellen kommt es bei der invasiven Form der Listeriose im Anschluss zu einer Bakteriämie. Als erstes zeigen sich grippeähnliche Symptome. Bei Schwangeren kann es zu Aborten oder Frühgeburten kommen. Säuglinge, Kleinkinder und immunsupprimierte Menschen entwickeln eine Meningoencephalitis und Septikämie. In der Risikogruppe besteht eine Mortalität von zirka 20-30% (JORDAN und MCAULIFFE, 2018; SCOBIE et al., 2019; <https://www.cdc.gov/listeria/symptoms.html>; eingesehen am: 12.06.2020). Amoxicillin und Ampicillin sind die Medikamente der Wahl für die Behandlung von Listeriose, oft in Kombination mit Aminoglycosiden. Rückfälle und Behandlungsfehler werden bei Personen mit Meningitis berichtet, die weniger als zwei Wochen lang behandelt wurden (PAGLIANO et al., 2017; <http://antimicrobe.org/b111.asp>; eingesehen am: 12.06.2020).

1.3. RESERVOIR, INZIDENZ UND AUSBRÜCHE VERURSACHT DURCH *SALMONELLA* UND *LISTERIA MONOCYTOGENES*

Im Zeitraum 2010 bis 2020 wurden im Schnellwarnsystem von Rapid Alert System for Food and Feed (RASFF), das Schnellwarnsystem für Lebens- und Futtermittel, 319 lebensmittelbedingte Ausbrüche verzeichnet, wobei ein hoher Anteil mit Noro- und Hepatitis A-Erkrankungen verbunden war (Meeresfrüchte, Früchte und Gemüse). Mit Salmonellen wurden 87 lebensmittelbedingte Ausbrüche in Verbindung gebracht (27,27 %). Fleisch und Fleischprodukte (außer Geflügelfleisch; n=30), Eier und Geflügelfleisch (n=29), Milch und Milchprodukte (n=9) und Nahrungsergänzungsmittel (n=8) waren die am häufigsten involvierten Vehikel (Zeitraum 2010-2020). In Tabelle 1 sind *Salmonella*-Ausbrüche, die mit Fleisch und Fleischprodukten (außer Geflügelfleisch) in Verbindung gebracht wurden, dargestellt (https://ec.europa.eu/food/safety/rasff_en; eingesehen am 12.06.2020). Salmonellen verursachen jeden dritten lebensmittelbedingten Ausbruch in der EU. Ein lebensmittelbedingter Krankheitsausbruch ist ein Vorfall, bei dem sich mindestens zwei Personen durch die gleiche kontaminierte Nahrung mit demselben Erreger infizieren. Der größte Anteil der Salmonellosen ist auf Eier zurückzuführen, wobei 2018 67 % der 1.581 Ausbrüche in der Slowakei, Spanien und Polen stattfanden.

den (EFSA und ECDC, 2019d; <https://www.efsa.europa.eu/en/news/salmonella-most-common-cause-foodborne-outbreaks-european-union>; eingesehen am: 12.06.2020). Im Legehennen-Bereich sind die fünf zu überprüfenden Zielerovare: Salmonella Enteritidis, Salmonella Typhimurium (einschließlich monophasischer Varianten), Salmonella Infantis, Salmonella Kentucky und entweder Salmonella Heidelberg, Salmonella Thompson oder ein variables Serovar. Eine erhöhte Besatzdichte, größere Betriebe und Stress führen zu vermehrtem Auftreten, Persistenz und Ausbreitung von Salmonellen in Legehennenherden (EFSA BIOHAZ PANEL, 2019).

Gegenwärtig werden in verschiedenen Industrieländern bestimmte gut an die Schweinefleischproduktion angepasste und persistente *Salmonella enterica*-Serotypen (z.B. Salmonella Typhimurium, Salmonella 1,4,[5],12:i:-, Salmonella Derby und Salmonella Rissen) mit Infektionen beim Menschen in Verbindung gebracht. Die Verbreitung dieser klinisch relevanten, oft multi-resistenten *Salmonella*-Serotypen steht mit der Intensivhaltung der Tiere und mit einer Zunahme des globalen Handels mit Schweinen und Schweinefleisch in direktem Zusammenhang (CAMPOS et al., 2019a).

Die meisten infizierten Schweine sind gesunde Überträger, und diejenigen, die am Ende der Mastperiode infiziert werden, könnten eine Gefahr für die menschliche Gesundheit darstellen. Eine Kontamination von Schweineschlachtkörpern kann durch Kreuzkontamination von anderen Schlachtkörpern und aus der Umgebung entlang der Schlachtlinie auftreten. Beim Menschen wurden mehrere Fälle von Salmonellose mit dem Verzehr von rohem oder nicht durchgegartem Schweinefleisch und Schweinefleischprodukten (z.B. Mett) in Verbindung gebracht (BONARDI, 2017). Rindfleisch, besonders Hackfleisch, wird ebenso bei *Salmonella*-Ausbrüchen als kontaminierte Lebensmittelmatrix gemeldet (Tabelle 1; RASFF Portal; https://ec.europa.eu/food/safety/rasff_en; eingesehen am: 12.06.2020a).

Listerien sind allgegenwärtig in der Umwelt; man findet sie in Oberflächenwasser, Erde, Pflanzenmaterial, Wildtieren und landwirtschaftlichen Nutztieren (JEYALETCHUMI et al., 2011; LINKE et al., 2014; NIGHTINGALE et al., 2014; SHARMA et al., 2020; WANG et al., 2017).

Im Gegensatz zu obligat intrazellulären Pathogenen, die in relativ stabilen wirtsassoziierten Umgebungen verbleiben können, muss *L. monocytogenes* als Saprophyt in unterschiedlichen Nischen/Habitaten physikalische und chemische Signale (e.g. niedriger pH-Wert, Säure, Austrocknung, Kälte) wahrnehmen und unter Kontrolle des Sigma B (σ_B) Faktors und des Listeriolysin regulatory protein (PrfA) darauf reagieren (TIENSUU et al., 2019). Nach der oralen Aufnahme durch einen empfänglichen Wirt wechselt *L. monocytogenes* nach Magen-Darm-Passage in einen intrazellulären Para-

siten (<https://www.sciencedirect.com/topics/medicine-and-dentistry/listeria>; eingesehen am: 15.06.2020).

Nach dem Eintritt in den Blutkreislauf werden einige Listerienzellen von Makrophagen in Leber und Milz phagozytiert. Wenn ihre Vermehrung nicht durch eine wirksame angeborene Immunantwort des Wirts gestoppt werden kann, gelangen die Bakterien wieder in den Blutkreislauf und verursachen eine Bakteriämie und Meningoencephalitis mit teils tödlichem Ausgang. Die Besonderheit von *L. monocytogenes* ist die Replikation in infizierten Zellen und Ausbreitung in Nachbarzellen, ohne eine humorale Immunreaktion hervorzurufen (FREITAG et al., 2009; NYILA, 2018).

Im Zeitraum 2010 bis 2020 wurden im Schnellwarnsystem RASFF 10 lebensmittelbedingte Ausbrüche, verursacht durch *L. monocytogenes*, gemeldet. Dabei wurden 6 von 10 Ausbrüchen durch Fleisch und Fleischprodukte (außer Geflügel) verursacht. Tabelle 1 zeigt die durch mit *L. monocytogenes* kontaminiertem Fleisch und Fleischprodukte (außer Geflügelfleisch) verursachten Ausbrüche (https://ec.europa.eu/food/safety/rasff_en; eingesehen am: 12.06.2020b; Zeitraum 2010-2020).

Tabelle 1: RASFF Meldungen über lebensmittelbedingte Erkrankungen durch *Salmonella* und *Listeria monocytogenes* in Fleisch und Fleischprodukten außer Geflügelfleisch im Zeitrahmen 2010-2020.

Datum	Meldung in	Lebensmittel	Herkunft
<i>L. monocytogenes</i>			
21.08.2014	Dänemark	Lammwürste	Dänemark
30.05.2016	Deutschland	Wurstprodukte	Deutschland
31.07.2019	Portugal	Blutwurst (10000; 2000; 10000; 1100; 1300 KbE/g)	Spanien
20.08.2019	Spanien	gekühlte Schweinefleischprodukte (>1.5*10 ⁴ KbE/g)	Spanien
10.09.2019	Spanien	gekühlte Schweinefleischprodukte (11000 KbE/g)	Spanien
20.09.2019	Spanien	gebratener Schweinebauch	Spanien
03.10.2019	Deutschland	gekühlte Würste	Deutschland
07.10.2019	Niederlande	kaltes Fleisch (Wurstwaren), in Scheiben geschnitten und vorverpackt	Niederlande
<i>Salmonella</i>			
25.03.2014	Italien	Wildschweinwürste	Italien
monophasische <i>S. typhimurium</i> (1,4(5),12:i:-)			
20.12.2011	Frankreich	getrocknete Würste "Red Label"	Frankreich
14.05.2014	Frankreich	Würste	Spanien
21.04.2016	Schweden	Salami	Polen
29.09.2016	Schweden	Salami	Italien
23.04.2018	Frankreich	Würste	Spanien
<i>S. typhimurium</i>			
28.05.2010	Frankreich	getrocknete Würste	Frankreich
04.11.2010	Frankreich	gefrorene, rohe Rindfleischburger	Italien
24.11.2010	Luxemburg	schimmelgereifte Salami	Frankreich
07.12.2015	Niederlande	Filet Americain	Niederlande, Rohmaterial aus Belgien, Tschechien, Dänemark, Polen
25.09.2017	Schweden	Salami	Spanien
06.11.2017	Dänemark	gekühlte, geschnittene Salami	Spanien
30.01.2018	Schweden	gekühlte Trüffelsalami	Italien
18.07.2018	Slowakei	gefrorene, vakuumverpackte Schweinefilets	Spanien, Tschechien
09.07.2019	Frankreich	Coppa	Italien, Deutschland (Rohmaterial), Frankreich (Rohmaterial)

Tabelle 1 fortgeführt: RASFF Meldungen über lebensmittelbedingte Erkrankungen durch *Salmonella* und *Listeria monocytogenes* in Fleisch und Fleischprodukten außer Geflügelfleisch im Zeitrahmen 2010-2020.

Datum	Meldung in	Lebensmittel	Herkunft
<i>S. typhimurium</i> DT 120			
17.06.2010	Dänemark	Salami mit Rehfleisch	Deutschland
18.05.2011	Dänemark	kaltgeräucherte Schweinefilets	Polen
<i>S. enterica</i>			
05.03.2010	Italien	Salami	Italien
25.05.2012	Italien	gekühltes, gefülltes Fleisch	Italien
<i>S. enterica ser. bovismorbificans</i>			
21.04.2017	Niederlande	Coburger Schinken	Belgien, Niederlande (Rohmaterial und Schnitt)
13.09.2019	Frankreich	gekühltes Pferdehackfleisch	Rumänien, Belgien (Verarbeitung)
<i>S. enteritidis</i>			
01.07.2014	Slowakei	gefrorene Schweinefilets	Ungarn
06.02.2015	Frankreich	gefrorenes Rinderhack	Polen
11.03.2015	Frankreich	gefrorenes Rinderhack	Polen
12.04.2018	Frankreich	gekühltes Pferdefleisch	Belgien, Rumänien (Verarbeitung), Ungarn (Rohmaterial)
<i>S. infantis</i>			
18.09.2015	Niederlande	gewürzte Rindersteaks	Niederlande, Litauen (Rohmaterial)
<i>S. rissen</i>			
17.07.2015	Frankreich	gefrorenes Rinderhack	Italien
<i>S. gold coast</i>			
19.11.2018	Niederlande	Schweinefleisch	Niederlande
<i>S. bredeney</i>			
15.07.2019	Irland	gekühlte Zubereitung aus gekochtem Schweinefleisch	Rumänien, Italien & Belgien (Rohmaterial)
<i>S. miami</i>			
22.04.2020	Frankreich	gekühlte, vakuumverpackte, gekochte, in Scheiben geschnittene Schweineschulter	Spanien

Der erste publizierte Listerien-Ausbruch ereignete sich in Nova Scotia mit fäkal-kontaminiertem Krautsalat (SCHLECH et al., 1983). In den folgenden Jahrzehnten wurden die meisten Listeriose-Ausbrüche durch Lebensmittel tierischen Ursprungs (Wurstwaren, Hot Dogs und Weichkäse, Rohmilch, Paté) hervorgerufen. Dabei war *L. monocytogenes* Serotyp 4b sehr häufig an diesen Ausbrüchen beteiligt (CARTWRIGHT et al., 2013; RYSER und MARTH, 2007b).

Aktuell werden vermehrt Ausbrüche mit Lebensmittel nicht-tierischen Ursprungs in Verbindung gebracht (Sprossen, Fertigsalate, Sellerie, Melonen, Steinobst und Karamelläpfel), was zu einem Paradigmenwechsel über mögliche *L. monocytogenes* Vehikel führte (BUCHANAN et al., 2017; GARNER und KATHARIOU, 2016).

1.4. VORKOMMEN VON *SALMONELLA* UND *LISTERIA* IN DER LEBENSMITTELPRODUKTION

Die EFSA und ECDC Zoonoseberichte der vergangenen Jahre melden bei Fertigprodukten immer eine niedrige *L. monocytogenes* Belastung (2018: 3,18% während der Herstellung; 0,48% im Handel). Der höchste Gehalt an Salmonellen positiven Proben war in Frischfleisch zu finden. Das Vorkommen der Top-5 Serovare waren bei den einzelnen Nutztierarten und Lebensmitteln wie in Tabelle 2 dargestellt. *S. enteritidis* und *S. infantis* war bei Legehennen, Masthühnern, Puten und Geflügelfleisch jeweils am höchsten vertreten. In Schweinen und Schweinefleisch wurden *S. derby* und *S. typhimurium* (monophasisch) am häufigsten nachgewiesen. *S. typhimurium* wurde an erster Stelle in Rindern und Rindfleisch detektiert (EFSA und ECDC, 2019e).

Tabelle 2: Reihenfolge (1-5) der Top-5 *Salmonella*-Serovar Belastung bei Nutztieren und den assoziierten Lebensmitteln.

		<i>S. derby</i>	<i>S. enteritidis</i>	<i>S. infantis</i>	<i>S. typhimurium</i>	<i>S. typhimurium monophasisch</i>
	Legehennen	5	1	2	3	4
	Puten	2	5	1	3	4
	Schweine	1	5	4	3	2
	Rinder	5	3	4	1	2
	Masthühner	5	2	1	3	4

Quelle: EFSA und ECDC, 2019.

Die prozentuale Verteilung der RASFF Meldungen bezüglich der Salmonellen, *L. monocytogenes*, EPEC und STEC Belastung in Fleisch und Fleischprodukten (außer Geflügelfleisch) während der Jahre 2010 bis 2020 ist in Abbildung 1 dargestellt.

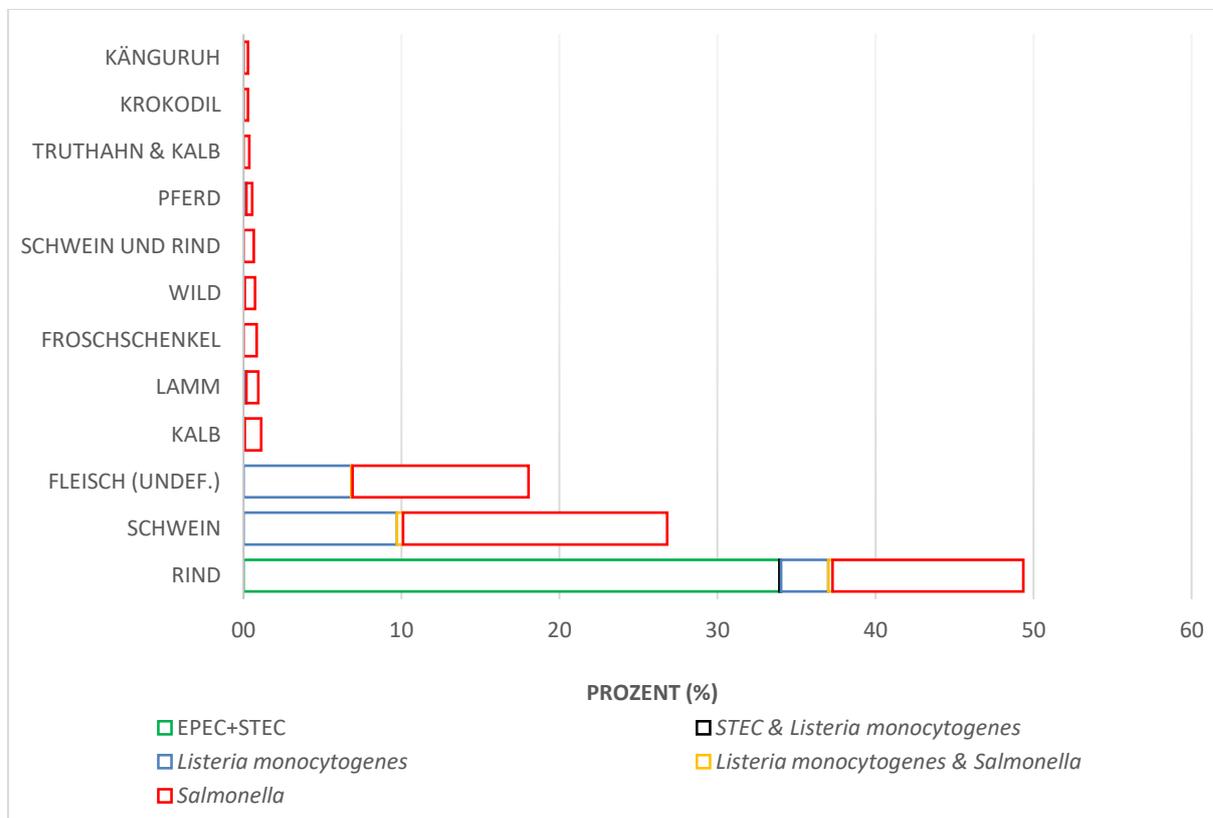


Abbildung 1: Meldungen bezüglich pathogener Mikroorganismen in der Kategorie Fleisch und Fleischprodukte (außer Geflügelfleisch) laut RASFF Portal (Zeitraumen 2010 - 2020).

Abkürzungen: EPEC, enteropathogene *Escherichia coli*, STEC, Shiga-toxin bildende *E. coli*.

Laut RASFF-Meldungen waren Rindfleisch und Rindfleischprodukte am stärksten mit lebensmittelpathogenen Mikroorganismen belastet. Am häufigsten waren sie mit enteropathogenen *Escherichia coli* (EPEC) in Kombination mit Shiga-toxin bildenden *E. coli* (STEC), gefolgt von *Salmonella* spp. und *L. monocytogenes* belastet. An zweiter Stelle wurde in Schweinefleisch und Schweinefleischprodukten *Salmonella* spp. und *L. monocytogenes* nachgewiesen.

Auf Verarbeitungsebene ist die Prävalenz von *L. monocytogenes* und *Salmonella* deutlich höher, vor allem in der Schlachthofumgebung und in Zerlegebetrieben. Das Vorhandensein von *L. monocytogenes* und *Salmonella* kann zu einer Kreuzkontaminationen der Rohware, des Intermediärprodukts, führen (KURPAS et al., 2018a).

Techniken zur Lebensmittelkonservierung wie Erhitzung, Einfrieren, Abkühlen, Nährstoffeinschränkung, Verringerung der Wasseraktivität, Säuerung, Pasteurisierung, Fermentation und chemi-

sche/biologische antimikrobielle Mittel werden zur Kontrolle des mikrobiellen Wachstums in Lebensmitteln eingesetzt (BAHRAMI et al., 2020; KHAN et al., 2017).

Nach einem Dekontaminationsschritt kann es zu einer Rekontamination des Endproduktes mit lebensmittelpathogenen Keimen aus dem Herstellungsumfeld kommen (CARRASCO et al., 2012a; REIJ et al., 2004).

Angemessene Hygienesysteme, die von den MitarbeiterInnen an Orten der Lebensmittelzubereitung angewendet werden und Kenntnisse über die verschiedenen Verbreitungswege dieser Bakterien können das Risiko einer Lebensmittelkontamination wirksam verringern. Standardisierte gesetzliche Vorschriften und die Kontrolle der Herstellung von Fleischprodukten sollten ein grundlegender Weg sein, um Lebensmittel vor einer Kontamination mit *L. monocytogenes* und *Salmonella* zu schützen (KURPAS et al., 2018b).

Salmonellen-Kreuzkontaminations- und Rekontaminations-Events wurden mit den folgenden Faktoren in Verbindung gebracht: schlechte Hygienepraxis, schlechtes Gerätedesign, Verschleiß von Oberflächen und mangelhafte Kontrolle der Lebensmittelinhaltsstoffe (CARRASCO et al., 2012b). Manche *L. monocytogenes* und *Salmonella*-Stämme können sich aufgrund ihrer Adaptionfähigkeit besonders erfolgreich im Lebensmittelumfeld etablieren und stellen die „In-house-Flora“ eines Betriebes dar. Diese „In-house-Flora“ kann zu einer anhaltenden Chargenkontamination und im schlimmsten Fall zu einem lebensmittelasoziierten Ausbruch oder zumindest einer Lebensmittelrückrufaktion führen (CAMPOS et al., 2019b; KASZONI-RÜCKERL et al., 2020b; MANIOS et al., 2015; STESSL et al., 2020).

1.5. GESETZLICHE GRUNDLAGEN

Lebensmittel tierischen und pflanzlichen Ursprungs können ein mikrobiologisches Risiko beherbergen. Die Anwendung der Guten Hygiene- und Herstellungspraxis (GHP, GMP) und der Hazard Analysis Critical Control Point (HACCP)-Grundsätze tragen zur Einhaltung der Lebensmittelsicherheit bei.

Lebensmittel, die nicht sicher für den menschlichen Verzehr sind, dürfen nach den allgemeinen Anforderungen an die Lebensmittelsicherheit, festgelegt mit der Verordnung (EG) Nr. 178/2002, nicht in Verkehr gebracht werden. In der Verordnung (EG) Nr. 2073/2005 werden die mikrobiologischen Sicherheitskriterien für Lebensmittel für relevante lebensmittelbedingte Bakterien, ihre Toxine und Metaboliten wie Salmonellen, *L. monocytogenes*, *Cronobacter sakazakii*, Enterotoxine von Koagulase-positiven Staphylokokken und Histamin in bestimmten Lebensmitteln dargelegt. Überdies werden Prozesshygienekriterien definiert, um den korrekten Ablauf des Produktionsprozesses anzuzeigen.

In Tabelle 3 sind die Sicherheits- (*L. monocytogenes* und *Salmonella*) und Prozesshygienekriterien (*Salmonella*) in Lebensmitteln und Schlachtkörpern dargestellt. Bei den Sicherheitskriterien unterscheidet man bei *L. monocytogenes* Produktgruppen, die das Wachstum fördern und nicht fördern. Produkte, die das Wachstum von *L. monocytogenes* nicht fördern, werden wie folgt definiert:

- pH-Wert von $\leq 4,4$ oder a_w -Wert von $\leq 0,92$
- pH-Wert von $\leq 5,0$ und a_w -Wert von $\leq 0,94$
- Erzeugnisse mit einer Haltbarkeitsdauer von weniger als 5 Tagen (EG VO 2073/2005).

Wenn ein Produkt vorliegt, das das Wachstum von *L. monocytogenes* fördert, sind sowohl die Belastung vor Chargenfreigabe qualitativ, als auch während der Haltbarkeit quantitativ zu bestimmen (ISO11290-1 und 2). Die Charge in der Produktkategorie „fördert das Wachstum von *L. monocytogenes*“ darf im Falle eines positiven *L. monocytogenes* Befundes nicht freigegeben werden. Bei Produkten, die nicht klar einer Gruppe zugeordnet werden können, sollten Challengetests durchgeführt werden (https://www.verbrauchergesundheit.gv.at/lebensmittel/buch/codex/beschluesse/Empfehlung_L_m_Challengetest.pdf?7i55we; https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/safety/docs/biosafety_fh_mc_technical_guidance_document_listeria_in_rte_foods.pdf; eingesehen am: 20.07.2020).

Die Belastung des Produktumfeldes mit *L. monocytogenes* ist nicht außer Acht zu lassen (<https://www.unitedfresh.org/content/uploads/2019/03/FINAL-UFPA-Listeria-Guidance.pdf>; eingesehen am: 20.07.2020) und sollte in einem Monitoring-Programm regelmäßig untersucht werden.

Salmonella spp. als Sicherheitskriterium darf in diversen Produktkategorien während der Haltbarkeitsdauer nicht nachweisbar in einer 10 oder 25 g Probe sein (Tabelle 3).

Salmonella spp. als Prozesshygienekriterium wird an Karkassen von Wiederkäuern, Pferden, Schweinen und Geflügel bestimmt. Dabei ist der Stichprobenumfang beträchtlich ($n=50$) und das Kriterium ist entweder vor (Wiederkäuer, Pferde und Schweine) oder nach der Kühlung (Geflügel) anzuwenden.

Tabelle 3: Lebensmittelsicherheitskriterien (*Listeria monocytogenes* und *Salmonella*) & Prozesshygienekriterien (*Salmonella*) nach Verordnung EG Nr. 2073/2005.

Lebensmittelsicherheitskriterien						
Lebensmittelkategorie		Probenahmeplan		Grenzwertes	Referenzmethode	Anwendung
		N	c	m	M	
<i>Listeria monocytogenes</i>						
verzehrfertige Lebensmittel	Säuglingsnahrung, medizinische Zwecke	10	0	In 25 g n. n.	EN/ISO 11290-1	während der Haltbarkeitsdauer
verzehrfertige Lebensmittel	die <i>L. monocytogenes</i> Wachstum begünstigen	5	0	100 KBE/g	EN/ISO 11290-2	während der Haltbarkeitsdauer
		5	0	In 25 g n. n.	EN/ISO 11290-1	vor Freigabe der Charge
verzehrfertige Lebensmittel	die <i>L. monocytogenes</i> Wachstum nicht begünstigen	5	0	100 KBE/g	EN/ISO 11290-2	während der Haltbarkeitsdauer
<i>Salmonella</i>						
Hackfleisch/Faschiertes und Fleischzubereitungen	zum Rohverzehr	5	0	In 25 g n. n.	EN/ISO 6579	während der Haltbarkeitsdauer
Hackfleisch/Faschiertes und Fleischzubereitungen aus Geflügelfleisch	zum Verzehr in durcherhitztem Zustand	5	0			
Hackfleisch/Faschiertes und Fleischzubereitungen	zum Verzehr in durcherhitztem Zustand	5	0	In 10 g n. n.		
Separatorenfleisch		5	0			
Fleischerzeugnisse	zum Verzehr in rohem Zustand bestimmt	5	0	in 25 g n. n.		
Fleischerzeugnisse aus Geflügelfleisch	zum Verzehr in durcherhitztem Zustand	5	0			
Gelatine und Kollagen		5	0			
Käse, Butter und Sahne aus Rohmilch oder aus Milch	die einer Wärmebehandlung unterhalb der Pasteurisierungstemperatur unterzogen wurden	5	0			
Milch- und Molkepulver		5	0			
Eiscreme	außer Erzeugnisse, bei denen das Salmonellenrisiko durch das Herstellungsverfahren oder die Zusammensetzung des Erzeugnisses ausgeschlossen ist	5	0			
Eierzeugnisse		5	0			

Tabelle 3 fortgeführt: Lebensmittelsicherheitskriterien (*Listeria monocytogenes* und *Salmonella*) & Prozesshygienekriterien (*Salmonella*) nach Verordnung EG Nr. 2073/2005.

Lebensmittelsicherheitskriterien						
Lebensmittelkategorie		Probenahmeplan		Grenzwertes	Referenzmethode	Anwendung
		n	c	m	M	
<i>Salmonella</i>						
verzehrfertige Lebensmittel	die rohes Ei enthalten, außer Erzeugnisse, bei denen das Salmonellenrisiko durch das Herstellungsverfahren oder die Zusammensetzung des Erzeugnisses ausgeschlossen ist	5	0	in 25 g n. n	EN/ISO 6579	während der Haltbarkeitsdauer
Gekochte Krebs- und Weichtiere		5	0			
Lebende Muscheln, Stachelhäuter, Manteltiere und Schnecken		5	0			
verzehrfertige Keimlinge	Keimlinge (verzehrfertig)	5	0			
verzehrfertiges Obst und Gemüse	vorzerkleinert	5	0			
verzehrfertige Obst- und Gemüsesäfte	nicht pasteurisiert	5	0			
getrocknete Lebensmittel	Säuglingsnahrung, medizinische Zwecke	30	0			
Prozesshygienekriterien						
<i>Salmonella</i>						
Schlachtkörper	von Rindern, Schafen, Ziegen und Pferden	50	2	In dem je Schlachtkörper beprobten Bereich nicht nachweisbar	EN/ISO 6579	Schlachtkörper nach dem Zurichten, aber vor dem Kühlen*
Schlachtkörper	von Schweinen	50	5			
Geflügelschlachtkörper	von Broilern und Puten	50	7	In 25 g einer gepoolten Probe von der Halshaut nicht nachweisbar		Schlachtkörper nach dem Kühlen*

Abkürzungen: n = Anzahl der Probeneinheiten der Stichprobe; c = Anzahl der Probeneinheiten, deren Werte zwischen m und M liegen.* Verbesserungen in der Schlachthygiene, Überprüfung der Prozesskontrolle und der Herkunft der Tiere; ** Verbesserungen in der Schlachthygiene, Überprüfung der Prozesskontrolle und der Herkunft der Tiere sowie der Maßnahmen im Bereich der Biosicherheit in den Herkunftsbetrieben.

1.6. DIAGNOSTIK

1.6.1. LISTERIENDIAGNOSTIK und TYPISIERUNG

Der Nachweis von *Listeria* spp. und *L. monocytogenes* setzt eine selektive Anreicherung voraus, die aus zwei Stufen besteht. Dazu wird die zu untersuchende Probe (25 g) in 225 ml Halbfraser verdünnt, homogenisiert (180 sek) und für 24 Stunden bei 30 °C inkubiert. Nach Inkubation wird 0,1 ml der Erstanreicherung zu 10 ml Vollfrasermedium gegeben und für 24 – 48 Stunden bei 37 °C inkubiert. Gemäß ISO 11290-1 (2017) werden die beiden Anreicherungen jeweils auf zwei Selektivmedien ausgestrichen und für 24-48 h bei 37 °C inkubiert. Eines der eingesetzten Selektivnährmedien sollte auf chromogenem Nachweis von Listerien basieren, wie der *Listeria* Agar nach Ottaviani und Agosti (ALOA).

Aktuelle Erkenntnisse zeigen, dass die Wiederbelebung und maximale Zunahme der *L. monocytogenes* Population während der ersten 24 Stunden Anreicherung in Vollfraser erfolgt. Daraus folgt, dass der zweite Anreicherungsschritt um 24 Stunden reduziert werden kann, ohne das Wachstum von *L. monocytogenes* zu beeinträchtigen oder die Empfindlichkeit der Methode zu beeinflussen (BESSE et al., 2016).

Durch neueingesetzte Sequenzierungsmethoden sind neben *L. monocytogenes*, *L. ivanovii*, *L. innocua*, *L. seeligeri*, *L. welshimeri*, und *L. grayi* 16 neue Listerien-Spezies identifiziert worden. Diese Listerien sind meist aus der Umwelt, seltener aus Lebensmitteln isoliert worden. Die Frage stellte sich, ob die Anreicherung der neuen Spezies kompetitiv gegenüber *L. monocytogenes* erfolgt. BARRE et al. (2016) zeigte, dass der Nachweis von *L. monocytogenes* durch die neuen Spezies nicht beeinträchtigt wird. Teilweise wurden neue Listerien-Arten wie *L. rocourtiae*, *L. weihenstephanensis*, *L. cornellensis*, *L. grandensis* und *L. newyorkensis* im Vergleich zu *L. monocytogenes* verzögert angereichert und teilweise nicht erfolgreich auf Selektivagar detektiert. Bei einigen der neuen Arten, insbesondere bei *L. marthii*, konnte ein gutes Wachstum festgestellt werden.

Das Vorkommen verschiedener *L. monocytogenes*-Stämme im gleichen Lebensmittel kann während der Anreicherungsschritte eine Stammkonkurrenz zur Folge haben, die zu einer ungleichmäßigen Vermehrung und zu einer Verzerrung der Ergebnisse beiträgt. Dies spielt besonders bei der epidemiologischen Aufklärung von Listeriose-Ausbrüchen eine bedeutende Rolle (ZILELIDOU et al., 2016).

Der chromogene Agar ALOA beruht auf dem chromogenen Nachweis von *Listeria* spp. durch die Detektion des Enzyms β -Glucosidase (türkis-blau gefärbte Kolonien) und von pathogenen Spezies (*L.*

monocytogenes und *L. ivanovii*) durch zusätzliche Hofbildung (phosphatidylspezifische Phospholipase; PIPLC). Konkurrenzflora, wie z.B. Enterokokken, sollte durch die Selektivkomponenten Lithiumchlorid, Polymyxin B und Nalidixinsäure unterdrückt werden, während Amphotericin das Wachstum von Hefen und Schimmelpilzen hemmt (ATLAS, 2010; <https://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/bam-media-m10a-aloa-agar-listeria-ottavani-agosti-medium>; eingesehen am: 20.07.2020).

Die Subkultivierung von verdächtigen Listerien-Kolonien erfolgt nochmals auf ALOA Agar oder im Falle von leicht einzeln isolierbaren Kolonien auf unselektiven Nährmedien. Die Spezies-Differenzierung sollte gemäß ISO 11290 (2017) mittels biochemischer Bestätigung durchgeführt werden. Dazu wird eine Vordifferenzierung mit Katalase, Oxidasereaktion und Gramfärbung durchgeführt. Listerien verhalten sich Katalase-positiv, Oxidase-negativ und Gram-positiv. Im Detail stellen sich Listerien als kokkoide Kurzstäbchen im mikroskopischen Präparat dar.

Die *L. monocytogenes*, *L. ivanovii* und selten *L. seeligeri* zeigen eine unterschiedlich ausgeprägte β -Hämolyse auf Schafblutagar. Zur Differenzierung von anderen Bakterienarten werden der Oxidase- und Katalase-Test sowie die Gramfärbung empfohlen. Außerdem werden die Äskulinhydrolyse, die Phospholipase C-Aktivität sowie die Fermentation von Rhamnose und Xylose zur Differenzierung herangezogen. *L. ivanovii* und *L. monocytogenes* sind Phospholipase C positiv, *L. monocytogenes* und *L. ivanovii* fermentieren Rhamnose oder Xylose, respektive (ISO 11290-1, 2017; MARKEY et al., 2013). Beim Christie-Atkins-Munch-Peterson (CAMP) Test werden zwei Kontrollstämme (*Staphylococcus aureus* ATCC 49444 und *Rhodococcus equi* ATCC 6939) auf Schafblutagar vertikal aufgetragen. Die Hämolyse von *L. monocytogenes* und *L. seeligeri* ist in der Nähe des *S. aureus* Streifens und von *L. ivanovii* in der Nähe des *R. equi* Streifens verstärkt (<https://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/bam-chapter-10-detection-listeria-monocytogenes-foods-and-environmental-samples-and-enumeration>; eingesehen am: 02.06.2020).

Die biochemische Bestätigung erfolgt meist mit miniaturisierten Teststreifen, die eine Reihe von Reaktionen enthalten, wie z.B. die Fermentation von Rhamnose oder Xylose oder den Arylamidase-Nachweis (DIM Test) (SETIANI et al., 2015; <https://www.biomerieux.de/klinische-diagnostik/apir-id-teststreifen>; eingesehen am: 21.07.2020).

Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS) ist eine neue Anwendung für die Identifizierung von Bakterien in der klinischen und Lebensmittelmikrobiologie. Bei dieser Methode ist die vollständige Proteinextraktion entscheidend für eine erfolgreiche Speziesidentifizierung. Spektren von Masse-zu-Ladungs-Verhältnis in bestimmten Bereichen, die den

ribosomalen Proteinprofilen der einzelnen Spezies entsprechen, können mit einer Spektrendatenbank verglichen werden (e.g. MALDI BioTyper Kompass-Explorer-Software) (THOUVENOT et al., 2018; https://www.bruker.com/fileadmin/user_upload/8-PDF-Docs/Separations_MassSpectrometry/Literature/Brochures/1862840_MBT_Food_brochure_01-2019_ebook.pdf; eingesehen am: 20.07.2020).

Alternativmethoden zur Listerien-Spezies-Bestätigung stellen immunologischen oder molekularbiologische Methoden, die auf Antigen-Antikörper-Nachweis und Polymerase chain reaction (PCR) basieren, dar (<https://www.rapidmicrobiology.com/test-method/listeria-detection-and-identification-methods>; eingesehen am: 21.07.2020).

Diese Methoden müssen gemäß ISO 16140 im Vergleich zu einer Referenzmethode (z.B. ISO 11290) validiert sein und im Labor auf die verschiedenen Lebensmittelmatrices optimiert werden. Das Labor muss regelmäßig an Ringversuchen teilnehmen, um die Validität der Ergebnisse zu verifizieren (ISO 16140 1-6, 2016-2020).

Die kritischen Punkte im Rahmen eines *Listeria*-Monitorings sind die anspruchsvollen Probenmatrices und der enorme Stichprobenumfang bei einer Beprobung aufgrund der meist niedrigen *Listeria*-Konzentration im Lebensmittelumfeld und in den Lebensmittelchargen. Probenahmekonzepte mit gepoolten Proben dienen der Zeit- und Kostenreduktion (JAGADEESAN et al., 2019; MESTER et al., 2017). Auch wenn nun laut ISO 11290-1 (2017) eine Verkürzung der Vollfraseranreicherungszeit möglich ist, muss überlegt werden, bei welcher Probenart dies anwendbar ist. In einer Studie, die drei international häufig verwendete Anreicherungsbouillonen auf ihre Produktivität zum Nachweis von durch Austrocknung gestressten Listerien verglich, wurde deutlich, dass diese sich zeitlich verzögert vermehrten. Höhere Zahlen positiver Ergebnisse bei den zweistufigen Schemata wurden durch eine Verlängerung der Dauer der Primäranreicherung um weitere 22 h erreicht (SHETH et al., 2018).

Entscheidend sind auch der sterile Tupfer oder Schwamm und die Größe der Probennahmestelle mit dem die Beprobung durchgeführt wird. Die Nachweisrate wird deutlich erhöht, wenn man größere Schwämme verwendet, wie z.B. World Bioproduct EZ Reach™ Split-Sampler oder 3M™ Sponge-Sticks. Die Probennahmestelle sollte möglichst groß gewählt werden und im Idealfall 10 x10 cm² oder mehr umfassen. Dementsprechend muss die Größe des Probennahmeschwammes angepasst werden (<https://www.worldbioproducts.com/uploads/1/2/9/1/129142376/ezreach.pdf>; eingesehen am: 21.07.2020; LIMOGES, FRONTINO und DONNELLY, 2020); WAGNER und STESSL, 2014).

Besonders pathogene Listerien-Arten sollten subtypisiert werden, um eine epidemiologische Aufklärung über Kontaminationsrouten und potenzielle Persistenz von Stämmen zu erhalten (FAGERLUND et al., 2020). Typisierungsmethoden werden in Speziallabors angewendet, da die Materialien sehr

kostenintensiv sind und eine fachliche Expertise und Präzision in der Anwendung Grundvoraussetzung sind (<https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/EQA-Listeria.pdf>; eingesehen am: 20.07.2020). Die Serotypisierung basiert auf Agglutination, bei der Antigene (somatische -O und Flagellen -H) von *L. monocytogenes* mit verschiedenen mono-/polyvalenten Antiseren reagieren (CHEN et al. 2017). Zum Vorscreenen der genetischen *L. monocytogenes*-Serogruppen gibt es etablierte PCR-Protokolle, mit denen die vier Hauptserovare (1/2a, 1/2b, 1/2c und 4b) unterschieden werden können (LECLERCQ et al., 2011).

Die Pulsfeld-Gelelektrophorese (PFGE) zählt als Goldstandard für die Typisierung pathogener Listerien-Stämme aus kontaminierten Lebensmittelproben. PFGE ist eine gelbasierte Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus (RFLP)-Technik, die auf der Verwendung von Restriktionsenzymen mit wenigen Restriktionsstellen basiert, um genomische DNA von *L. monocytogenes*-Stämmen zu schneiden. Der genetische Fingerprint wird anhand der Auftrennung der Restriktionsfragmente (40 bis 60 kb) in einer speziellen Gelelektrophorese identifiziert (<https://www.cdc.gov/pulsenet/PDF/listeria-pfge-protocol-508c.pdf>; eingesehen am: 21.07.2020).

Im Moment wird die größte Genauigkeit durch „whole genome sequencing“ (WGS) und „core genome multi locus sequence typing“ (cgMLST) oder „single nucleotid polymorphism“ SNP calling erreicht (CABAL et al., 2019).

Ein Vorteil von cgMLST ist ein vereinfachter Datenaustausch durch die „Cluster type“ (CT)-Bezeichnungen zwischen Laboren. Die Zuordnung von Isolaten mit identischen CTs zum gleichen epidemiologischen Fall ist unterstützend, jedoch sind Isolate, die verschiedenen CTs zugeordnet sind, nicht unbedingt unabhängig voneinander (HALBEDEL et al., 2018).

1.6.2. SALMONELLENDIAGNOSTIK

Zur Diagnostik von Salmonellen wird eine Voranreicherung in gepuffertem Peptonwasser (BPW) benötigt. 25 g der Probe werden mit BWP gemischt und bei 37 °C für 18 h inkubiert. Anschließend wird eine Anreicherung mit Müller-Kauffmann-Tetrathionat Novobiocin Bouillon (MKTTn) und Rappaport-Vassiliadis (RVS)-Bouillon durchgeführt. Es wird 1 ml des mit der Probe inkubierten BPW in 10 ml MKTTn übertragen und bei 37 °C für 18 h inkubiert. Außerdem wird 0,1 ml der mit BWP inkubierten Probe in 10 ml RVS Bouillon pipettiert und bei 41 °C für 24 h inkubiert. Die beiden Selektivnährmedien werden anschließend auf zwei Selektivagarplatten ausgestrichen. Eine nichtselektive Voranreicherung und im zweiten Schritt die Verwendung eines selektives Kulturmediums, RVS oder MKTTN, sorgen dafür, dass subletal geschädigte Salmonellen nachgewiesen werden können. In der aktuellen ISO 6579 (2017) kann man RVS Medium durch modified semi-solid Rappaport-Vassiliadis (MSRV)-Agar

ersetzen (MOOIJMAN, 2018). Einer der oft eingesetzten Selektivagar ist Xylose-Lysine-Deoxycholat (XLD) -Agar. Dieser dient der Differenzierung von Salmonellen und Shigellen von anderen *Enterobacteriaceae*. Durch den Zusatz von Lysin und Desoxycholat tendiert die Xylose-Fermentation von Salmonellen zu einem alkalischen pH-Wert, wodurch die rosa Koloniefarbe entsteht. Kolibakterien produzieren durch den Zusatz von Laktose und Saccharose einen Überschuss an Säure, der sich in einer gelben Koloniefarbe mit oder ohne gelbes Präzipitat manifestiert. Salmonellen verstoffwechseln Natriumthiosulfat und Ammoniumeisen (III)-Citrat und bilden Schwefelwasserstoff (H₂S) im alkalischen pH-Bereich, was zu einer zusätzlichen Schwarzfärbung der *Salmonella*-Kolonien im Zentrum führt (ISO 6579, 2017; MAHON et al., 2018). Der zweite Agar der Wahl basiert oft auf chromogenem Nachweis von *Salmonella* spp., wobei chromogene Substrate wie X-gal und Magentacaprylat kombiniert werden. X-gal ist das Substrat für den Enzymnachweis von β -D Galktosidase und Magentacaprylat detektiert Laktose-negative *Salmonella* in einer violetten Koloniefarbe (MANAFI, 2000). Die Bestätigung von *Salmonella* erfolgt nach ISO 6579 mithilfe von Antisera: O-Antigene werden mittels eines omnivalenten O-Antiserums getestet und dienen der ersten Konfirmation. Die Agglutination muss innerhalb von 30 Sekunden positiv sein. Im Anschluss wird eine Agglutinationsreaktion mit definierten polyvalenten Antisera, die auf H- und Vi-Antigene reagieren, durchgeführt. Dieses erlaubt die Unterteilung in die verschiedenen Serovare (International Organization for Standardization; ISO/TR 6579-3:2014). Das White-Kauffmann-Le Minor-Schema ist das am weitesten verbreitete und akzeptierte, um die Salmonellen-Serovare zu klassifizieren. Im Moment sind 2.610 Serovare mit Hilfe des Kauffmann-White-Schemas beschrieben (DIECKMANN und MALORNY, 2011b).

Die serologische Bestätigung muss immer mit einer biochemischen Bestätigung gepaart werden (<https://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/bam-chapter-5-salmonella>; eingesehen am: 20.07.2020). Diese kann mit kommerziellen Teststreifen durchgeführt werden (e.g. Analytic Profile Index - API 20 E).

Die Phagentypisierung und Multi-locus variable-number tandem-repeats analysis (MLVA) wird seit Jahrzehnten zur Subtypisierung von *S. Typhimurium* verwendet, um eine epidemiologische Aussage zu erzielen (CRABB et al., 2019). Aktuelle Studien tendieren zur CRISPR-Typisierung (Clustered Regular Interspaced Short Palindromic Repeats), die als „high throughput“ Methode das Potenzial hat, die Phagentypisierung zu ersetzen (MOHAMMED, 2017).

Im Moment wird für die *Salmonella*-Serotypisierung die Verwendung von Ganzgenom-Sequenzierungsdaten (WGS), die mit Kurzzeit-Sequenzierungstechnologien, wie beispielsweise den

Illumina-Sequenzierungsplattformen, erzeugt werden, favorisiert. Die Sequenziertechnologien unterliegen einer schnellen Verbesserungsmöglichkeit, somit können verschiedene Tools kombiniert werden.

Oxford Nanopore Technologies (ONT) Sequenzierplattformen mit langen „Reads“ bieten eine alternative WGS-Methode. Die Dauer der Bestätigung von *Salmonella*-Serotypen von der Reinkultur bis zu den Vorhersageergebnissen beträgt einen Tag (XU et al., 2020).

1.7. ZIEL DER STUDIE

Die nationalen Prävalenzdaten von 2018 zu *Salmonella* erscheinen beruhigend: Im Rahmen der Eigenkontrollen an Schlachthöfen wurden 5.605 Schlachtchargen von Schweinen negativ getestet (<https://www.ages.at/themen/krankheitserreger/salmonellen>; eingesehen am: 22.07.2020).

Die Belastung der Karkassen mit *L. monocytogenes* wird im Rahmen der Eigenkontrolle am Schlachthof nicht eruiert. Aktuelle Studien zeigten eine *L. monocytogenes*-Prävalenz auf Schlachtkörpern bis zu 22 % (DEMAÎTRE et al., 2020a). Von einer *L. monocytogenes*-Persistenz wurde aus mehreren Zerlegebetrieben berichtet (FIGUEROA-LÓPEZ et al., 2019a; SERENO et al., 2019a).

Im Rahmen der vorliegenden Diplomarbeit wurde der *L. monocytogenes* und *Salmonella* spp. Kontaminationsstatus auf Schweineschlachtchargen und während der Zerlegung von Schweinefleisch in einem longitudinalen Ansatz eruiert. Mögliche Kreuzkontaminationspunkte im Produktionsumfeld wurden im Beprobungsplan berücksichtigt. Das Ziel der Studie ist es, einerseits den potenziellen Pathogeneintrag longitudinal zu verfolgen und andererseits persistente *L. monocytogenes*-Klone zu identifizieren. Das Projekt wurde im Rahmen des österreichischen Kompetenzzentrums Feed and Food Quality, Safety and Innovation (FFoQSI) durchgeführt.

Praktische Anwendungen

Die Ergebnisse sollten für LebensmittelunternehmerInnen nützlich sein, um mögliche Übertragungswege von lebensmittelpathogenen Mikroorganismen zu erkennen und Reduktions- bzw. Eliminierungsstrategien zu entwickeln.

2. MATERIAL & METHODEN

2.1. GERÄTE UND MATERIALIEN

Die für die Diplomarbeit verwendeten Geräte und Materialien mit den zugehörigen Herstellern sind in der Appendix-Tabelle 1 aufgelistet.

2.2. PROBENNAHME

Eine Verarbeitungskette für Schweinefleisch wurde longitudinal auf die Präsenz von *Salmonella* spp. und *Listeria* spp. und *L. monocytogenes* beprobt.

Dazu wurden weitgehend Karkassenoberflächen im Nackenbereich (n=12 Proben pro Probennahmeort) und produktberührende und nicht-produktberührende Oberflächen im Prozessumfeld beprobt.

Insgesamt wurden 170 und 252 Wischproben (SampleRight™ Sponge Sampler mit HiCap™ Neutralizing Broth, Worldbioproducts, Bothell, USA) im Schlachthof bzw. Fleischerlegebereich steril genommen.

Die Probennahmestellen im Schlachtbereich an der Karkasse (je 12 Proben) waren longitudinal wie folgt ausgewählt: beim Entbluten, beim Abflammen, am Peitschentunnel, nach Eviszeration, bei der Klassifizierung, nach der Schockdusche und im Transporter. Die Umfeldproben umfassten personalassoziierte Proben (PE) wie Kettenhandschuhe, Handschuhe, Schuhe und Schürzen, produktberührende Oberflächen (carcass-contact surface, CCS) wie Messer, Säge, die Handbrause an der Säge und an der Eviszeration, Haken, das Geländer im Klassifizierungsbereich, den Peitschentunnel und das Wasser im Peitschentunnel. Als nicht-produktberührende Oberflächen wurden Lüftungen, Gitter, Geländer, die Kühlraumwände, unrecyceltes Brühwasser und die Hygieneschleuse beprobt (non-carcass contact surface, NCCS). Die Probennahmestellen im Zerlegebereich verfolgten jeweils die zu den zuvor beprobten Karkassen zugehörigen Schlögel und Karrees. Die ersten Proben wurden an der Karkasse im Kühlraum, dann bei der Grobzerlegung und anschließend an den Produktoberflächen von Karree und Schlögel entlang der Feinzerlegung gezogen. Außerdem wurden Karree und Schlögel während der Lagerung beprobt.

Als personalassoziierte Proben (PE) dienten Schürzen, Handschuhe und Schuhe nach Passage der Hygieneschleuse, in der Feinzerlegung und der Verpackung. Als produktberührende Proben (FCS) wurden die Hakensysteme im Kühlraum, Förderbänder in der Grob- und Feinzerlegung, Sägen in der Grobzerlegung, Messer und Kisten in der Feinzerlegung, Aufhängungen für das Karree, Haken für den Schlögel, der Fleischwol, sowie die Plastikverpackungen und Transportkisten (E2) beprobt. Folgende nicht-produktberührende Oberflächen (NFCS) wurden im Zerlegebereich inkludiert: Kühlraumwände, Boden, Feinzerlegung und Waagen.

2.3. MIKROBIOLOGISCHE UNTERSUCHUNG - *LISTERIA* SPP.

Die Wischproben wurden im nächsten Schritt auf das Vorhandensein von *L. monocytogenes* und *Listeria* spp. mit mikrobiologischen Mittel untersucht: Abbildung 2 zeigt das Vorgehen für die Listerienanreicherung laut EN ISO 11290-1:2017.

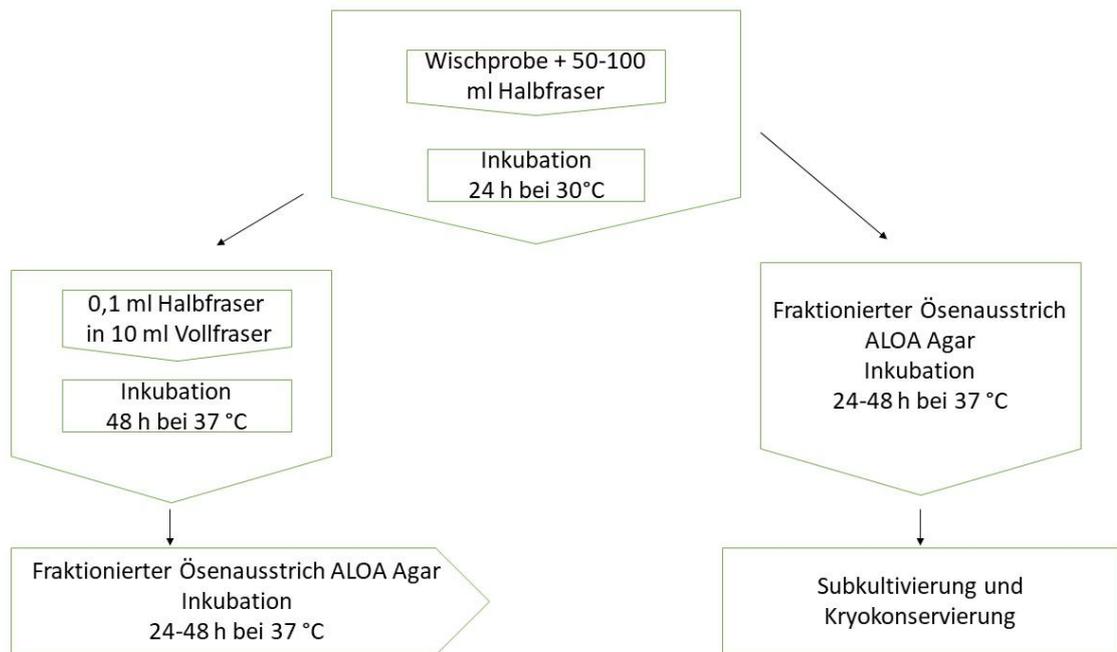


Abbildung 2: Isolierung und Detektion von *L. monocytogenes* und *Listeria* spp. aus Wischproben (ISO 11290-1). Abkürzungen: ALOA, Agar *Listeria* nach Ottaviani und Agosti.

Die Wischproben wurden gekühlt in das Labor transportiert (4 °C) und sofort verarbeitet.

Dazu wurden die Wischproben mit 50-100 ml Halbfraser vermengt, durchgeknetet und bei 30 °C für 24 h inkubiert. Nach Inkubation wurde der Halbfraser in 10 ml Vollfraser überimpft und anschließend aus dem Halbfraser ein fraktionierter Ösenausstrich (10 µl Öse (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland)) auf ALOA Agar durchgeführt. Vollfraser und ALOA Agar wurden bei 37 °C für 24-48 h inkubiert. Nach Inkubation der Vollfraser-Anreicherung wurde auf ALOA Agar/Brilliance *Listeria* Agar (Thermo Fisher Scientific Inc., Oxoid, Hampshire, UK) fraktioniert ausgestrichen und die Selektivagarplatten bei 37 °C für 24-48h inkubiert. Die Koloniemorphologiebewertung auf ALOA Agar/Brilliance *Listeria* Agar (Thermo Fisher Scientific Inc, Oxoid) erfolgte entsprechend der folgenden Kriterien:

Listeria spp. Kolonien erscheinen türkisblau aufgrund der β-D Glucosidase Reaktion; pathogene *Listeria* (*L. monocytogenes* und *L. ivanovii*) bilden zusätzlich einen Hof um die Kolonie durch die phosphatidylspezifische Phospholipase C Reaktion. Die grampositive und -negative Konkurrenzflora wird durch Selektivsupplemente gehemmt (Nalidixinsäure, Polymyxin B und Ceftazidim). Als

Antimykotikum wird Amphotericin B eingesetzt. Die Zusammensetzung des beim Versuch benutzten modifizierten ALOA Agars „Brilliance *Listeria* Agar“ (Thermo Fisher Scientific Inc., Oxoid), der Listerien differenziert durch den Nachweis von Lecithinase (Phosphotidylcholin-Phospholipase C (PCPLC)-Aktivität anstatt von Phosphotidylinositol-Phospholipase C (PIPLC)-Aktivität. Beide Enzyme, PCPLC und PIPLC, sind mit der Virulenz in *Listeria* spp. assoziiert, und daher ist das Vorhandensein eines der beiden Enzyme ein nützlicher Indikator für die Pathogenität, kann Tabelle 4 entnommen werden.

Tabelle 4: Zusammensetzung des Brilliance *Listeria* Agars, modifizierter Listerien Agar nach Ottaviani und Agosti (ALOA Agar).

BRILLIANCE LISTERIA AGAR BASIS	g/Liter
Peptone	18.5
Hefeextrakt	4
Natriumchlorid	9.5
Natriumpyruvat	2
Lithiumchlorid	15
Maltose	4
X-glucoside chromogenic mix	0.2
Agar	14
pH 7.2 ± 0.2 @ 25°C	
BRILLIANCE LISTERIA SELECTIVE SUPPLEMENT	pro Liter
Nalidixinsäure	26.0mg
Polymyxin B	10.0mg
Ceftazidim	6.0mg
Amphotericin	10.0mg
BRILLIANCE LISTERIA DIFFERENTIAL SUPPLEMENT	pro Liter
Lecithin	40.0ml

Quelle: http://www.oxoid.com/UK/blue/prod_detail/prod_detail.asp?pr=CM1080&cat=&c=UK&lang=EN; eingesehen am: 24.08.2020.

Typische *Listeria* spp. und *L. monocytogenes*-Kolonien wurden auf ALOA Agar/Brilliance *Listeria* Agar (Thermofisher, Oxoid) aufgereinigt und als Reinkulturen auf Trypton-Soja-Agar mit 6% Hefe (TSA-Y) (Biokar Diagnostics, Beauvais Cedex, Frankreich) übertragen. Nach einer Inkubation von 24-48 h bei 37 °C wurden die Isolate bei -80 °C in Glycerolstocks kryokonserviert (Sanyo Electric Co. Ltd., Moriguchi, Japan). Dazu wurden 500 µl Hirn-Herz-Bouillon (Thermo Fisher Scientific Inc., Oxoid) mit 500 µl 60 % Glycerol (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) gemischt und eine (10 µl) Öse (Sarstedt) von *Listeria*-Kolonien hinzugegeben und gevortext. Die Isolate wurden in der *Listeria*-Stammsammlung der Abteilung für Lebensmittelmikrobiologie hinterlegt.

2.4. MIKROBIOLOGISCHE UNTERSUCHUNG-SALMONELLA SPP.

Um Salmonellen nachweisen zu können, muss zuerst ein 2-stufiges Anreicherungsverfahren erfolgen (EN ISO 6579-1:2017; Abbildung 3).

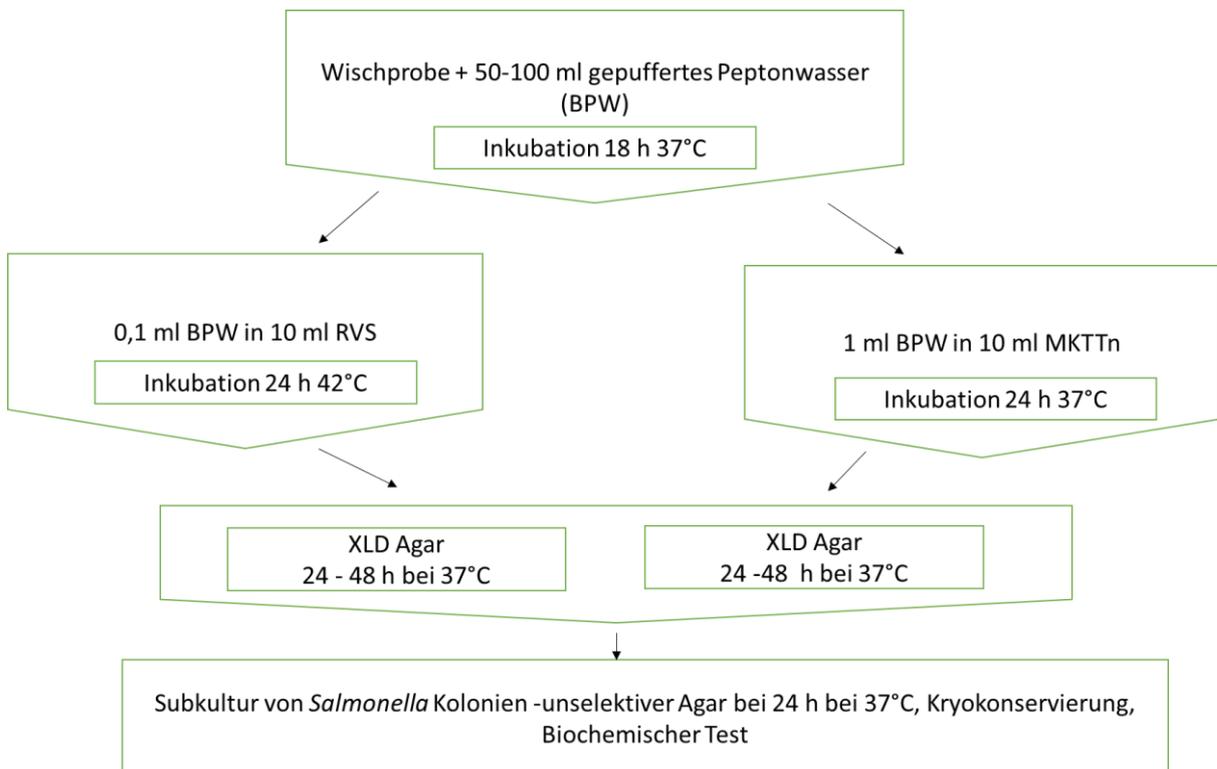


Abbildung 3: Isolierung und Detektion von *Salmonella* spp. aus Wischproben (ISO 6579).

Abkürzungen: XLD Agar= Xylose-Lysin-Deoxycholate Agar; RVS= Rappaport-Vassiliadis-Anreicherung; MKTTn= Müller-Kauffmann-Tetrathionate-Novobiocin-Bouillon

Die gewonnene Wischprobe wurde mit jeweils 50-100 ml BPW aufgefüllt und für 18 h bei 37 °C inkubiert. Für die selektive Anreicherung von *Salmonella* spp. wurde 0,1 ml BPW in 10 ml RVS überführt und bei 42 °C für 24 h inkubiert, zusätzlich wurde 1 ml BPW in 10 ml MKTTn hineinpipetiert

und für 24 h bei 37 °C inkubiert. Nach Abschluss der Inkubation wurde die jeweilige Anreicherung mit einer 10 µl Öse (Sarstedt) auf XLD Agar (Thermo Fisher Scientific Inc., Oxoid) ausgestrichen und bei 37 °C für 24-48 h inkubiert. Im Anschluss wurden die *Salmonella*-Kolonien subkultiviert, so dass Reinkulturen entstanden und diese wurden auf unselektivem Agar bei 37 °C für 24 h inkubiert. Danach wurden sie kryokonserviert und biochemische Test konnten durchgeführt werden.

Der Xylose-Lysin-Deoxycholate (XLD) (Thermo Fisher Scientific Inc., Oxoid) Agar dient der Detektion und Isolierung von *Salmonella* spp. und Shigella-Kolonien stellen sich durch die Decarboxylierung von Lysin als rosa–transparente Kolonien dar. Salmonellen fermentieren zusätzlich Xylose und bilden Schwefelwasserstoff, was eine Schwarzfärbung der Kolonien zur Folge hat. Andere *Enterobacteriaceae*, wie z. B. *Escherichia coli*, fermentieren Laktose und Saccharose unter Senkung des pH-Wertes, was einen Indikatorumschlag im Nährboden von rot (Phenolrot) zu gelb zur Folge hat. *E. coli* bildet zusätzlich häufig ein gelbes Präzipitat um die Kolonie. Die Zusammensetzung ist in Tabelle 5 angeführt.

Tabelle 5: Zusammensetzung des Xylose-Lysine-Deoxycholate (XLD)-Agars.

XLD AGAR BASIS	g/Liter
Hefeextrakt	3
L-Lysine HCl	5
Xylose	3.75
Lactose	7.5
Sucrose	7.5
Sodium Desoxycholat	1
Natriumchlorid	5
Natriumthiosulphat	6.8
Ammoniumeisencitrat	0.8
Phenolrot	0.08
Agar	12.5
pH 7.4 ± 0.2 @ 25°C	

Quelle: http://www.oxid.com/UK/blue/prod_detail/prod_detail.asp?pr=CM0469&c=UK&lang=EN; eingesehen am: 24.08.2020.

Typische *Salmonella* spp. Kolonien wurden auf XLD Agar (Thermo Fisher Scientific Inc., Oxoid) aufgereinigt und auf TSA-Y Agar (Biokar Diagnostics) für 24-48 h bei 37 °C inkubiert. Die Isolate wurden bei –80 °C kryokonserviert (siehe Kapitel 2.3) Die Subkulturen wurden einem Oxidasetest unter-

zogen. Dazu wurde Bakterienmaterial mit einem sterilen Tupfer (Lohmann und Rauscher GmbH, Rengsdorf, Deutschland) entnommen und mit dem Oxidasereagenz (bioMerieux SA, Marcy-l'Étoile, Frankreich) beträufelt. Nach 20 sek Einwirkzeit wurden Oxidase (Cytochromoxidase)-positive Bakterien durch einen Farbumschlag nach blau detektiert. Oxidase-positiv sind z. B. *Pseudomonadaceae*, *Aeromonadaceae* und *Moraxellaceae*, während *Enterobacteriaceae* wie *Salmonella* Oxidase-negativ reagieren (<https://bacdive.dsmz.de/>; eingesehen am: 24.08.2020). Grundsätzlich wurden alle *Salmonella*-verdächtigen Kolonien mittels PCR bestätigt. Im Fall von fraglichen Ergebnissen (meist schwer zu trennende Mischkulturen) wurde von Reinkulturen und nach Oxidase-negativer Reaktion eine biochemische Identifizierung mittels Analytic Profile Index (API®) 20 E (bioMerieux SA) durchgeführt. Zu dem Zweck wurde die *Salmonella* verdächtige Kultur auf TSA-Y (Biokar Diagnostics) bei 37 °C für 24-48 h angezüchtet und in den API 20 E überführt. Dazu wurden 5 Kolonien in 5 ml 0,9% NaCl (Merck KGaA) suspendiert und jeweils 100-150 µl in die einzelnen Reaktionswannen des Teststreifens überführt.

Die Reaktionen von Lysin-Decarboxylase (LDC), Ornithin-Decarboxylase (ODC), Arginin-Dehydrolase (ADH), Schwefelwasserstoff (H₂S) und Urea-Hydrolyse (URE) wurden mit sterilem Paraffinöl (Merck KGaA) überschichtet. Die Teststreifen wurden in mit destilliertem Wasser befeuchteten (3 ml, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) Inkubationswannen bei 37 °C für 24 h inkubiert. Die Beurteilung der Reaktionen erfolgte nach folgenden Auswerteschlüsseln (Tabelle 6), dabei wurde eine Zahlenbewertung jeder Reaktion durchgeführt, was in weiterer Folge in einem Api-Code resultierte. Dieser Code wurde im Api Web Online Tool von bioMerieux zur Speziesbestimmung herangezogen (<https://apiweb.biomerieux.com/login>; eingesehen am: 12.08.2020).

Tabelle 6: Auswertung *Enterobacteriaceae* API 20E (bioMerieux).

NACHWEIS VON	ABKÜRZUNG	POSITIVE REAKTION	NEGATIVE REAKTION
Beta-Galaktosidase	ONPG	gelb	farblos
Arginin-Dehydrolase	ADH	rot oder orange	gelb
Lysin-Decarboxylase	LDC	rot oder orange	gelb
Ornithin-Decarboxylase	ODC	rot oder orange	gelb
Citratverwertung	CIT	blau-grün oder blau	hellgrün oder gelb
Schwefelwasserstoff	H ₂ S	schwarzer Niederschlag	farblos bis grau
Urea- Hydrolysierung	URE	rot oder orange	gelb
Deaminase	TDA	rot-braun	gelb
Indol -Produktion	IND	innerhalb 2 min rot	gelb
Acetoin -Produktion	VP	pink bis rot in 10 min	farblos
Gelatinase	GEL	schwarze Diffusion	keine Diffusion
Verwertung von Zuckern			
Glukose	GLU	gelb	blau oder blau-grün
Mannitol	MAN	gelb	blau oder blau-grün
Inositol	INO	gelb	blau oder blau-grün
Sorbitol	SOR	gelb	blau oder blau-grün
Rhamnose	RHA	gelb	blau oder blau-grün
Sucrose	SAC	gelb	blau oder blau-grün
Melbiose	MEL	gelb	blau oder blau-grün
Amygdalin	AMY	gelb	blau oder blau-grün
Arabinose	ARA	gelb	blau oder blau-grün
Oxidase	OX	violett	farblos oder gelb

2.5. MOLEKULARBIOLOGISCHE CHARAKTERISIERUNG

2.5.1. EXTRAKTION DER BAKTERIELLEN DNA MIT CHELEX RESIN®

Die DNA-Extraktion erfolgte von der Ursprungsplatte als „Plattenabschwemmung“. Dabei wurde Material von verdächtigen Kolonien in 1 ml Tris (Hydroxymethyl)-Aminomethanhydrochlorid (Tris-HCL) – Lösung (0,01M) (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, USA) aufgenommen. Die Suspension wurde gevortext, zentrifugiert (8000 rcf, 5 min), der Überstand verworfen und das Zellpellet in 100 µl Tris aufgenommen und erneut gevortext. Im Falle von Isolatbestätigungen aus der Kryokultur wurden diese auf TSAY ausgestrichen, für 24-48 h bei 37 °C inkubiert und eine halbe 1 µl Öse in 100 µl Tris überführt. Die DNA-Extraktion in den weiteren Schritten erfolgte nach dem Protokoll von WALSH et al. (1991). 400 µl Chelex-Resin Lösung (Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA) wurden zur Zellsuspension überführt und gevortext. Die Proben wurden für 10 Minuten auf einen Thermoblock bei 100 °C

inkubiert (Kleinfeld Labortechnik, Gehrden, Deutschland) und nach Abkühlung für 5 Sekunden bei Höchstgeschwindigkeit in einer Tischzentrifuge (Eppendorf AG, Wien, Österreich) zentrifugiert. Der Überstand, der die bakterielle DNA enthielt, wurde vorsichtig abpipettiert, in ein 1,5 ml Maximum Recovery Röhrchen (Corning Life Sciences, Tewksbury, USA) überführt und bei -20 °C gelagert (Liebherr, Korneuburg, Österreich).

2.5.2. LISTERIA SPP. PCR SPEZIESBESTÄTIGUNG

Eine Multiplex-PCR wurde zur Identifizierung der folgenden Listerienarten verwendet: *L. grayi*, *L. innocua*, *L. ivanovii*, *L. monocytogenes*, *L. seeligeri* und *L. welshimeri*. Alle Arten können mit Invasionsassoziiertes Protein p60 (*iap* Gen) nachgewiesen werden (BUBERT et al., 1999). Primer, Mastermix-Zusammensetzung und PCR-Bedingungen sind in Tabelle 7, 8 und 9 dargestellt. Die Targetlänge der PCR-Produkte beträgt zwischen 480 bp für *L. grayi* und 1200 bp für *L. welshimeri*/*L. ivanovii*/*L. seeligeri*. *L. innocua* hat eine Targetlänge von 870 bp und die Targetlänge für *L. monocytogenes* beträgt 660 bp. Da *L. welshimeri*, *L. ivanovii* und *L. seeligeri* aufgrund ihrer gleichen Targetlänge nicht mit Hilfe einer Gelelektrophorese unterschieden werden können, muss zur Differenzierung dieser Listerien-Spezies ein API herangezogen werden. Tabelle 8 stellt die Zusammensetzung des Mastermixes dar und hier kann man entnehmen, dass 23 µl vom Mastermix und 2 µl vom Template in die 25 µl fassende Reaktionswanne je Probe gegeben wurden. Als Positivkontrollen dienten die DNA der folgenden Referenzstämme: *L. seeligeri* (INR 1657; ATCC 35967)/*L. ivanovii* (INR 1656; ATCC 19119)/*L. welshimeri* (INR 1655; ATCC 35897), *L. innocua* (INR 2951; ATCC 33090), *L. grayi* (INR 1654; ATCC 19120) und von *L. monocytogenes* (INR 2974; ATCC 35152). Die Negativkontrolle stammte aus der DNA-Extraktion (Chelex Extraktion nach WALSH et al., 1991) und als Negativkontrolle des PCR Mastermix („non-template control“, NTC) wurde Diethylcarbonat (DEPC)-Wasser (Thermo Fisher Scientific Inc.) mitgeführt.

In Tabelle 9 wird der Ablauf der im Thermocycler VWR Doppio (VWR, Wien, Österreich) stattfindenden 30 PCR Zyklen, die die Denaturierung, Anlagerung und Verlängerung der DNA beinhalten, beschrieben.

Tabelle 7: Primer für die Multiplex-PCR zur Listerien-Speziesidentifizierung (*iap* Gen).

PRIMER	SEQUENZ	SPEZIES	AMPLIFICATIONS-GRÖSSE (bp)
Siwi2	5' - TAA CTG AGG TAG CGA GCG AA - 3'	<i>L.welshimeri/L. ivanovii/L. seeligeri</i>	1200
Ino2	5' - ACT AGC ACT CCA GTT GTT AAA C - 3'	<i>L.innocua</i>	870
MonoA	5' - CAA ACT GCT AAC ACA GCT ACT - 3'	<i>L.monocytogenes</i>	660
Murga1	5' - CCA GCA GTT TCT AAA CCT GCT - 3'	<i>L. grayi</i>	480
Lis1B	5' - TTA TAC GCG ACC GAA GCC AAC - 3'	Reverse primer for all species	

Quelle: BUBERT et al. (1999).

Tabelle 8: Mastermixzusammensetzung für die Multiplex-PCR zur Listerien-Speziesidentifizierung (*iap* Gen).

MASTERMIX	ENDKONZENTRATION	STOCKKONZENTRATION	PRO REAKTION (µl)
DEPC treated water			8.45
10x buffer	1x		2.5
MgCl ₂	1.5 mM	50 nM	0.75
Siwi1	128 nM	1600 nM	2
Ino2	128 nM	1600 nM	2
MonoA	128 nM	1600 nM	2
Murga1	128 nM	1600 nM	2
Lis1B	128 nM	1600nM	2
dNTP' s	200 µM	5000 µM	1
Taq pol (Plat.)	1.5 U	5 U/ul	0.3
Mastermix			23
Template			2
Reaktionsvolumen			25

Quelle: BUBERT at al. (1999).

Tabelle 9: PCR-Cyclereinstellung für die Multiplex-PCR zur Listerien-Speziesidentifizierung (*iap* Gen).

PCR ABLAUF	ZEIT	TEMPERATUR
Start Denaturierung	2 Minuten	94 °C
Denaturierung	0,5 Minuten *	94 °C
Anlagerung	0,5 Minuten *	56 °C
Verlängerung	0,5 Minuten *	72 °C
Abschließende Verlängerung	5 Minuten	72 °C
Aufbewahrung		4 °C

*30 Zyklen; Quelle: BUBERT et al. (1999).

2.5.3. *SALMONELLA SPP.* PCR BESTÄTIGUNG

Zur Bestätigung von *Salmonella* spp. wurde nach RAHN et al. (1992) und MALORNEY et al. (2003) ein PCR-Assay mit dem Zielgen *invA* - Invasion Protein *invA* und einer Ampliconlänge von 284 bp durchgeführt. Die spezifischen *invA*-Primer sind 5'-GTG AAA TTA TCG CCA CGT TCG GGC AA-3' (forward primer: *S139*) und 5'-TCA TCG CAC CGT CAA AGG AAC C-3' (reverse Primer: *S141*).

Als Positivkontrolle diente *Salmonella enterica* DSM 554. Die Negativkontrolle stammte aus der DNA-Extraktion (Chelex Extraktion nach WALSH et al., 1991) und als Negativkontrolle des PCR-Mastermix („non-template control“, NTC) wurde DEPC (Thermo Fisher Scientific Inc.) -Wasser mitgeführt.

Die Beschreibung des Mastermixes und der PCR-Bedingungen sind in Tabelle 10 und 11 dargestellt. Der Mastermix setzte sich aus DEPC-Wasser, PCR-Puffer, MgCl₂, *S139* und *S141*, sowie dNTP's und Taq Polymerase zusammen, die genauen Maßangaben können der Tabelle 10 entnommen werden. Es wurden pro Reaktionswanne 20 µl Mastermix und 5 µl Template hineingegeben. Es fanden 30 PCR-Zyklen im Thermocycler VWR Doppio (VWR) statt. Nachfolgend lief die abschließende Verlängerung der PCR-Produkte ab, die hiernach bei 4 °C gelagert wurden (Tabelle 11).

Tabelle 10: Mastermixzusammensetzung für die *invA* PCR.

MASTERMIX	ENDKONZENTRATION	STOCKKONZENTARTION	PRO REAKTION (µl)
DEPC treated water			11.6
10x PCR buffer	1x		2.5
MgCl ₂	1.5 mM	50 mM	0.75
<i>S139</i>	400 nM	5000 nM	2
<i>S141</i>	400 nM	5000 nM	2
dNTP's	200 µM	5000 nM	1
Taq pol (Plat.)	0,75 U	5 U/µl	0,15
Gesamt			20
Template			5
Reaktionsvolumen			25

Quelle: RAHN et al. (1992).

Tabelle 11: PCR-Cyclereinstellung für Multiplex-PCR.

PCR ABLAUF	ZEIT	TEMPERATUR
Start Denaturierung	1 Minute	95 °C
Denaturierung	1 Minute *	95 °C
Anlagerung	0.5 Minute *	64 °C
Verlängerung	0.5 Minute *	72 °C
Abschließende Verlängerung	7 Minuten	72 °C
Aufbewahrung		4 °C

*30 Zyklen; Quelle: RAHN et al. (1992) und MALORNEY et al. (2003).

2.5.4. *LISTERIA MONOCYTOGENES* SEROGROUP PCR

Die häufig in humane Infektionen involvierten und epidemiologisch relevanten *L. monocytogenes*-Serogruppen wurden mittels Serogroup-PCR differenziert (1/2a, 3a; 1/2b, 3b; 1/2c, 3c; 4b, 4d, 4e) (DOUMITH et al., 2004) (Tabelle 12) Mit der Multiplex-PCR kann man 5 verschiedene Amplicons mit Hilfe der Gelelektrophorese unterscheiden, die jeweils speziellen Serogruppen zugeordnet werden können. Alle *Listeria*-Spezies haben ein Amplicon mit 370 bp, welches als Primer *prs* besitzt. *L.*

monocytogenes Serovare 1/2a, 1/2c, 3a und 3c hat 691 bp, die *L. monocytogenes* Serovare 1/2c und 3c haben 906 bp, während *L. monocytogenes* Serovare 1/2b, 3b, 4b, 4d und 4e eine Amplicongröße von 471 bp hat. Die *L. monocytogenes* Serovare 4b, 4d und 4e haben 597 bp als Amplicongröße.

Die Beschreibung der PCR-Bedingungen und des Mastermixes ist in Tabelle 13 und 14 dargestellt. Als Positivkontrolle diente *L. monocytogenes* (MURRAY et al., 1926) Pirie (ATCC® BAA-679™). Die Negativkontrolle stammte aus der DNA-Extraktion (Chelex Extraktion nach WALSH et al., 1991) und als Negativkontrolle des PCR-Mastermix („non-template control“, NTC) wurde DEPC (Thermo Fisher Scientific Inc.)-Wasser mitgeführt. Das Reaktionsvolumen pro Probe betrug 25 µl und setzte sich aus 20 µl Mastermix und 5 µl Template zusammen (Tabelle 13). Im Thermocycler VWR Dippio (VWR) fanden nach der anfänglichen Denaturierung 35 PCR-Zyklen mit Denaturierung, Anlagerung an die DNA und Verlängerung dieser statt. Zum Schluss erfolgte eine abschließende Verlängerung und die PCR-Produkte wurden bei 4 °C gelagert (Tabelle 14).

Tabelle 12: Primer für die Multiplex-PCR zur Serogroup-Differenzierung von *L. monocytogenes* (DOUMITH et al., 2004).

PRIMER	SEQUENZ	SPEZIES	AMPLIFICATIONS-GRÖSSE (bp)
<i>Imo0737</i>	For: AGGGCTTCAAGGACTTACCC Rev: ACGATTCTGCTTGCCATTC	<i>L. monocytogenes</i> Serovare 1/2a, 1/2c, 3a und 3c	691
<i>Imo1118</i>	For: AGGGGTCTTAAATCCTGGAA Rev: CGGCTTGTTCCGCATACTTA	<i>L. monocytogenes</i> Serovare 1/2c und 3c	906
<i>ORF2819</i>	For: AGCAAAATGCCAAAACCTCGT Rev: CATCACTAAAGCCTCCCATTG	<i>L. monocytogenes</i> Serovare 1/2b, 3b, 4b, 4d und 4e	471
<i>ORF2110</i>	For: A370GTGGACAATTGATTGGTGAA Rev: CATCCATCCCTTACTTTGGAC	<i>L. monocytogenes</i> Serovare 4b, 4d und 4e	597
<i>prs</i>	For: GCTGAAGAGATTGCGAAAGAAG Rev: CAAAGAAACCTTGATTGCGG	Alle <i>Listeria</i> -Spezies	370

Tabelle 13: Zusammensetzung des Mastermix für die Multiplex-PCR zur Serogroup-Differenzierung von *L. monocytogenes*.

MASTERMIX	ENDKONZENTRATION	STOCKKONZENTARTION	PRO REAKTION (µl)
DEPC water			12
10x PCR Puffer	1		2.5
MgCl ₂	2 mM	50 mM	1
<i>Lmo0737-F</i>	1 µM	100 µM	0.25
<i>Lmo0737-R</i>	1 µM	100 µM	0.25
<i>ORF2819-F</i>	1 µM	100 µM	0.25
<i>ORF2819-R</i>	1 µM	100 µM	0.25
<i>ORF2120-F</i>	1 µM	100 µM	0.25
<i>ORF2120-R</i>	1 µM	100 µM	0.25
<i>Lmo1118-F</i>	1.5 µM	100 µM	0.375
<i>Lmo1118-R</i>	1.5 µM	100 µM	0.375
<i>Prs-F</i>	0.2 µM	10 µM	0.5
<i>Prs-R</i>	0.2 µM	10 µM	0.5
dNTP's		5 mM	1
Taq pol (Plat.)		5 U/µl	0.3
Gesamt			20
Template			5
Reaktionsvolumen			25

Quelle: DOUMITH et al. (2004)

Tabelle 14: PCR-Cyclereinstellung für Serovar-PCR.

PCR-ABLAUF	ZEIT	TEMPERATUR
Start Denaturierung	3 Minuten	94 °C
Denaturierung	40 Sekunden	94 °C
Anlagerung	1.15 Minuten*	53 °C
Verlängerung	1.15 Minuten*	72 °C
Abschließende Verlängerung	7 Minuten	72 °C
Aufbewahrung		4 °C

* 35 Zyklen; Quelle: DOUMITH et al. (2004)

2.5.5. GELELEKTROPHORESE

Die PCR-Amplicons wurden mit Hilfe der Gelelektrophorese nach Größe aufgetrennt. Das 1,5 %ige Agarosegel wurde aus 100 ml 10 x Tris-Borat-Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) (TBE) (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) Puffer und 1,5 g Agarose (PeqLab, Erlangen, Deutschland) durch 3-minütiges Aufschmelzen in der Mikrowelle (Silva Schneider Electric, Rueil-Malmaison, France) hergestellt. Im Anschluss wurde 3,5 µl PeqGreen (PeqLab) zum flüssigen Agarosegel hinzugegeben und dieses in eine Gelkammer mit zwei 20 slot Gelkämmen gefüllt. Das entstandene Gel wurde

30 Minuten später in die mit 10 x TBE-Puffer, der aus 9,3 g EDTA (Sigma-Aldrich Co.), 55 g Borsäure (Sigma-Aldrich Co.), 108 g Tris-Hydroxymethylaminmethan (Sigma-Aldrich Co.) und 1000 ml Millipore Wasser hergestellt wurde, gefüllte Elektrophorese-Kammer (Bio-Rad Laboratories Inc.) passagiert. Die Gelelektrophorese lief bei einer Spannung von 120 V für 30 Minuten ab. Jeweils 5 µl einer 100-Basenpaar-(bp)Leiter (Thermo Fisher Scientific Inc.) wurden in die erste und letzte Tasche (slot) des Gels hineingegeben. Anschließend wurden alle anderen Taschen mit 10 µl Probe, die die PCR-Amplikons enthalten, und vorher mit 1 - 2 µl Probenladepuffer (SLB) (Thermo Fisher Scientific Inc.) gemischt wurden, befüllt. Nach Abschluss der Gelelektrophorese wurde das Gel in die Fotografiereinheit GelDoc 2000 (Bio-Rad Laboratories Inc.) gelegt, um unter UV-Licht die PCR-Amplikons visualisieren zu können. Das TIFF-Format diente als Dokumentation.

2.5.6. SUBTYPISIERUNG VON *LISTERIA MONOCYTOGENES* UND *SALMONELLA* SPP. MITTELS PULS-FELD-GELELEKTROPHORESE (PFGE)

L. monocytogenes und *Salmonella*-Isolate wurden auf TSA-Y Agar (Biokar Diagnostics) ausgestrichen und bei 37 °C für 24 Stunden inkubiert.

Die Kolonien wurden vom TSA-Y Agar (Biokar Diagnostics) mit einem sterilen Baumwolltupfer (Lohmann und Rauscher GmbH, Rengsdorf, Deutschland) in TRIS-EDTA (TE) Puffer übertragen und die optische Dichte (OD) auf 1.0 photometrisch bei 610 nm eingestellt (Shimadzu, UV1800; Kyoto, Japan).

Für die Herstellung von 10x TE Puffer muss man 60,57 g Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS; Sigma Aldrich Co.) & 14,61 g Ethylendiamintetraessigsäure Dinatriumsalz (EDTA-Na₂; Sigma Aldrich Co.) auf einen Liter auffüllen und mit Natronlauge und Salzsäure auf den pH-Wert von 8,0 einstellen. Aus dieser 10x TE Stocklösung wird 1x TE Puffer hergestellt, indem man 20 ml auf 1 l destilliertes Wasser auffüllt. Die Zellyse erfolgte für *L. monocytogenes* durch Zugabe von Lysozym (10mg/ml, Sigma Aldrich Co.; 40 µl) zu der Zellsuspension in TE Puffer (400 µl; OD 1.0) bei 56 °C für 30 min.

Im Fall von *Salmonella* war keine Zugabe von Lysozym zur Zellsuspension erforderlich. Es folgte direkt der nächste Schritt, das Einschmelzen der Zellsuspension in Agarose.

Dazu wurde 0,25 g Seakem Gold Agarose (VWR International, Radnor, USA) in 25 ml 10x TE Puffer aufgeschmolzen (Mikrowelle Silva Schneider Electric). Das Agarosegel wurde dann bei 56 °C im Wasserbad (GFL-1086-Schuettel-Wasserbad, Burgwedel, Germany) temperiert. Die Blöckchenformen wurden einseitig mit Laborklebeband beklebt und 20 µl Proteinase K (Sigma-Aldrich Co.) wurde zu jeder Zellsuspension hinzugegeben. In weiterer Folge wurde 400 µl Agarosegel mit der Zellsuspensi-

on durch Auf- und Abpipettieren gemischt und in die Blöckchenformen übertragen. Für jede Probe wurden 5 Blöckchen, ohne Luftblasen einzumischen, angefertigt. Die Blöckchen wurden nach dem Erstarren (ca. 30 min.) mit einem Spatel in Zell-Lysis-Puffer, der 25 µl Proteinase K (Stocklösung 20 mg/ml; Sigma-Aldrich Co.) enthielt, übertragen und über Nacht bei 54 °C im Wasserbad (GFL-1086-Schuettel-Wasserbad) geschüttelt. Die Rezeptur des Zell-Lysis-Puffer war wie folgt: 50 mM Tris, 50 mM EDTA, pH 8,0 + 1% Sarcosine + 0,1 mg/ml Proteinase K (<https://www.cdc.gov/pulsenet/PDF/listeria-pfge-protocol-508c.pdf>; eingesehen am: 25.08.2020).

Im nächsten Schritt wurden die Blöckchen alternierend, insgesamt 5-mal, mit 54 °C temperiertem Aqua bidest (B. Braun) und TE Puffer für jeweils 10 min bei 120 rpm gewaschen und in 5 ml TE Puffer bei 4 °C gelagert.

Der Restriktionsverdau erfolgte für *L. monocytogenes* mit *Asc I* (Thermo Fisher Scientific Inc., Life Technologies) und für Salmonella mit *Xba I* (Thermo Fisher Scientific Inc., Life Technologies). In beiden Ansätzen wurde Salmonella Braenderup H9812 als Längenmarker inkludiert. Im ersten Schritt des Makrorestriktionsverdau erfolgte eine Equilibrierung der Blöckchen für 10 min mit Puffer Tango. Im folgenden Schritt wurde das jeweilige Restriktionsenzym (*Asc I* und *Xba I*) zum erneuerten Puffer Tango hinzugefügt und bei 37 °C für 4 h verdaut. Die Rezepturen für den Enzymverdau sind in Tabelle 15 und 16 dargestellt.

Tabelle 15: Zusammensetzung des Enzymmixes für den *L. monocytogenes* Restriktionsverdau.

<i>Asc I</i> (37 °C) Stock (10U/µl)			
ohne Enzym		mit Enzymen	
1x		1x	
90,0 µl	Aqua bid.	87,5 µl	Aqua bid.
10,0 µl	Puffer Tango	10,0 µl	Puffer Tango
		2,5 µl	<i>Asc I</i>
	100 µl per sample		100 µl per sample

Tabelle 16: Zusammensetzung des Enzymmixes für den *Salmonella* spp. Restriktionsverdau.

<i>Xba</i> I (37 °C) Stock (50U/μl)			
ohne Enzym		mit Enzymen	
1x		1x	
90,0 μl	Aqua bid.	89,5 μl	Aqua bid.
10,0 μl	Puffer Tango	10,0 μl	Puffer Tango
		0,5 μl	<i>Xba</i> I
	100 μl per marker		100 μl per marker

Die Puls-Feld-Gelelektrophorese erfolgte im Anschluss, indem die Blöckchen in 200 μl 0.5x TBE Puffer für 5 min equilibriert wurden. Die Elektrophorese-Gießform wurde vorbereitet und ein 30 well Kamm auf die Ecke plaziert. Die Marker-Blöckchen (*Salmonella* Braenderup H9812) wurden an den Enden des Gels auf den ersten Positionen des Kammes plaziert, in weiterer Folge die entsprechenden Isolat-Blöckchen. Im Anschluss wurde eine 1 % Seakem Gold Agarose (VWR International, Radnor, USA) aufgeschmolzen (1,5 g und 100 ml 0,5x Tris-Borat-EDTA (TBE Puffer), in den Gelgießstand gegossen und der Kamm mit den Blöckchen wurde vorsichtig senkrecht im Gelgießstand platziert. Nach Aushärten des Gels wurde dieses in der PFGE-Wanne plaziert (Chef DR III system, Bio-Rad Laboratories Inc.) und für 22.5 h unter den folgenden Einstellungen „laufen gelassen“: initial switch time: 4.0 sec; final switch time: 40.0 sec, Spannung: 6 Volt und Included Angle: 120.

Der 0.5x TBE Puffer wurde aus einem 10x TBE Stock Puffer hergestellt, wobei die Rezeptur für 10x TBE wie folgt zusammengesetzt ist: Tris (Sigma-Aldrich Co.) 107,78g/l (0,89 M); EDTA-Na₂-Salz (Sigma-Aldrich Co.) 7,44 g/L (0,02 M) und Borsäure (Sigma-Aldrich Co.) 55,0 g/L (0,89 M).

Der 10x TBE Puffer wurde anschließend in Millipore Wasser (Milli-Q® Direct (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland)) verdünnt: 115 ml 10 x TBE, 2185 ml Millipore Wasser um ein Endvolumen von 0,5x TBE Puffer von 2300 ml zu erzielen.

Das Gel wurde in Ethidiumbromid für 10-30 min gefärbt (5 μl Ethidiumbromid, 500 ml Millipore Wasser) und in der Fotografiereinheit GelDoc 2000 (Bio-Rad Laboratories Inc.) unter UV-Belichtung aufgenommen. Die Gelbilder wurden im TIFF-Format gespeichert und in der Software Bionumerics (Version 6.6, Applied Maths NV, Sint-Martens-Latem, Belgium) ausgewertet. Die Ähnlichkeitsanalyse wurde anhand von Dice Koeffizienten mit einer Positionstoleranz von 1,5% durchgeführt. Das Clustering wurde mit der Methode der ungewichteten Paargruppen mit arithmetischem Mittel (UPGMA) erstellt. PFGE-Muster ohne Bandenunterschied wurden nach TENOVER et al. (1995) als genetisch nicht unterscheidbar betrachtet.

3. RESULTATE

3.1. *LISTERIA* SPP UND *L. MONOCYTOGENES* DETEKTION IN OBERFLÄCHENPROBEN

Die schlachthofassoziierten Proben (Schlachthof A), die innerhalb dieser Studie zum Nachweis von *L. monocytogenes* und *Salmonella* spp. gezogen wurden, sind in Abbildung 4 dargestellt. Die Proben, die im Zerlegebetrieb B genommen wurden, sind in Abbildung 5 dargestellt.

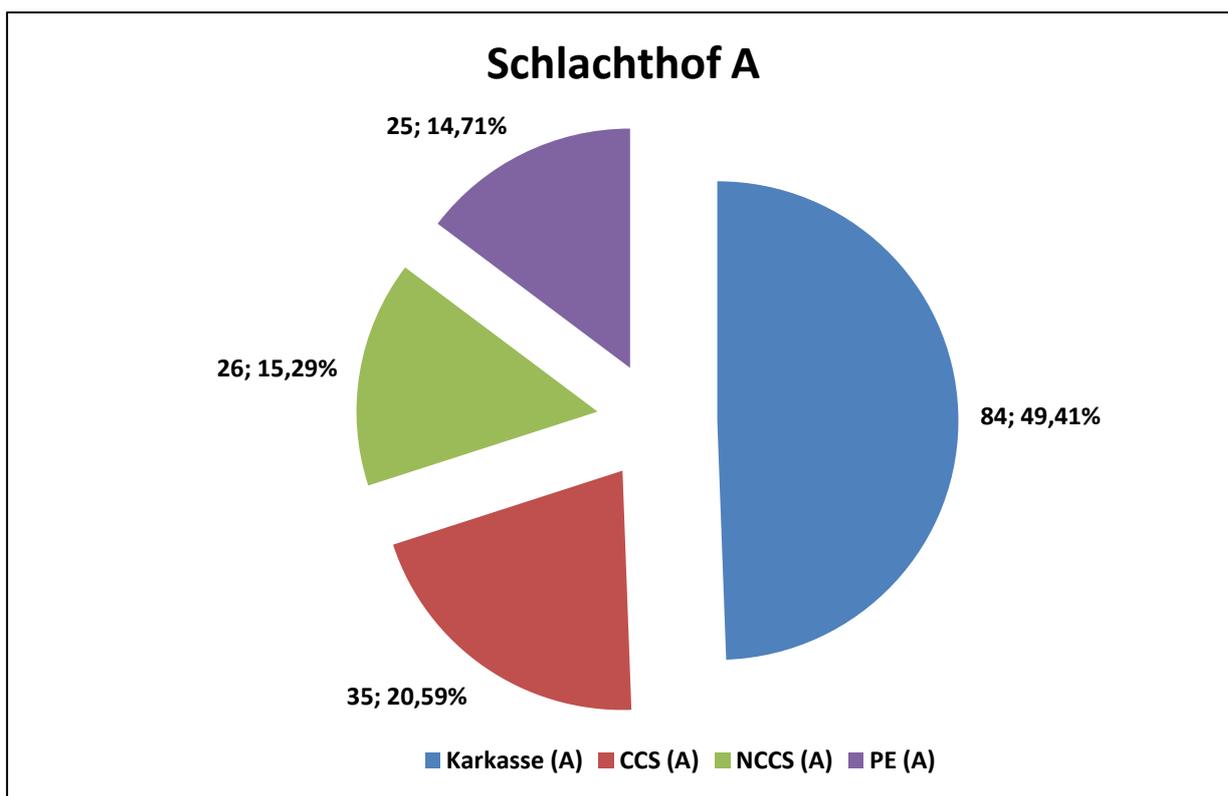


Abbildung 4: Verteilung der am Schlachthof A gewonnenen Proben (Anzahl; Prozent).
Abkürzungen: CCS=carcass contact surface; NCCS= non-carcass contact surface; PE= personalassozierte Proben.

In der Abbildung 4 wird die Verteilung der auf dem Schlachthof A gewonnenen Proben in Prozenten sowie deren Anzahl dargestellt. Insgesamt sind im Schlachthof A 170 Proben genommen und auf die Anwesenheit von *Salmonella* spp. und *Listeria monocytogenes* untersucht worden.

Der größte Probenanteil (49,41%, n=84) fiel auf die Beprobung der Karkassen, wobei 12 Schlachtkörper entlang der Schlachtkette verfolgt wurden. Die 12 Schlachtkörper entstammen drei Mastbetrieben (A, B, C). Die Probennahmeorte entlang der Schlachtkette waren während des Entblutens, beim Abflammen, am Peitschentunnel, nach der Eviszeration, bei der Klassifizierung, nach der Schockdusche und im Transporter. Es wurden 35 Proben (20,59%) von Oberflächen, die im

Kontakt mit den Karkassen standen (CCS), z.B. Messer, Säge, Haken, Klassifikationsgeländer etc. genommen. Von Oberflächen, die keinen Kontakt zum Schlachtkörper hatten (NCCS), beispielsweise Lüftungen, Gitter, Kühlraumwände, unrecyceltes Brühwasser, die Hygieneschleusen etc. wurden 26 Proben (15,29%) gezogen. Kettenhandschuhe, Handschuhe, Schuhe und Schürzen fielen in die Kategorie der personalassozierten Proben (PE) (n= 25; 14,71%).

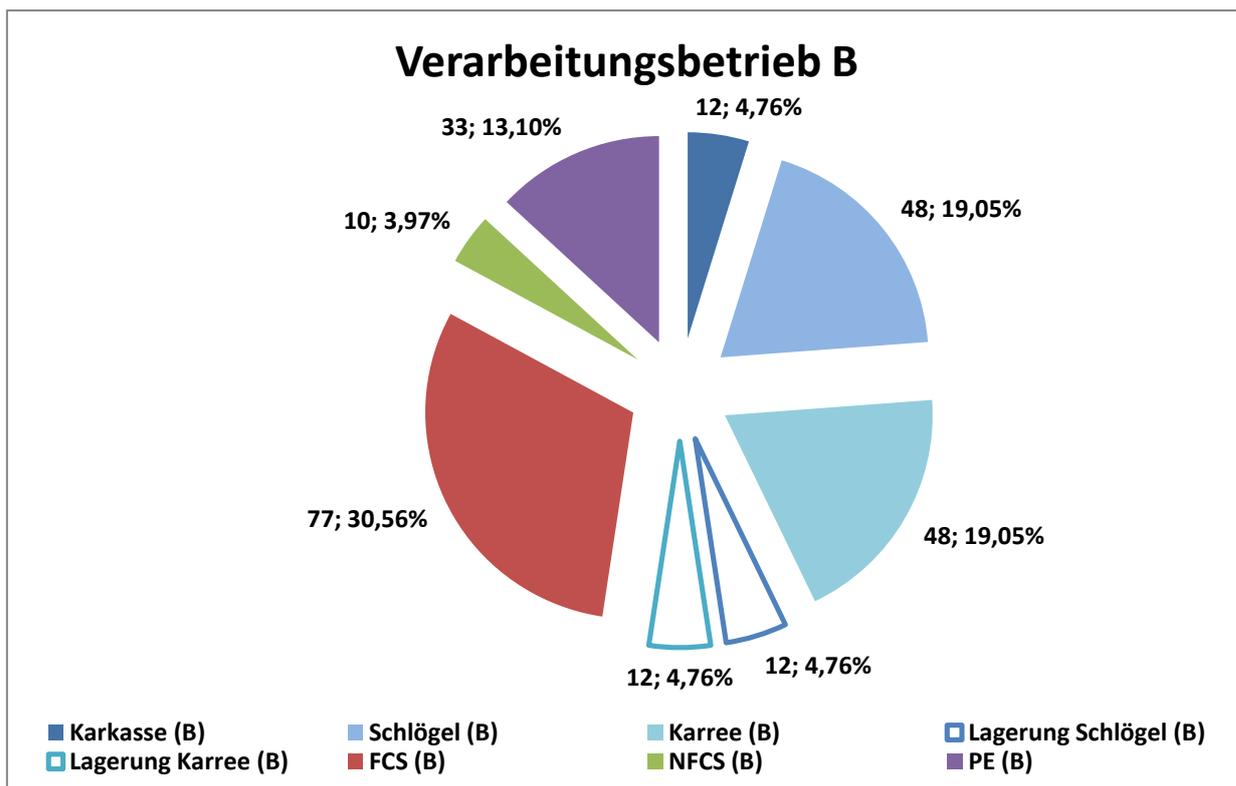


Abbildung 5: Verteilung der Probenentnahme im Zerlegebetrieb B (Anzahl; Prozent).

Abkürzungen: FCS= food contact surface; NFCS= non-food contact surface; PE= personalassozierte Proben.

Im Zerlegebetrieb B wurden 252 Proben aus acht verschiedenen Probenkategorien gezogen (Abbildung 5). Die meisten Proben wurden von Oberflächen (FCS) entlang der Zerlegekette von Schlögel und Karree, sowohl während der Grob- als auch Feinerlegung, gewonnen. In diesem Bereich wurden 30,56 % der Proben (n= 77/252) genommen. Es wurden 19,05 % der Proben (n= 48/252) jeweils vom Karree und Schlögel, d. h. von weiter zu verarbeitendem Fleisch, entlang der Zerlegekette genommen. Für die personalassozierten Proben (PE) wurden Schürzen, Handschuhe und Schuhe nach Passage der Hygieneschleuse, in der Feinerlegung und der Verpackung beprobt (n= 33; 13,10%). Von Karree und Schlögeloberflächen wurden auch während der Lagerung Proben gezogen (je n= 12/252; 4,76%).

Den kleinsten Probenanteil stellten 10 Proben (3,97%) von Oberflächen, die keinen Kontakt mit den Fleischerzeugnissen hatten (NFCS), dar. Dazu wurden Kühlraumwände, Bodenflächen sowie Waagen im Bereich der Feinzerlegung beprobt.

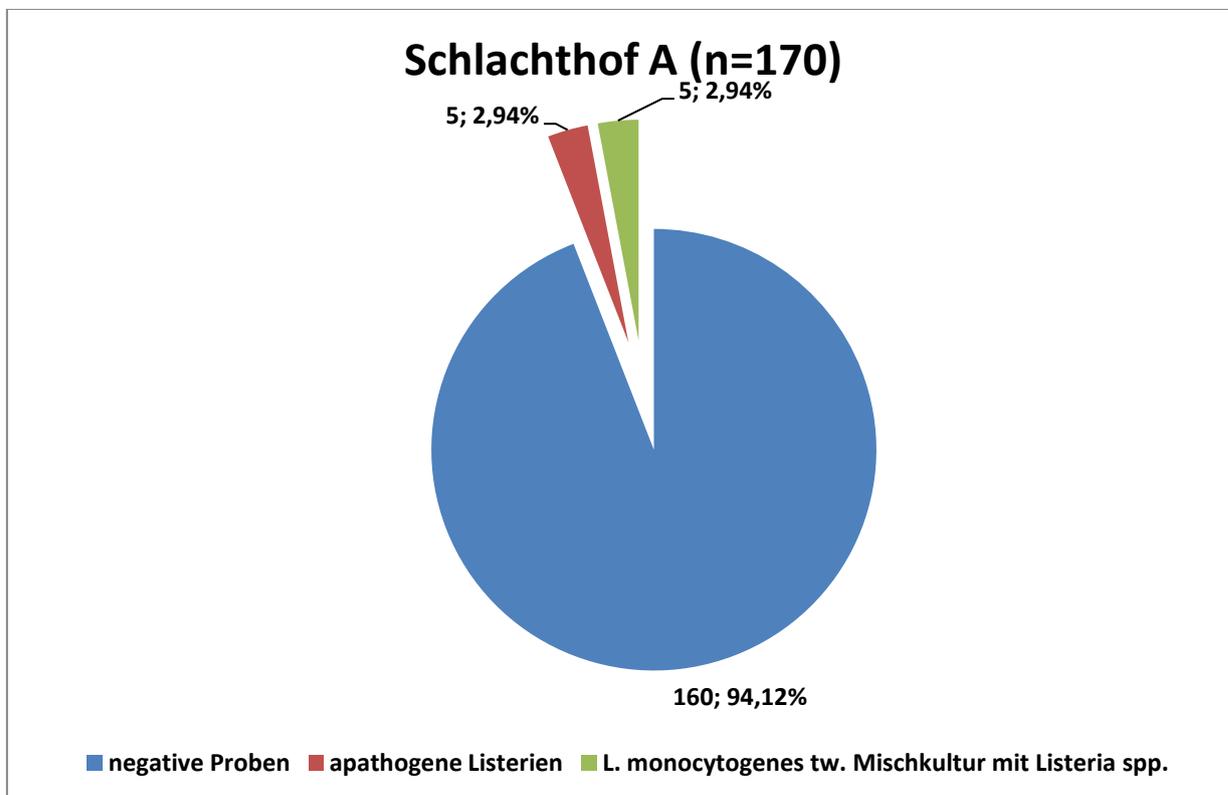


Abbildung 6: Verteilung (Anzahl, Prozent) der Speziesergebnisse im Schlachthof A.

In Abbildung 6 wird die Verteilung der Listerien-positiven und -negativen Proben im Schlachthof A dargestellt. Dabei wird bei den Proben, in denen Listerien nachgewiesen werden konnten, zwischen Proben mit apathogenen Listerien-Spezies und Kulturen, die *L. monocytogenes*-positiv waren, beziehungsweise wo eine Mischkultur mit *L. monocytogenes* nachgewiesen wurde, unterschieden.

Beim überwiegenden Anteil der Proben ($n= 160/170$; 94,12%) konnte keine Kontamination mit *Listeria* spp. nachgewiesen werden. Bei 2,94% der Proben ($n= 5$) wurde eine Kontamination mit *Listeria* spp. festgestellt. Die restlichen Proben ($n= 5$; 2,94%) wurden positiv auf *L. monocytogenes* bzw. eine *Listeria* spp. Mischkultur, die auch *L. monocytogenes* enthielt, getestet.

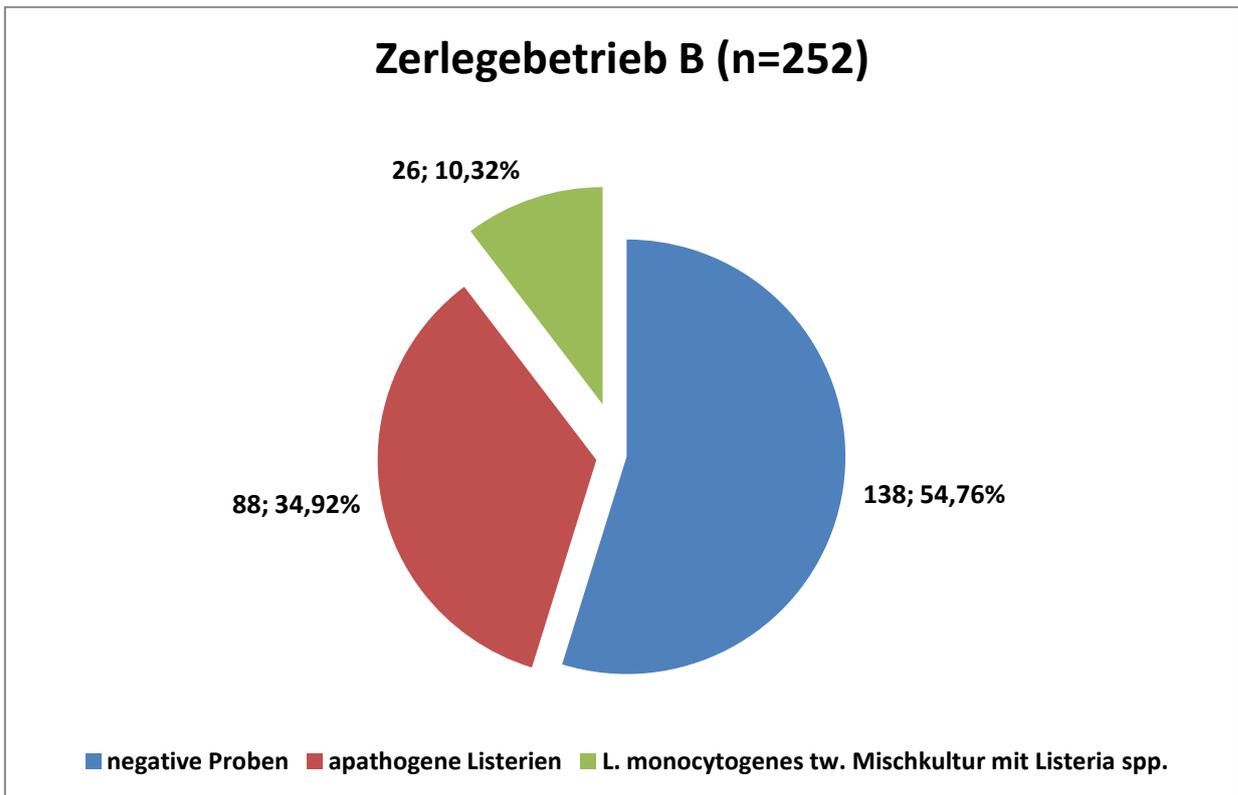


Abbildung 7: Verteilung (Anzahl, Prozent) der Speziesergebnisse im Zerlegebetrieb B.

In der Abbildung 7 wird die Verteilung der Listerien-positiven und -negativen Proben im Zerlegebetrieb B dargestellt.

Bei mehr als der Hälfte der am Zerlegebetrieb B gezogenen Proben ($n = 138/252$, 54,76%) war keine Kontamination mit Listerien nachweisbar. In 88 Proben (34,92%) konnten apathogene Listerien-Spezies und bei 10,32% ($n = 26/252$) konnte eine Kontamination der Probe mit *L. monocytogenes* alleine oder in einer Mischkultur mit anderen *Listeria*-Spezies zusammen vorliegend, nachgewiesen werden.

Tabelle 17: Probenahmeorte der *Listeria* spp. positiven Proben (Ort, Spezies, Probenanzahl).

BETRIEB	PROBE/PROBENAHMESTELLE	n	SPEZIES	PROBENAHMESTELLEN
Schlachthof A	Karkasse	80	negativ	
		2	<i>L. innocua</i>	Entbluten
		2	<i>L. monocytogenes</i> tw. gemischt mit anderen Spezies	Entbluten, Transporter
	Karkasse	84	gesamt	
	CCS	34	negativ	
		1	<i>L. welshimeri/L. seeligeri</i>	Peitschentunnel (Düsen)
	NCCS	24	negativ	
		2	<i>L. monocytogenes</i> tw. gemischt mit anderen Spezies	Hygieneschleuse (Bürste)
	PE	22	negativ	
		2	<i>L. innocua</i>	Eviszeration (Schürze), Hygieneschleuse (Schuhe)
1		<i>L. monocytogenes</i> tw. gemischt mit anderen Spezies	Hygieneschleuse (Schuhe)	
Umwelt-assoziiert	86	gesamt		
Zerlegebetrieb B	Schlögell/Karree	61	negativ	
		61	<i>L. welshimeri/L. seeligeri</i>	Schlögel (Entbeinen, Sortieren, Tiefziehen vorher, nachher, Lagertest); Karree (Karreeisen), FZ Karree (Tiefziehen vorher, nachher, Lagertest)
		10	<i>L. monocytogenes</i> tw. gemischt mit anderen Spezies	Schlögel (Sortieren, Tiefziehen vorher, nachher, Lagertest); FZ Karree (Tiefziehen vorher, Lagertest)
	Karkasse/Schlögel/Karree	132	gesamt	
	FCS	55	negativ	
		11	<i>L. welshimeri/L. seeligeri</i>	GB (FB, Säge), Entschartemaschine (Schlögel), FZ Schlögel (FB, Messer), Karree (Karreeisen), Faschiertes (Container)
		11	<i>L. monocytogenes</i> tw. gemischt mit anderen Spezies	Schlögel (Haken), GB (FB, Säge), FZ Karree (FB), Karree (Karreeisen)
	NFCS	4	negativ	
		4	<i>L. welshimeri/L. seeligeri</i>	Waage, FZ Schlögel (Boden)
		2	<i>L. monocytogenes</i> tw. gemischt mit anderen Spezies	Waage, FZ Karree (Boden)
	PE	18	negativ	
		12	<i>L. welshimeri/L. seeligeri</i>	Schieber (Handschuhe), FZ Schlögel & Karree (Schürze), FZ Schlögel (Handschuhe), Verpackung Karree & Schlögel (Handschuhe), Hygieneschleuse (Schuhe)
		3	<i>L. monocytogenes</i> tw. gemischt mit anderen Spezies	FZ (Schürze), Hygieneschleuse (Schuhe)
Umwelt-assoziiert	120	Gesamt		

Abkürzungen: CCS= carcass contact surface; NCCS= non-carcass contact surface; FCS= food contact surface; NFCS= non-food contact surface; PE= personalasoziierte Proben; FB= Förderband; GB= Grobzerlegung; FZ= Feinzerlegung, n= Anzahl.

Die Proben im Schlachthof A wurden, wie in Abbildung 5 beschrieben, unterteilt in Proben von der Karkasse und umweltassoziierte Proben, die nochmals in drei Kategorien unterteilt wurden: Oberflächenproben von Oberflächen mit Kontakt zur Karkasse (CCS), Oberflächen ohne Kontakt zur Karkasse (NCCS) und personalassoziierte Proben (PE).

Im Zerlegebetrieb B wurde zwischen den Fleischproben, welche in Schlägel und Karree unterteilt waren, und umweltassoziierten Proben unterschieden.

Die Umweltproben wurden wiederum in Proben von Oberflächen mit Kontakt zum Fleisch (FCS) und ohne Fleischkontakt (NFCS) sowie in personalassoziierte Proben unterteilt, siehe Abbildung 6.

In der Mehrheit der Karkassenproben vom Schlachthof A (n= 80/84; 95, 24%) waren keine Listerien nachweisbar. In zwei (2,38 %) der Proben bei der Station Entbluten war *L. innocua* nachweisbar. *L. monocytogenes* gemischt mit anderen Spezies (n= 2; 2,38%) war beim Entbluten und im Transporter auf den Karkassen nachweisbar. Bei der Beprobung von Oberflächen, die Kontakt mit der Karkasse hatten (CCS), konnte nur in einer Probe *L. welshimeri/L. seeligeri* nachgewiesen werden. Die *Listeria*-positiven Proben stammten von einer Düse im Peitschentunnel.

L. monocytogenes, teilweise gemischt mit anderen Spezies, konnte in zwei nicht-produktberührenden Oberflächen (NCCS) isoliert werden und entstammte Bürsten in der Hygieneschleuse.

Von den 25 personalassoziierten Proben (PE) waren 22 negativ. *L. monocytogenes*, teilweise als Mischkultur mit anderen Spezies, konnte an einer Probe von Schuhen in der Hygieneschleuse nachgewiesen werden. Eine Kontamination mit *L. innocua* lag bei zwei Proben vor. Eine Schürze bei der Eviszierung und Schuhe in der Hygieneschleuse wurden positiv beprobt.

Im Zerlegebetrieb B waren jeweils 61/132 (je 46,21%) der Karkassen/Fleischproben *Listeria* spp. negativ bzw. *L. welshimeri/L. seeligeri* positiv.

L. monocytogenes, teilweise als Mischkultur vorliegend, wurde in 10/132 (7,57%) Karkassen/Fleischproben isoliert. Diese Proben stammten vom Schlägel während des Sortierens, vor und nach dem Tiefziehen sowie beim Lagertest und vom Karree vor dem Tiefziehen und während der Lagerung.

Es wurden 77 Oberflächenproben von Oberflächen, die Kontakt zum Fleisch hatten (FCS), genommen. Von diesen waren 55 (71,42%) *Listeria* spp. negativ. Bei 11 (14,29%) der Proben wurden *L. welshimeri/L. seeligeri* isoliert. Diese Proben wurden vom Förderband und der Säge während der Grobzerlegung, der Entschartemaschine für den Schlägel, vom Förderband und Messer bei der Feinzerlegung des Schlägels, vom Karree reißen sowie vom Container, in dem das Faschierte gelagert

wurde, genommen. Bei 11 (14,29%) Proben vom Schlögelhaken, dem Förderband und der Säge in der Grobzerlegung, dem Förderband für das Karree sowie vom Karree reißen wurde eine Kontamination mit *L. monocytogenes*, welche teilweise auch als Mischkultur mit anderen Spezies vorlag, festgestellt. Von den 10 nicht-produktberührenden Proben (NFCS), waren 4 Proben negativ. Bei 4 (40%) Proben wurde eine Kontamination mit *L. welshimeri/L. seeligeri* detektiert. Diese Proben stammten von der Waage und dem Boden im Bereich der Schlögefleinzerlegung. *L. monocytogenes*, teilweise in Mischkulturen vorliegend, wurde in 2/10 (20%) der Proben, im Detail von der Waage und dem Boden im Bereich der Feinzerlegung für das Karree, nachgewiesen.

Bei drei der personalassoziierten Proben wurde *L. monocytogenes*, teilweise auch als Mischkultur mit anderen Spezies, isoliert. Die Proben stammten von einer Schürze in der Feinzerlegung und Schuhen in der Hygieneschleuse. *L. welshimeri/L. seeligeri* wurden in 12 Proben von Handschuhen eines Schiebers, Schürzen in der Feinzerlegung von Karree und Schlögel, dem Boden und Handschuhen in der Feinzerlegung, Handschuhen im Bereich der Verpackung von Karree und Schlögel sowie von Schuhen in der Hygieneschleuse nachgewiesen. Bei den restlichen 18 personalassoziierten Proben konnte keine Listerienkontamination festgestellt werden (Tabelle 17).

In der Tabelle 18 sind die Detailergebnisse der *Listeria spp.* positiven Proben nach ISO 11290-1 dargestellt. *L. innocua* war im Schlachthof A auf der Karkasse (Mastbetrieb C) beim Entbluten und auf personalassoziierten Proben nachweisbar (Schürze, Hygieneschleuse). *L. welshimeri/L. seeligeri* war lediglich auf den Düsen des Peitschentunnels (Hygiene Hot Spot) nachweisbar. Die Proben waren erst im Vollfraser (VF)-ALOA Ausstrich positiv, was auf eine niedrigere Kontamination hinweist.

Die *L. welshimeri/L. seeligeri*-Kontamination im Zerlegebetrieb B war im Bereich der Schlögelzerlegung bereits bei der Grobzerlegung (Entbeinen; Mastbetrieb A, C) sichtbar. Im weiteren Verlauf kam es wahrscheinlich zu einer *L. welshimeri/L. seeligeri*-Kreuzkontamination zwischen den Teilstücken der Mastbetriebe (A-B-C), die bis zum Lagertest nachweisbar war.

Auch die Karreezerlegelinie war *L. welshimeri/L. seeligeri* positiv. Beginnend bei der Grobzerlegung (Karree reißen; Mastbetrieb A-B-C) bis zum Lagertest (Mastbetrieb A-B-C) war eine Kreuzkontamination von Karreeteilstücken verfolgbar.

Bei der Grobzerlegung waren sowohl auf Säge als auch auf Förderbändern *L. welshimeri/L. seeligeri* nachweisbar. Auf der Stufe der Feinzerlegung waren im Bereich Schlögel die Entschartemaschine, Förderbänder, Messer und im Bereich Karree die Umgebung des Karree reißen positiv. Ein nicht in Zusammenhang mit der Beprobung stehender Container mit Faschierten war auch *L. welshimeri/L.*

seeligeri positiv getestet worden, was auf einen starken kontinuierlichen Listerien-Eintrag durch Frischfleisch-Chargen bei der Zerlegung hinweist. Personal wirkte direkt als Listerien-Vektor, da Handschuhe, Schuhe und Schürzen entlang der Zerlegekette positiv getestet wurden. Das hohe Vorkommen von Listerien besonders in der Prozessumgebung (FCS, NFCS) bedeutet, dass die Umfeldproben einen hohen Listerien-Mischkultur-Charakter aufweisen und ebenso einen hohen Begleitflora-Anteil besitzen. Dies ist bei der Listerien-Anreicherung im Halbfraser (HF) und Vollfraser (VF) deutlich sichtbar (Tabelle 18), da manche Proben im HF *L. welshimeri*/*L. seeligeri* positiv sind und im VF diese Population nicht mehr nachweisbar ist, da andere Listerien (*L. monocytogenes*; Tabelle 19) oder Begleitflora (*Bacillus*, *Enterococcus* etc) diese als Konkurrenzflora überwuchern.

In der Tabelle 19 werden die Proben, bei denen *L. monocytogenes* bzw. eine Mischkultur von *L. monocytogenes* mit anderen Listerien-Spezies nachgewiesen wurden, genauer erläutert. Es wird dargestellt, von welcher der 12 beprobten Karkassen die positive Probe stammt, aus welchem Mastbetrieb diese kommt, darüberhinaus der Probenentnahmeort sowie die Probenanzahl und ob ein Nachweis in Halb- und/oder Vollfraser-Anreicherung vorlag.

Tabelle 18: *Listeria* spp. positive Wischproben nach ISO 11290-1.

BETRIEB	PROBE	MÄSTER	KARKASSE	DETAILS	PROBENAHMEORT	N	ERGEBNIS	HF-ALOA	VF-ALOA
Schlachthof A	Karkasse	C	9	Entbluten	Nacken	2	IN		x
	PE			Eviszeration	Schürze	1	IN		x
	PE			Hygieneschleuse	Schuhe	1	IN		x
	CCS			Peitschentunnel	Düsen	1	WE/SE		x
Zerlegebetrieb B	Schlögel	A	2	Entbeinen	Schale	3	WE/SE		x
	Schlögel	C	12	Entbeinen	Schale	1	WE/SE		x
	Schlögel	A	3	Sortieren	Schale	2	WE/SE		x
	Schlögel	A	2	Tiefziehen vorher	Schale	3	WE/SE	x	
	Schlögel	B	6	Tiefziehen vorher	Schale	3	WE/SE	x	x
	Schlögel	C	9	Tiefziehen vorher	Schale	1	WE/SE	x	
	Schlögel	A	2	Tiefziehen nachher	Schale	2	WE/SE		x
	Schlögel	B	5	Tiefziehen nachher	Schale	2	WE/SE	x	x
	Schlögel	C	9	Tiefziehen nachher	Schale	3	WE/SE		x
	Schlögel	A	2	Lagertest	Schale	1	WE/SE		x
	Schlögel	B	5	Lagertest	Schale	3	WE/SE		x
	Schlögel	C	9	Lagertest	Schale	3	WE/SE		x
	Karree	A	4	Karreereißer	Schale	1	WE/SE	x	x
	Karree	B	6	Karreereißer	Schale	2	WE/SE	x	
	Karree	C	9	Karreereißer	Schale	2	WE/SE	x	
	Karree	A	2	Feinzerlegung	Rose	3	WE/SE		x
	Karree	B	5	Feinzerlegung	Rose	3	WE/SE		x
	Karree	C	9	Feinzerlegung	Rose	1	WE/SE	x	x
	Karree	A	2	Tiefziehen vorher	Rose	3	WE/SE	x	x
	Karree	B	5	Tiefziehen vorher	Rose	3	WE/SE		x
Karree	C	11	Tiefziehen vorher	Rose	2	WE/SE	x	x	

Tabelle 18 fortgesetzt: *Listeria* spp. positive Wischproben nach ISO 11290-1.

BETRIEB	PROBE	MÄSTER	KARKASSE	DETAILS	PROBENAHMEORT	N	ERGEBNIS	HF-ALOA	VF-ALOA
	Karree	A	3	Tiefziehen nachher	Rose	2	WE/SE	x	X
	Karree	B	6	Tiefziehen nachher	Rose	2	WE/SE		x
	Karree	C	9	Tiefziehen nachher	Rose	3	WE/SE	x	x
	Karree	A	2	Lagertest	Rose	3	WE/SE		x
	Karree	B	5	Lagertest	Rose	1	WE/SE		x
	Karree	C	11	Lagertest	Rose	3	WE/SE		x
	FCS			Grobzerlegung	Förderband	1	WE/SE	x	
	FCS			Grobzerlegung	Säge	1	WE/SE	x	x
	FCS			Feinzerlegung Schlögel	Förderband	1	WE/SE		x
	FCS			Feinzerlegung Schlögel	Messer	3	WE/SE	x	x
	FCS			Karreereißer		2	WE/SE	x	x
	FCS			Faschiertes	Container	1	WE/SE	x	
	FCS			Entscharmmaschine Schlögel		2	WE/SE		x
	NFCS			Waage		1	WE/SE		x
	NFCS			Waage		1	WE/SE	x	x
	NFCS			Waage		1	WE/SE		x
	NFCS			Feinzerlegung Schlögel	Boden	1	WE/SE	x	
	PE			Feinzerlegung Karree	Schürze	1	WE/SE	x	x
	PE			Feinzerlegung Schlögel	Schürze	2	WE/SE	x	x
	PE			Feinzerlegung Karree	Handschuhe	2	WE/SE	x	x
	PE			Feinzerlegung Schlögel	Handschuhe	2	WE/SE	x	x
	PE			Verpackung Karree	Handschuhe	2	WE/SE		x
	PE			Verpackung Schlögel	Handschuhe	1	WE/SE		x
	PE			Hygieneschleuse (reine Seite)	Schuhe	1	WE/SE		x
	PE			Schieber	Handschuhe	1	WE/SE	x	x

Abkürzungen: FCS= food contact surface; NFCS= non-food contact surface; PE= personalassozierte Proben; N= Anzahl; We/Se= *L. welshimeri*/*L. seeligeri*; N= Anzahl, HF-Aloa= Halbfraser-Anreicherung auf Aloa; VF-Aloa= Vollfraser-Anreicherung auf Aloa.

L. monocytogenes PCR Serotyp 1/2a, 3a war bereits im Schlachthof A auf der Karkasse beim Entbluten nachweisbar (Mastbetrieb C). Während der weiteren Zerlegung waren pathogene Listerien nicht nachweisbar. Erst im Transporter zum Zerlegetrieb B war *L. monocytogenes* PCR Serotyp 1/2a, 3a auf der Karkasse wieder nachweisbar (nun vom Mastbetrieb A). *L. monocytogenes* PCR Serotyp 1/2a, 3a und 1/2b, 3b waren im Bereich der Hygieneschleuse und auf den Schuhen des Personals beweisbar. Am häufigsten waren im Zerlegetrieb produktberührende Oberflächen (FCS) mit *L. monocytogenes* PCR Serotyp 1/2a, 3a kontaminiert (n= 11/26, 42,31%), gefolgt von Karree (n= 5/26, 19,23%) und Schlögel (n= 5/26, 19,23%).

L. monocytogenes konnte bei der Schlögelzerlegung im Anfangsbereich auf Teilstücken der drei Mastbetrieb A-B-C nachgewiesen werden. Bei der Lagerung waren nur Proben von Betrieb A *L. monocytogenes* positiv. Bei der Karreezerlegung war *L. monocytogenes* erst ab der Feinzerlegung nachweisbar (Proben von Mastbetrieb C), bei der Lagerung Stücke von Mastbetrieb B.

Diese Kreuzkontaminationen lassen sich auf eine hohe Umfeldbelastung der produktberührenden Oberflächen zurückführen. Im Bereich der Grobzerlegung waren bereits Haken und Säge mit *L. monocytogenes* belastet. Entlang der Schlögellinie waren schon Haken positiv, während entlang der Kareelinie die Kontamination durch das Umfeld besonders stark im Bereich der Förderbänder bemerkbar war. Die besondere Belastung mit *L. monocytogenes* PCR Serotyp 1/2a, 3a im Bereich der Feinzerlegung Karree spiegelte sich durch die Kontamination des Bodens, der Waage und auf der Personalschürze wieder. Die vom Personal *L. monocytogenes* positiv getesteten Schuhe unmittelbar nach Passage der Hygieneschleuse deuten auf eine nicht funktionsfähige Reinigung und Desinfektion hin (Tabelle 19).

Tabelle 19: *L. monocytogenes* (tw. gemischt mit anderen Spezies) positive Wischproben nach ISO 11290-1.

BETRIEB	PROBE	MÄSTER	KARKASSE	DETAILS	PROBENAHME-ORT	N	ERGEBNIS	HF-ALOA	VF-ALOA	SEROVAR PCR	SEROVAR PCR
Schlachthof A	Karkasse	C	11	Entbluten	Nacken	1	MONO		x	1/2a, 3a	
	Karkasse	A	4	Transporter	Nacken	1	MONO	x	x	1/2a, 3a	
	NCCS			Hygieneschleuse (reine Seite)	Bürste	2	MONO		x	1/2b, 3b	
	PE			Hygieneschleuse	Schuhe	1	MONO		x	1/2a, 3a	
Zerlegebetrieb B	Schlögel	A	1	Sortieren	Schale	1	MONO/WE		x	1/2a, 3a	
	Schlögel	B	5	Tiefziehen vorher	Schale	1	MONO/WE	x	x	1/2a, 3a	
	Schlögel	C	12	Tiefziehen vorher	Schale	1	MONO	x	x	1/2a, 3a	
	Schlögel	B	6	Tiefziehen nachher	Schale	1	MONO/WE	x	x	1/2a, 3a	
	Schlögel	A	3	Lagertest	Schale	1	MONO/WE	x	x	1/2a, 3a	
	Karree	C	11	Feinzerlegung	Rose	1	MONO	x	x	1/2a, 3a	
	Karree	C	12	Feinzerlegung	Rose	1	MONO/WE	x	x	1/2a, 3a	
	Karree	C	9	Tiefziehen vorher	Rose	1	MONO/WE	x	x	1/2a, 3a	
	Karree	B	6	Lagertest	Rose	1	MONO/WE		x	1/2a, 3a	
	Karree	B	7	Lagertest	Rose	1	MONO/WE		x	1/2c, 3c	1/2a, 3a
	FCS			Grobzerlegung	Förderband	1	MONO	x	x	1/2a, 3a	
	FCS			Grobzerlegung	Säge	1	MONO	x	x	1/2a, 3a	
	FCS			Feinzerlegung Karree	Förderband	1	MONO/WE	x	x	1/2c, 3c	1/2a, 3a
	FCS			Feinzerlegung Karree	Förderband	1	MONO	x	x	1/2a, 3a	
	FCS			Feinzerlegung Karree	Förderband	1	MONO/WE	x	x	1/2a, 3a	
	FCS			Feinzerlegung Karree	Förderband	1	MONO/WE	x	x	1/2a, 3a	
	FCS			Karreereißer		1	MONO/WE	x	x	1/2c, 3c	1/2a, 3a
	FCS			Schlögel	Haken	1	MONO/WE	x	x	1/2a, 3a	
FCS			Schlögel	Haken	1	MONO/WE	x	x	1/2a, 3a		
FCS			Schlögel	Haken	1	MONO	x		1/2a, 3a		
FCS			Schlögel	Haken	1	MONO	x	x	1/2a, 3a		

Tabelle 19 fortgeführt: *L. monocytogenes* (tw. gemischt mit anderen Spezies) positive Wischproben nach ISO 11290-1.

BETRIEB	PROBE	MÄSTER	KARKASSE	DETAILS	PROBENAHMORT	N	ERGEBNIS	HF-ALOA	VF-ALOA	SEROVAR PCR	SEROVAR PCR
Zerlegebetrieb B	NFCS			Waage		1	MONO/WE	x	x	1/2a, 3a	
	NFCS			Feinzerlegung Karree	Boden	1	MONO	x	x	1/2a, 3a	
	PE			Feinzerlegung Karree	Schürze	1	MONO	x	x	1/2a, 3a	
	PE			Hygieneschleuse (reine Seite)	Schuhe	1	MONO/IN/WE		x	1/2a, 3a	
	PE			Hygieneschleuse (reine Seite)	Schuhe	1	MONO		x	1/2a, 3a	

Abkürzungen: FCS= Food contact surface; NFCS= non-food contact surface; PE= personalassozierte Proben; N= Anzahl; MONO= *L. monocytogenes*; MONO/WE= Mischkultur aus *L. monocytogenes* und *L. welshimeri/L. seeligeri*; HF-Aloa= Halbfraser-Anreicherung auf Aloa; VF-Aloa= Vollfraser-Anreicherung auf Aloa.

3.2. SALMONELLA SPP. DETEKTION IN OBERFLÄCHENPROBEN

Im Bereich von Schlachthof A waren drei Wischproben vom Nacken an der Probenahmestelle „Entbluten“ *Salmonella* spp. positiv. Insgesamt waren drei Karkassen von zwei Mastbetrieben *Salmonella* spp. positiv (n=3/170; 1,76%). Die Proben aus Mastbetrieb A und B (Karkasse 3 und 5) waren in der Kombination RVS-Anreicherung und Ausstrich auf XLD Agar *Salmonella* spp. positiv. Die Probe von Karkasse 6 (Mastbetrieb B) war sowohl in der RVS als auch MKTTn-Anreicherung in Kombination mit dem Selektivausstrich auf XLD Agar *Salmonella* spp. positiv (Tabelle 20).

Tabelle 20: Salmonella spp. positive Wischproben nach ISO 6579-1.

BETRIEB	MÄS-TER	Karkas-se	PROBEN (N)	DETAILS	ORT	ISOLATE (N)	ISO 6579-1	invA PCR	PFGE -Typ (Xbal)
Schlachthof A	A	3	3	Entbluten	Nacken	1	RVS-XLD	positiv	MA1
	B	5	5	Entbluten	Nacken	3	RVS-XLD	positiv	MA1
	B	6	6	Entbluten	Nacken	6	RVS-XLD, MKTTn-XLD	positiv	MA2

XLD Agar= Xylose-Lysin-Deoxycholate Agar, RVS= *Rappaport-Vassiliadis* Anreicherung, MKTTn= Müller-Kauffmann-Tetrathionate-Novobiocin Bouillon.

3.3. SUPTYPISIERUNG MITTELS PULS-FELD-GELELEKTROPHORESE (PFGE)

Die *L. monocytogenes* Subtypisierung (n=78 Isolate) mittels Puls-Feld-Gelelektrophorese (PFGE) resultierte in 17 Ascl Profilen (Tabelle 21).

Acht *L. monocytogenes* Kryokulturen enthielten jeweils zwei verschiedenen *L. monocytogenes* Genotypen, die weder auf dem Selektivnährmedium ALOA, in der Bestätigungs-PCR (*iap* Gen) noch in der Serogroup PCR (alle 1/2a, 3a) differenzierbar waren. Erst die PFGE Typisierung half bei der Unterscheidung von jeweils zwei *L. monocytogenes* Genotypen pro Probe. *L. monocytogenes* PFGE-Profil (Ascl) MA3 und MA6 waren im Zerlegebetrieb B im Bereich FCS (Karreeisen, Schlögel Haken), am Schlögel (Entbeinen, Tiefziehen vorher; Mastbetrieb C) und am Karree (Lagertest; Mastbetrieb B) nachweisbar.

Das *L. monocytogenes* PFGE-Profil (Ascl) MA3 wurden ab dem Transporter (Schlachthof A) entlang der gesamten Zerlegung (Zerlegebetrieb B) nachgewiesen (n=48/86; 55.81 %). *L. monocytogenes* PFGE-Profil MA13 war der zweithäufigste Genotyp (n=9/86; 10.47%) präsent auf Karree (Feinzerlegung) und Schlögel (Tiefziehen vorher) (beide Mastbetrieb C), außerdem auf einer personalassoziierten Probe (Feinzerlegung Karree, Schürze).

Tabelle 21: *L. monocytogenes* Puls-Feld-Gelelektrophorese (PFGE) (n= 86) isoliert.

ORT	PROBE	MÄSTER	KARKASSE	DETAILS	PROBENAHPME-ORT	ISOLATE (N)	PCR-SEROGROUP	PFGE ASCI	ISOLATE (N)	PCR-SEROGROUP	PFGE ASCI Typ
Schlachthof A	Karkasse	C	11	Entbluten	Nacken	1	1/2a, 3a	MA1			
	NCCS			Hygieneschleuse (reine Seite)	Bürste	3	1/2b, 3b	MA2			
	Karkasse	A	4	Transporter	Nacken	4	1/2a, 3a	MA3			
	PE			Schleusen Schuhe	Schuhe	1	1/2a, 3a	MA4			
Zerlegebetrieb B	PE			Feinzerlegung Karree	Schürze	1	1/2a, 3a	MA3			
	Karree	C	12	Feinzerlegung	Rose	1	1/2a, 3a	MA3			
	Karree	B	6	Lagertest	Rose	4	1/2a, 3a	MA3			
	Schlögel	A	3	Lagertest	Schale	3	1/2a, 3a	MA3			
	Schlögel	B, C	5, 12	Tiefziehen vorher	Schale	6	1/2a, 3a	MA3			
	Schlögel	B	6	Tiefziehen nachher	Schale	2	1/2a, 3a	MA3			
	FCS			Karreereißer		1	1/2a, 3a	MA3	1	1/2a, 3a	MA6
	FCS			Schlögel	Haken	4	1/2a, 3a	MA3	1	1/2a, 3a	MA6
	FCS			Schlögel	Haken	3	1/2a, 3a	MA3			
	NFCS			Waage		1	1/2a, 3a	MA3			
	PE			Hygieneschleuse (reine Seite)	Schuhe	1	1/2a, 3a	MA3	1	1/2a, 3a	MA7
	PE			Hygieneschleuse (reine Seite)	Schuhe	2	1/2a, 3a	MA3	1	1/2a, 3a	MA8
	NFCS			Feinzerlegung Karree	Boden	1	1/2a, 3a	MA3			
	FCS			Grobzerlegung	Säge	2	1/2a, 3a	MA3			
	FCS			Feinzerlegung Karree	Förderband	6	1/2a, 3a	MA3			
	PE			Feinzerlegung Karree	Schürze	3	1/2a, 3a	MA3	1	1/2a, 3a	MA13
	FCS			Schlögel	Haken	2	1/2a, 3a	MA5			
	Schlögel	C	11	Entbeinen	Schale	1	1/2a, 3a	MA3	1	1/2a, 3a	MA6
	Schlögel	C	12	Tiefziehen vorher	Schale	1	1/2a, 3a	MA3	1	1/2a, 3a	MA6
	Karree	B	8	Lagertest	Rose	1	1/2a, 3a	MA3	1	1/2a, 3a	MA6
	Karree	C	11	Feinzerlegung	Rose	1	1/2a, 3a	MA9			
	Schlögel	B	5	Tiefziehen vorher	Schale	1	1/2a, 3a	MA10			
	Karree	C	12	Feinzerlegung	Rose	1	1/2a, 3a	MA11			
	Karree	C	9	Lagertest	Rose	2	1/2a, 3a	MA12			
	Karree	C	11, 12	Feinzerlegung	Rose	4	1/2a, 3a	MA13			
Schlögel	C	12	Tiefziehen vorher	Schale	4	1/2a, 3a	MA13				
Karree	B	7	Lagertest	Rose	1	1/2c, 3c	MA14				
FCS			Feinzerlegung Karree	Förderband	1	1/2c, 3c	MA14				
FCS			Schlögel	Haken	1	1/2a, 3a	MA15				

Tabelle 21 fortgeführt: *L. monocytogenes* Puls-Feld-Gelelektrophorese (PFGE) (n= 86) isoliert.

ORT	PROBE	MÄSTER	KARKASSE	DETAILS	PROBENAHMEN- ORT	ISOLATE (N)	PCR- SEROGROUP	PFGE ASCI	ISOLATE (N)	PCR- SEROGROUP	PFGE ASCI Typ
Zerlegebetrieb B	FCS			Grobzerlegung	Säge	1	1/2a, 3a	MA16			
	FCS			Grobzerlegung	Förderband	5	1/2a, 3a	MA17			
	FCS			Feinzerlegung Karree	Förderband	1	1/2a, 3a	MA18			

Abkürzungen: FCS= food contact surface; NCCS= non-carcass contact surface; NFCS= non-food contact surface; PE= personalassoziierte Proben; N= Anzahl

PFGE-Profil MA14 (PCR-Serogruppe 1/2c, 3c) war in zwei unterschiedlichen Probennahmestationen detektierbar: einerseits am Förderband der Feinzerlegung Karree, später beim Lagertest Karree (Mastbetrieb B).

Die *L. monocytogenes*-Genotypen im Schlachthof A waren im Zerlegebetrieb B nicht mehr detektierbar. Der Transporter von Schlachthof A beherbergte zum ersten Mal den am häufigsten nachweisbaren Genotyp MA3. In der Hygieneschleuse des Schlachthofs A wurde im Reinbereich der Bürsten *L. monocytogenes* MA2 (Serogruppe 1/2b, 3b) und auf den Schuhen nach Passage der Schleuse *L. monocytogenes* MA4 (Serogruppe 1/2a, 3a) isoliert, was auf einen *Listeria*-„Hotspot“ oder kritischen Hygienebereich hinweist. Dieselbe kritische Stelle wurde im Bereich der Hygieneschleuse im Zerlegebetrieb B erkannt. Auch hier waren die Schuhe nach Passage der Schleuse mit drei unterschiedlichen Genotypen besiedelt, mit dem am häufigsten detektierten PFGE-Typ MA3, darüber hinaus MA7 und MA8 (alle PCR-Serogruppe 1/2a, 3a).

Im Verlauf der Zerlegung wurden auch andere Genotypen registriert; dabei waren PFGE-Typ MA5 und MA15 eindeutig umweltassoziiert, da sie von den Haken im Bereich Schlögel isoliert wurden. MA16, MA17 und MA18 waren im Bereich Grobzerlegung und Feinzerlegung Karree auf Säge und Förderband präsent. *L. monocytogenes* PFGE-Typ MA10 war auf dem Schlögel (Mastbetrieb B) im Bereich der Verpackung (Tiefziehen vorher) nachweisbar. Die Genotypen MA11 und MA12 waren bei der Feinzerlegung und Lagerung vom Karree (Mastbetrieb C) detektierbar.

Die *Salmonella* spp. Subtypisierung resultierte in zwei *Xba*I PFGE-Profilen, wobei PFGE-Profil MA1 sowohl in den Wischproben von der Karkasse beim Entbluten von Mastbetrieb A und B enthalten war, was auf eine Kreuzkontamination hindeutet. Das PFGE-Profil MA2 war nur in einer Karkassenwischprobe von Mastbetrieb B nachweisbar (Tabelle 20).

4. DISKUSSION

Ziel der Studie war es, die *L. monocytogenes* und *Salmonella* spp. Kontamination von Schweinekarassen im Schlachthof und von Schweinefleisch während der Zerlegung zu untersuchen. Dazu wurden 170 und 252 Wischproben von Karkassen, Schlögel und Karree während der Zerlegung und personal- und umweltassoziierte Proben in Schlachthof A und Zerlegebetrieb B gezogen.

Bis dato gibt es in Schlacht- und Zerlegebetrieben keine rechtlich vorgeschriebenen Kontrollen, die den *L. monocytogenes* Kontaminationsstatus erheben, dieser wird erst in weiterverarbeitenden Betrieben überprüft (Verordnung (EG) Nr. 2073/2005).

Im Schlachthof A war die *Listeria* spp. (apathogen) und *L. monocytogenes* Prävalenz je 2,94%, dabei waren zwei Wischproben von Karkassen (n= 2/84) während des Entblutens und des Transports, zwei Proben von nicht-produktberührenden Oberflächen (NCCS) (n= 2/26) und eine personalassoziierte Probe *L. monocytogenes* positiv (n= 1/25).

Der Reinigung und Desinfektion des Transporters sollte besondere Beachtung geschenkt werden, da hier ein *Listeria*-Reservoir, besonders auf den Wänden, bestand.

Im Zerlegebetrieb B kam es zu einer deutlichen Steigerung im *Listeria*-Nachweis: 34,92% und 10,32% der Wischproben enthielten apathogene Listerien-Spezies und *L. monocytogenes* alleine oder in einer Mischkultur mit anderen *Listeria*-Spezies.

In dieser Diplomarbeit wurde *L. monocytogenes* im Bereich der Schlachtung auf Karkassen bei der Station Entbluten, im Bereich der Hygieneschleusen (Bürsten) und im Transporter nachgewiesen, während apathogene Listerien im Bereich des Peitschentunnels auf den Düsen und auf personalassoziierten Proben (Eviszeration-Schürze, Hygieneschleuse-Schuhe) detektiert wurden.

GAMBOA-MARIN et al. (2012) erhoben ähnlich niedrige Kontaminationslevels auf den Karkassen (3,7%) und einen deutlichen Anstieg im Verlauf der Zerlegung (33,9% bei Proben von entbeintem Fleisch).

Vergleichbar niedrige Prävalenzwerte (9,7%) wurden in Kanada (Provinz Quebec) erhoben (CHERIFI et al., 2020). *L. monocytogenes* wurde im Enthaarungs- und Ausweidungsbereich (5,7%), im Kühl- und Hängebereich (5,5%) und im Zerlege- und Entbeinungsbereich (3,5%) isoliert. Außerdem wurde die höchste Oberflächenbelastung auf Förderbändern (2,7-3,0%) sowie der Umgebung (3%), den Maschinen (2,6 %) und Buchten (4%) nachgewiesen. Die *L. monocytogenes* Prävalenz lag ebenso bei 9,03% in zwei spanischen Schlachthöfen (MORALES-PARTERA et al., 2018a).

Im Vergleich dazu betrug die Gesamtprävalenz von *L. monocytogenes* in einer Studie von MELONI et al. (2013a) auf Sardinien, Italien, 33% auf Schweineschlachtkörpern, 23% auf Kontaktoberflächen und 25% auf Nichtkontaktflächen.

In einem Schlachthof in Flandern, Belgien, wurde sogar eine *L. monocytogenes* Prävalenz von 22% in den Schweineschlachtkörperproben registriert (DEMAITRE et al., 2020b).

SALA et al. (2016) berichteten in einer Studie von ähnlich hohen Prävalenzen von *L. monocytogenes* für Kontaktoberflächen (23,3%) und Oberflächen ohne Lebensmittelberührung (29,7 %) in einem rumänischen Schlachthof.

L. monocytogenes wurde in 20,3% der Proben von Schweineschlachthöfen in Sonora, Mexiko, nachgewiesen. Auf inerten Oberflächen war die Prävalenz dabei mit 20,8% höher als in Proben von der

Karkasse (15,9%). Bei Schlachthöfen ohne FIT (Federal Inspection Type)-Status lag die *L. monocytogenes* Prävalenz mit 25,7% noch höher (FIGUEROA-LOPEZ et al., 2019b).

In dieser Studie war die Gesamtbelastung mit *L. monocytogenes* im Zerlegebereich B deutlich höher als im Schlachtbetrieb A.

L. monocytogenes wurde in 7,57 % der Fleischproben (Schlängel während des Sortierens, vor und nach dem Tiefziehen sowie beim Lagertest; vom Karree vor dem Tiefziehen und während der Lagerung) isoliert.

Bei 14,29% der produktberührenden Oberflächen, wie Proben vom Schlängelhaken, dem Förderband und der Säge in der Grobzerlegung, dem Förderband für das Karree sowie vom Karree reißen wurde eine Kontamination mit *L. monocytogenes* festgestellt. Das Lebensmittelumfeld war im Bereich der Waage und im Bodenbereich der Feinzerlegung für das Karree mit *L. monocytogenes* kontaminiert. Das Personal war ein wichtiger Vektor für Listerien-Kreuzkontaminationen von Fleisch zu produktberührenden Oberflächen und umgekehrt (Schürze, Handschuhe). Sowohl im Schlachthof als auch im Zerlegebetrieb waren Listerien im Reinbereich der Hygieneschleuse und auch nach Passage der Schleuse auf den Schuhen detektierbar. Die Hygieneschleusen stellen ein wesentliches Reservoir von Listerien für eine Verschleppung in das Produktumfeld dar und sollten auf ihre Funktionalität überprüft werden.

Auch SERENO et al. (2019b) fanden in einer brasilianischen Studie die höchste *L. monocytogenes*-Prävalenz auf den Förderbändern in der letzten Verpackungsstufe mit 55% positiven Proben, gefolgt von den Schneidebrettern (5%) und den Messern (2,5%). Demgegenüber wurde in einer Studie von ORTIZ et al. (2010a) eine *L. monocytogenes*-Prävalenz von 9% in Umweltproben und 24% in Rohstoff- und Produktproben registriert.

Ein besseres Hygienekonzept ist wichtig, um die Kreuzkontamination mit *L. monocytogenes* so gering wie möglich zu halten und damit auch eine Einschleppung von mit *L. monocytogenes* kontaminiertem Fleisch in Weiterverarbeitungsbetriebe zu verhindern. Deshalb ist es sinnvoll, die *L. monocytogenes*-Kontamination von Beginn der Schlachtkette an zu eruieren, um die Prävalenz im angelieferten Frischfleisch möglichst gering zu halten.

Die *L. monocytogenes* Subtypisierung mittels Puls-Feld-Gelelektrophorese (PFGE) resultierte in 17 Ascl Profilen (Tabelle 21), wobei die Isolierung teilweise erschwert war durch die gleichzeitige Anwesenheit mehrerer *L. monocytogenes*-Genotypen und verschiedener apathogener *Listeria*-Spezies. Die häufigste PCR-Serogruppe war 1/2a, 3a und der häufigste PFGE (Ascl)-Typ war MA3. Das *L. monocytogenes* PFGE-Profil (Ascl) MA3 wurden ab dem Transporter (Schlachthof A) entlang der ge-

samten Zerlegung (Zerlegebetrieb B) nachgewiesen (n= 48/86; 55.81 %). Da MA3 auch auf den Schuhen nach Passage der Hygieneschleuse nachzuweisen war, ist anzunehmen, dass dieser Typ sich bereits über einen längeren Zeitraum im Zerlegebereich etabliert hatte und persistent im Umfeld anzutreffen war.

Das Produktionsumfeld der Zerlegung beherbergte einige weitere PFGE-Profile (MA5, MA14, MA15, MA16, MA17 und MA18), die im Bereich der Grobzerlegung (Säge, Förderband), Schlägel (Haken), Feinzerlegung Karee (Förderband) anzutreffen waren und auf einen stetigen Eintrag durch das Rohfleisch hinweisen. Da wir auf ein besonders heterogenes Bild von *L. monocytogenes*-Genotypen trafen, ist anzunehmen, dass Reinigung und Desinfektion nicht effektiv sind oder bestimmte Nischen nicht erreicht wurden. Der Betrieb sollte im Rahmen eines Monitoringprogramms erfasst werden und es sollten Maßnahmen zur *Listeria*-Reduktion getroffen werden.

ORTIZ et al. (2010b) identifizierten in einer Studie, die in einem iberischen Schlachthof durchgeführt wurde, 29 verschiedene PFGE-Typen bei *L. monocytogenes*-Isolaten, von denen sich drei als persistierende Typen erwiesen und 73% der Isolate ausmachten. Ein PFGE-Typ dominierte (45% der Isolate) und wurde größtenteils aus den hergestellten Zwischenprodukten und der Umgebung des Herstellungsbereichs isoliert. Die Persistenz von *L. monocytogenes* schien stark mit der Herstellung der Produkte und nicht dem eingehenden Rohmaterial zusammenzuhängen. Man stellte fest, dass einige Klone im Herstellungsbereich drei Jahre lang überlebten. Die *L. monocytogenes*-Serotyp Prävalenz bei MELONI et al. (2013b) war ähnlich zusammengesetzt wie in unserer Studie: 1/2c und 1/2 a waren dominant, wobei in unserer Studie der 1/2a Anteil höher ausfiel.

CHERIFI et al. (2018) registrierten in einer Schlachthofstudie 30 *L. monocytogenes*-Stämme, von denen 25 persistierten, demgegenüber stellte eine brasilianische Studie von SERENO et al. (2019c) fest, dass sämtliche gewonnenen *L. monocytogenes*-Isolate einer Serogruppe angehörten und zwei genetische PFGE-Profile, die 98,4% Ähnlichkeit aufwiesen, hatten.

ORTIZ et al. (2016) wiesen in einer Studie in Spanien nach, dass die 14 *L. monocytogenes*-Isolate, die von Oberflächen gewonnen wurden, zu fünf verschiedenen PFGE-Typen gehörten. Vier PFGE-Typen gehörten zum Sequenztyp (ST) 121, einem global sehr häufig anzutreffenden Genotyp, der in mehreren Ländern in verschiedenen Verarbeitungsketten isoliert wurde. Die *L. monocytogenes* ST121 Stämme enthielten das Benzalkoniumchlorid (BAC) Resistenztransposon *Tn6188*, welches eine bestimmte Adaptionsfähigkeit dieser Genotypen vermittelt.

FELIX et al. (2018) fanden in französischen Schweine- und Schweinefleischprodukten bei *L. monocytogenes* positiven Proben den Hauptserotyp 1/2a in allen drei Kompartimenten. *L.*

monocytogenes 1/2c-Stämme waren in Schweinemastbetrieben selten und wurden vorwiegend im Lebensmittelumfeld sowie in fertigen Produkten isoliert. Für den Schweinefleischsektor und alle anderen Lebensmittelsektoren war *L. monocytogenes* 1/2a der Hauptserotyp. Der Anteil der 1/2 c-Stämme entsprach im Schweinefleischsektor und in Fleischprodukten 22,3 bzw. 22,2%.

In einer Studie in der kanadischen Provinz Quebec fand man indessen bei *L. monocytogenes* positiven Schlachthofproben (n=108/874), die während des Schlachtens und Zerlegens genommen wurden, vier verschiedene Serogruppen, wobei die Serogruppe 1/2b am häufigsten vorkam (LARIVIERE-GAUTIER et al., 2014a). Die PCR-Serogruppe 1/2b, 3b war auch in unserer Studie im Schlachthof A im Bereich der Hygieneschleuse nachweisbar.

Die Ergebnisse der PFGE von LARIVIERE-GAUTIER et al. (2014b) veranschaulichten eine deutliche Abnahme der Vielfalt der Stämme von den ersten Bereichen der Schlachthanlage bis zum Zerlegeraum (10 Pulsotypen in 13 positiven Proben im Stallbereich und 9/86 positiven Proben im Zerlegeraum). Die Resultate zeigten auch die Überrepräsentation eines einzigen vorherrschenden *L. monocytogenes* Stammes in der Umgebung des Zerlegeraums (Typ 1, der 96,1% der Isolate ausmachte). Es wurde eine starke genotypische Ähnlichkeit zwischen Stämmen, die in den frühen Produktionsbereichen isoliert wurden, und einigen Stämmen in der Zerlegehalle erkennbar (LARIVIERE-GAUTIER et al., 2014c).

In dieser Studie waren drei Wischproben von der Karkasse im Bereich Entbluten auf Schlachthofebene *Salmonella* spp. positiv (1,76%). In allen anderen Proben, sowohl im Schlachthof als auch im Zerlegebetrieb, konnte keine Kontamination mit Salmonellen festgestellt werden. Die Dekontaminationsmaßnahmen Abflammen und schneller Kühlprozess minimierten das Risiko einer *Salmonella*-Kontamination der untersuchten Karkassen.

Die in der Literatur dokumentierten *Salmonella*-Prävalenzdaten auf Schweineschlachthöfen sind deutlich höher.

LI et al. (2013) und BAI et al. (2015) dokumentierten eine *Salmonella* spp. Prävalenz von 10,71% und 29,2% in chinesischen Schweineschlachthöfen. Aktuellere Studien zeigen ähnlich hohe Prävalenzen (22,9%) von *Salmonella* serovar Derby, Rissen, and Typhimurium (JIU et al., 2020).

Eine Studie aus Kolumbien zeigte Mängel bei der Schlachtkörperdekontamination auf, bei der ein Handling ohne HACCP zu einem signifikanten Anstieg der *Salmonella*-Prävalenz auf 20-40% führte. Die höchste Erregerprävalenz war am Transport (28-32%) und beim „Hängen“ (16-36%) zu beobachten (FAJARDO-GUERRERO et al., 2020). Dem gegenüber steht eine Prävalenz von 12,93% entlang der Produktionskette in spanischen Schlachthöfen (MORALES-PARTERA et al., 2018b). HERNANDEZ et al.

(2013) registrierten eine Gesamtprävalenz von *Salmonella* spp. von 10,86% in spanischen Schlachthöfen. Der höchste Prozentsatz der Isolate wurde an den Station Vorkalken (36,25%), Lastwagen (23,21%), Zäkuminhalt (21,25%), Mandeln (17,50%), ileozäkale Lymphknoten (16,25%) und Stall (14,06%) festgestellt. Darüber hinaus waren 5,63% der Umweltproben von Schlachtlinie und Zerlegebereich (Messer und Tischoberfläche) und 3,75 % der Fleischproben vom Zerlegebereich (Schinken, Schulter und Lende) *Salmonella* spp. positiv. In einer älteren Studie von ARGUELLO et al. (2012a) war die *Salmonella* Prävalenz 39,7% auf Schweineschlachtkörpern in vier verschiedenen spanischen Schlachthöfen.

In belgischen Schlachthöfen war die *Salmonella* spp. Prävalenz bei Schweinen mit 48,2% sogar noch höher. Dabei wurde festgestellt, dass der Kontaminationsgrad im Stall die Prävalenz nach dem Polieren erhöhte und die Kontamination nach dem Spalten und Kühlen negativ vom Kontaminationsgrad beim Polieren beeinflusst wurde (DE BUSSE et al., 2011a).

PIRAS et al. (2014) wiesen in 15,9% der Proben von Schlachtkörpern und in 8,9% der Umweltproben in italienischen Schlachthöfen *Salmonella* spp. nach.

Schweinefleisch gilt in der EU als eine der wichtigsten Infektionsquellen für *Salmonella* Typhimurium inklusive monophasierer Stämme. MARIN et al. (2020) stellte einen hohen Grad der Kontamination mit Salmonellen der Mastschweine bei Ankunft im Schlachthof fest (71,4%), die auch am Ende des Schlachtprozesses nicht minimiert werden konnte (66,7%). Die PFGE-Profile (*Xba*I) waren direkt auf die Charge bei Ankunft am Schlachthof, die Verarbeitungsumgebung und die Kreuzkontamination der Karkassen zurückzuführen. Die Autoren schlugen ein Kontrollprogramm vor, um die *Salmonella*- Prävalenz in Schweinefarmen zu reduzieren und das Bewusstsein für Biosicherheitsmaßnahmen zu schärfen.

Auch in einer belgischen Studie wurde als vorherrschender Serotyp *S. Typhimurium* (58,7%) nachgewiesen, darüber hinaus wurde *S. Derby* (17,4%) gefunden. Die Genotypisierung ergab 46 verschiedene PFGE-Profile unter den 276 *Salmonella*-Isolaten. Derselbe Genotyp wurde im Stallbereich sowie in der Mundhöhle von 95% der Schweine gefunden. Die Ergebnisse deuteten darauf hin, dass der Stallbereich eine primäre Quelle von Salmonellen bei Schlachtschweinen ist und dass die Kontamination des Schlachtkörpers aus der Umwelt und nicht vom Schwein selbst (innere Kontamination) herrührte. Die Ergebnisse zeigten ferner, dass Schlachthöfe unterschiedlich gut in der Lage sind, mit *Salmonella*-positiven Schweinen umzugehen (DE BUSSE et al., 2011b). ARGUELLO et al. (2012b) fanden in Spanien als vorherrschende *Salmonella*-Serovare in Schlachtkörpern, in lebenden Schweinen, im Schlachthof und in der Umgebung des Schlachthofs *S. Typhimurium*, *S. Rissen*, *S. Derby* und *S.*

4,[5],12:i:-. Dieselben Serovaren wurden in allen Stationen gefunden, was die Hypothese stützte, dass infizierte Schweine die Hauptquelle der Salmonellen-Kontamination in Schlachthöfen sind.

In der Studie von COLELLO et al. (2018) wurden aus den 4,6% *Salmonella* spp. positiven Proben von argentinischen Schlachthöfen fünf Serotypen klassifiziert: *S. Typhimurium* in der Schweinefleischproduktionskette, *S. Kentucky* in landwirtschaftlichen Betrieben und Schlachthöfen, *S. Brandenburg* in Schlachthöfen, *S. Livingstone* in landwirtschaftlichen Betrieben und *S. Agona* in Entbeinungsräumen und Einzelhandelsmärkten. In Portugal wiesen GOMES-NEVES et al. (2012) vor allem *S. Typhimurium* und die monophasische Variante *S. 4,[5],12:i:-*, aber auch *S. Derby*, *S. Rissen*, *S. Mbandaka*, *S. London*, *S. Give*, *S. Enteritidis* und *S. Sandiego*, die insgesamt 17 PFGE-Typen entsprachen, nach.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Salmonellen sind die zweithäufigste infektiöse Ursache für humane gastrointestinale Erkrankungen übertragen durch diverse Lebensmittel. EU-weit wurden im Jahr 2018 91.857 Salmonellose-Fälle gemeldet, das bedeutet 20,1 Fälle auf 100.000 Einwohner. Die Schwere des Krankheitsverlaufs hängt von der Art der Virulenz-Plasmide, Flagellen, Fimbrien und Toxine, die vorhanden sind, ab.

Listeria monocytogenes ist besonders kälteadaptiert und umweltstressresistent, was zu einer persistierenden Kontamination in Lebensmittelbetrieben führen kann. EU-weit wurden 2018 2.549 Fälle an invasiver Listeriose gemeldet.

Ziel dieser Diplomarbeit war es, den Kontaminationsstatus des Schlachthofes A und des Zerlegebetriebes B, mit *Salmonella* spp. und *L. monocytogenes* zu ermitteln. *Salmonella* spp. dürfen in 25g einer Probe nicht vorkommen, während es für *L. monocytogenes* erst ab der Weiterverarbeitung rechtliche Vorgaben gibt. Dies führt zu Problemen in Betrieben, die Fleischprodukte erzeugen. Bei diesen wird eine Listerien-Kontamination detektiert, die nicht eliminierbar ist, da immer wieder Fleisch, welches mit *L. monocytogenes* kontaminiert ist, in den Betrieb gelangt und sich persistente Klone im Produktionsumfeld etablieren können.

Im Schlachthof A wurden 170 Wischproben sowohl von Karkassen (n=12) an sieben Stationen der Schlachtkette, als auch von produktberührenden Oberflächen, vom Umfeld und personalassoziierte Proben genommen. Im Zerlegebetrieb B wurden Schlägel und Karree während der Grob- und Feinzerlegung beprobt sowie Umweltproben, produktberührenden Oberflächen und personalassoziierte Wischproben gezogen (n=252).

Der Nachweis von *Salmonella* spp. und *L. monocytogenes* erforderte eine selektive Anreicherung gemäß ISO11290-1. Die Anreicherungen für *L. monocytogenes* wurden dann auf einem Selektivagar ausgestrichen und bei 37°C für 24h inkubiert. Im Schlachthof A waren 94,12 % der Proben negativ, bei 2,94% der Proben wurde *L. monocytogenes* isoliert und bei den restlichen 2,94% wurden apathogene Listerien nachgewiesen. Beim Zerlegebetrieb B waren 54,76% der Proben negativ, bei 34,92% wurden apathogene Listerien nachgewiesen und in 10,32 % der Proben wurden *L. monocytogenes* detektiert. Die Bestätigung der Isolate erfolgte mittels PCR-Methode. Zu der Typisierung der *L. monocytogenes* Stämme wurde die Puls-Feld-Gelelektrophorese (PFGE) herangezogen. Es wurden 17 *AscI* Profile identifiziert, wobei die Isolierung teilweise erschwert war, durch die gleichzeitige Anwesenheit von mehreren *L. monocytogenes*-Genotypen und verschiedenen apathogenen *Listeria*-Spezies. Die häufigste PCR-Serogruppe war 1/2a, 3a und der häufigste PFGE (*AscI*)-Typ war MA3. Dieser wurden ab dem Transport zum Zerlegebetrieb entlang der gesamten Zerlegung nachgewiesen. Da MA3 in den Schuhen nach Passage der Hygieneschleuse nachzuweisen war, ist anzunehmen, dass er bereits seit längerer Zeit im Zerlegebetrieb vorhanden und im Umfeld persistierte.

Im Zerlegebetrieb wurden einige weitere PFGE (*AscI*) Profile (MA5, MA14, MA15, MA16, MA17 und MA18), die im Bereich der Grobzerlegung, beim Schlögel, Feinzerlegung Karee anzutreffen waren und auf einen stetigen Eintrag durch das Rohfleisch hinweisen, identifiziert. Da ein besonders heterogenes Bild von *L. monocytogenes*-Genotypen vorliegt, ist anzunehmen, dass Reinigung und Desinfektion nicht effektiv waren oder bestimmte Nischen nicht erreicht wurden. Es sollten ein Monitoringprogramm für diesen Betrieb installiert und Maßnahmen zur *Listeria*-Reduktion getroffen werden.

Der *Salmonella* Nachweis erfolgte in einem zwei-stufigen Nachweisverfahren gemäß ISO6579. Anschließend wurden *Salmonella* Isolate mittels PCR Methode bestätigt und subtypisiert (PFGE). Die drei *Salmonella* spp. positiven Proben stammten von drei Schweineschlachtkörpern, von zwei Mastbetrieben, während der Station Entbluten. Die *Salmonella* spp. Subtypisierung resultierte in zwei *XbaI* PFGE-Profilen, wobei das PFGE (*XbaI*) Profil MA1 sowohl in den Wischproben von der Karkasse beim Entbluten von Mastbetrieb A und B enthalten war, was auf eine Kreuzkontamination hindeutet. Da in der weiteren Schweineschlachtkette keine Salmonellen mehr in den Proben nachgewiesen werden konnten, sorgten die Dekontaminationsmaßnahmen Abflammen und ein schneller Kühlprozess offensichtlich dafür, dass das Kontaminationsrisiko der untersuchten Schweineschlachtkörper minimiert werden konnte.

6. EXTENDED SUMMARY

Salmonella is the second most common infectious cause of human gastrointestinal diseases transmitted by various foods. EU-wide 91,857 cases of salmonellosis were reported in 2018, which means 20.1 cases per 100,000 inhabitants. The severity of the disease course depends on the type of virulence plasmids, flagella, fimbriae and toxins present.

Listeria monocytogenes is particularly cold-adapted and resistant to environmental stress, which can lead to persistent contamination in food plants. In 2018, 2,549 cases of invasive listeriosis were reported in the EU.

The aim of this diploma thesis was to determine the *Salmonella* spp. and *L. monocytogenes* contamination status of slaughterhouse A and cutting plant B. *Salmonella* spp. must not be present in 25g of a sample, whereas there are legal requirements for *L. monocytogenes* only after further meat processing. This leads to problems in companies producing ready-to eat meat products. *Listeria* contamination is detected and cannot be eliminated, as meat contaminated with *L. monocytogenes* repeatedly enters the plant and persistent clones can establish themselves in the production environment. In slaughterhouse A, 170 sponge samples were taken from carcasses (n=12) at seven stations of the slaughter chain, as well as from surfaces in contact with the product, from the surrounding area and personnel-associated samples. In cutting plant B, leg and loin were sampled during coarse and fine cutting, and environmental samples, product-contact surfaces and personal associated sponge samples were taken (n=252).

The detection of *Salmonella* spp. and *L. monocytogenes* required selective enrichment according to ISO 11290-1. The enrichments for *L. monocytogenes* were streaked on a selective agar and incubated at 37°C for 24 h. In slaughterhouse A 94.12% of the samples were negative, in 2.94% of the samples *L. monocytogenes* was isolated and in the remaining 2.94% samples apathogenic *Listeria* were detected. At cutting plant B 54.76% of the samples were negative, apathogenic *Listeria* were detected in 34.92% and *L. monocytogenes* was detected in 10.32% of the samples. The confirmation of the isolates was performed by PCR method. Pulse field gel electrophoresis (PFGE) was used for the typing of *L. monocytogenes* strains. Seventeen AscI profiles were identified. Isolation was partially complicated by the simultaneous presence of several *L. monocytogenes* genotypes and various apathogenic *Listeria* species. The most common PCR serogroup was 1/2a, 3a and the most common PFGE (AscI) type was MA3. These were detected from transport to the cutting plant along the entire cutting process. Since MA3 was detected on the shoes after passing through the hygiene lock, it can be assumed

that it had already been present in the cutting plant for some time and persisted in the surrounding area.

In the cutting plant some further PFGE (*Ascl*) profiles (MA5, MA14, MA15, MA16, MA17 and MA18) were identified, which were found in the area of the coarse cutting, at the flail, fine cutting karee and which indicate a continuous input by the raw meat. Since a particularly heterogeneous picture of *L. monocytogenes* genotypes is present, it can be assumed that cleaning and disinfection were not effective or certain niches were not reached. A monitoring programme for this processing facility should be installed and measures to reduce *Listeria* should be taken.

Salmonella detection was performed in a two-step detection procedure according to ISO 6579. Afterwards *Salmonella* isolates were confirmed by PCR and subtyped (PFGE). The three *Salmonella* spp. positive samples were taken from three pig carcasses, from two fattening farms, during the bleeding station. The *Salmonella* spp. subtyping resulted in two PFGE profiles, with the PFGE (*Xba*I) profile MA1 being present in both carcass sponge samples taken during bleeding of fattening farms A and B, indicating cross-contamination. As no *Salmonella* was detected in the samples in the further pig slaughter chain, the decontamination measures flaming and a fast cooling process obviously ensured that the contamination risk of the investigated pig carcasses was minimized.

7. LITERATURVERZEICHNIS

Adley, C. C., & Ryan, M. P. (2016). The nature and extent of foodborne disease. *Antimicrobial Food Packaging* (pp. 1-10). Academic Press. doi.org/10.1016/B978-0-12-800723-5.00001-2.

Alba, P., Leekitcharoenphon, P., Carfora, V., Amoruso, R., Cordaro, G., Di Matteo, P., ... & Guerra, B. (2020). Molecular epidemiology of *Salmonella* Infantis in Europe: insights into the success of the bacterial host and its parasitic pESI-like megaplasmid. *Microbial Genomics*, Volume 6, Issue 5. doi.org/10.1099/mgen.0.000365.

Álvarez-Ordóñez, A., & Briandet, R. (2016). Biofilms from a food microbiology perspective: Structures, functions, and control strategies. *Frontiers in microbiology*, 7, 1938. doi.org/10.3389/fmicb.2016.01938

Andino, A., & Hanning, I. (2015). *Salmonella enterica*: survival, colonization, and virulence differences among serovars. *The Scientific World Journal*, 2015. doi.org/10.1155/2015/520179.

Arguello, H., Carvajal, A., Collazos, J. A., García-Feliz, C., & Rubio, P. (2012). Prevalence and serovars of *Salmonella enterica* on pig carcasses, slaughtered pigs and the environment of four Spanish slaughterhouses. *Food Research International*, 45(2), 905-912. doi.org/10.1016/j.foodres.2011.04.017

Atlas, R. M. (2010). *Handbook of microbiological media*. CRC press.

Bahrami, A., Baboli, Z. M., Schimmel, K., Jafari, S. M., & Williams, L. (2020). Efficiency of novel processing technologies for the control of *Listeria monocytogenes* in food products. *Trends in Food Science & Technology*, 96, 61-78. doi.org/10.1016/j.tifs.2019.12.009.

Bai, L., Lan, R., Zhang, X., Cui, S., Xu, J., Guo, Y., ... & Zhang, D. (2015). Prevalence of *Salmonella* isolates from chicken and pig slaughterhouses and emergence of ciprofloxacin and cefotaxime co-resistant *S. enterica* serovar Indiana in Henan, China. *PLoS One*, 10(12), e0144532. doi.org/10.1371/journal.pone.0144532

Barre, L., Angelidis, A. S., Boussaid, D., Brasseur, E. D., Manso, E., & Besse, N. G. (2016). Applicability of the EN ISO 11290-1 standard method for *Listeria monocytogenes* detection in presence of new *Listeria* species. *International journal of food microbiology*, 238, 281-287. doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.09.028.

Bell, C. und Kyriakides, A. (2012). *Listeria*: a practical approach to the organism and its control in foods, 3, 30-35. Springer Science & Business Media.

Besse, N. G., Favret, S., Desreumaux, J., Brasseur, E. D., & Kalmokoff, M. (2016). Evaluation of reduction of *Fra*ser incubation by 24 h in the EN ISO 11290-1 standard on detection and diversity of *Listeria* species. *International journal of food microbiology*, 224, 16-21- doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.02.010.

Bonardi, S. (2017). *Salmonella* in the pork production chain and its impact on human health in the European Union. *Epidemiology & Infection*, 145(8), 1513-1526. doi.org/10.1017/S095026881700036X.

Brauge, T., Faille, C., Leleu, G., Denis, C., Hanin, A., & Midelet, G. (2020). Treatment with disinfectants may induce an increase in viable but non culturable populations of *Listeria monocytogenes* in biofilms formed in smoked salmon processing environments. *Food Microbiology*, 103548. doi.org/10.1016/j.fm.2020.103548.

- Bubert, A., Hein, I., Rauch, M., Lehner, A., Yoon, B., Goebel, W. & Wagner, M. (1999). Detection and Differentiation of *Listeria* spp. by a Single Reaction Based on Multiplex PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(10), 4688–4692.
- Buchanan, R. L., Gorris, L. G., Hayman, M. M., Jackson, T. C., & Whiting, R. C. (2017). A review of *Listeria monocytogenes*: an update on outbreaks, virulence, dose-response, ecology, and risk assessments. *Food control*, 75, 1-13. doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.12.016.
- Cabal, A., Pietzka, A., Huhulescu, S., Allerberger, F., Ruppitsch, W., & Schmid, D. (2019). Isolate-based surveillance of *Listeria monocytogenes* by Whole Genome Sequencing in Austria. *Frontiers in microbiology*, 10, 2282. doi.org/10.3389/fmicb.2019.02282.
- Campos, J., Mourão, J., Peixe, L., & Antunes, P. (2019). Non-typhoidal *Salmonella* in the pig production chain: a comprehensive analysis of its impact on human health. *Pathogens*, 8(1), 19. doi.org/10.3390/pathogens8010019.
- Carrasco, E., Morales-Rueda, A., & García-Gimeno, R. M. (2012). Cross-contamination and recontamination by *Salmonella* in foods: a review. *Food Research International*, 45(2), 545-556. doi.org/10.1016/j.foodres.2011.11.004.
- Cartwright, E. J., Jackson, K. A., Johnson, S. D., Graves, L. M., Silk, B. J., & Mahon, B. E. (2013). Listeriosis outbreaks and associated food vehicles, United States, 1998–2008. *Emerging infectious diseases*, 19(1), 1-9. doi: 10.3201/eid1901.120393
- Chen, J. Q., Regan, P., Laksanalamai, P., Healey, S., & Hu, Z. (2017). Prevalence and methodologies for detection, characterization and subtyping of *Listeria monocytogenes* and *L. ivanovii* in foods and environmental sources. *Food Science and Human Wellness*, 6(3), 97-120. doi.org/10.1016/j.fshw.2017.06.002
- Cherifi, T., Carrillo, C., Lambert, D., Miniaï, I., Quessy, S., Larivière-Gauthier, G., ... & Fravallo, P. (2018). Genomic characterization of *Listeria monocytogenes* isolates reveals that their persistence in a pig slaughterhouse is linked to the presence of benzalkonium chloride resistance genes. *BMC microbiology*, 18(1), 220. doi.org/10.1186/s12866-018-1363-9
- Cherifi, T., Arsenault, J., Pagotto, F., Quessy, S., Côté, J. C., Neira, K., ... & Fravallo, P. (2020). Distribution, diversity and persistence of *Listeria monocytogenes* in swine slaughterhouses and their association with food and human listeriosis strains. *PloS one*, 15(8), e0236807. doi.org/10.1371/journal.pone.0236807
- Colello, R., Ruiz, M. J., Padín, V. M., Rogé, A. D., Leotta, G., Padola, N. L., & Etcheverría, A. I. (2018). Detection and characterization of *Salmonella* serotypes in the production chain of two pig farms in Buenos Aires Province, Argentina. *Frontiers in microbiology*, 9, 1370. doi.org/10.3389/fmicb.2018.01370
- Crabb, H. K., Allen, J. L., Devlin, J. M., Firestone, S. M., Stevenson, M., Wilks, C. R., & Gilkerson, J. R. (2019). Traditional *Salmonella* Typhimurium typing tools (phage typing and MLVA) are sufficient to resolve well-defined outbreak events only. *Food microbiology*, 84, 103237. doi.org/10.1016/j.fm.2019.06.001

De Busser, E. V., Maes, D., Houf, K., Dewulf, J., Imberechts, H., Bertrand, S., & De Zutter, L. (2011). Detection and characterization of *Salmonella* in lairage, on pig carcasses and intestines in five slaughterhouses. *International journal of food microbiology*, 145(1), 279-286. doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.01.009

Demaître, N., Van Damme, I., De Zutter, L., Geeraerd, A.H., Rasschaert, G., De Reu, K. (2020). Occurrence, distribution and diversity of *Listeria monocytogenes* contamination on beef and pig carcasses after slaughter. *Meat Science*, 169, 108177. doi.org/10.1016/j.meatsci.2020.108177

Dieckmann, R., & Malorny, B. (2011). Rapid screening of epidemiologically important *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovars by whole-cell matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry. *Applied and environmental microbiology*, 77(12), 4136-4146. doi.org/10.1128/AEM.02418-10

Dodd, C. E., Aldsworth, T. G., & Stein, R. A. (Eds.). (2017). *Foodborne diseases*. Academic Press.

Doumith, M., Buchrieser, C., Glaser, P., Jacquet, C. & Martin, P. (2004). Differentiation of the Major *Listeria monocytogenes* Serovars by Multiplex PCR, *Journal of Clinical Microbiology*, 42(8), 3819–3822. doi.org/10.1128/JCM.42.8.3819-3822.2004

EFSA Panel on Biological Hazards (EFSA BIOHAZ Panel). (2019). *Salmonella* control in poultry flocks and its public health impact. *EFSA Journal*, 17(2). doi.org/10.2903/j.efsa.2019.5596

European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control (EFSA and ECDC). (2019). The European Union One Health 2018 Zoonoses Report. *EFSA Journal*, 17(12), e05926. doi.org/10.2903/j.efsa.2019.5926

Fagerlund, A., Langsrud, S., & Møretrø, T. (2020). In depth longitudinal study of *Listeria monocytogenes* ST9 isolates from meat processing industry: Resolving diversity and transmission patterns using WGS. *Applied and Environmental Microbiology*. doi.org/10.1128/AEM.00579-20

Félix, B., Feurer, C., Maillet, A., Guillier, L., Boscher, E., Kerouanton, A., ... & Roussel, S. (2018). Population genetic structure of *Listeria monocytogenes* strains isolated from the pig and pork production chain in France. *Frontiers in microbiology*, 9, 684. doi.org/10.3389/fmicb.2018.00684

Fajardo-Guerrero, M., Rojas-Quintero, C., Chamorro-Tobar, I., Zambrano, C., Sampedro, F., & Carrascal-Camacho, A. K. (2020). Exposure assessment of *Salmonella* spp. in fresh pork meat from two abattoirs in Colombia. *Food Science and Technology International*, 26(1), 21-27. doi.org/10.1177/1082013219864746

Figuroa-López, A. M., Maldonado-Mendoza, I. E., López-Cervantes, J., Verdugo-Fuentes, A. A., Ruiz-Vega, D. A., & Cantú-Soto, E. U. (2019). Prevalence and characterization of *Listeria monocytogenes* isolated from pork meat and on inert surfaces. *Brazilian Journal of Microbiology*, 50(3), 817-824. doi.org/10.1007/s42770-019-00073-7

Freitag, N. E., Port, G. C., & Miner, M. D. (2009). *Listeria monocytogenes*—from saprophyte to intracellular pathogen. *Nature Reviews Microbiology*, 7(9), 623-628. doi.org/10.1038/nrmicro2171

Gamboa-Marín, A., Buitrago M, S., Pérez-Pérez, K., Mercado R, M., Poutou-Piñales, R., & Carrascal-Camacho, A. (2012). Prevalence of *Listeria monocytogenes* in pork-meat and other processed products from the Colombian swine industry. *Revista MVZ Córdoba*, 17(1), 2827-2833.

Garner, D., & Kathariou, S. (2016). Fresh produce-associated listeriosis outbreaks, sources of concern, teachable moments, and insights. *Journal of food protection*, 79(2), 337-344. doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-15-387

Gomes-Neves, E., Antunes, P., Tavares, A., Themudo, P., Cardoso, M. F., Gärtner, F., ... & Peixe, L. (2012). Salmonella cross-contamination in swine abattoirs in Portugal: Carcasses, meat and meat handlers. *International journal of food microbiology*, 157(1), 82-87. doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.04.015

Goulet, V., King, L. A., Vaillant, V., & de Valk, H. (2013). What is the incubation period for listeriosis?. *BMC Infectious Diseases*, 13(1), 11. doi.org/10.1186/1471-2334-13-11

Halbedel, S., Prager, R., Fuchs, S., Trost, E., Werner, G., & Flieger, A. (2018). Whole-genome sequencing of recent *Listeria monocytogenes* isolates from Germany reveals population structure and disease clusters. *Journal of clinical microbiology*, 56(6). doi.org/10.1128/JCM.00119-18

Hernández, M., Gómez-Laguna, J., Luque, I., Herrera-León, S., Maldonado, A., Reguillo, L., & Astorga, R. J. (2013). Salmonella prevalence and characterization in a free-range pig processing plant: tracking in trucks, lairage, slaughter line and quartering. *International journal of food microbiology*, 162(1), 48-54. doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.12.026

Ibrahim, G. M., & Morin, P. M. (2018). Salmonella serotyping using whole genome sequencing. *Frontiers in microbiology*, 9, 2993. doi.org/10.3389/fmicb.2018.02993

ISO 11290-1, 2017 Mikrobiologie der Lebensmittelket-e - Horizontales Verfahren für den Nachweis und die Zählung von *Listeria monocytogenes* und von *Listeria sp.* - Teil 1: Nachweisverfahren (ISO 11290-1:2017); Deutsche Fassung EN ISO 11290-1:2017

ISO 16140-1:2016. Mikrobiologie der Lebensmittelkette -Methodenvalidierung-Teil 1: Vokabular

ISO 6579-1:2017. Mikrobiologie der Lebensmittelkette - Horizontales Verfahren zum Nachweis, zur Zählung und zur Serotypisierung von Salmonellen - Teil 1: Nachweis von *Salmonella* spp.

ISO/TR 6579-3:2014. Mikrobiologie der Lebensmittelkette - Horizontales Verfahren zum Nachweis, zur Zählung und zur Serotypisierung von Salmonellen - Teil 3: Richtlinien zur Serotypisierung von *Salmonella* spp.

Jagadeesan, B., Schmid, V. B., Kupski, B., McMahon, W., & Klijn, A. (2019). Detection of *Listeria* spp. and *L. monocytogenes* in pooled test portion samples of processed dairy products. *International journal of food microbiology*, 289, 30-39. doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.08.017

Jeyaletchumi, P., Tunung, R., Selina, P. M., Chai, L. C., Radu, S., Farinazleen, M. G., ... & Kumar, M. P. (2011). Evaluation of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes* in selected vegetable farms. *Journal of Tropical Agriculture and Food Science*, 39(2), 255-266.

- Jiu, Y., Meng, X., Hong, X., Huang, Q., Wang, C., Chen, Z., ... & Li, S. (2020). Prevalence and characterization of Salmonella in three typical commercial pig abattoirs in Wuhan, China. *Foodborne Pathogens and Disease*. doi.org/10.1089/fpd.2019.2737
- Jordan, K., & McAuliffe, O. (2018). *Listeria monocytogenes* in foods. In: *Advances in food and nutrition research* (Vol. 86, pp. 181-213). Academic Press. doi.org/10.1016/bs.afnr.2018.02.006
- Kaszoni-Rückerl, I., Mustedanagic, A., Muri-Klinger, S., Brugger, K., Wagner, K. H., Wagner, M., & Stessl, B. (2020). Predominance of Distinct *Listeria Innocua* and *Listeria Monocytogenes* in Recurrent Contamination Events at Dairy Processing Facilities. *Microorganisms*, 8(2), 234. doi.org/10.3390/microorganisms8020234
- Khan, I., Tango, C. N., Miskeen, S., Lee, B. H., & Oh, D. H. (2017). Hurdle technology: A novel approach for enhanced food quality and safety—A review. *Food Control*, 73, 1426-1444. doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.11.010
- Kocot, A. M., & Olszewska, M. A. (2020). Interaction of *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* with *Listeria innocua* in dual species biofilms and inactivation following disinfectant treatments. *LWT*, 118, 108736. doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108736
- Krämer, J., & Prange, A. (2016). *Lebensmittelmikrobiologie* (Vol. 1421). UTB.
- Kurpas, M., Wieczorek, K., & Osek, J. (2018). Ready-to-eat meat products as a source of *Listeria monocytogenes*. *Journal of veterinary research*, 62(1), 49-55. doi.org/10.2478/jvetres-2018-0007
- Lariviere-Gauthier, G., Letellier, A., Kerouanton, A., Bekal, S., Quessy, S., Fournaise, S., & Fravallo, P. (2014). Analysis of *Listeria monocytogenes* strain distribution in a pork slaughter and cutting plant in the province of Quebec. *Journal of Food Protection*, 77(12), 2121-2128. doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-14-192
- Leclercq, A., Chenal-Francois, V., Dieye, H., Cantinelli, T., Drali, R., Brisse, S., & Lecuit, M. (2011). Characterization of the novel *Listeria monocytogenes* PCR serogrouping profile IVb-v1. *International journal of food microbiology*, 147(1), 74-77. doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.03.010
- Li, R., Lai, J., Wang, Y., Liu, S., Li, Y., Liu, K., ... & Wu, C. (2013). Prevalence and characterization of Salmonella species isolated from pigs, ducks and chickens in Sichuan Province, China. *International journal of food microbiology*, 163(1), 14-18. doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.01.020
- Liao, J., Wiedmann, M., & Kovac, J. (2017). Genetic stability and evolution of the sigB allele, used for *Listeria sensu stricto* subtyping and phylogenetic inference. *Appl. Environ. Microbiol.*, 83(12), e00306-17. doi.org/10.1128/AEM.00306-17
- Limoges, M., Frontino, G., & Donnelly, C. (2020). Comparative recovery of *Listeria* spp. From dairy environmental surfaces using 3M™ and World Bioproducts© environmental swabs with standard enrichment and enumeration methods. *Food Control*, 107272. doi.org/10.1016/j.foodcont.2020.107272

Linke, K., Rückerl, I., Brugger, K., Karpiskova, R., Walland, J., Muri-Klinger, S., ... & Stessl, B. (2014). Reservoirs of *Listeria* species in three environmental ecosystems. *Appl. Environ. Microbiol.*, 80(18), 5583-5592. doi.org/10.1128/AEM.01018-14

Mahon, C. R., Lehman, D. C., & Manuselis Jr, G. (2018). *Textbook of diagnostic microbiology-e-book*. Elsevier Health Sciences.

Malorny, B., Tassios, P.T., Rådström, P., Cook, N., Wagner, M. & Hoorfar, J. (2003). Standardization of diagnostic PCR for the detection of foodborne pathogens. *International Journal of Food Microbiology* 83(1), 39-48. doi.org/10.1016/s0168-1605(02)00322-7

Manafi, M. (2000). New developments in chromogenic and fluorogenic culture media. *International journal of food microbiology*, 60(2-3), 205-218. doi.org/10.1016/S0168-1605(00)00312-3

Manios, S., Grivokostopoulos, N., Bikouli, V., Doultos, D., Zilelidou, E., Gialitaki, M., Skandamis, P. (2015). A 3-year hygiene and safety monitoring of a meat processing plant which uses raw materials of global origin. *Microbiologie*. 209. 60-69. doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.12.028

Marin, C., Chinillac, M. C., Cerdà-Cuellar, M., Montoro-Dasi, L., Sevilla-Navarro, S., Ayats, T., ... & Vega, S. (2020). Contamination of pig carcass with *Salmonella enterica* serovar Typhimurium monophasic variant 1, 4 [5], 12: i:-originates mainly in live animals. *Science of The Total Environment*, 703, 134609. doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.134609

Markey, B., Leonard, F., Archambault, M., Cullinane, A., Maguire, D. (2013) *Clinical veterinary microbiology e-book*. 12. 177-187. Mosby Elsevier

Mascellino, M. T. (Ed.). (2018). *Salmonella: A Re-emerging Pathogen*. BoD–Books on Demand.

Massacci, F. R., Morelli, A., Cucco, L., Castinel, A., Ortenzi, R., Tofani, S., ... & Magistrali, C. F. (2020). Transport to the Slaughterhouse Affects the *Salmonella* Shedding and Modifies the Fecal Microbiota of Finishing Pigs. *Animals*, 10(4), 676. doi.org/10.3390/ani10040676

McVey, D. S., Kennedy, M., Chengappa, M. (2013) *Veterinary Microbiology: Edition 3*. 32. 223-228. John Wiley & Sons

Meloni, D., Piras, F., Mureddu, A., Fois, F., Consolati, S. G., Lamon, S., & Mazzette, R. (2013). *Listeria monocytogenes* in five Sardinian swine slaughterhouses: prevalence, serotype, and genotype characterization. *Journal of food protection*, 76(11), 1863-1867. doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-12-505

Mester, P., Witte, A. K., Robben, C., Streit, E., Fister, S., Schoder, D., & Rossmanith, P. (2017). Optimization and evaluation of the qPCR-based pooling strategy DEP-pooling in dairy production for the detection of *Listeria monocytogenes*. *Food Control*, 82, 298-304. doi.org/10.1016/j.foodcont.2017.06.039

Mohammed, M. (2017). Phage typing or CRISPR typing for epidemiological surveillance of *Salmonella* Typhimurium?. *BMC research notes*, 10(1), 578. doi.org/10.1186/s13104-017-2878-0

Mooijman, K. A. (2018). The new ISO 6579-1: A real horizontal standard for detection of *Salmonella*, at last. *Food microbiology*, 71, 2-7. doi.org/10.1016/j.fm.2017.03.001

Morales-Partera, A. M., Cardoso-Toset, F., Luque, I., Astorga, R. J., Maldonado, A., Herrera-León, S., ... & Tarradas, C. (2018). Prevalence and diversity of *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp., and *Listeria monocytogenes* in two free-range pig slaughterhouses. *Food Control*, 92, 208-215. doi.org/10.1016/j.foodcont.2018.04.053

Murray, E. G. D., Webb, R. A., & Swann, M. B. R. (1926). A disease of rabbits characterised by a large mononuclear leucocytosis, caused by a hitherto undescribed bacillus *Bacterium monocytogenes* (n. sp.). *The Journal of Pathology and Bacteriology*, 29(4), 407-439. doi.org/10.1002/path.1700290409

Nightingale, K. K., Schukken, Y. H., Nightingale, C. R., Fortes, E. D., Ho, A. J., Her, Z., ... & Wiedmann, M. (2004). Ecology and transmission of *Listeria monocytogenes* infecting ruminants and in the farm environment. *Appl. Environ. Microbiol.*, 70(8), 4458-4467. doi.org/10.1128/AEM.70.8.4458-4467.2004

Nyila, M. A. (2018). Introductory Chapter: *Listeria monocytogenes*. In *Listeria Monocytogenes*. IntechOpen. doi.org/10.5772/intechopen.76905

Ortiz, S., López, V., Villatoro, D., López, P., Dávila, J. C., & Martínez-Suarez, J. V. (2010). A 3-year surveillance of the genetic diversity and persistence of *Listeria monocytogenes* in an Iberian pig slaughterhouse and processing plant. *Foodborne pathogens and disease*, 7(10), 1177-1184. doi.org/10.1089/fpd.2010.0535

Ortiz, S., López-Alonso, V., Rodríguez, P., & Martínez-Suárez, J. V. (2016). The connection between persistent, disinfectant-resistant *Listeria monocytogenes* strains from two geographically separate Iberian pork processing plants: evidence from comparative genome analysis. *Applied and environmental microbiology*, 82(1), 308-317. doi.org/10.1128/AEM.02824-15

Pagliano, P., Arslan, F., & Ascione, T. (2017). Epidemiology and treatment of the commonest form of listeriosis: meningitis and bacteraemia. *Infez Med*, 25(3), 210-216.

Pichhardt, K. (1998). *Grundlagen für die Praxis*. 1.1. 6-10. Springer-Verlag Berlin Heidelberg

Piras, F., Fois, F., Mazza, R., Putzolu, M., Delogu, M. L., Lochi, P. G., ... & Mazzette, R. (2014). *Salmonella* prevalence and microbiological contamination of pig carcasses and slaughterhouse environment. *Italian journal of food safety*, 3(4). doi.org/10.4081/ijfs.2014.4581

Rahn, K., De Grandis, S.A., Clarke, R.C., McEwen, S.A., Galán, J.E., Ginocchio, C. Curtiss III, R. & Gyles, C.L. (1992). Amplification of an *invA* gene sequence of *Salmonella typhimurium* by polymerase chain reaction as a specific method of detection of *Salmonella*, *Molecular and Cellular Probes*, 6(4), 271-279 doi.org/10.1016/0890-8508(92)90002

Reij, M. W., Den Aantrekker, E. D., & ILSI Europe Risk Analysis in Microbiology Task Force. (2004). Recontamination as a source of pathogens in processed foods. *International journal of food microbiology*, 91(1), 1-11. doi.org/10.1016/S0168-1605(03)00295-2

- Ryser, E. T., & Marth, E. H. (Eds.). (2007). *Listeria*, listeriosis, and food safety. CRC press.
- Sanderson, K., und Nair, S. (2013). Taxonomy and Species concept in the genus *Salmonella*. 1. 1-15. *Salmonella in domestic animals*. CABI
- Schardt, J., Jones, G., Müller-Herbst, S., Schauer, K., D’Orazio, S. E., & Fuchs, T. M. (2017). Comparison between *Listeria sensu stricto* and *Listeria sensu lato* strains identifies novel determinants involved in infection. *Scientific reports*, 7(1), 1-14. doi.org/10.1038/s41598-017-17570-0
- Schlech III, W. F., Lavigne, P. M., Bortolussi, R. A., Allen, A. C., Haldane, E. V., Wort, A. J., ... & Broome, C. V. (1983). Epidemic listeriosis—evidence for transmission by food. *New england journal of medicine*, 308(4), 203-206. doi.org/10.1056/NEJM198301273080407
- Sala, C., Morar, A., Tirziu, E., Nichita, I., Imre, M., & Imre, K. (2016). Environmental occurrence and antibiotic susceptibility profile of *Listeria monocytogenes* at a slaughterhouse raw processing plant in Romania. *Journal of food protection*, 79(10), 1794-1797. doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-16-052
- Scobie, A., Kanagarajah, S., Harris, R. J., Byrne, L., Amar, C., Grant, K., & Godbole, G. (2019). Mortality risk factors for listeriosis—A 10-year review of non-pregnancy associated cases in England 2006–2015. *Journal of Infection*, 78(3), 208-214. doi.org/10.1016/j.jinf.2018.11.007
- Sereno, M. J., Viana, C., Pegoraro, K., da Silva, D. A. L., Yamatogi, R. S., Nero, L. A., & dos Santos Bersot, L. (2019). Distribution, adhesion, virulence and antibiotic resistance of persistent *Listeria monocytogenes* in a pig slaughterhouse in Brazil. *Food microbiology*, 84, 103234. doi.org/10.1016/j.fm.2019.05.018
- Setiani, B. E., Elegado, F. B., Perez, M. T., Mabesa, R. C., Dizon, E. I., & Sevilla, C. C. (2015). API *Listeria* rapid kit for confirmatory phenotypic conventional biochemical test of the prevalence *Listeria monocytogenes* in selected meat and meat products. *Procedia Food Sci*, 3, 445-452. doi: 10.1016/j.profoo.2015.01.049
- Sharma, M., Handy, E. T., East, C. L., Kim, S., Jiang, C., Callahan, M. T., ... & Gartley, S. (2020). Prevalence of *Salmonella* and *Listeria monocytogenes* in non-traditional irrigation waters in the Mid-Atlantic United States is affected by water type, season, and recovery method. *Plos one*, 15(3), e0229365. doi.org/10.1371/journal.pone.0229365
- Sheth, I., Li, F., Hur, M., Laasri, A., De Jesus, A. J., Kwon, H. J., ... & Chen, Y. (2018). Comparison of three enrichment schemes for the detection of low levels of desiccation-stressed *Listeria* spp. from select environmental surfaces. *Food Control*, 84, 493-498. doi.org/10.1016/j.foodcont.2017.08.022
- Sinell, H. J. (Ed.). (2004). *Einführung in die Lebensmittelhygiene*. 2.3.1.1. 19-33. Georg Thieme Verlag.
- Stephan, R., Zweifel, C., Hächler, H., & Lehner, A. (2014). Non-typhöse *Salmonellen*. Behr's Verlag DE.
- Stessl, B., Szakmary-Brändle, K., Vorberg, U., Schoder, D., & Wagner, M. (2020). Temporal analysis of the *Listeria monocytogenes* population structure in floor drains during reconstruction and expansion of a meat pro-

cessing plant. *International journal of food microbiology*, 314, 108360.
doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2019.108360

Tenover, F. C., Arbeit, R. D., Goering, R. V., Mickelsen, P. A., Murray, B. E., Persing, D. H., & Swaminathan, B. (1995). Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *Journal of clinical microbiology*, 33(9), 2233. doi.org/ 10.1128/JCM.33.9.2233-2239.1995

Thouvenot, P., Vales, G., Bracq-Dieye, H., Tessaud-Rita, N., Maury, M. M., Moura, A., ... & Leclercq, A. (2018). MALDI-TOF mass spectrometry-based identification of *Listeria* species in surveillance: a prospective study. *Journal of microbiological methods*, 144, 29-32. doi.org/10.1016/j.mimet.2017.10.009

Tiensuu, T., Guerreiro, D. N., Oliveira, A. H., O'Byrne, C., & Johansson, J. (2019). Flick of a switch: regulatory mechanisms allowing *Listeria monocytogenes* to transition from a saprophyte to a killer. *Microbiology*, 165(8), 819-833. doi.org/10.1099/mic.0.000808

Tindall, B. J., Grimont, P. A. D., Garrity, G. M., & Euzéby, J. P. (2005). Nomenclature and taxonomy of the genus *Salmonella*. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 55(1), 521-524. doi.org/10.1099/ijs.0.63580-0

van Asten, A. J., & van Dijk, J. E. (2005). Distribution of "classic" virulence factors among *Salmonella* spp. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 44(3), 251-259. doi.org/10.1016/j.femsim.2005.02.002

Vos, P., Garrity, G., Jones, D., Krieg, N. R., Ludwig, W., Rainey, F. A., ... & Whitman, W. B. (Eds.). (2009). *Bergey's manual of systematic bacteriology: Volume 3: The Firmicutes* (Vol. 3). Springer Science & Business Media.

Wagner, M., & Stessl, B. (2014). Sampling the food processing environment: taking up the cudgel for preventive quality management in food processing environments. In *Listeria monocytogenes* (pp. 275-283). Humana Press, New York, Ny. doi.org/10.1007/978-1-4939-0703-8_23

Walsh, P.S., Metzger, D.A., Higuchi, R. (1991). Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *Biotechniques*.10(4), 506-513.

Wang, Y., Lu, L., Lan, R., Salazar, J. K., Liu, J., Xu, J., & Ye, C. (2017). Isolation and characterization of *Listeria* species from rodents in natural environments in China: Isolation and characterization of *Listeria* species. *Emerging microbes & infections*, 6(1), 1-6. doi.org/10.1038/emi.2017.28

Weber, H. (Ed.). (2010). *Mikrobiologie der Lebensmittel: Band 1: Grundlagen* (Vol. 1). Behr's Verlag DE.

Xu, F., Ge, C., Luo, H., Li, S., Wiedmann, M., Deng, X., ... & Tang, S. (2020). Evaluation of real-time nanopore sequencing for *Salmonella* serotype prediction. *Food Microbiology*, 89, 103452. doi.org/10.1016/j.fm.2020.103452

Zilelidou, E., Manthou, E., Skandamis, P. (2016) Growth differences and competition between *Listeria monocytogenes* strains determine their predominance on ham slices and lead to bias during selective enrichment with the ISO protocol, *International journal of food*, doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.07.016

8. DANKSAGUNG

Diese Arbeit wurde im Rahmen eines Forschungsvorhabens des Austrian Competence Centre for Feed and Food Quality, Safety and Innovation (FFoQSI) erstellt.

Das COMET-K1 Kompetenzzentrum FFoQSI wird im Rahmen von COMET – Competence Centers for Excellent Technologies durch BMVIT, BMDW und die Bundesländer Niederösterreich, Oberösterreich und Wien gefördert. Das Programm COMET wird durch die FFG abgewickelt.

9. APPENDIX

Tabelle 1: Verwendete Materialien und Geräte.

Geräte	
Elektrophorese Einheit	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, USA
Gefrierschrank -20 °C	Liebherr, Korneuburg, Österreich
Gefrierschrank -80 °C	Sanyo, Morigushi, Japan
Gel Doc	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, USA
GFL-1086-Schuettel-Wasserbad	Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel, Germany
Heizblock MBT 250	Kleinfeld Labortechnik., Gehrden, Deutschland
Inkubator 37 °C	Ehret, Emmendingen, Deutschland
Mikrowelle	Silva Schneider Electric, Rueil-Malmaison, France
PFGE electrophoresis chamber, Chef DR III system	Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, USA
Software Bionumerics (Version 6.6, Applied Maths NV)	Sint-Martens-Latem, Belgium
Thermocycler VWR Doppio	VWR, Wien, Österreich
Tischentrifuge 5424	Eppendorf AG, Wien, Österreich
Vortex	Scientific Industries Inc., Bohemia, USA
Waage	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
Verbrauchsmaterialien	
PCR Tubes (0,2ml)	neoLab Migge GmbH, Heidelberg, Deutschland
100bp DNA Leiter	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
API 20E, API10S, rapid ID32E	bioMerieux, Marcy' l'Etoile, Frankreich
Aqua bidest	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Ascl Enzym	Thermo Fisher Scientific Inc., Life Technologies, Waltham, USA
Borsäure	Sigma-Aldrich Co. LCC, St. Louis, USA
Chelex	Bio-Rad Laboratories, Mernes-la-Coquette, Frankreich
DEPC water	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Diethylpyrocarbonat (DEPC) Wasser	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
dNTP Mischung 20mM	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
EDTA-Na ₂	Sigma-Aldrich Co. LCC, St. Louis, USA
Ethidiumbromid	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Glycerol	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Halbfraser Medium	Biokar Diagnostics, Solabia Group, Cedex, France
Impfschlingen 1,10 µl	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Kryoröhrchen	Biologix Group Ltd, Shandong China
Latex-Handschuhe	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Lysozym	Sigma-Aldrich Co. LCC, St. Louis, USA
Millipore Wasser (Milli-Q® Direct)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

MR safe-lock tubes: 1.5 ml	Corning Life Sciences, Tewksbury, USA
NaCl	Merck KGaA, Darmstadt, Germany
Oxidase Reagenz	bioMerieux SA, Marcy-l'Étoile, Frankreich
Paraffinöl	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
PCR Primer	Microsynth AG, Balgach, Schweiz
Peq Green	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Germany
peqGOLD Universal Agarose	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Germany
Pipetten 1-1000 µl	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Germany
Platinum Taq DNA Polymerase Mastermix	Firma Invitrogen - Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham USA
Proteinase K	Sigma-Aldrich Co. LCC, St. Louis, USA
Raucotupf Stieltupfer	Lohmann und Rauscher GmbH, Rengsdorf, Deutschland
<i>Xba</i> I, <i>Asc</i> I	Thermo Fisher Scientific Inc., Life Technologies, Waltham, USA
Sample Loading Buffer (SLB)	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
SampleRight™ Sponge Sampler mit HiCap™ Neutralizing Broth	Worldbioproducts, Bothell, USA
Seakem Gold Agarose	VWR International, Radnor, USA
TBE buffer 10x (Tris-Borat-EDTA-Puffer)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Tris HCL	Sigma-Aldrich, Wien, Österreich
Trishydroxymethylaminomethane	Sigma-Aldrich Co. LCC, St. Louis, USA
Tube 1,5, 2ml	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Wasserstoffperoxid	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Medien und Platten	
Gepuffertes Peptonwasser	Thermo Fisher Scientific Inc., Oxoid, Waltham, USA
Trypton Soja Agar (TSA) mit 6 % Hefeextrakt	Biokar Diagnostics, Beauvais Cedex, Frankreich
Muller-Kauffmann Tetrathionate-Novobiocin Broth (MkTTn)	Thermo Fisher Scientific Inc., Oxoid, Waltham, USA
Rappaport-Vassiliadis Soya Peptone Broth (RSV Broth)	Thermo Fisher Scientific Inc., Oxoid, Waltham, USA
Xylose-Lysine-Desoxycholate (XLD) Agar	Thermo Fisher Scientific Inc., Oxoid, Waltham, USA
Half-Fraser Broth, Fraser Broth	BIOKAR Diagnostics, PANTIN Cedex, France
Brilliance™ Listeria Agar Base	Thermo Fisher Scientific Inc., Oxoid, Waltham, USA