

# Listeria monocytogenes in einem Räucherfischbetrieb MALDI-TOF-MS als neues „Source-Tracking-Tool“

E. Müller-Hohe, B. Scherer, S. Schill, C. Wind



## Einleitung

*Listeria monocytogenes* spielt als Zoonoseerreger in der amtlichen Lebensmitteluntersuchung eine wichtige Rolle. Schnelle Nachweismethoden und zuverlässige Identifizierungstechniken sind dabei unerlässlich. Zur Feintypisierung und zur Aufklärung epidemiologischer Infektketten (Source-Tracking) ist die Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE) derzeit als Methode der Wahl anerkannt. Auch whole genome sequencing (WGS) wird immer häufiger eingesetzt. Aufgrund der Komplexität und des hohen Aufwands finden diese Methoden jedoch nur in wenigen Laboren Anwendung.

Die MALDI-TOF Massenspektrometrie hat als moderne Analysetechnik in der mikrobiologischen Untersuchung in den letzten Jahren eine weite Verbreitung erfahren. Eine Identifizierung von Mikroorganismenisolaten ist mit dieser Technik innerhalb kürzester Zeit möglich. Am CVUA Freiburg wird über die Identifizierung hinaus der Einsatz der MALDI-TOF-MS als „Source-Tracking-Tool“ im Routinelabor getestet.

## Material und Methoden

Im Rahmen der Untersuchung von Planproben wurden am CVUA Freiburg im Jahr 2014 in einem Betrieb, der Salmoniden züchtet und Räucherfische herstellt, *Listeria monocytogenes* in einem geräucherten Forellenfilet in Keimgehalten  $>1,0E2$  KbE/g nachgewiesen. In weiteren Räucherfischproben des Betriebes waren *Listeria monocytogenes* in der Anreicherung positiv. Aus diesen Proben wurden Isolate zur näheren Charakterisierung mittels PFGE an das nationale Referenzlabor für *Listeria monocytogenes* am Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR) geschickt. Dabei wurde festgestellt, dass die innerhalb des Betriebes isolierten *Listeria monocytogenes*-Stämme zwei unterschiedlichen PFGE-Typen zugeordnet werden konnten. In der Folge wurden regelmäßig weitere Proben aus diesem Betrieb amtlich überprüft. Zwei Jahre später, im Jahr 2016, waren in einer Forelle sowie in Umgebungsproben des Betriebes erneut *Listeria monocytogenes* in der Anreicherung nachweisbar.

Um zu überprüfen, ob es sich bei den *Listeria monocytogenes*-Isolaten aus 2016 um die gleichen Stämme handelte wie 2014, ob es sich also eine persistierende Kontamination handeln konnte, oder ob eine neue Kontamination mit anderen Stämmen vorlag, wurden zwei Isolate aus 2014 (ein Isolat je PFGE-Typ) und sechs Isolate aus 2016 mittels MALDI-TOF-MS-Subtyping untersucht. Die *Listeria monocytogenes*-Isolate wurden im MALDI-TOF-Massenspektrometer (MALDI microflex LT/SH System, Bruker) gemessen, die erhaltenen Spektren verglichen und auf kleinste Unterschiede hin analysiert. Übereinstimmende Spektren oder Peakdifferenzen können dabei Hinweise auf gleiche oder verschiedene Stämme liefern. In Abbildung 2 sind Beispiele für diskriminierende Peaks dargestellt, die zur Stamm-Differenzierung herangezogen werden können.

## Ergebnisse und Schlussfolgerungen

Mittels MALDI-TOF-MS-Subtyping konnten die acht untersuchten Isolate in drei Gruppen eingeteilt werden. Die beiden unterschiedlichen Isolate aus 2014 stimmten jeweils mit zwei Isolaten aus 2016 überein (Gruppen I und III). Zwei weitere Isolate aus 2016 zeigten untereinander das gleiche Spektrum (Gruppe II), unterschieden sich jedoch von den Isolaten der beiden anderen Gruppen. Die Isolate wurden am NRL für *Listeria monocytogenes* mittels PFGE untersucht. Übereinstimmend zu den Subtyping-Ergebnissen wurden die acht Isolate drei unterschiedlichen PFGE-Typen zugeordnet. Somit konnte bei den untersuchten *Listeria monocytogenes* Stämmen eine Korrelation zwischen MALDI-Typen und PFGE-Typen festgestellt werden (Tabelle 1).

Tabelle 1: Ergebnisse MALDI-TOF-MS-Subtyping & PFGE\*

<i>Listeria monocytogenes</i>	Jahr	Isolat Idd. Nr.	PFGE Ergebnis*		MALDI- Subtyping Gruppe
			Asc I- Profil	Apa I- Profil	
	2014	1	48	82	I
	2016	2	48	82	
	2016	3	48	82	
	2016	4	21	120	II
	2016	5	21	120	
	2014	6	47	69	III
	2016	7	47	69	
	2016	8	47	69	

\* PFGE-Untersuchungen durchgeführt am NRL *Listeria monocytogenes* am BfR

Bei identischen PFGE-Mustern und MALDI-TOF-MS Spektren liegt die Vermutung nahe, dass es sich um gleiche Stämme handelt. Die Ergebnisse zeigen, dass in dem überprüften Betrieb sowohl in 2014 als auch in 2016 jeweils die zwei gleichen *Listeria monocytogenes* Stämme nachweisbar waren, was auf eine persistierende Kontamination hinweist. 2016 war darüber hinaus ein weiterer Stamm identifizierbar, der 2014 nicht nachgewiesen wurde. Ggf. kann es sich hierbei um eine neue Kontamination handeln.

Durch Einsatz der Subtyping-Technik bietet die MALDI-TOF-Massenspektrometrie die Möglichkeit, *Listeria monocytogenes*-Isolate auf Stammebene zu unterscheiden. Die Ergebnisse sind innerhalb kurzer Zeit inhouse erzielbar. Das MALDI-TOF-MS-Subtyping kann somit als Screening-Verfahren eingesetzt werden, als Grundlage für betriebliches Monitoring, epidemiologische Studien und sog. „Source-Tracking“.

### Danksagung:

Wir bedanken uns herzlich bei Frau Dr. Sylvia Kleitl und ihrem Laborteam vom NRL für die Durchführung der PFGE-Untersuchungen.

### Anschrift der Verfasser:

Chemisches und Veterinäruntersuchungsamt Freiburg, Am Moosweiher 2, 79108 Freiburg, e-mail: poststelle@cvuafr.bwl.de

58. Arbeitstagung des Arbeitsgebietes Lebensmittelhygiene der DVG vom 26. bis 29. 09. 2017 in Garmisch-Partenkirchen

## MALDI-TOF-MS-Subtyping

Für die Subtypisierung von Mikroorganismen mittels MALDI-TOF-MS sind standardisierte Bedingungen erforderlich, damit geringe Peak-Unterschiede in den Massenspektren nicht methodisch bedingt sind, sondern auf tatsächliche Unterschiede zwischen den Mikroorganismen zurückgeführt werden können. Zur Sicherstellung der Reproduzierbarkeit der Peaks sind für jeden Organismus mindestens zwei zeitlich voneinander getrennte Ansätze (Kultivierung, Probenpräparation, Messung) unter Beibehaltung der zuvor festgelegten Bedingungen durchzuführen:



Abbildung 1: Untersuchungsang MALDI-TOF-MS Subtyping

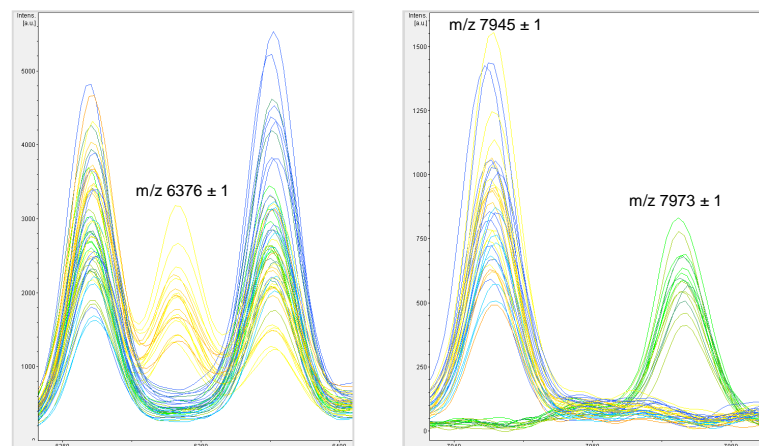


Abbildung 2: Beispiele für diskriminierende Peaks zur Stamm-Differenzierung



Baden-Württemberg