



Erfahrungen aus der Listerienberatung – Kolloquium vom 29. August 2019

Autoren

Thomas Berger, Lena Fritsch, René Imhof, Ernst Jakob, Thomas Stanke,
Alicia Romanò



Impressum

Herausgeber:	Agroscope, Schwarzenburgstrasse 161, 3003 Bern www.agroscope.ch
Auskünfte:	Thomas Berger
Redaktion:	Thomas Berger
Titelbild	Ernst Jakob, Agroscope
Download	www.agroscope.ch/transfer
Copyright	© Agroscope 2019
ISSN	2296-7214 (online)

Inhaltsverzeichnis

1. 30 Jahre Listeria Monitoring Programm.....	4
2. Listerienprävention in den Branchenleitlinien	5
3. Beratungserfahrungen aus der Sicht eines industriellen Betriebes.....	8
4. Potenzial des Whole Genome Sequencing	9
5. Potenzial von MALDI-TOF	11
Literaturverzeichnis	13

Fünf Referentinnen und Referenten fassten die Erfahrungen aus 30 Jahren Listerienberatung und -prävention aus verschiedener Sicht zusammen und zeigten auf, was mit modernen Techniken wie Whole Genome Sequencing und MALDI-TOF heute möglich ist.

1. 30 Jahre Listeria Monitoring Programm

René Imhof (Agroscope) blickte auf «30 Jahre Listeria Monitoring Programm» zurück. Der Beginn des Listeria Monitoring Programms geht auf die Listeriose-Epidemie 1983 bis 1988 zurück, verursacht durch Vacherin Mont d'Or-Käse (122 Krankheitsfälle führten zu 33 Todesfällen; *Bundesamt für Gesundheitswesen, 1986, 1986; Bille, 1988; Bille J., 1989; Büla et al., 1995*). Agroscope, respektive die damalige Forschungsanstalt für Milchwirtschaft, erhielt den Auftrag ein Labor zum Nachweis von Listerien aufzubauen und Massnahmen zu definieren, um eine Wiederholung solcher Ereignisse auszuschliessen, was in der Folge auch gelang.

Listerien sind gefährliche Überlebenskünstler. Sie überlisten unser Immunsystem und überleben im Innern von Fresszellen des Immunsystems. Zudem sind sie Opportunisten, was bei *Listeria monocytogenes* (*L. monocytogenes*) zu besonderen gesundheitlichen Risiken für Menschen mit geschwächtem Immunsystem führt, sowie für Schwangere, jüngere und ältere Menschen, der sogenannten YOPI-Gruppe (englisch: «young (newborn), old, pregnant or immuno compromised people»). Obwohl andere bakterielle Infektionen häufiger auftreten, ist der Anteil an tödlichen Krankheitsverläufen bei einer Listeriose besonders hoch.

In der Folge setzte Agroscope drei Massnahmen um:

1. Labor für Listerienanalysen

Der Nachweis von Listerien dauerte in den Anfängen noch 65 Tage (1985), war aber 1993 durch laufende Verbesserungen schon unter 10 Tagen möglich und ab 2006 schon in 48 Stunden realisierbar.

2. Das Listeria Monitoring Programm (LMP)

Durch die Einführung regelmässiger Kontrollen in zwei Regelkreisen (Käsereien und Handelslager) konnte sichergestellt werden, dass keine kontaminierten Käse auf den Markt gelangten, was auch den Käseexport sicherstellte. In einer ersten Phase von 1990 bis 2001 erfolgte mit viel Aufwand und Analysen die Sensibilisierung, Schulung, Beratung und die Mithilfe bei der Sanierung von betroffenen Betrieben sowie der Aufbau von Qualitätssicherungsmassnahmen in den Betrieben. Ab 2002 bis 2009 wurden der Aufwand reduziert, die Qualitätssicherung optimiert und HACCPs eingeführt. Parallel dazu verlagerte Agroscope seine Tätigkeit auf die Beratung und Unterstützung von regionalen Beratern. Das Hygienerecht wurde in dieser Zeit ebenfalls angepasst und das LMP regionalisiert. Das LMP in seiner alten Form ist seit 2010 überholt und wurde auf ein Restmandat reduziert.

3. Das Agroscope Listerien-Beratungsteam

Bei Listerienproblemen kann das Listerien-Beratungsteam von Agroscope für Mithilfe und Beratung bei Betriebssanierungen angefordert werden. Im Team stehen 3-4 Mitglieder aus verschiedenen Arbeitsfeldern (Herstellungstechnologie sowie Hygiene und Mikrobiologie) zur Verfügung. Wo nötig kann das Team Fachwissen oder weitere Experten aus den Fachbereichen von Agroscope beiziehen. Im ersten Schritt wird der Ist-Zustand aufgenommen

(Abbildung 1) und das Vorkommen von Listerien generell und *L. monocytogenes* im Speziellen untersucht (Umgebungs-, Schmierwasser- und Produkteproben).

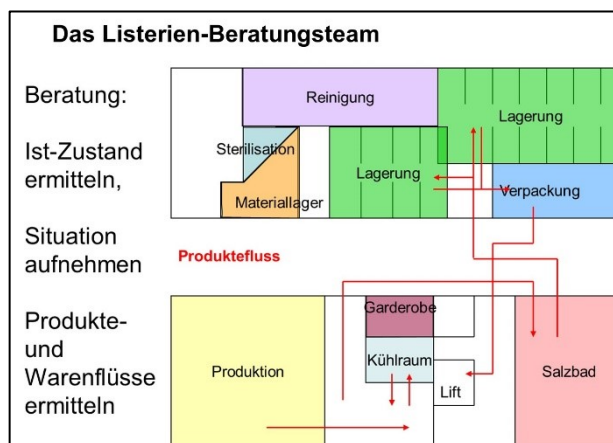


Abb. 1: Ermittlung des Ist-Zustands in der Listerien-Beratung

Es werden die Produkte- und Warenflüsse ermittelt und die Erkenntnisse fliessen in eine Risiko- und Schwachpunkteanalyse ein (Abbildung 2), die dann im dritten Schritt zu Sanierungsvorschlägen führt (Abbildung 3).

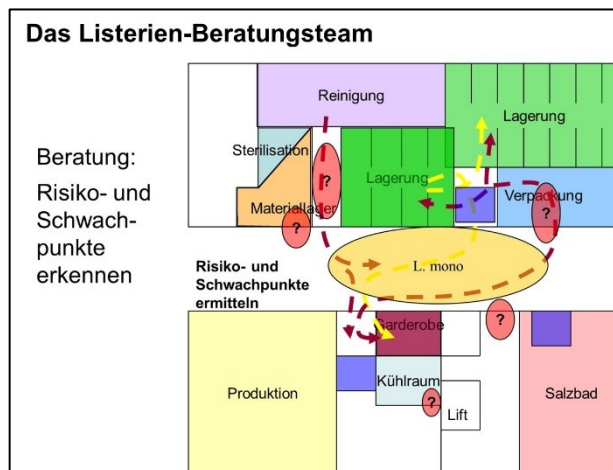


Abb. 2: Beschreibung der Risiko- und Schwachpunkte in der Listerien-Beratung

Ein spezielles Augenmerk gilt auch den Brettern für die Käsereifung. Sie müssen mit Dampf thermisch behandelt werden, was einer Pasteurisation gleichkommt. Die Erfahrungen aus dem LMP und den Betriebssanierungen wurden später auch miniaturisiert für Alpbetriebe, die sich eine einfache Dampfbehandlung im Bausatz selber konstruieren können (Abbildung 4). Die Anleitung dazu findet sich unter: [Imhof & Riva Scettrini, 2015](#)

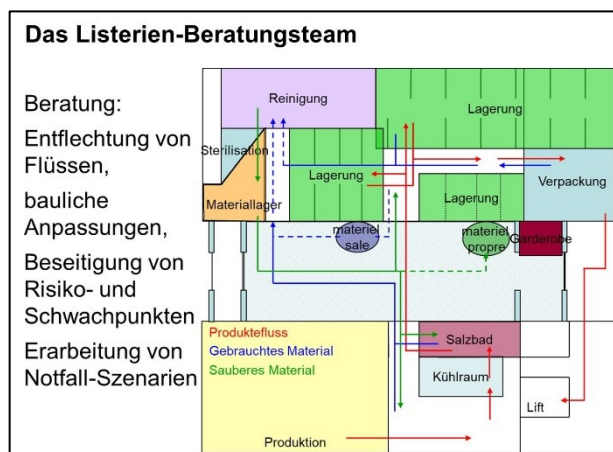


Abb. 3: Ermittlung des Soll-Zustandes in der Listerien-Beratung



Abb. 4: Dampfzelle im Baukastenprinzip für Alpen und Kleinstbetriebe

Da die Verwendung von Holz in der Käsebereitung international immer wieder umstritten ist, wurde in einem Versuch die Wirksamkeit der Dampfbehandlung gezeigt und publiziert ([Imhof et al. 2017](#); [International Dairy Federation, 2016](#)). Da-mit ist die kritische Argumentation widerlegt, Holz kann durch eine Hitzebehandlung in einer Dampfzelle hygienisch einwandfrei für den Gebrauch im Kontakt mit Lebensmitteln präpariert werden.

Eine Forschungsgruppe bei Agroscope arbeitet an Listerien-Schutzkulturen. Seitens LMP und Betriebsberatung sind keine direkten Erfahrungen mit Schutzkulturen oder Phagen-basierten Produkten während Sanierungen in eskalierten Situationen vorhanden. In Fällen, die aus zweiter Hand bekannt sind, haben diese Produkt bisher keine nachhaltige Wirkung in einer akuten Listeriensituation gezeigt. Kunden werden daher nicht zum Gebrauch solcher Produkte ermuntert, bevor im Betrieb nicht die Hausaufgaben gemacht wurden. Die Wirksamkeit solcher Produkte bei präventivem Einsatz muss noch bewiesen werden.

Eine erfolgreiche Hygienestrategie basiert auf den folgenden Faktoren:

- betriebseigenes QM-System diszipliniert leben,
- das Lot-Prinzip einhalten,
- Sensibilisierung und Schulung des Personals,
- Einsatz von Guter Herstellungspraxis, HACCP und Hygienekonzept.

2. Listerienprävention in den Branchenleitlinien

Ernst Jakob (Agroscope) zeigte, wie eine erfolgreiche «Listerienprävention in den Branchenleitlinien» implementiert werden kann. Ein Blick auf die Zahlen im Europäischen «Rapid Alert System for Food and Feed» (RASFF) zeigt, wo die Probleme bei *L. monocytogenes* und Käse liegen. Die RASFF Notifikationen zu *L. monocytogenes* in Käse aus den Jahren 2009 - 2019 weisen Keimzahlen zwischen ca. 0.1 - 1'800'000 Koloniebildende Einheiten (KBE)/g auf, davon 44 % > 100 *L. monocytogenes* (KBE)/g (Abbildung 5).

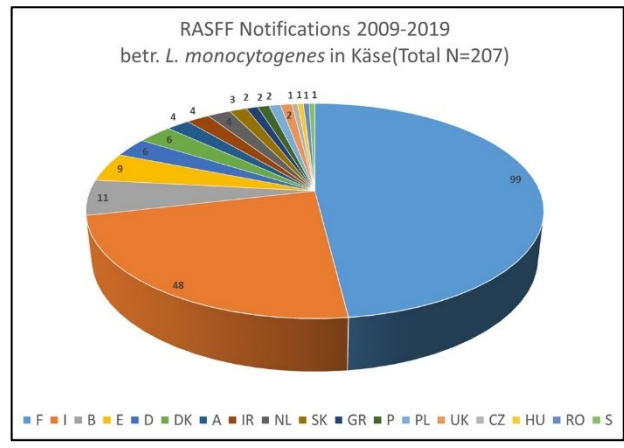


Abb. 5: RASFF Notifikationen 2009-2019 betreffend *L. monocytogenes* in Käse sortiert nach Ländern

Die meisten Notifikationen stammten aus Frankreich, Italien und Belgien, keine aus der Schweiz. Abbildung 6 zeigt, dass betreffend Festigkeit am ehesten Weichkäse betroffen ist, wobei der Käsetyp in vielen Fällen nicht näher spezifiziert wurde.

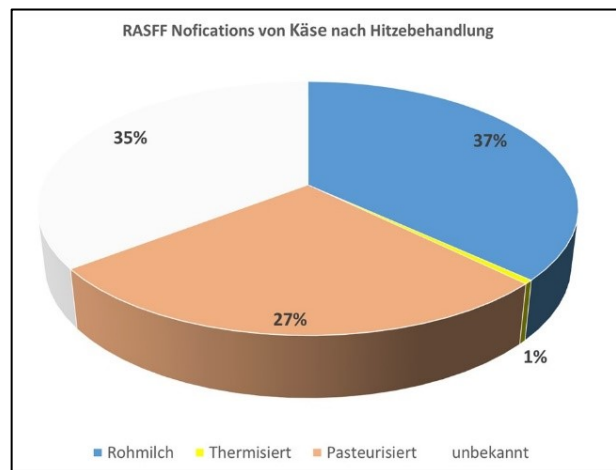


Abb. 6: RASFF Notifikationen 2009-2019 betreffend *L. monocytogenes* in Käse sortiert nach Hitzebehandlung

Die Abbildung 7 und Tabelle 1 sind ebenfalls wichtig für die effektive Implementierung einer Listerienprävention, sind doch entgegen der landläufigen Meinung nicht einfach Rohmilchkäse kritische Produkte, sondern sehr oft Käse aus pasteurisierter Milch, da Listerien-Probleme oft auf eine Rekontamination zurückzuführen sind. Lang gereifte Käse sind sogar sehr sichere Produkte, da die Wahrscheinlichkeit, dort Listerien zu finden, gering ist ([Bundesamt für Lebensmittelsicherheit und Veterinärwesen, 2017](#)).

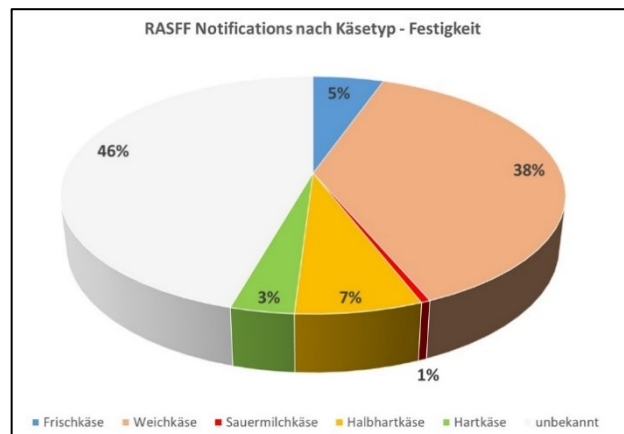


Abb. 7: RASFF Notifikationen 2009-2019 betreffend *L. monocytogenes* in Käse sortiert nach Käsetyp (Teigbeschaffenheit).

Tab. 1: *L. monocytogenes* in Hartkäse aus pasteurisierter Milch (gemäss Auswertung der Nationalen Untersuchungsprogramme in der EU, Community Summary Report 2008 der EFSA, A. Lutz, BLV, 2010)

Country	Sampling unit	Details	Units Tested Presence		Units Tested Enumeration	
			N	% Pos	N	%
Cheeses made from milk from cows						
Bulgaria	Batch	at retail	2,502	0	231	0
Czech Republic	Batch	at processing	3,523	1.7	2,153	0
Germany	Single	at processing	682	1.3	214	0
	Single	at retail	3,172	0.5	1,621	0.1

Jahr	Milch	Teig	Rinde	Fehlerursache	
2003	Halbhartkäse Rohmilch	pos	pos	Ein Produzent lieferte täglich kontaminierte Milch	
2005	Weichkäse mit Weisschimmel	pasteurisiert	?	pos	Kreuzkontamination mit extern gereiften Rotschmierekäselein
2006	Halbhartkäse	teilthermisiert (Abendmilch)	neg.	pos	Schmieremaschine
2007	Halbhartkäse (Alp)	Rohmilch	pos	pos	kontaminierte Milch (10 – 100 KBE/ml)
2007	Raclette	pasteurisiert	neg	pos	Wasseraustritt von Kanalisationwasser in den Keller nach Hochwasser
2008	Weichkäse	thermisiert	pos	pos	Euterlisteriose einer Kuh. Thermisation bei 65°C ohne Heisshaltezeit
2008	Halbhartkäse	Rohmilch	?	pos	Handelskeller, Kontaminationsquelle unbekannt
2008	Halbhartkäse	thermisiert	neg	pos	unbekannt, parallele Produktion von Emmentaler?
2008	Halbhartkäse	Rohmilch	pos	pos	unbekannt
2009	Schafweichkäse Typ Brie	pasteurisiert	?	pos	Listerien im Emmentaler-Salzbad, Kreuzkontamination
2009	Halbhartkäse	Rohmilch	?	pos	Milch teilw. positiv -> kontaminiertes Melkaggregat (Vakumschlauch) bei einem Milchproduzenten
2009	Weichkäse	thermisiert	pos	pos	Lieferantenmilch (mobiler Melkstand, Zisternenwasser)
2009	Halbhartkäse (Alp)	Rohmilch	pos	pos	unbekannt (Teig pos. <10 kbE/g, Schmierwasser pos., Salzbad pos.)
2009	Halbhartkäse	thermisiert	neg	pos	unbekannt (Salzbad neg.)

Abb. 9: Agroscope-Beratungen 2003 – 2009, Bedeutung von Prozessfehlern und Kreuzkontaminationen

Gesetzlich vorgegeben ist das Umfeldmonitoring gemäss Hygieneverordnung Art. 69 «Probenahme in Verarbeitungsbereichen und bei Ausrüstungen» (HyV, 2018):

²Lebensmittelbetriebe, die genussfertige Lebensmittel herstellen, die ein durch *Listeria monocytogenes* verursachtes Risiko für die menschliche Gesundheit bergen könnten, haben im Rahmen ihres Probenahmeplans Proben aus den Verarbeitungsbereichen und den verwendeten Ausrüstungen auf *Listeria monocytogenes* zu untersuchen.

- European Guide for Good Hygiene Practices in the production of artisanal cheese and dairy products (FACE, Farmhouse and Artisan Cheese & Dairy Producers Network) – 2016 ([Albrecht-Seidel, 2016](#))
- QM Fromarte (Käsereien) – 2008 ([Anonymous, 2008](#))
- SAV Leitlinie (Sömmerungsbetriebe) – 2015 ([Jakob & Menéndez González, 2015](#))

Lebensmittel und Gebrauchsgegenstände						817.024.1
Lebensmittelkategorie	Mikroorganismen/deren Toxine, Metaboliten	Probenahmeplan			Analytische Referenzmethode	Stufe, für die das Kriterium gilt
		n	c	m		
1.2 Andere als für Säuglinge oder für besondere medizinische Zwecke bestimmte, genussfertige Lebensmittel, die die Vermehrung von <i>L. monocytogenes</i> begünstigen können	<i>Listeria monocytogenes</i>	5	0	100 KBE/g ¹⁸	EN/ISO 11290-2 ¹⁹	In Verkehr gebrachte Erzeugnisse während der Haltbarkeitsdauer
		5	0	In 25 g nicht nachweisbar ²⁰	EN/ISO 11290-1	Bevor das Lebensmittel die unmittelbare Kontrolle der verantwortlichen Person des Herstellerbetriebs verlassen hat
¹⁸ Die verantwortliche Person muss zur Zufriedenheit der zuständigen Vollzugsbehörde nachweisen können, dass das Erzeugnis während der gesamten Haltbarkeitsdauer den Wert von 100 KBE/g nicht übersteigt. ¹⁹ 1 ml Inoculum wird auf eine Petrischale (140 mm Durchmesser) oder auf 3 Petrischalen (je 90 mm Durchmesser) aufgebracht. ²⁰ Dieses Kriterium gilt für Erzeugnisse, bevor sie die unmittelbare Kontrolle der verantwortlichen Person des Herstellerbetriebs verlassen, wenn diese nicht zur Zufriedenheit der zuständigen Vollzugsbehörde nachweisen kann, dass das Erzeugnis den Grenzwert von 100 KBE/g während der gesamten Haltbarkeitsdauer nicht überschreitet.						
1.3 Andere als für Säuglinge oder für besondere medizinische Zwecke bestimmte, genussfertige Lebensmittel, die die Vermehrung von <i>L. monocytogenes</i> nicht begünstigen können ^{21 22}	<i>Listeria monocytogenes</i>	5	0	100 KBE/g	EN/ISO 11290-2 ²³	In Verkehr gebrachte Erzeugnisse während der Haltbarkeitsdauer
²² Erzeugnisse mit einem pH-Wert von $\leq 4,4$ oder a_w -Wert von $\leq 0,92$. Erzeugnisse mit einem pH-Wert von $\leq 5,0$ und a_w -Wert von $\leq 0,94$; Erzeugnisse mit einer Haltbarkeitsdauer von weniger als 5 Tagen werden automatisch dieser Kategorie zugeordnet. Andere Lebensmittelkategorien können vorbehaltlich einer wissenschaftlichen Begründung ebenfalls zu dieser Kategorie zählen.						

Abb. 8: Gesetzliche Vorgaben für *L. monocytogenes* (HyV, 2018)

Zu beachten sind auch die beiden gesetzlich festgelegten Grenzwerte (Abbildung 8) von «nicht nachweisbar in 25 g» und « ≤ 100 KBE/g» für diejenigen Produkte, in denen sich *L. monocytogenes* während der gesamten Haltbarkeit nicht vermehren kann, was durch Challenge-Tests zu belegen ist.

Weitere hilfreiche Informationen liefern die Erfahrungen aus der Beratung. In Abbildung 9 sind einige Beratungsfälle aus den Jahren 2003 – 2009 aufgelistet. Die markierten Fälle zeigen den gravierenden Einfluss von Prozessfehlern (fehlende Heisshaltezeit bei der Thermisierung) und Kreuzkontaminationen, hier durch ein kontaminiertes Salzbad.

Aktuell sind folgende Branchenleitlinien nach VO (EG) Nr. 852/2004 (VO (EG) Nr. 852/2004, 2009) bzw. Art. 80 der Lebensmittel- und Gebrauchsgegenständeverordnung (LGV, 2019) verfügbar:

Alle Branchenleitlinien sind HACCP basiert. Zur Risikoherrschaft gehören die Tabelle 2 genannten Massnahmen.

Tab. 2 Wichtige Beherrschungsmassnahmen für Käse-produzierende Betriebe

Was	Wie
Validierte Rezepturen	Validierung im Rahmen einer HACCP-Studie
Eintrag über Rohstoffe minimieren	Rohstoffüberwachung Kühlagerung der Rohmilch Hitzebehandlung u.a.
Eintrag aus Umgebung verhindern	Hygienezonen Gute Herstellungspraxis Umfeldmonitoring
Überleben, Wachstum minimieren	Rezeptur (Brenntemperatur, Reifezeit etc.) Prozessüberwachung Prozesshygienekontrollen
Endprodukt	Prozesshygienekontrollen Endproduktkontrollen Datierung

Zu beachten sind ebenfalls die Herstellungsbedingungen gemäss Pflichtenheft für Käse mit «Geschützter Ursprungsbezeichnung» GUB (Stand 28.02.2018). Hier finden sich allerdings auch Anforderungen, die zur Erhöhung eines Listerienrisikos führen, z.B. bei Vacherin fribourgeois mit Milchlagerungsbedingungen von bis zu 18 °C, bis maximal 24 Stunden und fakultativer Thermisierung (Tabelle 3). Die Lebensmittelsicherheit ist dabei selbstverständlich zu garantieren, aber nicht einfach.

Tab. 3: Auswahl von Anforderungen für Käse mit «Geschützter Ursprungsbezeichnung» GUB gemäss ihrer Pflichtenhefte (Stand 28.02.2018). Einige sind kritisch bezüglich Listerienprävention.

Käsesorte	Thermisierung	Brenn-temperatur	Milchlagerung		minimale Reifezeit
Berner Alpkäse	nicht erlaubt	≥ 50 °C	k.A. (18 °C)	≤ 15 h	4.5 Monate
Emmentaler	nicht erlaubt	52 – 54 °C	k.A. (18 °C)	≤ 24 h	4 Monate
Etivaz	nicht erlaubt	≤ 57 °C	max. 18 °C ²	≤ 18 h	135 Tage
Formaggio d'alpe ticinese	nicht erlaubt	41 – 50 °C	k.A. (18 °C)	≤ 18 h	60 Tage
Glarner Alpkäse	nicht erlaubt	44 – 47 °C	< 13 °C	≤ 24 h	60 Tage
Gruyère	nicht erlaubt	54 – 57 °C	12 bis 18 °C	≤ 18 h	5 Monate
Sbrinz	nicht erlaubt	54 – 57 °C	k.A. (18 °C)	≤ 24 h	18 Monate
Tête de Moine	nicht erlaubt	44 – 53 °C	≤ 18 °C ³	≤ 18 h ³	75 Tage
Vacherin fribourgeois	fakultativ (ALP pos.) ¹	30 – 36 °C	k.A. (18 °C)	≤ 24 h	70 Tage
Vacherin Mont d'Or	57 bis 68 °C ≤ 15s (ALP pos.)	32 – 38 °C	10 – 18 °C	≤ 20 h	17 Tage
Walliser Raclette	nicht erlaubt	36 – 45 °C	< 8 °C ⁴	≤ 24 h	3 Monate
Werdenberger/Liechtensteiner Bloderkäse	kann: 55 – 69 °C/≥ 15s (ALP pos.)	≤ 45 °C / pH < 4.65	k.A. (18 °C)	≤ 24 h	keine
Werdenberger/Liechtensteiner Sauerkäse	kann: 55 – 69 °C/≥ 15s (ALP pos.)	≤ 45 °C / pH < 4.65	k.A. (18 °C)	≤ 24 h	2 Monate

k.A. = keine Angabe, d.h. es gelten die gesetzlichen Anforderungen (max. 18 °C)
 ALP pos. = Reaktion der Alkalischen Phosphatase muss nach der Behandlung positiv sein
¹ Temperatur und Zeit sind nicht definiert
² Höchsttemperatur der gelagerten Abendmilch am Morgen
³ wird die Milch unter 8 °C gekühlt, darf sie max. 24 h gelagert werden
⁴ Sommerbetriebe dürfen die Milch bei < 13 °C lagern

Neben den oben genannten Faktoren ist auch die Qualität der Rohstoffe entscheidend für die Herstellung sicherer Produkte. Im Gegensatz zu anderen Ländern (Tabelle 4), in denen die Listerien-Prävalenz in der Milch bis fast 20 % beträgt, ist die in der Schweiz verwendete Rohmilch von Kühen ohne Fütterung von Silage entscheidend und beträgt nur 0.33 % (Imhof, 2014).

Tab. 4: Prävalenz von *L. monocytogenes* in Rohmilch (Kuusta M. et al., European Dairy Magazine, No. 2, 2010)

Probearart	Anzahl Proben	Prävalenz %	Land (Publ.-Jahr)
Tankmilch Hof	294	1.0	Schweden (2002)
Silomilch Molkerei	295	19.5	Schweden (2002)
Tankmilch Hof	861	6.5	USA (2004)
Tankmilch Hof	113	5.3	Nordirland (1992)
Silomilch Molkerei	113	33.3	Nordirland (1992)
Tankmilch Hof	948	5.9	USA (2003)
Tankmilch Hof	774	3.6	Spanien (1998)
Tankmilch Hof	131	4.6	USA (2001)
Tankmilch Hof	1720	2.7	Kanada (1997)
Tankmilch Hof	589	7.9	Irland (1992)

Weitere kritische Faktoren sind das Wachstum von *L. monocytogenes* in Milch in Abhängigkeit von der Lagerungstemperatur und -zeit (Abbildung 10), sowie der Einfluss der Hitzebehandlung auf die Keimreduktion in Abhängigkeit der Temperatur bei einer Heisshaltezeit von 15 s (Tabelle 5).

Auch die Reifezeit von Rohmilchkäse hat einen Einfluss auf das Überleben von *L. monocytogenes*. Bachmann & Spahr konnten 1995 zeigen, dass *L. monocytogenes* in Hartkäse bereits nach einem Tag nicht mehr nachweisbar war, sich hingegen in Halbhartkäse auch nach 90 Tagen nur ca. auf einen Zehntel der ursprünglichen Keimzahl reduzierte.

Abbildungen 11 und 12 zeigen exemplarisch auf, welche Anforderungen betreffend *L. monocytogenes* aus dem bekannten Wissen abgeleitet werden müssen um das Listerien-Risiko beherrschen zu können.

Zusammenfassend gilt für die Schweizer Branchenleitlinien in der Milchwirtschaft (QM Fromarte und SAV Leitlinie):

- sie sind HACCP-basiert,
- sie interpretieren die gesetzlichen Vorgaben in einer pragmatischen und doch wissenschaftlich fundierten Weise,
- das QM Fromarte ist zertifizierbar (Umsetzungskontrolle durch regelmässige Audits),
- wo nötig werden Betriebe durch die milchwirtschaftlichen Berater der regionalen Beratungsplattformen bei der Umsetzung der Leitlinien unterstützt.

Als Folge gibt es sehr wenig Rückrufe von Schweizer Käse wegen Listerien.

Die Schweizer Erfahrungen sind zusammen mit deutschen und österreichischen Erfahrungen im «InterLab Leitfaden zu Listerien in Milchprodukten» zusammengefasst worden (Abbildung 13).

Darin bekennen sich die Autorinnen und Autoren zur Listerien-freien Käseproduktion (keine Verwendung des Grenzwertes von «≤ 100 KBE/g»).

Der Leitfaden (InterLab, 2018) und ein Übersichtartikel (Becker, 2017) sind unter den folgenden Links abrufbar:

- [Leitfaden, Website Agroscope, Liebefeld](#)
- [Leitfaden, Website HBLFA Tirol, Rotholz](#)
- [Leitfaden, Website MUVA, Kempten](#)
- [Übersichtsartikel, B&L Medien Gesellschaft, Hilden](#)

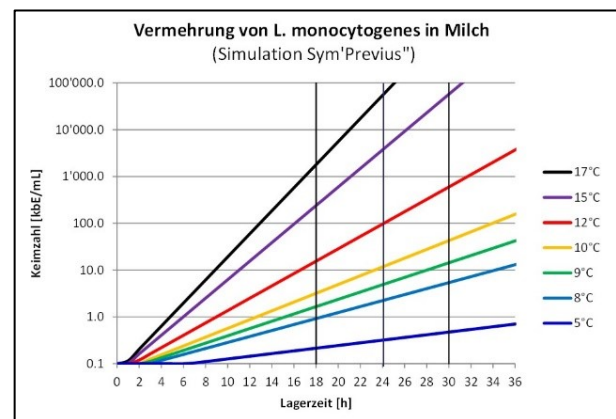


Abb. 10: Vermehrung von *L. monocytogenes* in Milch bei verschiedenen Temperaturen berechnet mit Sym'Previsus

Tab. 5: Einfluss der Hitzebehandlung auf die Keimreduktion von *L. monocytogenes* in der Milch (Sörqvist, 2003)

Thermisierungsbedingungen		Keimreduktion	
Temperatur	Heisshaltezeit	<i>Listeria monocytogenes</i> ¹	<i>Salmonella</i> spp. ²
57 °C	15 s	<0,1 log	0,2 log
62 °C	15 s	0,2 log	1,5 log
65 °C	15 s	0,7 log	5,7 log
68 °C	15 s	2,0 log	>7 log

¹ Berechnungsbasis: D-Wert bei 65 °C in Milch: 21,6 s, z-Wert: 6,7 °C (Sörqvist, 2003)
² Berechnungsbasis: D-Wert bei 65 °C in div. Medien: 2,6 s, z-Wert: 5,2 °C für *Salmonella* spp. ohne *S. senftenberg* (Sörqvist, 2003)

Hartkäse, thermisiert 65 °C/15 s (oder mind. äquivalent)
HACCP Plan

oPRP	Kriterium	Probematerial	Frequenz ¹	Vorgabe
oPRP5 (Salzen)	Listeria spp.	Salzlake (ggf. mit CaCO ₃ stabilisiert)	8 x jährlich oder 1/180 Chargen	n.n. / 25 g,ml
oPRP6 (Reifung)	Listeria spp.	Schmierewasser nach Käsepflege (bei Rotschmierekäse) oder Rindenprobe (schaben)	8 x jährlich oder 1/45 Chargen	n.n. / 25 g

¹Minimale Frequenz (gilt nur wenn in einer Serie von n=5 Probenahmen keine Listerien festgestellt worden sind)

Abb. 11: HACCP-Plan für *L. monocytogenes* für Halbhartkäse im Betrieb, Revision 2019 des QM Fromarte
 oPRP = operative Präventivprogramme (Englisch „operational prerequisite programs“); n.n. = nicht nachweisbar

Halbhartkäse, thermisiert 65 °C/15 s (oder mind. äquivalent)
Anforderung im Handel (Ende MHD)

Kriterium	Probematerial	Vorgabe
Listeria monocytogenes	essbarer Anteil, ggf. mit Anteil Rinde	n.n. / 25 g,ml

Abb. 12: HACCP-Plan betreffend *L. monocytogenes* für Halbhartkäse im Handel, Revision 2019 des QM Fromarte
 MHD = Mindesthaltbarkeitsdatum; n.n. = nicht nachweisbar

3. Beratungserfahrungen aus der Sicht eines industriellen Betriebes

Thomas Stanke (Sachsenmilch) berichtete über seine «Beratungserfahrungen aus der Sicht eines industriellen Betriebes». Dass sich die Erfahrungen der Listerienberatung vom Alpbetrieb über die gewerbliche Verarbeitung in der Dorfkäserei auch auf grosse Industrielle Betriebe übertragen lassen, zeigte Thomas Stanke in seiner eindrücklichen Präsentation. Das Listerien-Berater-team kommt rein präventiv zum Einsatz und hat die Aufgabe allfällige Betriebsblindheit im Keim zu ersticken.

Neben den üblichen Massnahmen zur Vermeidung von Listerienproblemen kommt im Grossbetrieb (Abbildung 14) empfindlichste Analytik zum Einsatz um auch Reste von Listerien-Subspezies in Umfeldproben entdecken und eliminieren zu können. Wo nötige werden sofort bauliche Massnahmen ergriffen. So ist es möglich auch in grossen Mengen Käse Listerien-frei zu produzieren und sich auf dem Markt behaupten zu können.

InterLab Leitfaden

QUALITÄTSMANAGEMENT

Listerien in Milchprodukten

InterLab dankt der Fa. Funke-Dr. N. Gerber Labortechnik für die Unterstützung!

Unsere Autoren: Becker, H.¹; Berger, T.²; Eliskases-Lechner, F.³; Jakob, E.⁴; Knödlseher, M.⁴; Mürtlbauer, E.; Westermair, T.; Zengerl, P.²

¹ Ludwig-Maximilians-Universität (LMU) München (Deutschland)
² Agroscope Institut für Lebensmittelwissenschaften ILM, Liebefeld (Schweiz)
³ HBLFA Tirol, Standort Forschung und Service Rotholz (Österreich)
⁴ MUVA Kempen GmbH (Deutschland)

Der krankheitsreger *Listeria (L.) monocytogenes* stellt nach wie vor eine große Herausforderung für Käsehersteller dar. Listerien sind eine der häufigsten Ursachen von Rückfaltungen aus mikrobiologischen Gründen bei Lebensmitteln. Abgesehen von möglichen schweren Erkrankungen beim Menschen können daher Kontaminationen der Lebensmittel mit *L. monocytogenes* zu großen wirtschaftlichen Verlusten für den Lebensmittelkonzument führen. Das Vorhandensein von zwei unterschiedlichen Grenzwerten (nicht nachweisbar in 25 g versus 100 koloniebildende Einheiten pro Gramm) macht es zudem schwieriger zu entscheiden, wie mit positiven Ergebnissen umgegangen werden soll.

Aus diesem Grund hat die Internationale Gemeinschaft der Laboratorienleiter in der Lebensmittelwirtschaft (InterLab) einen Leitfaden für Listerien in Milchprodukten ausgearbeitet¹. Der Leitfaden gibt Empfehlungen zur Umsetzung der Vorgaben der Verordnung (EG) Nr. 2073/2005² über mikrobiologische Kriterien für Lebensmittel und zur Beurteilung der Verkehrsfähigkeit gemäß Verordnung (EG) Nr. 178/2002 (Basisverordnung)³. Der Leitfaden dient als Hilfsmittel für mikrobiologische Be-

Abb. 13: Übersichtartikel zum «InterLab Leitfaden zu Listerien in Milchprodukten» (Becker, 2017)



Abb. 14: Milchverarbeitung im Grossbetrieb Sachsenmilch, Lepersdorf

4. Potenzial des Whole Genome Sequencing

Über das «**Potenzial des Whole Genome Sequencing**» informierte **Lena Fritsch (Anses)**. Diese relativ neue Technik verfügt über das zurzeit höchste Diskriminierungsvermögen und ermöglicht das Erkennen neuer Zusammenhänge (*Abbildung 15*).

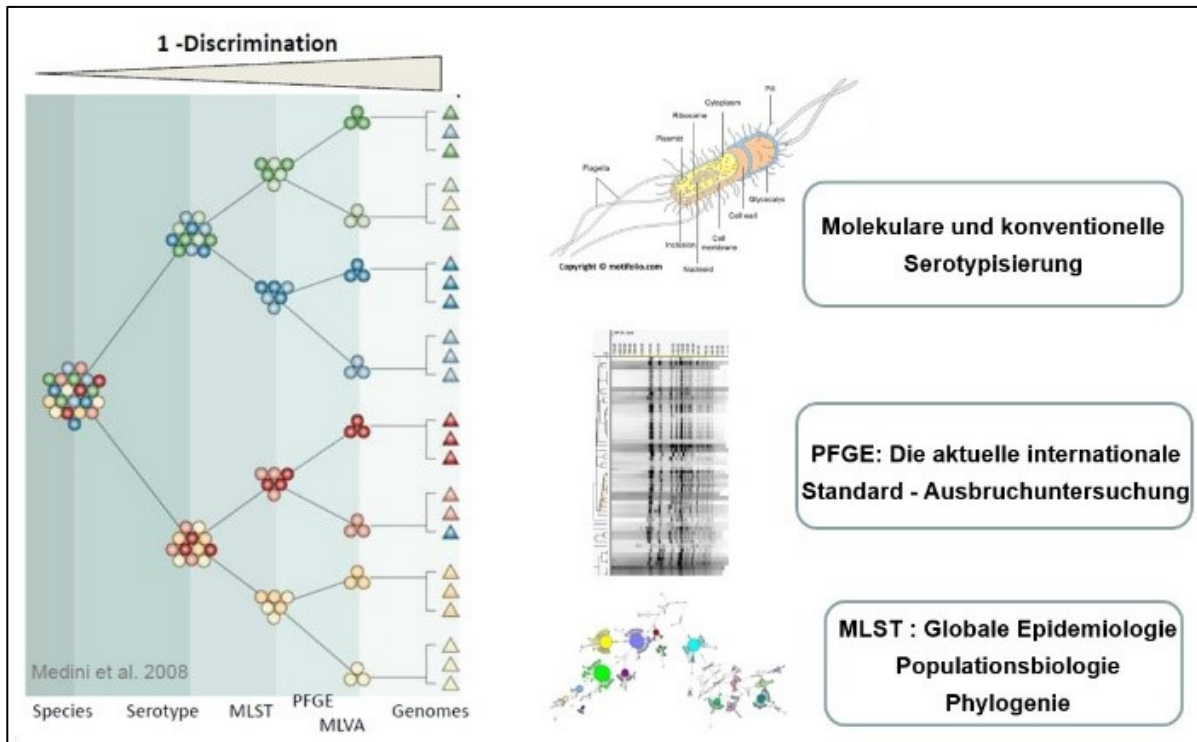


Abb. 15: Übersicht zu den verfügbaren Typisierungstechniken für *L. monocytogenes*

Beim Whole Genome Sequencing (WGS) wird vereinfacht dargestellt aus einer Reinkultur das zu untersuchende Bakterium entnommen, die DNA extrahiert und anschliessend sequenziert. Die dabei entstehenden «reads» werden anschliessend assembliert, also wieder zum nun bekannten Genom zusammengebaut. Allfällige genomische Varianten lassen sich im Vergleich zum Referenzgenom ebenfalls erkennen (*Abbildung 16*).

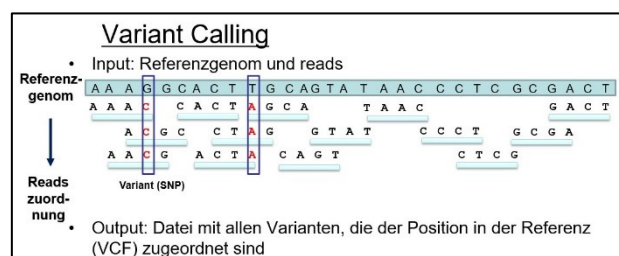


Abb. 16: Identifizierung genomischer Varianten durch den Vergleich der Reads mit einem Referenzgenom

Die so gewonnenen genetischen Informationen lassen sich z.B. zur Abklärung von Ausbrüchen, zur Identifikation genetischer Marker, für Risk Assessments und die Identifizierung von Ausbruchsquellen verwenden.

Für die Lebensmittelhersteller ermöglicht das WGS

- eine schnelle und effiziente Ursachenabklärung bei Kontaminationen (z.B. Zutaten) und die

- Unterscheidung zwischen neuen oder wiederkehrenden (persistenten) Kontaminationen (*Jackson, 2016*)

Die Einführung des WGS hat bereits dazu geführt, dass bei der Überwachung der Listeriose

- die Quellen der Ausbrüche häufiger und schneller identifiziert werden (siehe auch *Abbildung 17*) und
- die Gesamtzahl der identifizierten ausbruchsassoziierten Fälle zugenommen hat.

Zu beachten sind aber die SNP-Distanzen (Single Nucleotide Polymorphism, englisch für Einzelnucleotid-Polymorphismus, Bezeichnung für eine Variation eines einzelnen Basenpaares in einem DNA-Doppelstrang), die Baumtopologie, der Bezug epidemiologischer Daten und Informationen zur Rückverfolgbarkeit. Dies sind wichtige Informationen, da

- verschiedene Bakterienpopulationen unterschiedliche Niveaus an genetischer Vielfalt besitzen,
- der genetische Drift, die natürliche Selektion, u.ä.,
- die Isolationstechnik und die kulturellen Eigenschaften ebenfalls eine wichtige Rolle spielen und falls sie nicht beachtet werden, zu falsch-positiven Befunden führen können. Ein Beispiel dazu liefert *Abbildung 18*.

Beim Einsatz des WGS bei Ausbruchsabklärungen gibt es noch Verbesserungspotenzial. Dies betrifft

- die Zusammenhänge zwischen WGS und den bis jetzt verwendeten Typisierungsdaten (Serotyp, klonaler Komplex CC),
- die Informationen zur Diskriminierung zwischen den Befunden (benötigt Bioinformatik-Kompetenzen),
- die Verbreitung von WGS-Informationen und die Regelung der Rechte dazu (z.B. Datenbankzugriffsrechte),
- die langfristige Speicherung der Daten,
- die Standardisierung der Technik.

Bislang noch wenig erforscht sind die genetischen Marker, das WGS-basierte Risk Assessment und die Zuordnung von Stämmen zu Ausbruchsquellen. Um genetische Marker zu identifizieren benötigt man genomweite Assoziati-

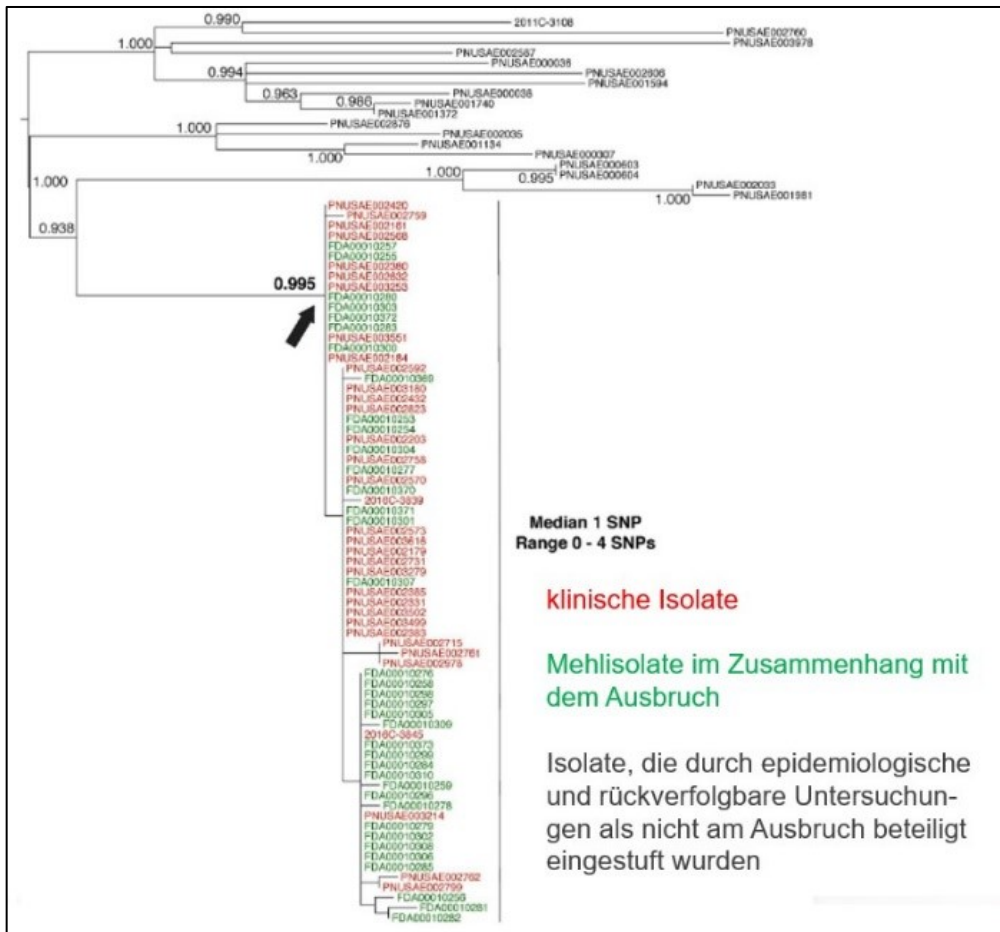


Abb. 17: Vergleich von *Listeriensequenzen* aus klinischen und Mehlsproben bei der Abklärung eines Ausbruchs (Pightling, 2018)

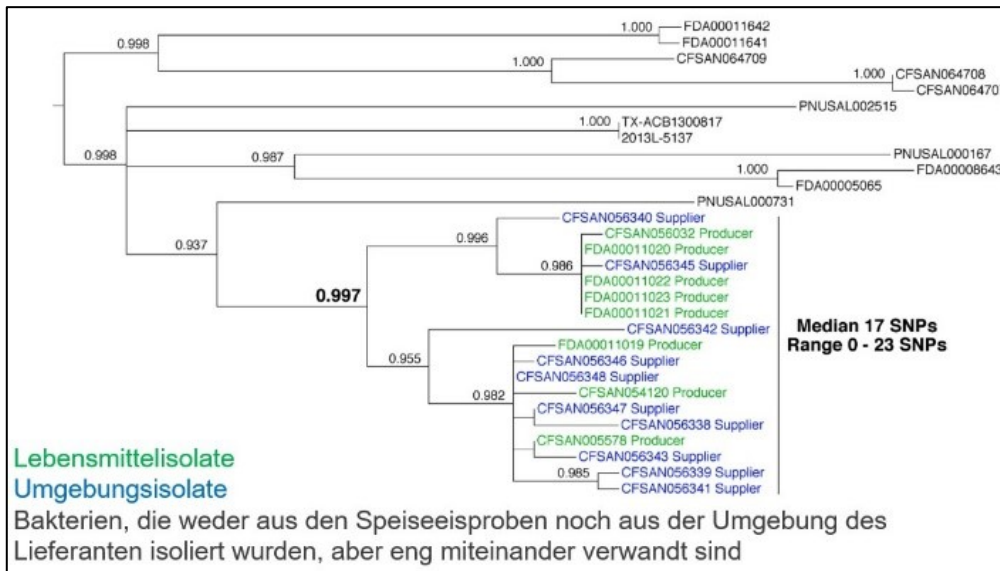


Abb. 18: Beispiel einer falsch-positiven Quellenidentifikation bei *L. monocytogenes*-Isolaten aus einer Eiscremeprobe und Umweltproben eines Zulieferers (Pightling, 2018)

onsstudien. Sie könnten helfen phänotypische Unterschiede zwischen Stämmen zu identifizieren (z.B. bezüglich Persistenz, Antibiotikaresistenz, Virulenz oder Stresstoleranz). Diese Informationen könnten zu einer verbesserten Gefahrenidentifikation, zu Anpassungen beim Management von Lebensmittelsicherheitsrisiken, zu Verbesserungen in der Predictive Food Microbiology und zu Verbesserungen beim Risk Assessment führen (gezielter auf risikoreiche Subpopulationen pathogener Organismen ausgerichtet).

Bei der Zuordnung zu Ausbruchquellen lässt sich feststellen, dass die höchste Exposition von fast 52 % die am wenigsten virulenten Stämme betrifft, während es in weniger als 10 % der Fälle zum Kontakt mit den sehr virulenten Stämmen kommt. Die virulenten Stämme sind unterschiedlich auf die verschiedenen Lebensmittel verteilt (Abbildung 19).

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass WGS:

- den "one in all" Ansatz ermöglicht,
- ein hohes Diskriminierungspotenzial besitzt, was ein Mehrwert bei Ausbruchsuntersuchungen darstellt,
- vielversprechende neue Applikationen ermöglicht,

- noch Lücken in der Harmonisierung der Qualitätskriterien und bei der Standardisierung aufweist,
- noch zu klärende Fragen beim Verfügbarmachen der Daten zeigt,
- bei der European Food Safety Authority EFSA anerkannt ist und genutzt wird.

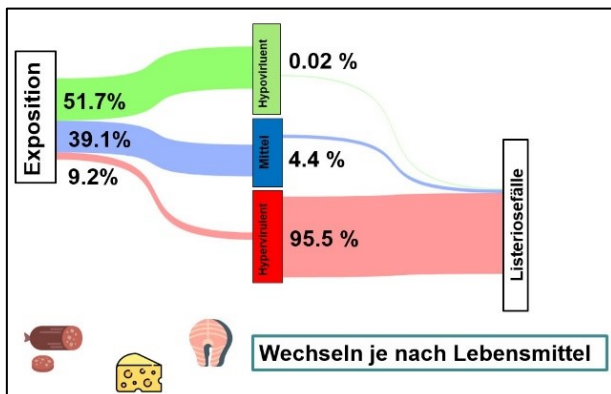


Abb. 19: Expositionsrate und Virulenz bei Listeriosefällen, verändert sich je nach Lebensmittel

Das WGS bietet somit vielversprechende Möglichkeiten ist aber für sich alleine ohne biologischen Kontext und denjenigen der öffentlichen Gesundheit, von beschränktem Nutzen.

5. Potenzial von MALDI-TOF

Über das „**Potenzial von MALDI-TOF**“ berichtete **Alicia Romanò (Agroscope)** in ihrer Präsentation. MALDI-TOF steht für Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time Of Flight (deutsch Matrix-unterstützte Laser-Desorption/Ionisation) und ist ein Verfahren zur Ionisation von Molekülen und deren massenspektrometrischer Untersuchung. Die Technik ist nicht neu und erste Daten zu Bakterienuntersuchungen wurden schon vor einigen Jahren präsentiert. Die Weiterentwicklungen haben die Technik aber nun zu einem wertvollen Werkzeug werden lassen, was sich z.B. auch an der Anzahl Veröffentlichungen erkennen lässt. So sind aktuell etwas mehr als 100 Publikationen mit den Stichworten «MALDI-TOF» und «öffentliche Gesundheit» vorhanden.

Bei der Untersuchung von Proben wird eine kleine Menge einer reinen Kolonie auf das Target aufgetragen, mit einer speziellen Matrix versetzt, getrocknet und mit dem Laser punktgenau erhitzt und verdampft. Dabei ist unbedingt auf die Probenmenge zu achten (*Bastin, 2018*). Der MALDI-Prozess transformiert das Protein und die Peptide von isolierten Mikroorganismen in positiv geladene Ionen. Dies wird durch einen UV-Laser erreicht. Die Matrix absorbiert die Laserenergie und überträgt Protonen auf die intakten Proteine in der Gasphase. Die Ionen werden dann elektronisch beschleunigt und erreichen das Flugrohr mit einer massenabhängigen Geschwindigkeit. Da die verschiedenen Proteine und Peptide unterschiedliche Massen haben, gelangen die Ionen zu unterschiedlichen Zeiten zum Detektor (= Flugzeit, Time-of-Flight TOF). Das Gerät misst die Zeit zwischen der gepulsten Beschleunigung und dem entsprechenden Detektorsignal der Ionen, dann wird die

Zeit in genaue Molekularmassen umgewandelt. Die charakteristischen Spektren (proteomischer Fingerprint) werden mit Referenzspektren verglichen (*Abbildung 20 und 21*).

Die Vorteile der Methode sind:

- rasche Resultate,
- tiefe laufende Kosten,
- gute Wiederholbarkeit,
- robuste und zuverlässige Resultate,



Abb. 20: Vorgehen bei der MALDI-TOF-Analyse

kritisch sind:

- die Probenmenge,
- die Anfangskosten,
- die regelmäßige Erweiterung der Referenzspektrenbibliothek.

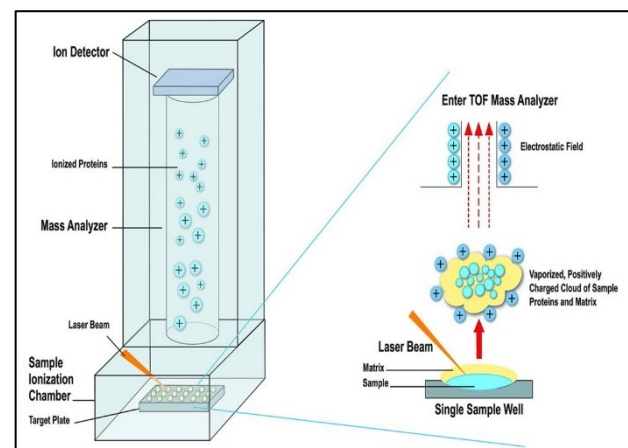


Abb. 21: Funktionsweise bei der Untersuchung von infektiösen Krankheiten mit MALDI-TOF (*Patel, 2015*)

MALDI-TOF Massenspektrometrie wird bei Agroscope zur Identifizierung von Milchsäurebakterien und Hefen, sowie für Versuche zur Unterscheidung von Stämmen in Starterkulturen, z.B. *Streptococcus thermophilus*.

Alicia Romanò verwendet die Methode ebenfalls im Rahmen ihrer Dissertation. Ziel der Forschung ist es, zu untersuchen, ob es einen Zusammenhang zwischen dem in der Milchdrüse gefundenen Resistom und den durch Umweltpollen isolierten Bakterien gibt. Das intramammäre Resistom wird in Bezug zur Umgebung gesetzt (Einstreu, Zitzengummi, Zitzenoberfläche), siehe auch *Abbildung 22*.

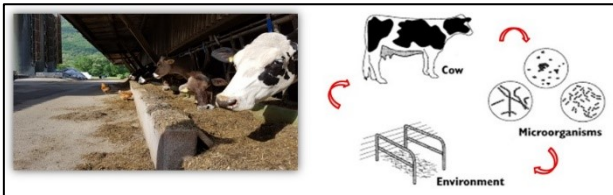


Abb. 22: Bezug zwischen den intramammären Resistom und seiner Umgebung (Einstreu, Zitzengummi, Zitzenoberfläche)

Für die mehr als 1600 anfallenden Proben ist die Verwendung von MALDI-TOF die einfachste und schnellste Lösung zur Identifizierung der in den Proben enthaltenen Spezies. Die Proben werden auf Blut- oder Selektivagar angezüchtet und die Reinkulturen mit MALDI-TOF identifiziert. Bislang konnten aus 1200 Proben 1484 verschiedene Stämme die zu 102 verschiedenen Spezies gehören bestimmt werden, 64 % davon waren *Staphylococcus* Subspezies.

In der Literatur finden sich weitere Beispiele für den erfolgreichen Einsatz von MALDI-TOF:

- Wasseranalysen von Umweltproben zur Bestätigung von *Legionella*-Befunden,
- pharmazeutische Mikrobiologie,
- taxonomische Forschung,
- Lebensmittelmikrobiologie (Bestätigungsanalyse bei positiven Befunden von Bakterien, *Cronobacter*, *Salmonella* spp.)
- Veterinärbakteriologie (Mastitiserreger, ungewöhnliche Spezies),
- Subtypisierungen bei antibiotikaresistenten Keimen wie KPC produzierende *Enterobacteriaceae* oder MRSA bei *Staph. aureus*.

Literaturverzeichnis

- Albrecht-Seidel M., Carrasco R., Laithier C., Sienkiewicz M., Thomas P., Blanchard F., Jurs K., Murphy J., Nepomuceno A., Van de Voort I., Cordier B., Espinosa S., Jimenez M.J., Keen G., Lesty M., Neaves P., Stecher B., Stradiotto K., Tallone G., Valeriano A., Vasara E., Siren R. 2016. European Guide for Good Hygiene Practices in the production of artisanal cheese and dairy products - Target: Farmhouse and Artisan producers. Revised version of 20th December 2016, 98 pp
- Anonymous. 2008. QM-FROMARTE, Bern
- Bachmann H.P., Spahr U. 1995. The Fate of Potentially Pathogenic Bacteria in Swiss Hard and Semihard Cheeses Made from Raw Milk. *J. Dairy Sci.*, 78, 476-483
- Bastin B., Bird P., Benzinger Jr M.J., Crowley E., Agin J., Goins D., Sohler D., Timke M., Shi G., Kostrzewa M. 2018. Confirmation and Identification of *Salmonella* spp., *Cronobacter* spp., and Other Gram-Negative Organisms by the Bruker MALDI Biotyper Method: Collaborative Study, First Action 2017.09. *Journal AOAC Int.*, 101, 5, 1593-1609
- Becker H., Berger T., Eliskases-Lechner F., Jakob E., Knödseder M., Märtlbauer E., Westermair T., Zangerl P. 2017. InterLab Leitfaden: Listerien in Milchprodukten. FOOD-Lab, 1, 34-38
- Bille J., Glauser M.-P. 1988. Zur Listeriose-Situation in der Schweiz. *Bulletin des Bundesamtes für Gesundheitswesen*, 3, 28-29
- Bille J. 1989. Anatomy of a Foodborne Listeriosis Outbreak. In: *Foodborne Listeriosis, Proceedings of a Symposium on September 7, 1988 in Wiesbaden, FRG*, Behr's Verlag, Hamburg and Technomic Publishing Company, Lancaster, PA, 39 - 46
- Büla C.J., Bille J., Glauser M.P. 1995. An Epidemic of Food-Borne Listeriosis in Western Switzerland: Description of 57 Cases Involving Adults. *Clin. Infect. Dis.*, 20, 66-72
- Bundesamtes für Gesundheitswesen. 1986. Salmonellenepidemie bedingt durch Weichkäse. *Bulletin des Bundesamtes für Gesundheitswesen*, 8, 48 - 49
- Bundesamt für Lebensmittelsicherheit und Veterinärwesen. 2017. *Listeria monocytogenes* und der Konsum von Milch und Milchprodukten während der Schwangerschaft – Empfehlungen und Hintergrundinformationen. Bundesamt für Lebensmittelsicherheit und Veterinärwesen BLV, 3. Fassung, Juli 2017, 7 pp
- HyV. 2018. Verordnung des EDI über die Hygiene beim Umgang mit Lebensmitteln (Hygieneverordnung EDI, HyV), 817.024.1, vom 16. Dezember 2016 (Stand am 30. Oktober 2018)
- Imhof R. 2014. Prävalenz von pathogenen Keimen in Rohmilch und im Teig von Rohmilchkäsen. Präsentation: Beratertagung, 08. Dezember 2014
- Imhof R., Riva Scettrini R. 2015. Einfache Dampfzelle für die Hitzebehandlung von Käsebrettern. *Agroscope Technik*, April 2015, 8pp
- Imhof R., Schwendimann L., Riva Scettrini P. 2017. Sanitising wooden boards used for cheese maturation by means of a steam-mediated heating process. *J. Consum. Prot. Food Saf.*, 12, 255–263
- InterLab. 2018. InterLab Leitfaden zu Listerien in Milchprodukten. Version 1, 16pp, Juni 2018
- International Dairy Federation. 2016. Use of wood in cheese ripening. IDF Factsheet, November 2016, 2 pp
- Jackson B.R., Tarr C., Strain E., Jackson K.A., Conrad A., Carleton H., Katz L.S., Stroika S., Gould L.H., Mody R.K., Silk B.J., Beal J., Chen Y., Timme R., Doyle M., Fields A., Wise M., Tillman G., Defibaugh-Chavez S., Kucerova Z., Sabol A., Roache K., Trees E., Simmons M., Wasilenko J., Kubota K., Pousee H., Klimke W., Besser J., Brown E., Allard M., Gerner-Smidt P. 2016. Implementation of Nationwide Real-time Whole-genome Sequencing to Enhance Listeriosis Outbreak Detection and Investigation. *Clin. Infect. Diseases.*, 63, 3, 380–386
- Jakob E. Menéndez González S. 2015. Leitlinie für die gute Verfahrenspraxis bei der Milchgewinnung und -verarbeitung in Sömmerungsbetrieben. Schweizerischer Alpwirtschaftlicher Verband SAV und Schweizer Alpkäse c/o Schweizer Milchproduzenten SMP, Bern
- Kuousta M. et al. 2010. *European Dairy Magazine*, No. 2
- Lutz A. 2010. Auswertung der Nationalen Untersuchungsprogramme in der EU, Community Summary Report 2008 der EFSA, Bundesamt für Lebensmittelsicherheit und Veterinärwesen BLV
- LGV. 2019. Lebensmittel- und Gebrauchsgegenständeverordnung (LGV), 817.02, vom 16. Dezember 2016 (Stand am 15. Oktober 2019)
- Patel R. 2015. MALDI-TOF MS for the Diagnosis of Infectious Diseases. *Clin. Chem.*, 61, 1, 100–111
- Pightling A.W., Pettengill J.B., Luo Y., Baugher J.D., Rand H., Strain E. 2018. Interpreting Whole-Genome Sequence Analyses of Foodborne Bacteria for Regulatory Applications and Outbreak Investigations. *Front. Microbiol.*, 9, 482, 13pp
- Sörqvist S. 2003. Heat resistance in liquids of *Enterococcus* spp., *Listeria* spp., *Escherichia coli*, *Yersinia enterocolitica*, *Salmonella* spp. and *Campylobacter* spp. *Acta Vet. Scand.* 44, 1–2, 1–19
- Verordnung (EG) Nr. 852/2004 DES EUROPÄISCHEN PARLAMENTS UND DES RATES vom 29. April 2004 über Lebensmittelhygiene (ABl. L 139 vom 30.4.2004, S. 1), konsolidierte Fassung vom 20.04.2009