

Verkürzung und Optimierung des Nachweises von Listerien und *L. monocytogenes* in Milcherzeugnissen

Koordinierung:	Forschungskreis der Ernährungsindustrie e.V. (FEI), Bonn
Forschungsstelle I:	Universität München Lehrstuhl für Hygiene und Technologie der Milch Prof. Dr. E. Märtlbauer/Dr. C. Bürk
Forschungsstelle II:	Technische Universität München Zentralinstitut für Ernährungs- u. Lebensmittelforschung Abt. Mikrobiologie, Freising-Weihenstephan Prof. Dr. S. Scherer
Forschungsstelle III:	Eidgenössische Techn. Hochschule Zürich Institut für Lebensmittel- und Ernährungswissenschaften Labor für Lebensmittelmikrobiologie Prof. Dr. M. Loessner
Industriegruppe:	Milchindustrie-Verband e.V., Bonn
	Projektkoordinator: Dr. K. Lechner Edelweiß-Käsewerk, Kempten/Allgäu
Laufzeit:	2002 – 2005
Zuwendungssumme:	€ 291.400,-- (Förderung durch BMWi via AiF/FEI)

Ausgangssituation:

Die konventionelle kulturelle Untersuchung von Lebensmitteln auf Listerien wird international (ISO, IDF), supranational (CEN) und national (DIN, Amtl. Sammlung § 35 LMBG) nach dem gleichen Schema – Primäranreicherung, evtl. Unteranreicherung, Nachweis, Bestätigung - durchgeführt.

Der komplette Untersuchungsgang einschließlich Bestätigung verdächtiger Kolonien dauert bis zu 12 Tagen, ein negatives Ergebnis liegt frühestens nach 5 Tagen vor. Insbesondere für Produkte mit kurzer Haltbarkeit ist diese Zeitspanne nicht akzeptabel. Da die Produkte bis zum Vorliegen eines Ergebnisses im Betrieb verbleiben müssen, können außerdem beträchtliche Kosten für die Bereitstellung von Lagerkapazitäten anfallen. Aus diesem Grund gibt es in letzter Zeit Anstrengungen zur Neuentwicklung von Methoden für den Schnellenachweis von Listerien auf der Basis von Nukleinsäure-Hybridisierung, Nukleinsäure-Amplifikation durch PCR und

Immunoassays, aber auch auf der Basis alternativer Nachweisverfahren.

Ziel des Forschungsvorhabens war die Entwicklung von Verfahren zum Nachweis von Listerien in Milcherzeugnissen innerhalb von ca. 24 h. Als Grundlage diente dabei zum einen die so genannte TaqMan-PCR, eine Modifikation der Polymerase-Kettenreaktion mit automatischer Online-Detektion der Amplifikationsprodukte auf Basis fluoreszierender Oligonukleotidsonden. Zum anderen wurden rekombinante listerienspezifische Bakteriophagen sowie rekombinant hergestellte zellwandbindende Domänen aus Phagenlysinen zur Separation und zur Detektion von Listerien verwendet.

Forschungsergebnis:

Im Rahmen des Projekts wurde eine genusspezifische TaqMan-PCR zum Nachweis von *Listeria* spp. und eine speziesspezifische TaqMan-PCR für den Nachweis von *L. monocytogenes* entwickelt. Der genusspezifische Nachweis für *Listeria* spp. erfasst mit *L. monocytogenes*, *L. innocua*, und *L. seeligeri* die wichtigsten und am häufigsten in Milchprodukten nachgewiesenen Listerienspezies. Wenn für bestimmte Anwendungen die vollständige Erfassung des Genus *Listeria* erforderlich ist, besteht die Möglichkeit, im gleichen Nachweissystem anstelle der fluoreszenzmarkierten TaqMan-Sonde den interkalierenden Fluoreszenzfarbstoff SybrGreen zu verwenden. Der speziesspezifische Nachweis für *L. monocytogenes* erfasst alle getesteten Stämme dieser Spezies und reagierte mit keiner anderen Spezies falsch positiv.

Bei Versuchen zur Anwendbarkeit der Nachweise für komplexe Lebensmittelmatrizes wurde keine negative Beeinflussung der PCR-Nachweise durch Probenbestandteile beobachtet. In künstlich kontaminierter Milch und verschiedenen Käse-Standardsorten konnten die Listerien nach 48 h selektiver Anreicherung korrekt nachgewiesen werden.

Für eine weitere Verkürzung der Nachweiszeit wurden die Listerien nach einer Übernachtenanreicherung mit den an der Forschungsstelle III entwickelten paramagnetischen listerienbindenden CBD-Partikeln isoliert und anschließend eine kurze Anreicherung (3 h) in einem nicht-selektiven Medium durchgeführt. Mit dieser Methode konnte die Nachweiszeit auf 32 h reduziert werden. Allerdings ist diese Methode insbesondere bei erfahrungsgemäß kritischen Matrizes wie Rotschmierekäse etwas weniger sensitiv als die Methode mit 48 h Anreicherung.

Die zellwandbindenden Domänen der Phagenlysin Ply 500 und Ply 118 eigneten sich sehr gut zur Immobilisierung von *Listeria*-Zellen auf den super-paramagnetischen Dynabeads® M-270 Epoxy. Generell konnten über 80 % der Zielzellen bei einer Zellkonzentration von ca. 10^4 KbE/100 µl wiedergefunden werden.

Der Vergleich von CBD-magnetischer Separation (CBD-MS) und Ausplattierung auf Oxford-Agar mit der IDF-Standardmethode anhand von künstlich kontaminierten Lebensmitteln hat gezeigt, dass der Bead-Assay mindestens gleich gut, in den meisten Fällen sogar besser als die IDF-Standardmethode abschneidet.

Eine kombinierte Methode mit CBD-MS und Detektion über den rekombinanten Reporterphagen A511::luxAB konnte etabliert werden. Nach Adaptation an das Mikrotiterplattenformat und Optimierung der Messparameter wurden Zellkonzentrationen bis zu etwa 2×10^4 KbE pro Well detektiert. Diese Methode ermöglichte bei allen kontaminierten Lebensmitteln (außer Camembert) nach 24 h selektiver Anreicherung den Nachweis einer *Listeria*-Zellkonzentration von 100 KbE/g oder mehr. Die minimale Analysezeit betrug hierbei etwa 28 Std. Im Vergleich zur Referenzmethode entspricht dies einer Zeitersparnis von rund 2 Tagen.

Eine Methodenvergleichsstudie der im Rahmen des Projektes entwickelten Methoden mit dem kulturellen Referenzverfahren und einem kommerziellen PCR-Verfahren wurde durchgeführt. Dabei wurden 173 dotierte Proben verschiedener in Abstimmung mit dem Projektbegleitenden Ausschuss ausgewählter Matrizes (Produkt- und Umfeldproben) sowie 103 native Proben vergleichend untersucht. Die im Rahmen des Projektes entwickelten Methoden zeigten ebenso wie das kommerzielle PCR-Verfahren eine gute bis sehr gute Übereinstimmung mit dem kulturellen Referenzverfahren.

Wirtschaftliche Bedeutung:

Die mit dem Standardverfahren mindestens 5, im positiven Fall einschließlich aller Bestätigungsreaktionen bis zu 12 d dauernde Untersuchung kann auf 28-52 h verkürzt werden. Neben einer beträchtlichen Einsparung an Arbeitszeit, Verbrauchsmaterial und Geräten ergeben sich aus der zeitlichen Verkürzung weitere vielfältige wirtschaftliche Positiveffekte: Je schneller eine Kontamination nachgewiesen wird, umso schneller kann eine Entscheidung über die weitere Verwendung des betroffenen Produktes gefällt werden. Bei mehrstufiger Produktion werden die Prozesszeiten durch Freigabe des nächsten Arbeitsschrittes nach nur einem Tag drastisch verkürzt. Bei kontinuierlichen Produktionen wird durch das schnellere Erkennen einer Kontamination das Risiko weiterer Fehlproduktionen bei einer Nachweiszeit von nur noch 1-2 Tage gegenüber bisher fünf Tagen wesentlich verringert.

Auch wenn bei den meisten kmU kein eigenes Betriebslabor zum Nachweis pathogener Keime vorhanden ist, bleibt der Zeitvorteil bei externer Untersuchung in Dienstleistungslaboratorien ebenfalls bestehen. Dies ist eine gewinn-

bringende Ergänzung des Methodenspektrums und damit vorteilhaft für die Beschleunigung von Produktionsabläufen. Darüber hinaus kann durch das verkürzte Verfahren das Produktionsrisiko deutlich verringert werden.

Die Methoden für die PCR-Nachweise können bei entsprechender Ausstattung in den Betriebslaboratorien direkt für die Eigenkontrolle angewendet werden. Die kommerzielle Verfügbarkeit der CBD-beschichteten Beads durch die Firma Profos steht unmittelbar bevor. Mit der in den Methodenvergleich einbezogenen kommerziellen PCR (Roche Diagnostics) konnte eine Methode validiert werden, die alle erforderlichen patentrechtlichen Lizenzen für Auftragsuntersuchungen aufweist. Die Nutzung der Methoden ist nicht auf die Milchindustrie beschränkt, sondern kann auch auf andere Wirtschaftsbereiche, in denen eine Kontamination mit Listerien relevant ist, ausgedehnt werden.

Publikationen (Auswahl):

1. FEI-Schlussbericht 2006.
2. Kretzer, J. W., Lehmann, R., Banz, M., Kim, K.-P., Korn, C. and Loessner, M. J.: Use of high affinity cell wall-binding domains of bacteriophage endolysins for immobilization and separation of bacterial cells. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 1992-2000 (2007).
3. Hagens, S. and Loessner, M. J.: Application of bacteriophages for detection and control of foodborne pathogens. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 513-519 (2007).
4. Bürk, C., Völzke, M., Sjöholm, A., Knödlseeder, M., Kretzer, J. W., Lehmann, R., Loessner, M. J. und Märtilbauer, E.: Verkürzung der Nachweiszeit für *Listeria monocytogenes*. *Deutsche Milchwirtschaft* 57, 663-665 (2006).
5. Loessner, M.J.: The enemy's enemy is our friend: phageborne tools for detection and control of foodborne pathogens. *Mitt. Lebensm. Hyg.* 96, 30-38 (2005).
6. Loessner, M.J.: Bacteriophage endolysins – current state of research and applications: *Curr. Opin. Microbiol.* 8, 480-487 (2005).
7. Völzke, M., Bürk, C. und Märtilbauer, E.: Listerien-Screening mittels real-time PCR. Poster 45. Arbeitstagung des Arbeitsgebietes Lebensmittelhygiene der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft e.V., 28.9-1.10.2004, 572-575 (2004).

Weiteres Informationsmaterial:

Universität München
Lehrstuhl für Hygiene und Technologie der Milch
Schönleutner Str. 8, 85764 Oberschleißheim
Tel.: 089/2180-78600, Fax: 089/2180-78602
E-Mail:
e.maertlbauer@mh.vetmed.uni-muenchen.de

Eidgenössische Techn. Hochschule Zürich
Institut für Lebensmittel- und Ernährungswissenschaften
Labor für Lebensmittelmikrobiologie
Schmelzbergstr. 9, CH- 8092 Zürich
Tel.: 0041-1-632-3335, Fax: 0041-1-632-1266
E-Mail: martin.loessner@ilw.agrl.ethz.ch

Forschungskreis der Ernährungsindustrie e.V. (FEI)
Godesberger Allee 142-148, 53175 Bonn
Tel.: 0228/372031, Fax: 0228/376150
E-Mail: fei@fei-bonn.de