

GOED OF SLECHT NIEUWS VAN OUDE VRIENDEN?

- even bijpraten over voedselpathogenen -

SYMPOSIUM

Wageningen, 17 maart 2011

FiMM Postbus 381 6700 AJ WAGENINGEN

Tel 06 44 834 988 e-mail info@fimm.nl www.fimm.nl

SYMPOSIUM

“GOED OF SLECHT NIEUWS VAN OUDE VRIENDEN?” - even bijpraten over voedselpathogenen -

Donderdag 17 maart 2011, Hof van Wageningen te Wageningen

Programma

09.30-10.00	Ontvangst, koffie, thee
10.00-10.10	Inleiding <i>Dr. Rijkelt Beumer (Wageningen Universiteit)</i>
10.10-10.40	Pathogene sporenvormers: <i>Bacillus</i> belangrijker dan <i>Clostridium</i> ? <i>Dr. Ir. Heidy den Besten (Wageningen Universiteit)</i>
10.40-11.10	Campylobacters: nog steeds een uitdaging? <i>Wilma Hazeleger (Wageningen Universiteit)</i>
11.10-11.40	Koffie, thee
11.40-12.10	<i>Staphylococcus aureus</i> : een goede verklikker voor slechte hygiëne? <i>Dr. Ir. Paul in 't Veld (nieuwe Voedsel en Warenautoriteit, Eindhoven)</i>
12.10-12.40	<i>Cronobacter</i> : een link naar een reservoir? <i>Dr. Ir. Martine Reij (Wageningen Universiteit)</i>
12.40-13.45	Lunch
13.45-14.15	<i>Salmonella</i> : nooit weggeweest! <i>Drs. Kirsten Mooijman (RIVM, Bilthoven)</i>
14.15-14.45	<i>Listeria monocytogenes</i> : wat te doen met kolonies zonder halo op ALOA? <i>Dr. Rijkelt Beumer (Wageningen Universiteit)</i>
14.45-15.15	<i>Escherichia coli</i> in al zijn/haar facetten <i>Dr. Ir. Annet Heuvelink (nieuwe Voedsel en Warenautoriteit, Zutphen)</i>
15.15-15.30	Afsluiting <i>Dr. Rijkelt Beumer (Wageningen Universiteit)</i>
15.30	Koffie, thee, borrel

Voor elke pathogeen wordt een (kort) overzicht gegeven met de belangrijkste kenmerken, een beetje historie, een leuke uitbraak, en de huidige stand van zaken. Voor dit laatste onderdeel kan je denken aan trends: nemen uitbraken en sterftecijfers toe (of af), is er een toename van ziektegevallen bij bepaalde risicogroepen. Of is er sprake van resistentie, zijn er nieuwe reservoirs gevonden, of is er een ander belangrijk feit te melden uit geregistreerde gevallen. Ja, en dan eindigt het met een wijze raad: het zou het meest effectief zijn om ...

***Listeria*: een oudje van 85 jaar**

Rijkelt Beumer
Wageningen Universiteit
Laboratorium voor Levensmiddelenmicrobiologie

In 1926 werd voor het eerst de ziekteverwekker beschreven van een ziekte die nu bekend staat als listeriose. Nog niet geïsoleerd uit een mens, maar uit een ziek laboratoriumkonijn. Een jaar later werd deze bacterie ook gevonden in een gerbil in Zuid-Afrika. Ter ere van Lord Lister, en naar de ziekte die de kiem veroorzaakte kreeg het de naam *Listerella hepatolyticus*. Enige tijd later kregen beide soorten, omdat ze identiek waren, dezelfde naam: *Listerella monocytogenes*. In 1940 kreeg dit micro-organisme de huidige naam: *Listeria monocytogenes*. Aanvankelijk rekende men het geslacht tot de familie van de *Corynebacteriaceae*, maar omdat listeria's meer overeenkomsten hebben met melkzuurbacteriën, verhuisde het geslacht naar sectie 14 van Bergeys Manual, regelmatige, niet-sporenvormende Grampositieve staven (1).

Tot voor kort bestond het geslacht uit zes verschillende soorten, waarvan vooral *L. monocytogenes* als pathogeen wordt beschouwd. Af en toe wordt melding gemaakt van humane listeriosis veroorzaakt door *L. ivanovii* (2). Dit aantal is slechts een klein deel (< 1%) van het aantal gevallen dat wordt veroorzaakt door *L. monocytogenes*.

In 2010 zijn twee nieuwe *Listeria* soorten beschreven: *Listeria rocourtiae*, genoemd naar Jocelyne Rocourt, een Frans microbiologe die veel gewerkt heeft aan de taxonomie van het geslacht *Listeria*. De nieuwe soort werd in Oostenrijk geïsoleerd uit gesneden sla (3). De andere soort, *Listeria marthii*, is genoemd naar Elmer Marth, als dank voor al het onderzoek dat hij verrichte aan listeria's. Deze soort werd geïsoleerd uit de bodem, en uit stilstaand en stromend water in het Finger Lakes National Forest in New York (4).

Al vele jaren wordt door diverse onderzoekers gewezen op het feit dat sommige *L. monocytogenes* soorten geen halo's vertonen op chromogene platen, maar wel hemolyse (een virulentiekenmerk) vertonen. Tot op heden zijn er nauwelijks listeriosegevallen beschreven veroorzaakt door dit soort stammen. Ook werden ze niet vaak uit levensmiddelen geïsoleerd. In december 2010 kwam een PhD-studente uit Thailand in ons lab werken. Zij bracht haar eigen, in Thailand uit kip geïsoleerde *L. monocytogenes* stammen mee. Deze werden geïsoleerd op het PALCAM-medium, en na reïnstreken op de traditionele manier bevestigd volgens de oude ISO 11290. Alle reacties, ook hemolyse en de CAMP-reactie, waren positief voor *L. monocytogenes*.

In Wageningen werden de stammen afgestreken op ALOA-platen, en vertoonden na twee dagen bebroeden bij 37°C nog geen halo. Door toeval, de platen werden weer teruggezet in de stoof, bleek dat na vier en vijf dagen bebroeden een kleine halo zichtbaar werd. Nader onderzoek, afsterving op oppervlakken en de reactie op Caco-2 cellen liet zien dat de term wat zwakker is dan 'normale' *L. monocytogenes* stammen.

Binnen de ISO wordt van de normen voor het isoleren en tellen van *Listeria* en *L. monocytogenes* (ISO11290-1 en ISO11290-2) het gedeelte voor bevestiging van geïsoleerde kolonies gewijzigd. Reden hiervoor is dat het toegestaan is een tweede, chromogeen medium, te gebruiken.

Hieronder wordt het voorstel voor de bevestiging beschreven:

Tabel 1 Bevestigingsreacties voor verdachte kolonies van *Listeria monocytogenes* en andere *Listeria* soorten, gegroeid op (niet) chromogene isolatiemedië

	Verdachte <i>L.monocytogenes</i>	Verdachte <i>Listeria</i> soorten
ALOA and een tweede medium, indien chromogeen	Gramkleuring (optioneel) Haemolyse CAMP test (indien nodig) Rhamnose Xylose	Gramkleuring Haemolyse CAMP test (indien nodig) VP test Meer testen als soortindeling gewenst is (mannitol, rhamnose, xylose)
Tweede medium, indien niet chromogeen	Gramkleuring Haemolyse CAMP test (indien nodig) Rhamnose Xylose	Gramkleuring Haemolyse CAMP test (indien nodig) VP test Meer testen als soortindeling gewenst is (mannitol, rhamnose, xylose)

Table 2 Reacties voor de identificatie van *Listeria* soorten

Soorten	Hemolyse	Productie van zuur uit		CAMP test	
		Rhamnose	Xylose	<i>S. aureus</i>	<i>R. equi</i>
<i>L. monocytogenes</i>	+	+	—	+	—
<i>L. innocua</i>	—	V	—	—	—
<i>L. ivanovii</i>	+	—	+	—	+
<i>L. seeligeri</i>	(+)	—	+	(+)	—
<i>L. welshimeri</i>	—	V	+	—	—
<i>L. grayi</i> subsp. <i>grayi</i>	—	—	—	—	—
<i>L. grayi</i> subsp. <i>murrayi</i>	—	V	—	—	—
<i>L. rocourtiae</i>	—	+	+	—	—
<i>L. marthii</i>	—	—	—	—	—
V: variabele reactie; (+): zwakke reactie; +: . 90 % of positieve reacties; —: geen reactie					
NOTE — Er zijn (zeldzame) <i>L. monocytogenes</i> soorten die geen β -haemolyse, noch een positieve CAMP-reactie geven onder de condities zoals die beschreven zijn in ISI11290-1 en -2.					

Referenties

Beumer, RR (1997) *Listeria monocytogenes*: detection and behaviour in food and in the environment. Proefschrift Wageningen Universiteit.

Guillet, C et al. (2010) Human listeriosis caused by *Listeria ivanovii*. Emerging Infectious diseases **16** 136-138.

Leclercq, A et. al. (2010) *Listeria rocourtiae* sp. nov. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology **60** 2210-2214.

Graves, LM et al. (2010) *Listeria marthii* sp. nov., isolated from the natural environment, Finger Lakes National Forest. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology **60** 1280-1288.

Listeria : 85 jaar

Rijkelt Beumer

Leerstoelgroep Levensmiddelenmicrobiologie

Wageningen Universiteit

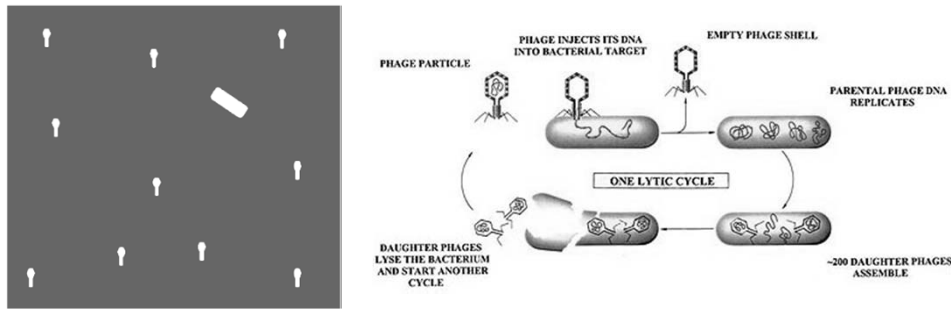
Listeria monocytogenes

In de twintiger jaren van de vorige eeuw werd het 'Tiger River virus', nu *Listeria monocytogenes*, gebruikt om gerbils uit te roeien in een brede strook Zuidafrikaans grondgebied.



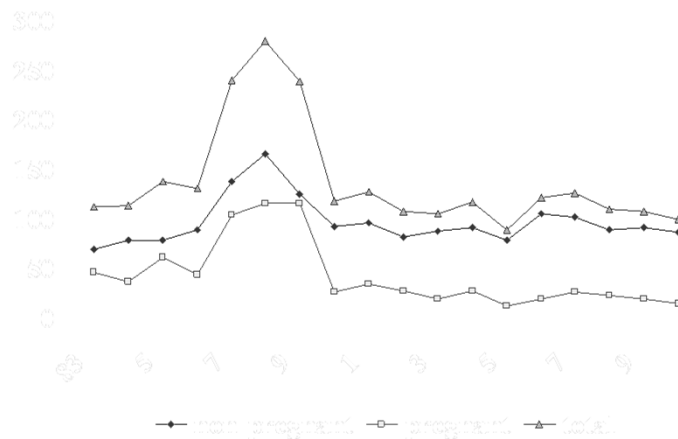
Listeria monocytogenes

Nu wordt geprobeerd *Listeria monocytogenes* te elimineren met behulp van bacteriofagen. Het kan verkeren

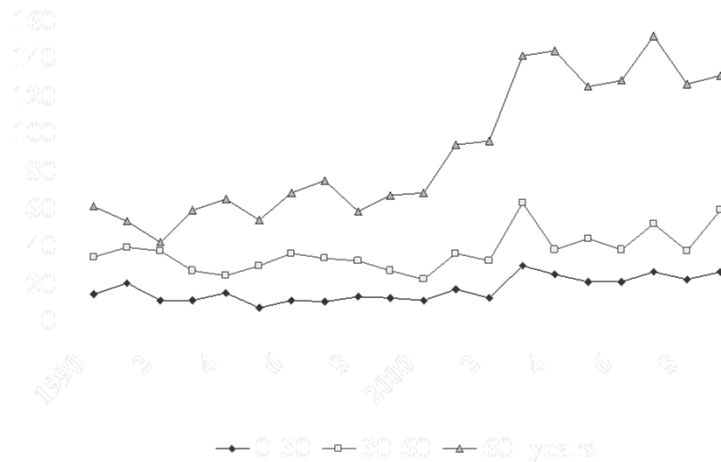


Bacteriophage significantly reduces *Listeria monocytogenes* on raw salmon fillet
 KAMLESH A. SONI AND RAMAKRISHNA NANNAPANENI
 Journal of Food Protection, Vol. 73, No. 1, 2010, Pages 32-38

Listeria monocytogenes



Listeria monocytogenes



Listeria monocytogenes

- * omgeving, apparatuur
- * (gerookte) vis
- * rauwe melk, (rauwmelkse) kaas (met oppervlakteflora)
- * vlees, en vleesproducten
- * kant en klaar maaltijden
- * groenten



Listeria monocytogenes: ziekteverschijnselen

gastro-enteritis (zeldzaam)
incubatietijd 1 dag

bloedvergiftiging
3-70 dagen

hersenvliesontsteking
3-70 dagen

ongeboren/jong geboren
3-70 dagen



20-40%

Listeria monocytogenes: ziekteverschijnselen

dose response relatie
vermoedelijk (erg) hoog voor 'gezonde' personen,
maar lager voor de yopi's

het max aantal cfu's op het moment van consumptie
(100/g) geeft voldoende bescherming

Listeria monocytogenes: criteria

In de wetgeving van veel landen staat:
afwezigheid van *Listeria monocytogenes*, en dat
betekent doorgaans: niet aantoonbaar in 25 g

In een aantal andere landen geldt:
op het moment van consumptie afwezigheid van
L. monocytogenes in 0.01 g (dat betekent <100 cfu/g)

Nu actueel: challenge toetsen

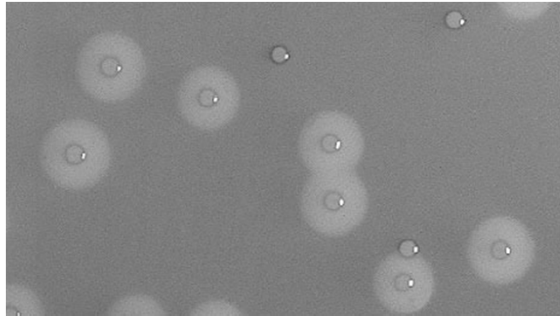
Listeria monocytogenes: aantonen

- * Horizontale methode voor het aantonen/tellen van
Listeria monocytogenes ISO 11290-1/2
- * Voor een aanwezigheid-/afwezigheidstest test:
(tweetraps) ophoping gevolgd door ...
isolatie op selectieve media
- * Voor het tellen (aantonen afwezigheid in 0.01 g):
plaattellingen

Listeria monocytogenes: aantonen

Een substraat voor het aantonen van β -glucosidase, een enzym aanwezig in alle *Listeria* spp, wordt vaak gebruikt voor het aantonen van *Listeria* spp met chromogene media

het onderscheid van *L. monocytogenes* met andere listeria's berust op productie van phospholipase C



Confirmation in 'old' standard

All *Listeria* spp

- Catalase +
- Gram stain + cb
- Motility + (if necessary)

Listeria monocytogenes

- Haemolysis (blood agar) + (or with red blood cells)
- Rhamnose +
- Xylose -
- CAMP test +

Confirmation from 2nd medium if not chromogenic

Presumptive <i>L. monocytogenes</i>		other pres. <i>Listeria</i>
- Gram stain	+	Gram
- Haemolysis	+	Haemolysis
- (BA, or red blood cells)		
- CAMP test, if necessary	+	CAMP, if ...
- Rhamnose	+	VP
- Xylose	-	further test if speciation needed

Confirmation from ALOA and 2nd medium if chromogenic

Presumptive <i>L. monocytogenes</i>		other pres. <i>Listeria</i>
- Gram stain optional	+	Gram
- Haemolysis	+	Haemolysis
- (BA, or red blood cells)		
- CAMP test, if necessary	+	CAMP, if ...
- Rhamnose	+	VP
- Xylose	-	further test if speciation needed

Why these tests ... see Annex 5
Distinction of *Listeria* from other genera

	Gram	Catalase	Mot	VP	37°C
<i>Listeria</i>	+cb	+	+	+	+
<i>Bacillus</i> *	+b	+	V	V	+
<i>Carnobacteria</i> *	+b	+	-	-	+
<i>Staphylococcus</i> *	+c	+	-	V	+

* known to grow on ALOA and other chromogenic media, sometimes with blue or bluish colonies

Why these tests ... see Annex 5
Distinction of *Listeria* from other genera

	Gram	Catalase	Mot	VP	37°C
Streptococci	+c	+	-	V	+
Lactobacilli	+b	-	-	-	+
<i>Brochothrix</i>	+b	+	-	+	-
<i>Kurthia</i>	+b	+	+	-	+
<i>Erysipelothrix</i>	+b	+	-	-	+
<i>Corynebacteria</i>	+b	+	-	-	+

Explanation

growth at 37

Bac, Carnobac, Staph, Strep, Lactob, Kurthia, Erisipelothrix, Coryneb.

catalase

Bac, Staph, (Lactob), Kurthia, Coryneb

Gram

none, maybe doubt

VP (according to tests performed by H. Becker)

Bac, Staph, Strep, Broch

Additional tests with set of 128 *L. mono*

Isolated from	#
food products	89
incl. env. samples	
outbreaks/carriers	22
ref. strains	10
unknown	5
mutant	2

Results with the set of 128 *L. mono* strains

	# pos	# neg
Gram stain	128 cb	
Blood agar haemolysis	120	8
Microtiter plate haemo	128	0
Rhamnose	128	0
Xylose	0	128
Mannitol		

Results with *Listeria* spp isolated from 90 RTE meals at the end of shelf life

<i>Listeria</i> experts (2)	LM	other L	other
ALOA, direct	18	22	0
ALOA, with confirm	0	0	0
<i>Listeria</i> dummies (4)			
ALOA, direct	17/18	20/22	2/7*
ALOA, with confirm	0/1	0/2	0

*tested with: Gram, Haemo (mt), rhamnose, xylose, VP

Results with *Listeria* spp isolated from
40 food products: 1:1 susp. pss, 3 d 7°C

<i>Listeria</i> experts (2)	LM	other L	other
ALOA, direct	10	12	0
ALOA, with confirm	0	0	0

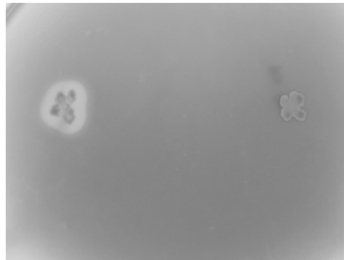
Listeria dummies (4)

ALOA, direct	7/10	7/10	2/5*
ALOA, with confirm	0/1	0/2	0

*tested with: Gram, Haemo (mt), rhamnose, xylose, VP

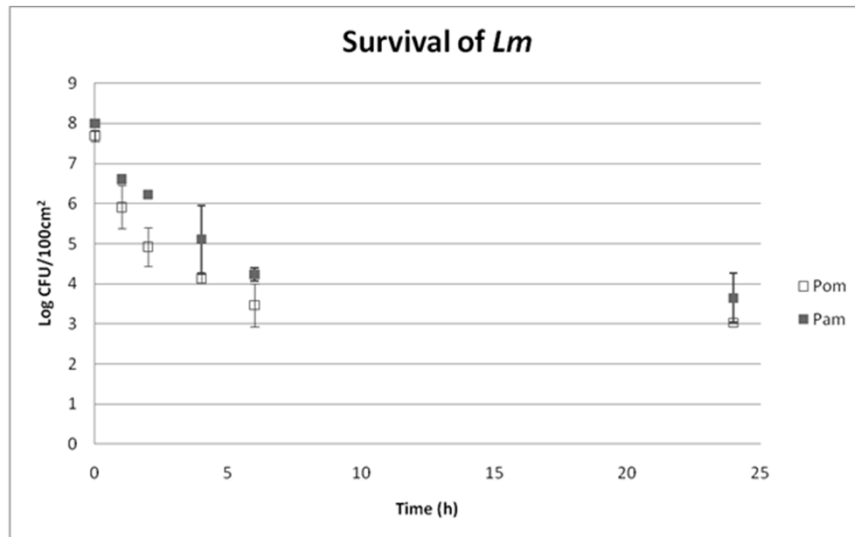
Probleem met *Listeria monocytogenes* ...

- sommige stammen produceren geen halo na twee dagen bebroeden



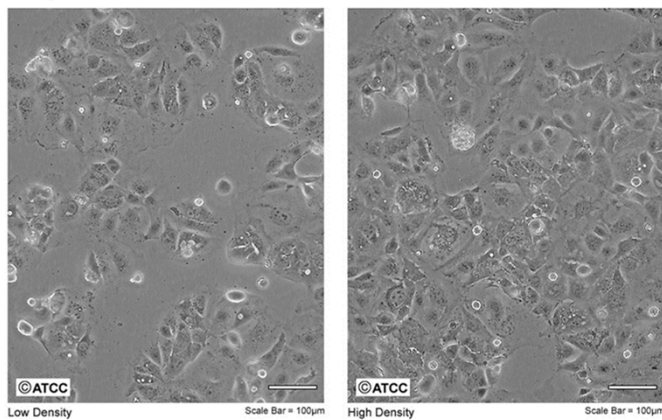
- Maar: zijn wel hemolyse-positief ... ook pathogeen?

Listeria monocytogenes: geen halo,
overleving op roestvrij staal



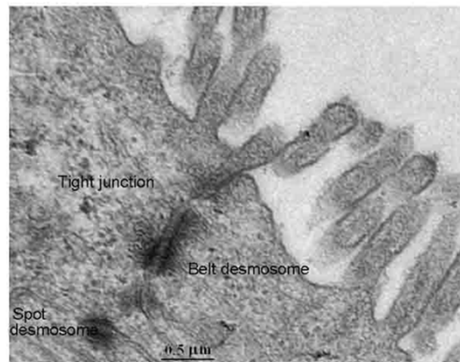
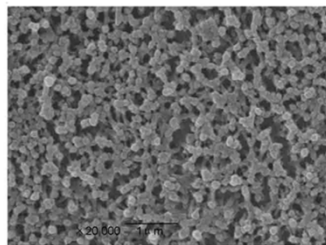
Listeria monocytogenes, geen halo: toetsen
met *Caco-2* cellen op hechting en invasie

ATCC Number: HTB-37
Designation: *Caco-2*



Listeria monocytogenes, geen halo: toetsen met Caco-2 cellen op hechting en invasie

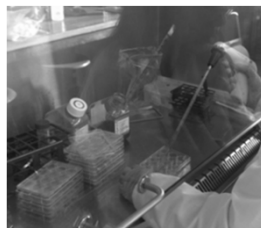
- * na enige tijd bebroeden: differentiatie van cellen
- * toevoegen stammen
- * resultaten (tellen)



Listeria monocytogenes, geen halo: toetsen met Caco-2 cellen op hechting en invasie



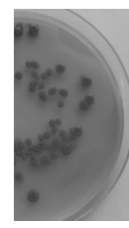
groei Caco-2
cellen, 2week



differentiatie
3 week



Listeria's erbij tellen



Listeria monocytogenes, geen halo: toetsen met Caco-2 cellen op hechting en invasie

No.	strain	Adhesion/ invasion (%)
1	<i>Salmonella</i> Enteriditis PT4	1.97±0.96
2	<i>E.coli</i> K 12	-
3-13	<i>B. subtilis</i> 168, B102, A, B, C, D, 3-24, 10-3, 12-20, 14-83, 18-48	-
14-20	<i>B. cereus</i> F4810/72, 5975c, 5975c kc1, 5975c kc3, KBAB4, pal 18, ATCC14579	-
21	<i>L. monocytogenes</i> H21	2.58±1.13
22	<i>L. monocytogenes</i> F2	1.86±0.78
23	<i>L. monocytogenes</i> FC03A	1.28±0.27
24	<i>L. monocytogenes</i> C4	2.18±1.03
25	<i>L. monocytogenes</i> LSH36	1.99±0.63
26	<i>L. monocytogenes</i> ATCC19118	0.94±0.69
27	<i>L. monocytogenes</i> Li1	0.30±0.27
28	<i>L. monocytogenes</i> Li2	0.11±0.06

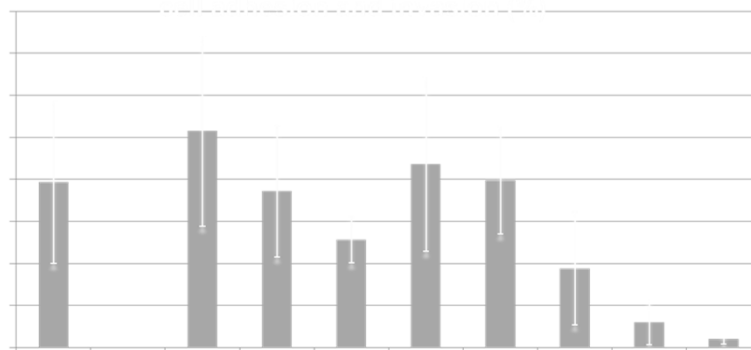
Salmonella + control

E. coli - control

Bacillus geen reactie

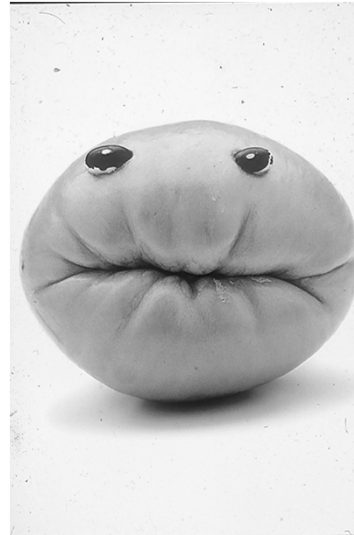
Listeria wel reactie

Listeria monocytogenes, geen halo: toetsen met Caco-2 cellen op hechting en invasie

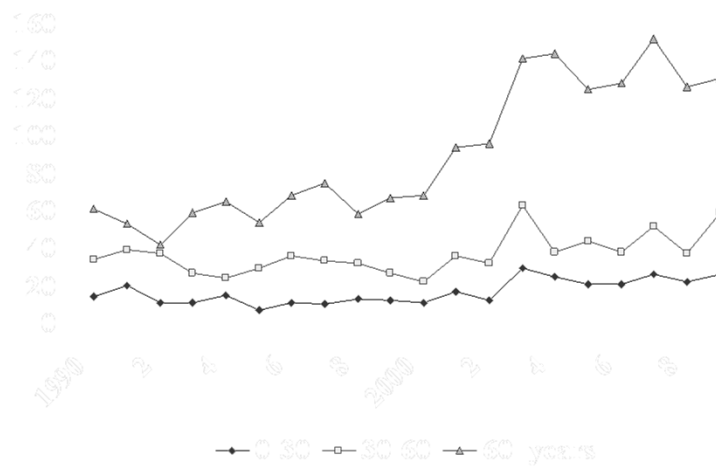


Ja, wat nu

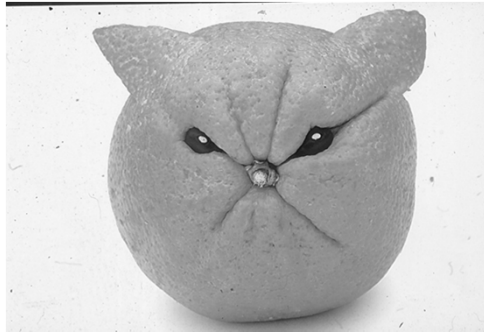
- * langer bebroeden?
- * standaard hemolysereactie doen met kolonies zonder halo?



Listeria monocytogenes



Toch maar even voorzichtig zijn!



Rijkelt