

**Aus dem Institut für Lebensmittelsicherheit und –hygiene, AG Fleischhygiene
des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin**

**Untersuchung zum Eintrag von *Listeria monocytogenes*
in die Lebensmittelkette von Schlachtschweinen**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades
einer Doktorin der Veterinärmedizin
an der
Freien Universität Berlin**

**vorgelegt von
Verena Oswaldi
Tierärztin aus Klagenfurt/Wörthersee**

**Berlin 2023
Journal-Nr.: 4417**

**Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin der
Freien Universität Berlin**

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Uwe Rösler
Erste Gutachterin: Univ.-Prof. Dr. Diana Meemken
Zweiter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Stefan Schwarz
Dritter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Marcus Doherr

Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):

pigs
pig finishing
listeria monocytogenes
listeria innocua
listeria welshimeri
prevalence
animal housing
food hygiene
food safety
food contamination
multilocus sequence typing
abattoirs
carcasses
tonsils
germany

Tag der Promotion: 06.10.2023

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung.....	1
2 Literaturübersicht.....	3
2.1 <i>Listeria</i> spp.....	3
2.1.1 <i>Listeria monocytogenes</i>	3
2.1.2 <i>Listeria innocua</i>	7
2.1.3 <i>Listeria welshimeri</i>	8
2.2 Next Generation Sequencing (NGS)	8
2.2.1 Gesamtgenomsequenzierung (WGS)	8
2.2.2. Multilocus Sequenz Typisierung (MLST).....	8
2.2.3 Erkenntnisse aus der Gesamtgenomanalyse von <i>Listeria</i> spp.	8
2.2.4 Virulenzgene.....	9
2.3 Antimikrobielle Resistenzen (AMR).....	10
2.3.1 Antimikrobielle Resistenzen in <i>Listeria</i> spp.....	11
3 Publikationen.....	13
3.1 Publikation 1.....	13
3.2 Publikation 2.....	21
4 Übergreifende Diskussion	37
5 Schlussfolgerungen.....	40
6 Zusammenfassung.....	41
7 Summary.....	43
8 Literaturverzeichnis.....	45
9 Weitere Publikationen im Rahmen der Promotion.....	59
10 Danksagung	61
11 Finanzierungsquellen.....	62
12 Interessenskonflikte	62
13 Selbstständigkeitserklärung	62

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
AMR	Antimikrobielle Resistenz
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
CC	klonaler Komplextyp
cgMLST	core genome - Multilocus Sequenz Typisierung
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
d.h.	das heißt
DNA	Desoxyribonukleinsäure
<i>E</i>	<i>Enterococcus</i>
ECDC	European Center for Disease Prevention and Control
EFSA	European Food Safety Authority
et al.	et alii; und andere
EU	Europäische Union
G	Guanin
GRAS	generally recognized as safe
<i>L</i>	<i>Listeria</i>
LIPI	Listeria Pathogenitätsinsel
LLO	Listeriolysin O
LLS	Listeriolysin S
MIC/MHK	minimale Hemmkonzentration
MLST	Multilocus Sequenz Typisierung
NGS	Next Generation Sequencing
RTE	ready-to-eat
SNP	Einzelnukleotid-Polymorphismus
spp.	species pluralis
ST	Sequenztyp
WGS	Ganzgenomsequenzierung
z.B.	zum Beispiel

1 Einleitung

Lebensmittelbedingte Zoonosen stellen weltweit eine erhebliche Gefahr für die öffentliche Gesundheit dar. In der EU sind im Jahr 2020 die Campylobacteriose und Salmonellose die häufigsten zoonotischen Erkrankungen beim Menschen. Die Listeriose folgte als fünfhäufigste Zoonose. Davon verursachten Infektionen mit *Listeria (L.) monocytogenes* jedoch die schwerwiegendsten Verläufe mit der höchsten Rate an Hospitalisierungen (EFSA und ECDC 2021). Die Mehrheit der Erkrankungen wird bei Personen über 64 Jahren, im Speziellen bei Personen über 84 Jahren, beobachtet. Die durch den demografischen Wandel steigende Anzahl an älteren Personen in unserer Gesellschaft macht eine Aufklärung der Bevölkerung zu einem korrekten Umgang mit Lebensmitteln in Bezug auf diesen Erreger aktueller denn je.

L. monocytogenes ist somit ein in der Lebensmittelproduktion gefürchteter Erreger, der die lebensmittelherstellende Industrie immer wieder durch Berichte von Krankheitsausbrüchen infolge Lebensmittelkontamination in den Medien erscheinen lässt und enorme wirtschaftliche Schäden für die betroffenen Betriebe, vor allem durch Produktrückrufe, bedeuten kann. Im Jahr 2020 wurden nur 6,4% der Listeriosefälle in der EU im Zuge eines Ausbruches (d.h. Krankheitsfälle werden auf dasselbe Lebensmittel als Quelle zurückgeführt) gemeldet. Insgesamt wurden 16 lebensmittelbedingte Ausbrüche mit 120 Krankheitsfällen berichtet, davon sind sechs auf Fisch- und zwei auf Fleischprodukte zurückzuführen. Drei der Ausbrüche fanden in Deutschland statt (EFSA und ECDC 2021).

In der Verordnung (EG) Nr. 2073/2005 der Kommission sind Lebensmittelsicherheitskriterien auf Ebene der Schlachtung und Verarbeitung festgelegt. Auf Ebene der Primärproduktion gibt es im Gegensatz dazu in dem Umfang keine harmonisierte gesetzliche Überwachung, so dass wenig vergleichbare amtliche Daten über das Vorkommen von *L. monocytogenes* in der Primärproduktion vorliegen. Bei Wiederkäuern, die häufiger an einer klinisch manifesten Listeriose erkranken, gibt es im Vergleich zu anderen Nutztieren mehr klinische Daten. Für Schweine, bei denen Infektionen mit *Listeria* zum größten Teil klinisch inapparent verlaufen, deutlich weniger.

Da Schweinefleischprodukte eine bedeutende Rolle als Quelle von humanen Listerieninfektionen haben und es immer wieder zu Krankheitsfällen bzw. -ausbrüchen durch den Verzehr von Schweinefleischprodukten kommt, ist das Wissen zu Eintragsquellen und die Rolle der Primärproduktion beim Eintrag in die Lebensmittelkette wichtige Voraussetzung, um lebensmittelbedingte Listeriosen zu reduzieren.

Vorhandene Studien zum Vorkommen von Listerien beim Schwein und dessen Bedeutung für humane Erkrankungsfälle kamen in verschiedenen Regionen der Erde zu unterschiedlichen Ergebnissen und Schlussfolgerungen. So finden sich neben zahlreichen Untersuchungen der Belastung verschiedener Lebensmittel außerdem häufig Arbeiten zur Resistenzsituation bei Listerien. Nur selten werden diese jedoch mit dem Vorkommen in der Primärproduktion oder antibiotischen Behandlungen im Schweinesektor verknüpft.

So stellt sich z.B. die Frage, welche Auswirkungen der nachweislich geringere Antibiotikaeinsatz beim Schwein in Deutschland im Zuge der Antibiotikaminimierungsstrategie seit 2011 auf die Prävalenz von Listerien, die vergleichsweise sensibel gegenüber einer großen Auswahl an Antibiotika sind, hat.

Gleichzeitig stellen die Anwendung antimikrobieller Substanzen ein Risiko zur Bildung von Resistenzen in bakteriellen Erregern dar, sodass eine Überwachung der Resistenzsituation sinnvoll ist, um eine erfolgreiche Behandlung humaner Erkrankungsfälle auch in Zukunft gewährleisten zu können.

Ziel dieser Arbeit ist es, mehr über die Rolle des Schlachtschweins im Vergleich zur Umwelt am Eintrag von Listerien in Schlachtbetriebe herauszufinden, um so zu Strategien der Verringerung der Listerienkontamination von Schweinefleisch beitragen zu können. Zudem werden die Eigenschaften in Bezug auf Virulenz und antimikrobieller Resistenz der betreffenden Isolate weiterführend untersucht, da diese Eigenschaften relevant für die Beurteilung der Entstehung und Behandlung einer humanen Listeriose sind und die Überwachung der Resistenzen für die Erhaltung der öffentlichen Gesundheit eine große Rolle spielt.

2 Literaturübersicht

2.1 *Listeria* spp.

Das Genus *Listeria* wird der großen Gruppe der nicht sporenbildenden, Gram-positiven, regelmäßig geformten Stäbchenbakterien zugeordnet, zu denen auch *Lactobacillus*, *Erysipelothrix*, *Brochothrix*, *Renibacterium*, *Kurthia* und *Caryophanon* zählen (Rocourt und Buchrieser 2007).

Das Genus beinhaltet 20 Spezies, die in zwei Gruppen eingeteilt werden, *Listeria sensu stricto* und *Listeria sensu lato*. Erstere besteht aus *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *L. welshimeri*, *L. seeligeri*, *L. ivanovii* und *L. marthii*. Zur Gruppe *Listeria sensu lato* werden die Spezies *L. grayi*, *L. rocourtiae*, *L. fleischmannii*, *L. weihenstephanensis*, *L. floridensis*, *L. aquatica*, *L. cornellensis*, *L. riparia*, *L. grandensis*, *L. booriae*, *L. newyorkensis*, *L. costaricensis*, *L. goaensis* und *L. thailandensis* gezählt (Leclercq et al. 2019).

Davon werden zwei als pathogen eingestuft, *L. monocytogenes* und *L. ivanovii*. Erstere weist als bekannteste Spezies die größte Bedeutung bei menschlichen Erkrankungsfällen auf, zweitens spielt vor allem bei Erkrankungen von Wiederkäuern eine Rolle. Obwohl die restlichen Listerienspezies als apathogen gelten, gibt es Berichte einzelner Erkrankungsfälle durch atypische, hämolytische *L. innocua* (Moura et al. 2019; Perrin et al. 2003) sowie *L. seeligeri* (Rocourt et al. 1986).

2.1.1 *Listeria monocytogenes*

2.1.1.1 Geschichte

L. monocytogenes wurde in den 1920er-Jahren durch E.G.D. Murray im Zuge von Krankheitsausbrüchen in Labortieren in Cambridge entdeckt und von Murray, Webb und Swann erstmals beschrieben. J. Pirie entdeckte das Bakterium unabhängig davon bei ungewöhnlichen Todesfällen bei Gerbils in Südafrika (Rocourt und Buchrieser 2007) und benannte es nach Lord Joseph Lister aus Schottland, dem Erfinder der antiseptischen Chirurgie (Gibbons 1972). Die Bezeichnung *monocytogenes* geht auf die bei dieser Erkrankung typischerweise beobachtete Monozytose bei den Labortieren zurück (Allerberger und Huhulescu 2015).

Der erste dokumentierte humane Krankheitsfall betraf im Jahre 1924 einen an Meningitis leidenden Soldaten am Ende des ersten Weltkrieges (McLauchlin 1997). Mit der Einführung der großflächigen Nutzung von Kühlgeräten, verarbeiteten Lebensmitteln und somit verlängerten Haltbarkeiten von Lebensmitteln seit den 1960er-Jahren nahmen auch durch *L. monocytogenes* verursachte Erkrankungen zu (Lamont et al. 2011). Außerdem führt die veränderte multinationale Produktion und Vermarktung von Lebensmitteln zu einem erhöhten Potential für großflächige und länderübergreifende Krankheitsausbrüche aufgrund kontaminierter und weit verteilter kommerzieller Lebensmittel und deren Produkte (Allerberger 2007).

2.1.1.2 Eigenschaften

Das Gram-positive Bakterium vermehrt sich bei Temperaturen von 0 bis 45°C (Grau und Vanderlinde 1990), bei hohen Salzkonzentrationen bis 10%, bei pH-Werten von 4,4 bis 9,4 (George et al. 1988) sowie bei geringer Nährstoffverfügbarkeit. Aufgrund dieser Widerstandsfähigkeit gegenüber vielen Umweltstressoren ist es nicht nur ubiquitär in der Umwelt verbreitet, sondern auch gut an die Bedingungen in der Lebensmittelherstellung angepasst. Es stellt sich morphologisch als Stäbchen ohne Kapsel dar und ist bei Temperaturen unter 25-30°C durch peritrich angeordnete Flagellen beweglich. Es weist einen niedrigen GC-Gehalt der DNA auf (Rocourt und Buchrieser 2007).

2.1.1.3 Biodiversität

Die Spezies *L. monocytogenes* kann in vier evolutionäre Linien gruppiert werden (Orsi et al. 2011). Durch Serotypisierung, die auf flagellären (H) und somatischen (O) Antigenen basiert, wird *L. monocytogenes* in 17 Serotypen unterteilt (Ramaswamy et al. 2007), von denen die vier Serotypen 1/2a, 1/2b, 1/2c und 4b am häufigsten mit der humanen Listeriose assoziiert werden (Seeliger und Höhne 1979). Die Serotypen 1/2b und 4b gehören der Linie I, 1/2a und 1/2c der Linie II an, während die Linien III und IV nur selten und vorwiegend aus tierischen Quellen isoliert werden (Orsi et al. 2011). Des Weiteren können über 170 klonale Komplextypen (CCs) und über 300 Sublinien unterschieden werden (<http://bigsd.b.pasteur.fr/listeria>), von denen die bedeutendsten weltweit mit hoher Prävalenz auftreten, wobei Unterschiede im Verhältnis von Lebensmittel assoziierten Listerien zu klinisch assoziierten bestehen (Chenal-Francisque et al. 2011).

2.1.1.4 Humane Listeriose

Listeria monocytogenes kann human- als auch tierpathogen sein und ist der bedeutendste Erreger der humanen Listeriose. Diese stellt durch ihre hohe Letalität eine der schwerwiegendsten lebensmittelübertragenen Zoonosen in der EU dar. Im Jahr 2020 wurden 1.876 bestätigte Fälle, 780 Hospitalisierungen und 167 Todesfälle durch Listeriose in der EU gemeldet, das entsprach 0,42 Fälle auf 100.000 Einwohner. Von 1.283 Fällen, deren Ausgang gemeldet wurde, lässt sich eine Fatalitätsrate von 13% errechnen (EFSA und ECDC 2021). Davon entfielen 575 Erkrankungsfälle auf Deutschland, was einer Inzidenz von 0,7 pro 100.000 Einwohnern entspricht, die Fatalitätsrate lag bei 5% (RKI 2021).

Die minimale Infektionsdosis, bei der mindestens 50% der exponierten Individuen erkranken, unterscheidet sich je nach Wirtsanfälligkeit, Listerienstamm und Lebensmittelmatrix. Meist erfordert es eine hohe Bakterienzahl von circa 100.000 Bakterien/g im kontaminierten Lebensmittel. Die genaue minimale Infektionsdosis ist jedoch nicht bekannt (Hoelzer et al. 2012).

Eine Infektion kann sich als nicht-invasive gastrointestinale Form in immunkompetenten Personen oder als invasive Form in sehr jungen, alten, immunsuppressiven und schwangeren Personen mit Symptomen wie Meningoenzephalitis oder Septikämie zeigen. Eine perinatale Infektion des Fötus via Plazenta kann zu Abort, Totgeburt oder Neugeborenenlisteriose führen (Allerberger und Wagner 2010). Das Bakterium verhält sich im Wirtsorganismus fakultativ intrazellulär. Es kann direkt von der Wirtszelle unter Umgehung des extrazellulären Milieus in benachbarte Zellen eindringen und anatomische Barrieren wie die Blut-Hirn-Schranke sowie Plazentarschranke aktiv überwinden (Allerberger und Huhulescu 2015). Die intra- und interzelluläre Verbreitung sorgt für ein Entkommen dieses Erregers vor Immunabwehrmechanismen wie zirkulierenden Antikörpern und Komplementsystem, aber nicht vor der T-Zell-induzierten Immunität (Mielke et al. 1997).

Auch wenn es einzelne Berichte direkter Infektion durch asymptomatische Trägertiere gibt, erfolgt die große Mehrheit der Infektionen durch Verzehr kontaminierter Lebensmittel. Seit den 1950er Jahren wurden kontaminierte Lebensmittel als Ursache vermutet (Seeliger 1955), bis 1981 zum ersten Mal eine Infektion als durch Lebensmittel übertragen nachgewiesen werden konnte (Schlech et al. 1983). Seitdem wurden weltweit sowohl zahlreiche sporadische Fälle als auch Ausbrüche auf den Verzehr verschiedener Lebensmittel wie z.B. Käse (Koch et al. 2010; Currie et al. 2015), Fleischprodukte (Currie et al. 2015) oder gefrorenen Mais (McLauchlin et al. 2021) zurückgeführt. In der EU konnten 2020 neun Ausbrüche auf ein Lebensmittel als Quelle zurückgeführt werden. Hierbei waren Fisch und Fischprodukte für sechs Ausbrüche, Fleisch und Fleischprodukte für zwei und Milchprodukte für einen Ausbruch verantwortlich. Von sechs weiteren Ausbrüchen konnte bei schwacher Beweislage nur für

einen Ausbruch Milchprodukte als Ursache vermutet werden, während die Ursache der restlichen nicht bekannt ist (EFSA und ECDC 2021).

Zur Behandlung der humanen Listeriose werden verschiedene Antibiotika eingesetzt, darunter am häufigsten Ampicillin oder Penicillin allein oder in Kombination mit Gentamicin. Eine Kombination aus Trimethoprim und einem Sulfonamid wird für Patienten mit einer Allergie gegen β -Lactam-Antibiotika angewendet. Vancomycin wird zur Behandlung einer Bakteriämie, Erythromycin bei an Listeriose erkrankten, schwangeren Frauen angewendet. Außerdem werden seltener Rifampicin, Tetracycline, Chloramphenicol und Fluorchinolone eingesetzt (Alonso-Hernando et al. 2012).

2.1.1.5 Vorkommen

L. monocytogenes ist als Saprophyt des Bodens aufgrund seiner hohen Widerstandsfähigkeit gegenüber äußeren Umweltbedingungen weit verbreitet. Durch das Vorhandensein des Bakteriums in Abwässern und Fäzes und die Tatsache, dass es sich in verrottendem Pflanzenmaterial zahlreich vermehrt, wird seine ubiquitäre Präsenz im Boden erklärt (Farber und Peterkin 1991). Sein Genom weist eine hohe Anzahl an Genen, die Transportproteine kodieren, sowie Regulatorgene auf. Dies ist charakteristisch für einen ubiquitären Lebensstil (Vivant et al. 2013). Eine generell hohe Stressresistenz ist für eine Besiedlung des Bodens notwendig. Auch die Fähigkeit zur Biofilmbildung verbessert das Überleben im Boden (Sévellec et al. 2022). Biofilme sind auf einer Oberfläche oder Substrat irreversibel festsitzende Gemeinschaften von Mikroorganismen, die von extrazellulärer polymerer Matrix umgeben sind und veränderte Phänotypen hinsichtlich deren Wachstumsrate und Gentranskription aufweisen (Donlan und Costerton 2002). Durch Biofilmbildung erhöht das Bakterium seine Persistenz gegenüber Umwelteinflüssen und auch gegenüber Desinfektionsmitteln (Lourenço et al. 2011).

Nischen im Boden wie die Rhizosphäre, der unmittelbar von lebenden Wurzeln beeinflusste Bereich, werden erfolgreich von *L. monocytogenes* besiedelt. Eine endophytische Besiedlung ist jedoch nicht bekannt (Klijujev et al. 2018; Kutter et al. 2006). Das Bakterium kommt zudem in Wasser, Staub und Tierfutter vor und kann so Lebensmittel kontaminieren. Vor allem rohe sowie verarbeitete Produkte, die zum Verzehr ohne vorherige Erhitzung vorgesehen sind, bergen ein erhöhtes Risiko für Konsumenten. Von allen getesteten Lebensmitteln in der EU in 2020 wurden mit 4,8% am meisten *L. monocytogenes* positive Proben in ready-to-eat (RTE) Fleisch und Fleischprodukten gefunden, gefolgt von RTE Fisch und Fischprodukten mit 4,2%, RTE Obst und Gemüse mit 2,9% und RTE Milch und RTE Milchprodukten mit 0,44% positiven Proben. Betrachtet man die Kategorie RTE Fleisch und RTE Fleischprodukte genauer, war der Anteil an positiven Proben in Rindfleischprodukten mit 7,4% am höchsten, gefolgt von Schweinefleischprodukten mit 3% und Geflügelfleischprodukten mit 0,65% (EFSA und ECDC 2021).

2.1.1.6 Menschen und Tiere als Carrier

Neben dem Menschen wurde das Bakterium in vielen Tierarten nachgewiesen, von Säugetieren über Vögel bis hin zu Fischen und Krustentieren (Roberts und Wiedmann 2003). Auch z.B. asymptomatische Hunde wurden als Träger festgestellt (Iida et al. 1991), die Rolle von Haustieren in der Verbreitung ist jedoch nicht gut erforscht. Eine Übertragung des Bakteriums von Haustieren wie Hund oder Katze auf den Menschen ist nicht dokumentiert. Nutztiere jedoch sind ein wichtiges Reservoir. Sie tragen zur Zirkulation des Bakteriums in Tierhaltungen und einem Transfer in den Boden durch fäkale Ausscheidung bei (Hurtado et al. 2017). Während Listerien in Wiederkäuern eine neurologische Erkrankung sowie Aborte verursachen können, kommt es in Schweinen nur selten zu einer klinisch manifesten Erkrankung (Stein et al. 2018). Die meisten Infektionen bleiben asymptomatisch. Mehrere

Studien untersuchten verschiedene Organe von gesunden Schweinen auf das Vorkommen von *L. monocytogenes* und stellten dabei unterschiedliche Prävalenzen fest.

So fanden Hellström et al. (2010) in Finnland in Proben von Schweinen in Tonsillen mit 24% positiven Proben die in ihrer Studie höchste Prävalenz, gefolgt von Geschlinge, Darminhalt und Schlachttierkörper. Auch Tierfutter und Fleischprodukte wurden beprobt und es wurden die Prävalenzen von konventionell mit biologisch gehaltenen Schweinen verglichen. Im Tierfutter und in Proben von Schweinen aus biologischer Produktion war sie signifikant höher als in jenen aus konventioneller Produktion, jedoch nicht in den daraus resultierenden Fleischprodukten. Weitere Studien aus Finnland berichten, verglichen mit verschiedenen Organproben, die höchsten Prävalenzen in Proben von Zunge (14%) und Tonsillen (12%) (Autio et al. 2000) bzw. in Tonsillenproben von Mastschweinen mit 22% eine signifikant höhere Prävalenz des Bakteriums als in jenen von Sauen (6%) (Autio et al. 2004).

Esteban et al. (2009) untersuchten Kotproben von 17 Schweinepopulationen im Baskenland auf *L. monocytogenes*, wovon keine Probe positiv war.

In Japan wurde eine Prävalenz von 0,8% im Darminhalt von 5.975 Schlachtschweinen aus verschiedenen Schlachthöfen (Iida et al. 1998) und 0,3% im Darminhalt von 250 Tieren aus einer Herde (Yokoyama et al. 2005) festgestellt.

Sarno et al. (2016) untersuchten Tonsillenproben von 504 gesunden, geschlachteten Schweinen in einem Schweizer Schlachthof und kamen zu einer Prävalenz von 5,6%. Außerdem fanden Wacheck et al. (2010) in 153 erlegten Wildschweinen in der Schweiz eine Prävalenz von 17% in Tonsillenproben und 1% in Kotproben.

Eine ältere Studie aus Jugoslawien berichtet von einem Anteil von 45% an *L. monocytogenes* positiven Tonsillenproben bei insgesamt 103 Schlachtschweinen. Proben vom Darminhalt hingegen brachten bei 3% von 97 Tieren ein positives Ergebnis (Bunčić 1991). Diese tonsillären Carriertiere stammten häufiger von Betrieben mit Silagefütterung als von Betrieben, die mit einer Trockenfütterung arbeiteten.

Von 172 Schlachtschweinen in Dänemark waren 1,7% Träger von *L. monocytogenes* und 2,3% von *L. innocua* in Proben vom Darminhalt (Skovgaard und Nørrung 1989).

In Süddeutschland wurden Tonsillen- sowie Kotproben von 50 Schlachtschweinen untersucht, wobei die Tonsillenproben mit 32% ein deutlich höheres Vorkommen aufwiesen als die Kotproben mit 4% (Fredriksson-Ahomaa et al. 2009).

In Kanada beprobten Farzan et al. (2010) Schweinebetriebe anhand von gepoolten Kotproben. Von 122 Proben fielen 3,3% positiv aus, die von elf Betrieben stammten. Dabei waren drei der positiven Proben von Absetzferkeln und eine von Mastschweinen. Keine Probe von Sauen ergab ein positives Ergebnis.

In der Studie von Kanuganti et al. (2002) wurden 300 Schlachtschweine aus einem Betrieb in den USA anhand verschiedener Probenmatrices auf das Vorhandensein von *L. monocytogenes* untersucht. Die höchsten Prävalenzen wurden je nach Anzuchtmethode mit 3,2% bzw. 7,1% in Tonsillenproben, gefolgt von Abstrichuntersuchungen von Schlachttierkörpern mit 1,5% bzw. 4,1% nach der Schlachtung festgestellt. Tonsillenproben von Tieren desselben Stalles vor der Schlachtung ergaben 0% bzw. 0,3% positive Ergebnisse. Proben von Darminhalt ergaben kein positives Ergebnis.

In Frankreich wurden Mastschweine vor dem Transport in den Schlachthof auf 93 Betrieben mittels Kottupfern getestet, wovon in 14% der Betriebe positive Proben nachgewiesen wurden (Beloil et al. 2003b). Boscher et al. (2012) verglichen Prävalenzen bei Sauen mit jenen bei Mastschweinen in denselben Betrieben anhand gepoolter Kotproben und fanden 46% der

Betriebe und 11% der Sauenproben als positiv. Für Mastschweine wurden 25% der Betriebe und 14,5% der Proben positiv auf *L. monocytogenes* getestet.

Adorasio et al. (2003) stellten in Italien 13% von 189 Schweinen als asymptomatische Trägertiere von *L. monocytogenes* fest, dafür wurden Speicheldrüsen, Mesenteriallymphknoten und Tonsillen untersucht. Auf Sardinien fanden Meloni et al. (2013) in Schlachthöfen eine *L. monocytogenes*-Prävalenz von 7% im Darminhalt der Schlachtschweine und von 33% in Schlachttierkörpern.

Eine Studie in Trinidad kam zu Ergebnissen von 5% *L. monocytogenes*-positiven Rektaltupfern und 1,9% positiven Schweineschlachtkörpern (Adesiyun und Krishnan 1995).

2.1.1.7 Risikofaktoren für das Vorkommen von Listerien bei Schweinen

Gute landwirtschaftliche Praxis kann das Vorkommen des Erregers auf Betrieben und somit den Mastschweinen verringern (Hellström et al. 2010). Vor allem Faktoren wie große Gruppengrößen und Kontakt mit Haustieren und Schädlingen, aber auch organische Produktion, mangelnde Hygienebedingungen und Betriebsmanagement wurden mit einer erhöhten Prävalenz von *L. monocytogenes* auf Schweinebetrieben assoziiert. Zu diesem Betriebsmanagement zählen Gülle-Management, grob gemahlene Futtermittel, Zugang zu einem Außenbereich und Verwendung des Trog als Tränke (Hellström et al. 2010).

Die Fütterung gilt als hauptsächliche Infektionsquelle für Listerien bei Tieren. So wurde Nassfütterung während der Mast für Schweine als Risikofaktor festgestellt (Beloil et al. 2003b; Skovgaard und Nørrung 1989). Beloil et al. (2003a) fanden höhere Listerienachweisraten in Proben von Nassfutter als von trockenem Futter. Diese wurde auf eine Kontamination durch die Leitungen für Nassfutter zurückgeführt. Eine andere Erklärung dafür ist eine veränderte mikrobiologische Flora im Verdauungstrakt der Schweine durch Nassfütterung, die ein Listerienwachstum fördert (Fosse et al. 2009). Silagefütterung ist mit einer erhöhten Listerienprävalenz in Tieren assoziiert (Bunčić 1991), da sie hohe Bakterienzahlen enthalten kann (Gray und Killinger 1966; Gray 1960). Vor allem bei Wiederkäuern spielt dies eine wichtige Rolle, während Silagefütterung bei Schweinen seltener vorkommt. Husu (1990) stellte bei Rindern mittels Kotproben eine niedrigere Zahl an Carriertieren in der reinen Weidesaison als in der Saison mit hauptsächlicher Silagefütterung fest.

Neben der Fütterung spielen Hygienebedingungen auf dem Betrieb eine Rolle. So wiesen Betriebe mit wenig bis keiner Reinigung generell und höchstens einmal wöchentlichen Stiefel-Desinfektion der MitarbeiterInnen im Speziellen eine höhere Infektionsrate der Schweine auf. Ebenso verhält es sich mit dem Fehlen eines Umkleieraumes vor dem Stalleingang (Beloil et al. 2003b). Dieselbe Studie identifizierte ein zu kurzes Leerstehen der Absatzferkelbuchten von nur einem Tag oder weniger vor Neueinstellung als Risikofaktor. Innerhalb der Betriebe, die mit Nassfutter fütterten, wurde außerdem eine Desinfektion der Futterleitungen mit einem höheren Risiko einer Listerieninfektion assoziiert als keine Reinigung der Leitungen oder eine nur mit Wasser. Als Erklärung wurden die beiden Hypothesen aufgestellt, dass Futterrestschichten und Biofilme Listerien enthalten können (Skovgaard 1990) und durch Reinigungs- und Desinfektionsmaßnahmen vermehrt abgespült und diese dadurch verteilt werden oder aber, dass andere Bakterien in Biofilmen, die durch Desinfektion zerstört werden, in der Lage sind, das Wachstum von Listerien zu hemmen (Royer et al. 2004).

2.1.2 *Listeria innocua*

Listeria innocua ist normalerweise apathogen für Mensch und Tier, nur sehr vereinzelt gibt es Fallberichte von menschlichen Erkrankungen, die durch pathogene *L. innocua*-Isolate verursacht wurden (Favaro et al. 2014; Perrin et al. 2003).

Aufgrund seiner engen genetischen Verwandtschaft zu *L. monocytogenes* wird *L. innocua* in vielen Studien als Modell und Indikator für dessen Präsenz verwendet (Glaser et al. 2001). Eine unterschiedliche Stresstoleranz verschiedener Linien kann jedoch zu abweichenden Überlebensfähigkeiten und somit Ergebnissen führen, daher sollten die als Modell verwendeten *L. innocua*-Isolate sorgfältig ausgewählt werden (Milillo et al. 2012). Milillo et al. (2012) führen weiter aus, dass sich diese nur für Studien im kontrollierten Labor eignen, aber nicht in Lebensmittelbetrieben eingesetzt werden sollen. Sie können bei Testung auf *Listeria* spp. zu positiven Probenergebnissen führen, was im Falle von *L. innocua* zu unnötigem Aufwand für Reinigung und Desinfektion führt. Ein Vorteil im Wachstum und die Bildung von inhibitorischen Stoffen fördert eine Verdrängung von *L. monocytogenes* durch *L. innocua* bei der Anzucht in verschiedenen Anreicherungsmedien und kann so zu falsch negativen Ergebnissen bei Proben auf *L. monocytogenes* führen (Cornu et al. 2002; Curiale und Lewus 1994).

2.1.3 *Listeria welshimeri*

L. welshimeri gilt als apathogene Spezies und wird häufig aus der Umgebung und seltener aus tierischen Proben isoliert. Auch der Mensch wurde als fäkaler Träger des Bakteriums festgestellt (Andre und Genicot 1987).

Die Präsenz von *L. welshimeri* in Proben verschiedener Lebensmittelmatrices kann die Isolierung von *L. monocytogenes* verhindern und so zu falsch negativen Ergebnissen führen, da es als dominante Spezies in der Anreicherung wächst (Dailey et al. 2015).

2.2 Next Generation Sequencing (NGS)

Next Generation Sequencing (NGS) als analytisches Tool hat sich als wirkungsvolle Methode zur Ausbruchsanalyse etabliert und ist vorangegangenen Methoden weit überlegen. Denn mit Hilfe des NGS können Isolate, die für ein Krankheitsgeschehen verantwortlich sind, einer Quelle zugeordnet werden und Verwandtschaften zwischen Isolaten festgestellt werden.

2.2.1 Gesamtgenomsequenzierung (WGS)

Die Gesamtgenomsequenzierung (Whole Genome Sequencing, WGS), eine Methode des NGS, ist die Analyse des gesamten bakteriellen Genoms. Sie ermöglicht den Vergleich von DNA-Sequenzen des gesamten Genoms, Base für Base, einen Einblick in die Evolution bakterieller Spezies und bringt zusätzliche Informationen, z.B. Virulenz- und antimikrobielle Resistenzmarker (Lüth et al. 2018).

2.2.2. Multilocus Sequenz Typisierung (MLST)

Die Multilocus Sequenz Typisierung (MLST) stellt die wichtigste Methode zum Vergleich von Isolaten dar und erlaubt dies zwischen Laboren auf globalem Level (Chenal-Francisque et al. 2011). Basierend auf den Nukleotidsequenzen von sieben *housekeeping* Genen (Haushaltsgenen) liefert sie eine übertragbare und standardisierte Terminologie, indem Stämme in Sequenztypen (STs) und klonale Komplextypen (CCs) unterteilt werden. Ein ST ist definiert als die Übereinstimmung von Allelen der sieben Haushaltsgene, ein CC als Cluster von STs, die in mindestens sechs Allelen übereinstimmen (Félix et al. 2018).

Das core-genome (cg) MLST, eine Weiterentwicklung des klassischen MLST, vereint diese Methode mit den umfangreichen Daten, die beim WGS erlangt werden (Salcedo et al. 2003). Basierend auf 1.748 *core loci* schlugen Moura et al. (2016) ein Standardnomenklatursystem dafür vor.

2.2.3 Erkenntnisse aus der Gesamtgenomanalyse von *Listeria* spp.

Die Publikation der gesamten Genomsequenz von *L. monocytogenes* sowie von der eng verwandten Spezies *L. innocua* (Glaser et al. 2001) war ein wichtiger Schritt zum Verständnis ihrer Biologie auf Molekularebene. Eine Untersuchung von Gesamtgenomen mehrerer

Listerienspezies (den Bakker et al. 2010) identifizierte ein Pangenom mit 2.032 Kern- und 2.918 akzessorischen Genen. Auch weisen die Genome eine hohe Syntanie auf, d.h. die Anordnung der Gene blieb zwischen den verschiedenen Spezies stark konserviert. Genverluste gingen mit der Entwicklung der einzelnen Spezies und vermutlich mit dem Wandel hin zu einer saprophytischen Lebensweise einher. Die verschiedenen Spezies entwickelten sich vermutlich vor circa 47 Millionen Jahren aus einem gemeinsamen pathogenen Vorfahren, der die wichtigsten Virulenzgene besaß (den Bakker et al. 2010).

So fehlen im Genom der Spezies *L. innocua* Virulenzgene, die sich auf dem 10-kb Virulenzlokus befinden und für eine Infektion der Wirtszelle nötig sind (Chakraborty et al. 2000; Cossart und Lecuit 1998). Die Analyse des Gesamtgenoms von *L. welshimeri* (Hain et al. 2006) zeigt ebenso eine große genetische Ähnlichkeit mit *L. monocytogenes*, mit Ausnahme des Fehlens von Genen, die für Virulenz und andere Eigenschaften für die Pathogenität von *L. monocytogenes* verantwortlich sind sowie Genen für Kohlenhydrattransport und Kohlenhydratmetabolismus. Insgesamt weist das Genom 482 Gene weniger als jenes von *L. monocytogenes* auf, von welchen 249 Gene auch im Genom von *L. innocua* fehlen, was eine ähnliche Entwicklung dieser beiden Spezies von einem gemeinsamen Vorfahren aus bestärkt (Hain et al. 2006).

Eine enge Verwandtschaft von *Listeria* zu *Bacillus subtilis* und *Staphylococcus aureus* wurde aufgrund der großen genetischen Ähnlichkeit festgestellt und zeugt von einer hohen Stabilität der Genome dieser Gruppe von Bakterien (Glaser et al. 2001).

Gentransfer durch Transformation kann als Ursache der genetischen Unterschiede zwischen *Listeria* und *Bacillus subtilis* wie auch zwischen den Spezies *L. innocua* und *L. monocytogenes* vermutet werden (Glaser et al. 2001).

2.2.3.1. Klonale Komplextypen (CCs)

Es werden hypervirulente und hypovirulente CCs unterschieden, die mit unterschiedlicher Häufigkeit aus Tieren, humanen Erkrankungsfällen und Lebensmitteln isoliert werden, was für eine Anpassung an unterschiedliche ökologische Nischen spricht (Sévellec et al. 2022). Zu den hypervirulenten CCs werden unter anderem CC1, CC2, CC4, CC6 und CC11 gezählt, welche am häufigsten als Ursache humaner Erkrankungsfälle identifiziert werden. Als hypovirulent werden z.B. die Lebensmittel assoziierten klonalen Komplextypen CC9 und CC121 bezeichnet, die nur selten eine Erkrankung in immunkomprimierten Patienten verursachen (Maury et al. 2016). Dazwischen gibt es intermediär eingestufte Komplextypen verschiedener Herkünfte.

2.2.4 Virulenzgene

Virulenzgene spielen eine essenzielle Rolle im Infektionszyklus und geben daher Auskunft über die Pathogenität eines Erregers. Bei Listerien sind diese Gene in getrennten Clustern organisiert. Folgende sogenannte Pathogenitätsinseln wurden identifiziert.

Der Virulenzgen-Cluster Pathogenitätsinsel 1 (LIPI 1) beinhaltet die Gene *prfA*, *plcA*, *hly*, *actA*, und *plcB*, die intrazelluläres Überleben sowie Motilität ermöglichen. Die Gene *hly* und *plcA* vermitteln das Entkommen aus den Endosomen, *actA* durch Aufbau der Aktinfilamente und Geißelbildung die inter- und intrazelluläre Motilität. Durch Kontakt mit der Plasmamembran werden Protrusionen in Form von Pseudopodien ausgebildet, die bei Kontakt in die benachbarte Zelle aufgenommen werden. Die Gene *plcB* und *hly* sind nun für die Auflösung der beiden Plasmamembranen zuständig, sodass das Bakterium in das Zytoplasma entkommen und ein neuer Infektionszyklus beginnen kann (Kuchmina 2008; Chakraborty et al. 2000). Die Fähigkeit zur beta-Hämolyse, die vollständige Hämolyse von Erythrozyten, wird durch ein Hämolysin, genannt Listeriolysin O (LLO), das durch das Gen *hly* kodiert wird, ermöglicht (Geoffroy et al. 1987) und ist nötig für die Virulenz von *L. monocytogenes* (Gaillard

et al. 1986). Auch die pathogene Spezies *L. ivanovii* sowie die hämolytische und apathogene Spezies *L. seeligeri* weisen dieses Gencluster in ihrem Genom auf (Gouin et al. 1994), wobei auch von nicht hämolytischen *L. seeligeri*-Isolaten ohne LIPI 1 berichtet wurde (Volokhov et al. 2006). Den normalerweise apathogenen und nicht hämolytischen *L. innocua* und *L. welshimeri* fehlen LIPI 1 (Gouin et al. 1994). Es wurden aber atypische, hämolytische *L. innocua*-Isolate gefunden, die LIPI 1 (Johnson et al. 2004) sowie das nachfolgend beschriebene Gen *inIA* (Volokhov et al. 2007) in ihrem Genom aufweisen.

Die Gene *inIA* und *inIB* sind für die Anheftung an die Wirtszelle sowie die folgende Internalisierung verantwortlich. Das Gen *inIA* kodiert den entscheidenden Virulenzfaktor Internalin A (Clayton et al. 2011), der an Spezies-spezifischen Rezeptoren an Epithelzellen anheften kann. Während zur Überwindung der intestinalen Barriere nur *inIA* beteiligt ist, ist zusätzlich *inIB* zur Überwindung der plazentären Barriere notwendig (Disson et al. 2021; Disson et al. 2008). Das Gen *inIA* ist in allen *L. monocytogenes*-Isolaten vorhanden, jedoch in der Mehrzahl der hypovirulenten Isolate nur in verkürzter Form, in klinischen Isolaten wird es deutlich häufiger in voller Länge exprimiert (Disson et al. 2021).

Die Pathogenitätsinsel 3 (LIPI 3), auch LLS-Cluster genannt, enthält acht Gene (Vilchis-Rangel et al. 2019) und wurde in einigen Isolaten der Linie I von *L. monocytogenes* nachgewiesen, die für einen Großteil der Krankheitsausbrüche verantwortlich sind. Dies spricht für eine mögliche wichtige Rolle von LIPI 3 bezüglich der Hypervirulenz von Isolaten. Das Gen *lIsA* dieses Clusters kodiert für die Produktion von Listeriolysin S (LLS), ein hämolytischer und zytotoxischer Faktor, der zur Virulenz beiträgt und auch in anderen Pathogenen wie *Staphylococcus aureus* oder *Clostridium botulinum* vorkommt (Cotter et al. 2008). Clayton et al. (2014) identifizierten LIPI 3 oder Überreste davon auch in etlichen *L. innocua*-Isolaten, wobei unklar ist, ob dieser vom gemeinsamen Vorfahren in einem langsamen Prozess verloren ging oder jüngst von *L. monocytogenes* erworben wurde.

Ebenfalls in einer stark klinisch assoziierten Untergruppe der Linie I von *L. monocytogenes* wurde die Pathogenitätsinsel 4 (LIPI 4) charakterisiert, ein aus sechs Genen bestehender Virulenzcluster. LIPI 4 kodiert vermutlich für ein Phosphotransferasesystem, das bei der Infektion der Plazenta und des Zentralnervensystems beteiligt ist, die genauen Mechanismen sind mit heutigem Forschungsstand unbekannt (Maury et al. 2016). Auch *L. innocua* besitzt diesen Gencluster, seine Bedeutung für diese apathogene Spezies ist noch ungeklärt (Disson et al. 2021).

Die Pathogenitätsinsel 2 (LIPI 2) ist ein speziesspezifischer Virulenzcluster, der in *L. ivanovii* vorkommt und ausschlaggebend für dessen Virulenz und Wirtstropismus ist. Die Gene dieses Clusters kodieren für zehn Internalin-Proteine sowie den Virulenzfaktor Sphingomyelinase (SmcL) (Domínguez-Bernal et al. 2006). In einem hypervirulenten *L. monocytogenes*-Isolat aus einem Krankheitsausbruch bei Schafen in China wurde ein Teil von LIPI-2 detektiert und für dessen Hypervirulenz verantwortlich gemacht (Yin et al. 2019).

2.3 Antimikrobielle Resistenzen (AMR)

Antibiotika werden seit der Erfindung von Penicillin im Jahr 1929 für die Behandlung vieler bakterieller Krankheiten eingesetzt und finden als Zusatz im Tierfutter zur Leistungsförderung Verwendung, was in der EU jedoch seit 2006 verboten ist (Castanon 2007; Jones und Ricke 2003). Durch diesen Antibiotikaeinsatz führte ein selektiver Druck über diesen Zeitraum zur Entwicklung von Mikroorganismen, die gegen ein oder mehrere antimikrobielle Substanzen resistent sind und ein Risiko für die öffentliche Gesundheit darstellen (Luque-Sastre et al. 2018). Antimikrobielle Resistenzen können intrinsisch oder erworben sein. Intrinsische Resistenzen kommen als eine Folge von angelegten strukturellen oder funktionellen Eigenschaften eines Bakteriums vor, wie Abwesenheit des Rezeptors für ein Antibiotikum,

geringe Affinität, Impermeabilität der Zellwand oder Enzymproduktion (Irving et al. 2012), erworbene Resistenzen entstehen durch Genmutationen oder horizontalen Gentransfer (Blair et al. 2015). Jene durch spontane Mutationen erworbene nennt man primäre Resistenzen, diese können auch ohne Kontakt zur jeweiligen antibiotischen Substanz entstehen, sind chromosomal kodiert und werden nicht an andere Spezies weitergegeben. Obwohl sie nur selten auftreten, verschaffen sie jenem Bakterium bei Anwesenheit des Antibiotikums einen Selektionsvorteil, sodass es empfindlichen Populationen überlegen ist und sich weiterverbreiten kann (Urban-Chmiel et al. 2022; Acar und Röstel 2001). Sekundär erworbene Resistenzen entstehen beim Kontakt mit der antibiotischen Substanz und ihre Mechanismen sind komplexer. Die verantwortlichen Gene befinden sich extrachromosomal im Zytoplasma in Plasmiden, das sind kleine ringförmige DNA-Moleküle. Ein einzelnes Plasmid kann Resistenzgene für mehrere verschiedene Antibiotika beinhalten und diese von einer Bakterienzelle zur nächsten transferieren, hauptsächlich via Konjugation und Transduktion. Bei der Konjugation werden Plasmide bei direktem Kontakt über Proteinröhren an eine andere Bakterienzelle weitergegeben, bei der Transduktion wird der Transfer durch Bakteriophagen vermittelt (Urban-Chmiel et al. 2022; van Hoek et al. 2011). Unter mobile genetische Elemente, die ihre Position im Genom verändern können, fallen Transposons und Insertionssequenzen. Insertionssequenzen enthalten ein Gen, das für das Enzym Transposase kodiert sowie sich gegenläufig wiederholende Endsequenzen, was ihnen ein beliebiges versetztes Einbauen in die DNA erlaubt. Ein Transposon kann darüber hinaus noch weitere genetische Information, z.B. Resistenzgene, enthalten (Urban-Chmiel et al. 2022).

2.3.1 Antimikrobielle Resistenzen in *Listeria* spp.

Listeria monocytogenes gilt generell als empfindlich gegenüber den meisten zur Behandlung von Gram-positiven Bakterien eingesetzten antimikrobiellen Substanzen, wobei eine Zunahme an Resistenzen beschrieben wird. Erstmals wurde 1988 von einem multiresistenten klinischen *L. monocytogenes*-Isolat in Frankreich berichtet (Poyart-Salmeron et al. 1990). Seitdem wurden etliche weitere resistente Isolate, auch anderer Listerienspezies, nachgewiesen (Olaimat et al. 2018; Conter et al. 2009; Charpentier et al. 1995; Facinelli et al. 1993). Dabei wurde in einigen Studien ein Anstieg der Resistenzen über die Zeit beobachtet, auch gegenüber solchen zur Listeriosebehandlung eingesetzten antibiotischen Substanzen wie Gentamicin (Hailu et al. 2021; Olaimat et al. 2018; Aras und Ardiç 2015; Alonso-Hernando et al. 2012). Resistenzen gegenüber Tetrazyklinen und Fluorchinolonen werden laut Morvan et al. (2010) immer häufiger beobachtet. Dem gegenüber wurde in anderen Publikationen kein Anstieg von AMR-*L. monocytogenes*-Isolaten beobachtet, auch Resistenzen gegenüber Gentamicin nur in Einzelfällen (Baquero et al. 2020; Granier et al. 2011). Ebenso wurden gegenüber Antibiotika erster Wahl zur Listeriosebehandlung, Ampicillin und Penicillin, in vielen Studien keine Resistenzen berichtet (Mota et al. 2020; Yan et al. 2019; Granier et al. 2011), andere wiesen hohe Resistenzraten von bis zu 75% bzw. 80% gegenüber Ampicillin bzw. Penicillin nach (Iwu und Okoh 2020; Sharma et al. 2017; Aras und Ardiç 2015; Jamali et al. 2015; Rahimi et al. 2010). Davis und Jackson (2009) fanden in Nordamerika keine Penicillin-resistenten *L. monocytogenes*-Isolate, jedoch waren alle *L. innocua*- sowie *L. welshimeri*-Isolate in ihrer Studie resistent gegenüber Penicillin. Von 259 *L. monocytogenes*-Isolaten aus Lebensmitteln, Umgebung der Lebensmittelproduktion und Patienten in Deutschland fanden Noll et al. (2018) keine Resistenzen gegenüber Ampicillin, ca. 1% der Isolate resistent gegenüber Penicillin, ca. 5% gegenüber Gentamicin und ca. 23% gegenüber Tetrazykline. Insgesamt wurden in der genannten Studie 56% aller untersuchten Isolate als multiresistent eingestuft, also resistent gegenüber mindestens drei antimikrobiellen Substanzen.

In Listerien kommen wenige intrinsische antimikrobielle Resistenzen vor, darunter gegenüber Fusidinsäure und die meisten modernen Cephalosporine. Des Weiteren unterscheiden sich die verschiedenen Spezies in ihren Resistenzen, so liegt beispielsweise bei *L. monocytogenes*

und *L. innocua* eine intrinsische Resistenz gegenüber Fosfomycin vor, bei *L. innocua*, *L. ivanovii* und *L. seeligeri* gegenüber die Fluorchinolone Enoxacin und Sparfloxacin (Troxler et al. 2000).

Häufiger, wenn auch dennoch seltener als in anderen Genera, kommen erworbene Resistenzen gegenüber antibiotischen Wirkstoffen bei Listerien vor, meist durch mobilisierbare genetische Elemente wie konjugative und mobilisierbare Plasmide und konjugative Transposons erworben (Godreuil et al. 2003; Charpentier et al. 1999; Poyart-Salmeron et al. 1990). Diese Mechanismen sind in *L. monocytogenes* wesentlich mit Resistenzen gegenüber Fluorchinolon-, Makrolid- und Cefotaxim-Antibiotika assoziiert. Durch Plasmide können Resistenzgene an andere *L. monocytogenes*-Isolate, aber auch spezies- und genusübergreifend weitergegeben sowie von ihnen erworben werden, wie beispielsweise das Plasmid pIP501 aus *Streptococcus* (Pérez-Díaz et al. 1982). Über konjugative Transposons können Gene, die für Resistenzmechanismen kodieren, zwischen Listerienspezies sowie zwischen Listerien und anderen Genera ausgetauscht werden. Ein Beispiel hierfür ist das Transposon Tn916 mit einem breiten Wirtsspektrum. Es trägt das Tetrazyklinresistenzgen *tet(M)* und seine Übertragung wurde von *E. faecalis* auf *L. innocua* und weiter auf andere Listerienspezies sowie zurück zu *E. faecalis* nachgewiesen (Celli und Trieu-Cuot 1998; Vicente et al. 1988).

Hanes und Huang (2022) analysierten AMR-Gene von *L. monocytogenes*-Isolaten weltweiten Ursprungs von 2010 bis 2021 und stellten als die häufigsten Resistenzgene *fosX*, *lin* und *abc-f* fest, gefolgt von *tet(M)* und *vanC*, *vanR*, *vanS*, *vanT* und *vanXY-C*. In der Studie wurde keine Zunahme der AMR-Gene über den genannten Zeitraum beobachtet. Mit 99,98% ist *fosX* und mit 97,8% *lin* in fast allen Isolaten vorhanden. Das Gen *fosX* aus dem Kerngenom kodiert für eine Fosfomycinresistenz (Scotti et al. 2018) und das Gen *lin* für eine Resistenz gegenüber Lincomycin. Das AMR-Gen *abc-f* kodiert einen ABC-Transporter, der eine Resistenz gegenüber jenen Antibiotika bewirkt, die an den Ribosomen Gram-positiver Mikroorganismen ansetzen (Sharkey et al. 2016). Für eine Resistenz gegenüber Tetracycline kodiert *tet(M)*. Die AMR-Gene *vanC*, *vanR*, *vanS*, *vanT* und *vanXY-C* bewirken eine Vancomycinresistenz und wurden nur in Isolaten aus Umgebungsproben aus den Jahren 2014 bis 2016 gefunden (Hanes und Huang 2022).

Yan et al. (2019) untersuchten 2.862 *L. monocytogenes* aus Lebensmitteln in China von 2012 bis 2015 und wiesen in 28 Isolaten phänotypische Resistenzen gegenüber ein bis vier Antibiotika nach. Genetische Untersuchungen legten nahe, dass diese von anderen Bakterien durch horizontalen Gentransfer oder Aufnahme in das Chromosom erworben wurden. Am häufigsten wurde eine Resistenz gegen Tetrazykline in 8,7% der Isolate festgestellt, auch gegen Erythromycin (2,2%), Trimethoprim/Sulfamethoxazol (0,98%) und Chloramphenicol (0,8%) kamen Resistenzen vor, in zehn Isolaten gegen alle vier Substanzen, sodass sie als multiresistent eingestuft wurden. Als Reservoir von Tetrazyklinresistenzen könnte *L. innocua* für andere Spezies, inklusive *L. monocytogenes*, fungieren. Facinelli et al. (1993) vermuten, dass ein Transfer von Resistenzgenen zwischen den beiden Spezies im Gastrointestinaltrakt von Haustieren oder in der Lebensmittelumgebung stattfinden kann, da diese Spezies dort zusammentreffen. In den letzten Jahren ist das wissenschaftliche Interesse an der Bedeutung der Umwelt als Ort der Verbreitung von antimikrobiellen Resistenzen zwischen Mikroorganismen gestiegen (Urban-Chmiel et al. 2022), da horizontaler Gentransfer an jedem Ort, an dem sie zusammentreffen, stattfinden kann. Zwischen phylogenetisch eng verwandten Bakterien ist er wahrscheinlicher (Smillie et al. 2011) und wird durch Stressoren wie antimikrobielle Substanzen und Biozide, z.B. quartäre Ammoniumverbindungen wie sie in der Lebensmittelproduktion verwendet werden, induziert (Guérin et al. 2021; Jutkina et al. 2018; Zhang et al. 2017).

3 Publikationen

Die beiden folgenden Publikationen in wissenschaftlich anerkannten Zeitschriften mit Peer-Review-Verfahren liegen dieser kumulativen Dissertation zugrunde.

3.1 Publikation 1

Titel: Slaughter pigs as carrier of *Listeria monocytogenes* in Germany

Autoren: Verena Oswaldi, Janine Dzierzon, Susann Thieme, Roswitha Merle, Diana Meemken

Jahr: 2021

Zeitschrift: Journal of Consumer Protection and Food Safety, 16(2), 109-115

DOI: <https://doi.org/10.1007/s00003-021-01322-4>

Eigener Anteil an der Publikation: Vorbereitung zur Probenahme, Probenahme in den Schlachtbetrieben, Bearbeitung der Proben im Labor, Anzucht und Isolierung der Isolate, Durchführung der Bestätigungsuntersuchungen, statistische Analyse und Erstellung des Manuskriptes



Slaughter pigs as carrier of *Listeria monocytogenes* in Germany

Verena Oswaldi¹ · Janine Dzierzon¹ · Susann Thieme¹ · Roswitha Merle² · Diana Meemken¹

Received: 14 December 2020 / Revised: 4 March 2021 / Accepted: 23 March 2021
© The Author(s) 2021

Abstract

Listeria (L.) monocytogenes as the cause of human listeriosis is widespread in the environment and a hazard considering food safety. Almost all animal species as well as humans can be asymptomatic carriers of this bacterium. In pigs, the tonsils are identified as the organ with the highest detection rate compared to other sample matrices. We sampled 430 pigs in total in two slaughterhouses in Northwest and East Germany, two structurally different and important regions in pig production, to re-examine pigs as a possible source of *Listeria*-contamination of pork products. We detected a low prevalence of *L. monocytogenes* in tonsil samples of 1.6% (7/430) on single animal level and of 11.6% (5/43) on herd level with no significant difference between the two German regions. Apart from *L. monocytogenes*, the usually non-pathogenic *L. innocua* had a prevalence of 1.2% (5/430) on single animal level. From 200 pigs from Northwest Germany, intestinal content samples were analysed in addition to tonsil samples from the same animals, but no positive sample was found for *L. monocytogenes* (0.0%, 0/200), while four pigs were positive for *L. innocua* (2.0%, 4/200). Although the prevalence of *L. monocytogenes* in tonsils is low, the risk of cross-contaminating meat with the pathogen is still given.

Keywords *Listeria monocytogenes* · Abattoir · Pig tonsils · Pig intestinal content · Asymptomatic carrier · Slaughter hygiene

1 Introduction

Listeria (L.) monocytogenes as the most important human pathogenic species of the genus *Listeria* is the causative agent of the rare but severe human listeriosis (Allerberger and Wagner 2010). There are 20 recognized species of the genus *Listeria*, and apart from *L. monocytogenes*, the species *L. ivanovii* is also considered a pathogen (Leclercq et al. 2019). *L. innocua* is considered to be non-pathogenic, although there are rare reports of disease caused by atypical hemolytic *L. innocua* strains (Moura et al. 2019; Perrin et al. 2003).

Human listeriosis can manifest in a non-invasive gastrointestinal form in immunocompetent persons or in an invasive form in young, old, immunocompromised or pregnant

patients with symptoms like meningitis, encephalitis, sepsis, perinatal infections and abortions (Allerberger and Wagner 2010). In 2019, the incidence of human listeriosis in Germany was 0.7 cases per 100,000 people with a case fatality rate of 7% (Robert Koch-Institut 2020). In the European Union, the case fatality rate is even higher (16%) which makes listeriosis one of the most serious foodborne diseases with 14 reported foodborne outbreaks in 2018 (EFSA and ECDC 2019).

L. monocytogenes is frequently found in food products of animal origin such as processed meat, fish and dairy products, but also in vegetable products (Desai et al. 2019). In particular, pork meat was linked to several outbreaks of listeriosis (Duranti et al. 2018; Pichler et al. 2009). Next to raw and unprocessed food products, also processed and heat-treated products that have been contaminated after heating bear a particular risk for causing an infection (Ramaswamy et al. 2007).

The resilient bacterium *L. monocytogenes* is ubiquitous in the environment. It has been isolated from soil, dust, water, feed and sewage and from almost any animal species, including asymptomatic humans (Allerberger 2007). In asymptomatic pigs, it has been found in several matrices

✉ Verena Oswaldi
verena.oswaldi@fu-berlin.de

¹ Working Group Meat Hygiene, Institute of Food Safety and Food Hygiene, Freie Universität Berlin, Berlin, Germany

² Institute for Veterinary Epidemiology and Biostatistics, Freie Universität Berlin, Berlin, Germany

including intestinal content, tonsils, lymph nodes, pluck sets and carcass swabs, while tonsils showed the highest prevalence (Fredriksson-Ahomaa et al. 2009; Hellström et al. 2010; Iida et al. 1998; Kanuganti et al. 2002; Sarno et al. 2016). In rare cases it can also cause clinical disease in pigs (Stein et al. 2018).

Feed is described as the main source of contamination with *Listeria*, but also an environmental source is possible due to the soil origin of *Listeria* spp. (Beloeil et al. 2003; Skovgaard and Nørrung 1989).

For South Germany, Fredriksson-Ahomaa et al. (2009) found prevalence rates for *L. monocytogenes* of 32% (16/50) in tonsils and 4% (2/50) in feces originating from pigs.

The aim of the present study was to get a first overview of the current status of contamination in pig herds with *L. monocytogenes* in two other important and structurally different pig production regions of Germany, the Northwest and the East, to reconsider pigs as a possible source of contamination of pork products. Compared to South of Germany, where farms are small but numerous, there are many large farms and a very high production animal density in the Northwest of Germany, whereas the East has few very large farms. Numerically, 43% of fattening pig farms keeping 19% of total German fattening pigs are located in the South. In the Northwest, there are 29% of German fattening pig farms which are keeping 56% of fattening pigs, while 5% of German fattening pig farms keeping 11% of fattening pigs are located in the East (Merle et al. 2012). The two different regions were chosen to examine if differences in agricultural structure have an effect on the *L. monocytogenes* contamination of pig herds.

2 Materials and methods

The samples were taken from conventionally raised fattening pigs of 6–7 months of age in two industrial slaughterhouses. The slaughter capacity of both slaughterhouses amounts to more than 5000 pigs per day. The slaughterhouses as well as the fattening pig farms are located in Germany in two regions with different agricultural structures. The Northwest is characterized as a high pig dense region with many large sized pig farms whereas the East stands for a low pig dense region with a few but huge pig farms.

In slaughterhouse A, tonsil as well as intestinal content samples from 200 slaughter pigs from 20 farms, i.e. ten pigs per farm, were taken on four different dates in winter 2018/2019. The randomly chosen farms raise at least 1000 pigs per year and are located in Northwest Germany. We selected every third pig of each chosen herd, till attaining ten pigs. In order to get both samples from the same animal, one person labelled the chosen pigs before evisceration. Samples of tonsils were taken using sterile forceps and disposable

scalpels (Cutfix®; B.Braun, Melsungen, Germany) after the splitting of carcasses and were stored in sterile stomacher bags (VWR® Blender Bag; Radnor, PA, USA). In slaughterhouse A, the carcasses were split along the midline from back to front inclusively their heads. Intestinal content from the same animals were taken into a 15 ml fecal tube (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Germany) after evisceration by incising the correspondent rectum with a sterile scalpel.

Due to negative results for *L. monocytogenes* in fecal samples in slaughterhouse A, no fecal samples were taken in slaughterhouse B. The sampling in slaughterhouse B was performed in autumn 2019. Samples from 180 pigs originating from 18 farms located in East Germany and 50 pigs originating from five farms located in Northwest Germany were taken. Therefore, from each randomly selected farm, ten pigs were randomly chosen and their tonsils were cut out with a disposable scalpel and a sterile forceps directly at the end of the slaughter line and stored in sterile stomacher bags. This slaughterhouse used automatic splitting with saws splitting exclusively the heads of the carcasses.

All samples were transported in cold storage between 2 and 8 °C directly into the institute's laboratory and examination started the following day.

Processing of the samples was performed in accordance to the EN ISO 11290-1:2017 protocol (Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* and of *Listeria* spp.) with minor modifications: samples of tonsils weighed 12 g on average, whereas samples of intestinal content weighed 1–2 g. They were homogenized in a stomacher (Smasher™ High-Performance Blender/Homogenizer, bioMerieux, Marcy-l'Étoile, France) for 2 min with half-Fraser broth (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) in a dilution of 1:10. The homogenate was incubated for 24 h at a temperature of 30 °C. Altogether, 0.1 ml of the incubated suspension was mixed in 10.0 ml Fraser broth (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) and incubated for 24 h at 37 °C, followed by streaking out on two selective agar plates. Those selective agar plates were Agar *Listeria* according to Ottaviani and Agosti (ALOA; Merck KGaA, Darmstadt, Germany) and PALCAM agar (Merck KGaA, Darmstadt, Germany). The agar plates were incubated at 37 °C for 48 h. Presumptive colonies were streaked out on Columbia blood agar (Oxoid Ltd., Hampshire, UK) and incubated for 24 h at 37 °C, followed by a CAMP test, catalase test, biochemical tests including rhamnose and xylose sugar utilization and Gram staining in accordance with the EN ISO 11290-1:2017. As confirmation, a multiplex polymerase chain reaction (PCR) as described by Bubert et al. (1999) was performed, firstly to confirm the Genus *Listeria* and secondly to verify the species. The cycling conditions were 95 °C for 5 min for the initial denaturation, followed by 95 °C for 15 s (denaturation), 58 °C for 30 s annealing, 72 °C for 50 s (extension) and 72 °C for 5 min as a final step.

Table 1 Results in samples of tonsils in % (n/N) (95% CI confidence interval)

	Detection rate of <i>Listeria</i> spp. (95% CI)	Detection rate of <i>L. monocytogenes</i> (95% CI)	Detection rate of <i>L. innocua</i> (95% CI)
Total	2.8% (12/430) (1.23–4.35%)	1.6% (7/430) (0.43–2.82%)	1.2% (5/430) (0.15–2.18%)
Slaughterhouse A	1.5% (3/200) (0.00–3.18%)	1.0% (2/200) (0.00–2.38%)	0.5% (1/200) (0.00–1.48%)
Slaughterhouse B ^a	4.4% (8/180) (1.43–7.46%)	2.8% (5/180) (0.38–5.18%)	1.7% (3/180) (0.00–3.54%)
Slaughterhouse B ^b	2.0% (1/50) (0.00–5.88%)	0.0% (0/50) (0.00–6.98%)	2.0% (1/50) (0.00–5.88%)

^aSamples of pigs from East Germany^bSamples of pigs from Northwest Germany

Species identification was also confirmed by matrix-assisted laser desorption-ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) (Bruker MALDI Biotyper[®]; Bruker Daltonik, Bremen, Germany).

Calculation of sample size was based on an expected prevalence between 4 and 30% according to previous studies in Germany and other European countries within the last 15 years (Fredriksson-Ahomaa et al. 2009; Hellström et al. 2010; Sarno et al. 2016). We tested 200 and 230 animals per slaughterhouse, respectively for an accuracy of 5–10%. The Chi-square-test and odds ratio were performed with IBM[®] SPSS[®] Statistics Version 25 (SPSS, Inc., Chicago, IL) with $p \leq 0.05$ defined as statistically significant. The 95% confidence intervals (95% CI) were calculated using epitools¹ and causascientia² if the result was zero.

3 Results

In tonsil samples, the detection rate for *Listeria* spp. was 2.8% (12/430) on single animal basis (Table 1). The detection rate of *L. monocytogenes* was 1.6% (7/430). In slaughterhouse A, three out of 200 pigs (3/200, 1.5%) originating from Northwest Germany were positive for *Listeria* spp. in tonsil samples. In detail, two samples were positive for *L. monocytogenes* (2/200, 1.0%) and one for *L. innocua* (1/200, 0.5%). All affected animals originated from different farms. In intestinal content samples, four animals from four different farms were tested positive for *L. innocua* (Table 2). None of these animals showed positive results in tonsils.

Table 2 Results in samples of intestinal content in % (n/N) (95% CI)

	Detection rate of <i>Listeria</i> spp. (95% CI)	Detection rate of <i>L. monocytogenes</i> (95% CI)	Detection rate of <i>L. innocua</i> (95% CI)
Slaughterhouse A	2.0% (4/200) (0.06–3.94%)	0.0% (0/200) (0.00–1.82%)	2.0% (4/200) (0.06–3.94%)

No intestinal content sample taken in slaughterhouse B

In slaughterhouse B, out of 180 pigs from East Germany, eight samples (8/180, 4.4%) were positive for *Listeria* spp. Five of those isolates were confirmed as *L. monocytogenes* (5/180, 2.8%) and three as *L. innocua* (3/180, 1.7%). These five *L. monocytogenes* positive samples originated from three farms with three isolates from pigs of the same farm and the other two from two different farms, respectively. In addition, the three isolates of *L. innocua* came from one single farm—a farm with no *L. monocytogenes* positive samples. From 50 pig tonsil samples from Northwest Germany slaughtered in slaughterhouse B, *L. innocua* was found in one sample (1/50, 2.0%).

A herd with at least one positive tonsil sample was regarded positive. The total herd level detection rate was 16.3% (7/43) for *Listeria* spp. and 11.6% (5/43) for *L. monocytogenes* (Table 3). Considering only results of intestinal content samples, the herd detection rate of *Listeria* spp. was 20.0% (4/20) and of *L. monocytogenes* 0.0% (0/20) in slaughterhouse A (Table 4).

To compare the results of pigs tested in both slaughterhouses, the samples of intestinal content in slaughterhouse A were omitted in the following results: the herd detection rate in slaughterhouse A was 10.0% (2/20) for *Listeria* spp. as well as for *L. monocytogenes*. In slaughterhouse B, the herd detection rate for *Listeria* spp. was 21.7% (5/23) and for *L. monocytogenes* 13.0% (3/23). The Chi-square-test showed no statistically significant association ($p = 0.420$ for *Listeria* spp. resp. $p > 0.999$ for *L. monocytogenes*) of slaughterhouse and the finding of positive herds, as though the odds ratio showed a 2.5 (95% CI 0.428–14.607) resp. 1.4 (95% CI 0.202–9.018) times higher risk to find a positive pig herd in slaughterhouse B. Altogether, in tested pig herds originating from Northwest Germany the herd detection rate was 12.0% (3/25) for *Listeria* spp. and 8.0% (2/25) for *L. monocytogenes*. In pig herds originating from East Germany, the herd detection rate was 22.2% (4/18) for *Listeria* spp. and 16.7% (3/18) for *L. monocytogenes*. The odds ratio showed a 2.1 (95% CI 0.406–10.802) resp. 2.3 (95% CI 0.343–15.436) times higher risk for a positive herd originating from East Germany, but the Chi-square-test showed no statistically significant correlation between positive results and origin of pigs ($p = 0.427$ resp. $p = 0.634$) in this study.

¹ <https://epitools.ausvet.com.au/ciproportion> Accessed March 2021.² https://www.causascientia.org/math_stat/ProportionCI.html Accessed March 2021.

Table 3 Results on herd level in samples of tonsils in % (n/N) (95% CI)

	Herd detection rate of <i>Listeria</i> spp. (95% CI)	Herd detection rate of <i>L. monocytogenes</i> (95% CI)	Herd detection rate of <i>L. innocua</i> (95% CI)
Total	16.3% (7/43) (5.24–27.31%)	11.6% (5/43) (2.05–21.21%)	7.0% (3/43) (0.00–14.59%)
Slaughterhouse A	10.0% (2/20) (0.00–23.15%)	10.0% (2/20) (0.00–23.15%)	5.0% (1/20) (0.00–14.55%)
Slaughterhouse B ^a	22.2% (4/18) (3.02–41.43%)	16.7% (3/18) (0.00–33.88%)	5.6% (1/18) (0.00–16.14%)
Slaughterhouse B ^b	20.0% (1/5) (0.00–55.06%)	0.0% (0/5) (0.00–45.93%)	20.0% (1/5) (0.00–55.06%)

^aSamples of pig herds from East Germany^bSamples of pig herds from Northwest Germany

As on herd basis, also the single animal results showed no statistically significant association of the origin of pigs and positive results for *Listeria* spp. as well as for *L. monocytogenes* ($p=0.134$ resp. $p=0.135$) with an odds ratio of 2.9 (95% CI 0.848–9.650) resp. 3.5 (95% CI 0.680–18.470).

For comparison of the specificity of culture, PCR and MALDI-TOF MS for species identification, the results for all isolates were identical with all methods.

4 Discussion

This study shows the first data of asymptomatic *L. monocytogenes* carrier pigs originating from two structurally different pig production regions in Germany, the Northwest and the East. Results of 1.6% (7/430) positive *L. monocytogenes* tonsil samples in total assume a high hygienic standard in the corresponding farms. The diverse agricultural structures with high vs. low density and big vs. very big farms in the Northwest and East of Germany, respectively, showed no significant difference on the impact of contamination with *L. monocytogenes*. For South Germany, where farms are in average smaller but the density of farms is high (Merle et al. 2012), Fredriksson-Ahomaa et al. (2009) isolated *L. monocytogenes* in 34% of tonsils and 4% in feces of 50 slaughter pigs. Next to agricultural structures, the occurrence of *L. monocytogenes* in pigs may also be influenced by, e.g., date and method of investigations.

Other prevalence studies of *L. monocytogenes* in asymptomatic pigs in different regions of the world come to various results. In Fig. 1, results of several selected studies in comparison with our results are illustrated in reverse chronological order. The previous studies show a variation of results from 0% positive fecal samples in North Spain (Esteban et al. 2009) to 45% positive samples of tonsils in Yugoslavia (Bunčić 1991), even though a direct comparison must be seen critically because of different sampling

Table 4 Results on herd level in samples of intestinal content in % (n/N) (95% CI)

	Herd detection rate of <i>Listeria</i> spp. (95% CI)	Herd detection rate of <i>L. monocytogenes</i> (95% CI)	Herd detection rate of <i>L. innocua</i> (95% CI)
Slaughterhouse A	20.0% (4/20)	0.0% (0/20)	20.0% (4/20)

In slaughterhouse B, no intestinal content samples were taken
CI Confidence interval

and detection methods, sample sizes and circumstances like husbandry conditions. Considering the environmental source of *L. monocytogenes*, the feeding and husbandry conditions have an impact on the contamination of pigs on the farm (Skovgaard 1990). For example, pigs were partially fed with silage in the study of Bunčić (1991) what explains a higher prevalence of *L. monocytogenes*. In the study of Hellström et al. (2010) pigs from organic farms showed a higher prevalence than conventionally raised pigs in farm-level as well as at slaughterhouse level. Different feeding practices, e.g., hay or straw as coarse feed, and more contact to soil, plants and other animals lead to a higher risk of contamination with this ubiquitous pathogen. The chronological depiction of previous study results indicates a slight trend of decreasing numbers of the bacterium found in pigs. The negative correlation with the increasing numbers of human disease cases could be explained by changing of production and distribution of food which support the widespread of the pathogen. For instance, the rising popularity of ready-to-eat products, which are intended to be eaten without further heating, are one of the most important sources for human listeriosis (Kurpas et al. 2018).

As shown in Figure 1, prevalence rates from our study are comparably low. In slaughterhouse A, we detected 1.0%

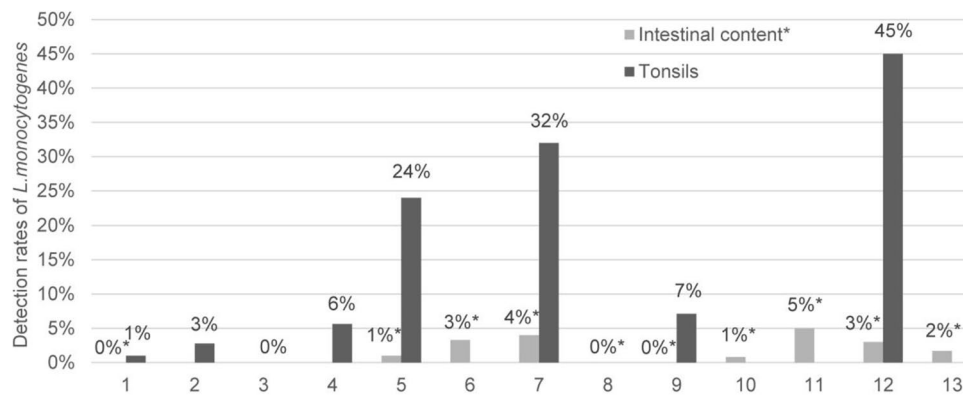


Fig. 1 Detection rates of *L. monocytogenes* in pigs found in this and in various studies worldwide in reverse chronological order. 1: Slaughterhouse A (pigs from Northwest Germany). 2: Slaughterhouse B (pigs from East Germany). 3: Slaughterhouse B (pigs from Northwest Germany). 4: Sarno et al. (2016) (Switzerland). 5: Hellström

et al. (2010) (Finland). 6: Farzan et al. (2010) (Canada). 7: Fredriksson-Ahomaa et al. (2009) (South Germany). 8: Esteban et al. (2009) (Spain). 9: Kanuganti et al. (2002) (USA). 10: Iida et al. (1998) (Japan). 11: Adesiyun and Krishnan (1995) (Trinidad). 12: Bunčić (1991) (Yugoslavia). 13: Skovgaard and Nørrung (1989) (Denmark)

(2/200) of tonsil samples vs. 0.0% (0/200) intestinal content samples positive for *L. monocytogenes*. Results suit with the higher detection rate of this pathogen in samples of tonsils than of intestinal content from other studies (Fredriksson-Ahomaa et al. 2009; Hellström et al. 2010). Intestinal content taken as samples of feces would be easily accessible on the farm but is shown there to be an improper material to detect the actual number of asymptomatic carrier pigs in a herd. Therefore, the examination of tonsils in the slaughtering process should be preferred.

Results of this study confirm that especially tonsils can still be a reservoir for *L. monocytogenes*. The low prevalence indicates a minor but potential risk of cross-contamination of the bacterium from tonsils to meat or the slaughterhouse environment where *L. monocytogenes* could accumulate and spread along the food chain. Autio et al. (2000) found mechanical saws as source of cross-contaminating *L. monocytogenes* to pig carcasses. It underlines the importance of hygiene at the point of splitting the carcasses, removing tonsils and other steps in the slaughter line. An automatic saw like used in slaughterhouse B has the advantage of being cleaned with hot water after splitting a pig carcass, so there is a minor risk of cross-contaminating *L. monocytogenes* from one carcass to the next. More research is necessary to evaluate the difference in cross-contamination with *L. monocytogenes* between different types of saws and practices, e.g. splitting inclusively or exclusively the heads of carcasses.

Furthermore, in our study we could show an intra-farm accumulation of three *L. monocytogenes* as well as three *L. innocua* positive samples in slaughterhouse B, revealing a transmission inside a herd or a shared origin of contamination on the farm, such as feeds. Cross-contamination in the slaughterhouse is unlikely to be the cause for it because the positive tested carcasses were not sampled one after another

in the slaughter line. Due to data protection reasons, it was not possible in our study to get more detailed information about the farms to compare agricultural practices. Beloeil et al. (2003) identified wet feeding during the fattening period as well as low hygienic standards on farm as risk factors for *L. monocytogenes* contamination of pigs on farm level. Hellström et al. (2010) underlined the importance of hygiene conditions and added as further risk factors a large group size, contact with pet and pest animals, organic production, farm management practices like management of manure, use of coarse feed, access to outdoor areas and drinking from the trough.

5 Conclusions

In two high-capacity slaughterhouses, 250 pigs originating from Northwest Germany and 180 pigs from East Germany were tested for *Listeria* spp. in tonsils and the first 200 pigs also in intestinal contents. The rates of asymptomatic *L. monocytogenes* carrier pigs (1.6% in tonsil resp. 0.0% in intestinal content samples) found in this study are lower than in previous studies worldwide.

Due to the high numbers of pigs slaughtered per day in an average slaughterhouse in the concerned regions, the risk to introduce *L. monocytogenes* into the food chain is present. Especially tonsils of pigs may represent a reservoir for *L. monocytogenes* and slaughterhouse hygiene remains important to prevent a contamination of food products. On farm level, the feeding system, high hygiene and biosecurity standards are important to decrease the risk of contamination of pigs. Furthermore, differences in agricultural structures such as the high vs. low density of pig farms in Northwest

and East Germany, respectively, had no significant impact on the prevalence rates of asymptomatic *L. monocytogenes* carrier pigs in our study.

Acknowledgements The authors would like to thank the slaughterhouses for their collaboration in sample taking and the Institute for Animal Hygiene and Environmental Health, FU Berlin for the opportunity of using their MALDI-TOF MS. Thanks to the QS science fund for funding this study.

Author contributions DM conceived the first study conception. All other authors contributed to the final study conception and design. Material preparation, data collection and analysis were performed by VO and JD. The first draft of the manuscript was written by VO and all authors commented on previous versions of the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Funding Open Access funding enabled and organized by Projekt DEAL. This study was funded by the QS Qualität und Sicherheit GmbH science fund (Freie Universität Berlin Contract Number: 2018000308).

Declarations

Conflict of interest The authors declare that they have no conflict of interest.

Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

References

- Adesiyun AA, Krishnan C (1995) Occurrence of *Yersinia enterocolitica* O:3, *Listeria monocytogenes* O:4 and thermophilic *Campylobacter* spp. in slaughter pigs and carcasses in Trinidad. *Food Microbiol* 12:99–107. [https://doi.org/10.1016/S0740-0020\(95\)80085-9](https://doi.org/10.1016/S0740-0020(95)80085-9)
- Allerberger F (2007) *Listeria*. In: Simjee S (ed) *Foodborne diseases*. Humana Press, Totowa, pp 27–39
- Allerberger F, Wagner M (2010) Listeriosis: a resurgent foodborne infection. *Clin Microbiol Infect* 16:16–23. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2009.03109.x>
- Autio T, Säteri T, Fredriksson-Ahomaa M, Rahkio M, Lundén J, Korkeala H (2000) *Listeria monocytogenes* contamination pattern in pig slaughterhouses. *J Food Prot* 63:1438–1442. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-63.10.1438>
- Beloel P-A, Chauvin C, Toquin M-T, Fablet C, Le Nôtre Y, Salvat G, Madec F, Fravallo P (2003) *Listeria monocytogenes* contamination of finishing pigs: an exploratory epidemiological survey in France. *Vet Res* 34:737–748. <https://doi.org/10.1051/vetres:2003031>
- 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. *Appl Environ Microbiol* 65:4688–4692
- Bunčić S (1991) The incidence of *Listeria monocytogenes* in slaughtered animals, in meat, and in meat products in Yugoslavia. *Int J Food Microbiol* 12:173–180. [https://doi.org/10.1016/0168-1605\(91\)90067-Y](https://doi.org/10.1016/0168-1605(91)90067-Y)
- Desai AN, Anyoha A, Madoff LC, Lassmann B (2019) Changing epidemiology of *Listeria monocytogenes* outbreaks, sporadic cases, and recalls globally: a review of ProMED reports from 1996 to 2018. *Int J Infect Dis* 84:48–53. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2019.04.021>
- Duranti A, Sabbatucci M, Blasi G, Acciari VA, Ancora M, Bella A, Busani L, Centorame P, Cammà C, Conti F, de Medici D, Di Domenico M, Di Marzio V, Filippini G, Fiore A, Fisichella S, Gattuso A, Gianfranceschi M, Graziani C, Guidi F, Marcacci M, Marfoglia C, Neri D, Orsini M, Ottaviani D, Petruzzelli A, Pezzotti P, Rizzo C, Ruolo A, Scavia G, Scuota S, Tagliavento G, Tibaldi A, Tonucci F, Torresi M, Migliorati G, Pomilio F (2018) A severe outbreak of listeriosis in central Italy with a rare pulso-type associated with processed pork products. *J Med Microbiol* 67:1351–1360. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.000785>
- EFSA and ECDC (2019) The European Union one health 2018 zoonoses report. *EFSA J* 17(12):5926. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2019.5926>
- Esteban JI, Oporto B, Aduriz G, Juste RA, Hurtado A (2009) Faecal shedding and strain diversity of *Listeria monocytogenes* in healthy ruminants and swine in Northern Spain. *BMC Vet Res*. <https://doi.org/10.1186/1746-6148-5-2>
- Farzan A, Friendship RM, Cook A, Pollari F (2010) Occurrence of *Salmonella*, *Campylobacter*, *Yersinia enterocolitica*, *Escherichia coli* O157 and *Listeria monocytogenes* in swine. *Zoonoses Public Health* 57:388–396. <https://doi.org/10.1111/j.1863-2378.2009.01248.x>
- Fredriksson-Ahomaa M, Gerhardt M, Stolle A (2009) High bacterial contamination of pig tonsils at slaughter. *Meat Sci* 83:334–336. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2009.06.004>
- Hellström S, Laukkanen R, Siekkinen K-M, Ranta J, Majjala R, Korkeala H (2010) *Listeria monocytogenes* contamination in pork can originate from farms. *J Food Prot* 73:641–648. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-73.4.641>
- Iida T, Kanzaki M, Nakama A, Kokubo Y, Maruyama T, Kaneuchi C (1998) Detection of *Listeria monocytogenes* in humans, animals and foods. *J Vet Med Sci* 60:1341–1343. <https://doi.org/10.1292/jvms.60.1341>
- Kanuganti SR, Wesley IV, Reddy PG, McKean J, Hurd HS (2002) Detection of *Listeria monocytogenes* in pigs and pork. *J Food Prot* 65:1470–1474. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-65.9.1470>
- Kurpas M, Wiczorek K, Osek J (2018) Ready-to-eat meat products as a source of *Listeria monocytogenes*. *J Vet Res* 62:49–55. <https://doi.org/10.2478/jvetres-2018-0007>
- Leclercq A, Moura A, Vales G, Tessaud-Rita N, Aguilhon C, Lecuit M (2019) *Listeria thailandensis* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 69:74–81. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.003097>
- Merle R, Busse M, Rechter G, Meer U (2012) Regionalisierung Deutschlands anhand landwirtschaftlicher Strukturdaten. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr* 125:52–59. <https://doi.org/10.2376/0005-9366-125-52>
- Moura A, Disson O, Lavina M, Thouvenot P, Huang L, Leclercq A, Fredriksson-Ahomaa M, Eshwar AK, Stephan R, Lecuit M (2019) Atypical hemolytic *Listeria innocua* isolates are virulent, albeit less than *Listeria monocytogenes*. *Infect Immun*. <https://doi.org/10.1128/IAI.00758-18>

- Perrin M, Bemer M, Delamare C (2003) Fatal case of *Listeria innocua* bacteremia. *J Clin Microbiol* 41:5308–5309. <https://doi.org/10.1128/JCM.41.11.5308-5309.2003>
- Pichler J, Much P, Kasper S, Fretz R, Auer B, Kathan J, Mann M, Huhulescu S, Ruppitsch W, Pietzka A, Silberbauer K, Neumann C, Gschiel E, de Martin A, Schuetz A, Gindl J, Neugschwandtner E, Allerberger F (2009) An outbreak of febrile gastroenteritis associated with jellied pork contaminated with *Listeria monocytogenes*. *Wien Klin Wochenschr* 121:149–156. <https://doi.org/10.1007/s00508-009-1137-3>
- Ramaswamy V, Cresence VM, Rejitha JS, Lekshmi MU, Dharsana KS, Prasad SP, Vijila HM (2007) *Listeria*—review of epidemiology and pathogenesis. *J Microbiol Immunol Infect* 40:4–13
- Robert Koch-Institut (2020) Infektionsepidemiologisches Jahrbuch meldepflichtiger Krankheiten für 2019
- Sarno E, Fierz L, Zweifel C, Tasara T, Stephan R (2016) Characteristics of *Listeria monocytogenes* isolated from tonsils of slaughtered fattening pigs in Switzerland. *J Verbr Lebensm* 11:19–23. <https://doi.org/10.1007/s00003-015-0974-4>
- Skovgaard N (1990) The impact of the prevalence of *Listeria monocytogenes* in the environment on meat and milk hygiene. *Microbiol Aliments Nutr* 8:15–20
- Skovgaard N, Nørnung B (1989) The incidence of *Listeria* spp. in faeces of Danish pigs and in minced pork meat. *Int J Food Microbiol* 8:59–63. [https://doi.org/10.1016/0168-1605\(89\)90080-9](https://doi.org/10.1016/0168-1605(89)90080-9)
- Stein H, Stessl B, Brunthaler R, Loncaric I, Weissenböck H, Ruczizka U, Ladinig A, Schwarz L (2018) Listeriosis in fattening pigs caused by poor quality silage - a case report. *BMC Vet Res* 14:362. <https://doi.org/10.1186/s12917-018-1687-6>

Publisher's Note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

3.2 Publikation 2

Titel: Distribution and Characteristics of *Listeria* spp. in Pigs and Pork Production Chains in Germany

Autoren: Verena Oswaldi, Stefanie Lüth, Janine Dzierzon, Diana Meemken, Stefan Schwarz, Andrea T. Feßler, Benjamin Félix, Susann Langforth

Jahr: 2022

Zeitschrift: Microorganisms, 10(3), 512

DOI: <https://doi.org/10.3390/microorganisms10030512>

Eigener Anteil an der Publikation: Probenahme, Bearbeitung und Anzucht der Proben im Labor, Durchführung und Auswertung der antimikrobiellen Resistenztestung unter Anleitung, Erstellung des Manuskriptes



Article

Distribution and Characteristics of *Listeria* spp. in Pigs and Pork Production Chains in Germany

Verena Oswaldi ^{1,2,3,*} , Stefanie Lüth ⁴ , Janine Dzierzon ^{1,3} , Diana Meemken ^{1,3} , Stefan Schwarz ^{3,5} , Andrea T. Feßler ^{3,5} , Benjamin Félix ⁶ and Susann Langforth ^{1,3}

- ¹ Institute of Food Safety and Food Hygiene, Department of Veterinary Medicine, Freie Universität Berlin, Königsweg 67, 14163 Berlin, Germany; janine.dzierzon@fu-berlin.de (J.D.); diana.meemken@fu-berlin.de (D.M.); susann.langforth@fu-berlin.de (S.L.)
- ² Animal Health Team, European Food Safety Authority (EFSA), Via Carlo Magno 1A, 43126 Parma, Italy
- ³ Veterinary Centre for Resistance Research (TZR), Freie Universität Berlin, Robert-von-Ostertag-Str. 8, 14163 Berlin, Germany; stefan.schwarz@fu-berlin.de (S.S.); andrea.fessler@fu-berlin.de (A.T.F.)
- ⁴ Department Biological Safety, German Federal Institute for Risk Assessment (BfR), Diedersdorfer Weg1, 12277 Berlin, Germany; stefanie.lueth@bfr.bund.de
- ⁵ Institute of Microbiology and Epizootics, Centre of Infection Medicine, Department of Veterinary Medicine, Freie Universität Berlin, Robert-von-Ostertag-Str. 7, 14163 Berlin, Germany
- ⁶ Salmonella and Listeria Unit, Laboratory for Food Safety, French Agency for Food, Environmental and Occupational Health & Safety (ANSES), University of Paris-Est, 14, rue Pierre et Marie Curie, CEDEX, 94706 Maisons-Alfort, France; benjamin.felix@anses.fr
- * Correspondence: verena.oswaldi@fu-berlin.de; Tel.: +39-351-7329089



Citation: Oswaldi, V.; Lüth, S.; Dzierzon, J.; Meemken, D.; Schwarz, S.; Feßler, A.T.; Félix, B.; Langforth, S. Distribution and Characteristics of *Listeria* spp. in Pigs and Pork Production Chains in Germany. *Microorganisms* **2022**, *10*, 512. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10030512>

Academic Editor:
Elena González-Fandos

Received: 23 January 2022
Accepted: 23 February 2022
Published: 26 February 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: *Listeria* (*L.*) *monocytogenes* is a foodborne pathogen that can cause disease, mainly in elderly, pregnant or immunocompromised persons through consumption of contaminated food, including pork products. It is widespread in the environment and can also be found in asymptomatic carrier animals, for example, in different tissues of pigs. To learn more about their nature, 16 *Listeria* spp. isolates found in tonsils and intestinal content of pigs and 13 isolates from the slaughterhouse environment were characterized using next-generation sequencing (NGS). A wide distribution of clonal complexes was observed in pigs, as well as in the pork production chain, suggesting multiple sources of entry. Hypervirulent clones were found in pig tonsils, showing the potential risk of pigs as source of isolates causing human disease. The presence of closely related isolates along the production chain suggests a cross-contamination in the slaughterhouse or recontamination from the same source, strengthening the importance of efficient cleaning and disinfection procedures. The phenotypical antimicrobial resistance status of *L. monocytogenes* isolates was examined via broth microdilution and revealed a low resistance level. Nevertheless, genotypical resistance data suggested multiple resistances in some non-pathogenic *L. innocua* isolates from pig samples, which might pose a risk of spreading resistances to pathogenic species.

Keywords: *Listeria monocytogenes*; *Listeria innocua*; *Listeria welshimeri*; pork production; food safety; next-generation sequencing; MLST; SNP; antimicrobial resistance; food contamination

1. Introduction

Listeria (*L.*) *monocytogenes*, a Gram-positive bacterium, is the cause of human listeriosis, a rare foodborne illness with a high hospitalization and case-fatality rate [1]. Currently, 20 *Listeria* species are known [2], among which *L. monocytogenes* and *L. ivanovii* are considered mammalian pathogens. While infections caused by *L. ivanovii* are seldom and mainly affect ruminants, *L. monocytogenes* is associated with most human and animal listeriosis disease cases [3]. Other *Listeria* species are generally considered non-pathogenic, although there are some rare cases of disease reported caused by *L. innocua* [4,5] and *L. seeligeri* [6].

The species *L. monocytogenes* is subdivided into four evolutionary lineages [7–10] and 13 serovars. Almost all human disease cases are associated with one of three serovars:

4b, 1/2a or 1/2b [11]. The bacterium is further classified into sequence types (STs) via multilocus sequence typing (MLST) and into clonal complexes (CCs). STs are defined as the unique collective of alleles from seven housekeeping genes, and CCs are defined as clusters of STs sharing at least six alleles [12,13]. MLST is a reference method that allows for comparison of isolates and demonstrates that only a few frequent *L. monocytogenes* clones are globally distributed [14].

Its resilience against a wide range of environmental stressors, such as low nutrient availability, acidic conditions, high salinity, and a broad temperature range from 0 °C to 45 °C [11] give *L. monocytogenes* the ability to survive in different food sources. In addition, *L. monocytogenes* is widespread in the environment, requiring constant control of this pathogen in food production facilities [1]. It is also present in the intestines of asymptomatic animals and humans [15]. Regarding pigs, studies have confirmed the presence of the pathogen on carcasses and in different tissues [16], as well as in the farm environment and in feed [17]. The prevalence of *Listeria* spp. in pigs in German slaughterhouses was described by Oswaldi et al. [18]. *L. monocytogenes* is frequently found in pork products worldwide [19,20], especially in products intended to be eaten raw (ready-to-eat products); this poses a threat to public health [21]. Some studies have confirmed living pigs as the origin of *L. monocytogenes* found in pork [17,22]; others identified the slaughter and processing environment as the source of pork contamination [23,24]. Demaitre et al. [25] reasoned that persistent isolates in the slaughterhouse environment are more likely the source of contamination than less common, presumably transient and sporadically introduced isolates, as routine cleaning and sanitizing have become ineffective. Next-generation sequencing (NGS) makes it possible to investigate the origin of isolates and provides information on virulence and resistance [26].

L. monocytogenes is a highly heterogeneous species in terms of pathogenicity and contains hypovirulent and hypervirulent clones, which are most likely to cause disease. Thus, knowledge about the clonal structure of isolates is needed to assess their potential to cause disease [27]. The major genes associated with virulence in *Listeria* are involved in the cell infectious cycle: *prfA*, *plcA*, *hly*, *mpl*, *actA* and *plcB* for pathogenicity island 1 and *inlA* and *inlB* for pathogenicity island 2 [28]. Isolates considered non-pathogenic do not possess these virulence genes [29].

Knowledge about the antimicrobial resistance (AMR) status of isolates that cause human disease is crucial for treatment and the prevention of fatal outcomes. *L. monocytogenes* is susceptible to a wide range of antimicrobial agents that are effective against Gram-positive bacteria, such as tetracyclines, erythromycin, ampicillin and gentamicin [30], and shows intrinsic resistance to fosfomycin and fusidic acid [31]. The multiple antimicrobial resistance of a *L. monocytogenes* isolate was first shown in 1988 [32], followed by various resistant strains from different sources, including food, as well as environmental and human clinical samples [33]. Poyart-Salmeron et al. [32] showed that resistance genes can be transferred between *Listeria* species and other bacteria by self-transmissible plasmids.

The aim of this study was to perform NGS on *Listeria* spp. isolates found in pigs and along the corresponding pork processing chain to gain knowledge about their MLST types, differences in SNPs, virulence genes and antimicrobial resistance genes. Moreover, we identified the presence of phenotypic resistance against antimicrobial agents in these *L. monocytogenes* via broth microdilution. These results may provide insights into the relatedness of *Listeria* spp. found in pigs and along the corresponding pork production chain, as well as their relevance for human disease.

2. Materials and Methods

2.1. Origin of Isolates

The isolates were recovered by sampling 430 fattening pigs and the slaughterhouse environment in two industrial high-capacity pig slaughterhouses in Germany, as described by Oswaldi et al. [18], later referred to as slaughterhouses A and B. Overall, 16 isolates of *Listeria* spp. originating from pigs and 13 isolates originating from the slaughterhouse envi-

ronment were isolated. In slaughterhouse A, samples were collected from pig tonsils and intestinal content on four dates in the winter period of 2018/2019, later referred to as dates 1 to 4. On sampling dates 3 and 4, with two months in between, environmental samples were also taken from slaughter, cutting and processing environments during processing. These environmental samples were collected with sponges (Whirl-Pak™ Speci-Sponge™ Environmental Surface Sampling Bags, Nasco, Fort Atkinson, WI, USA) moisturized with 10 mL sterile 0.85% saline solution. The samples from pig tonsils in slaughterhouse B were taken in October 2019 (sampling dates 5 and 6); no environmental samples were taken due to organizational reasons. Sample transportation and examination, as well as confirmation of presumptive isolates, were performed as described by Oswaldi et al. [18]. All confirmed isolates were stored under cryopreservation conditions at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ in cryovials (ROTI®Store cryovials, Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Germany).

2.2. Sequencing and Bioinformatic Analysis of Sequences

Next-generation sequencing (NGS) was performed at the German Federal Institute for Risk Assessment (BfR) in Berlin, Germany. The DNA was isolated with a PureLink™ Genomic DNA Mini Kit (Invitrogen™, Carlsbad, CA, USA). For lysis, the PulseNet protocol for Gram-positive bacteria was used (<https://www.cdc.gov/pulsenet/pdf/pnl32-miseq-nextera-xt.pdf>; accessed on 22 April 2021). DNA concentration was quantified using a Qubit™ dsDNA BR assay kit with a Qubit™ 2.0 fluorometer (Invitrogen™, Carlsbad, CA, USA). The sequencing library was prepared with an Illumina DNA prep kit (Illumina Inc., San Diego, CA, USA). Sequencing was performed in paired-end mode at 2×150 bp with an Illumina NextSeq 500 or at 2×300 bp with an Illumina MiSeq (Illumina Inc., San Diego, CA, USA). Trimming of sequencing raw reads and overall quality assessment was conducted using the pipeline AQUAMIS [34].

For single-nucleotide polymorphism (SNP) analysis, the pipeline snippySnake (https://gitlab.com/bfr_bioinformatics/snippySnake; accessed on 25 May 2021), based on Snippy (<https://github.com/tseemann/snippy>; accessed on 25 May 2021), was used. Three separate SNP analyses were carried out for the three different *Listeria* species found so as not to distort the analysis with interspecies variability. Optimal reference genomes for SNP analysis were automatically identified via the mash-based search included in the snippySnake workflow. Accordingly, NZ_CP026043.1 (strain FDAARGOS_58) was used as reference for the analysis of *L. monocytogenes* strains, NC_003212.1 (strain Clip11262) was used as reference for the analysis of *L. innocua* strains, and NZ_LT906444.1 (strain NCTC11857) was used as reference for the analysis of *L. welshimeri* strains. Complete linkage clustering of SNP distance matrices was performed in R. Trees were exported using the *phylogram* package and visualized in iTOL [35]. Strains with single-digit SNP differences were rated as likely to be related to one another.

The BakCharak pipeline (https://gitlab.com/bfr_bioinformatics/bakcharak; accessed on 27 May 2021) was used for MLST determination (database: pubMLST), as well as for screening of sequences for antimicrobial resistance genes (database: NCBI resistance gene database) and virulence factors (database: VFDB).

2.3. Antimicrobial Susceptibility Testing

For all *L. monocytogenes* isolates, antimicrobial susceptibility testing was performed by broth microdilution according to the recommendations of the Clinical and Laboratory Standards Institute given in the document VET06 [36]. Bacterial suspensions with a turbidity equivalent to McFarland 0.5 were prepared. Subsequently, 5 μL of the suspension was mixed per mL CAMHB II (cation-adjusted Mueller-Hinton-II) broth (Oxoid, Wesel, Germany) supplemented with 5% (v/v) lysed horse blood. Then, 50 μL of this suspension was pipetted in each well of the four microtiter plates (Thermo Fisher Scientific, Basingstoke, UK) with a multichannel pipet and incubated at $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 24 h. To count the colony-forming units (cfu), 100 μL of the suspension was inoculated on Columbia blood agar. *Streptococcus pneumoniae* ATCC® 49619 was used as a quality control

strain. The resulting minimal inhibitory concentrations (MICs) of penicillin, ampicillin and sulfamethoxazole/trimethoprim were classified as susceptible, intermediate or resistant according to the clinical breakpoints available in CLSI documents M45 [37] and VET06 [36]. For the remaining antimicrobial agents, erythromycin, clindamycin, ciprofloxacin, gentamicin, tetracycline and vancomycin, the clinical breakpoints for staphylococci listed in the CLSI document M100 [38] were used. Furthermore, based on CLSI document VET01S [39], breakpoints for staphylococci of animal origin were applied for amoxicillin/clavulanic acid, enrofloxacin, marbofloxacin, pirlimycin and doxycycline. For streptomycin and neomycin, the breakpoints described by Troxler et al. [31] were used.

3. Results

3.1. Presence of *Listeria* spp. in Pigs in Slaughterhouse A and B

Sixteen isolates of *Listeria* spp. (seven *L. monocytogenes* and nine *L. innocua*) used in this study were found in porcine samples; their distribution and prevalence in pigs were reported by Oswaldi et al. [18]. Two *L. monocytogenes* and five *L. innocua* isolates originated from slaughterhouse A, taken on sampling dates 1 to 4, whereas the remaining five *L. monocytogenes* and four *L. innocua* isolates came from slaughterhouse B on sampling dates 5 and 6.

3.2. Presence of *Listeria* spp. in Environmental Samples in Slaughterhouse A

The numbers of slaughter and processing environmental samples positive for *Listeria* spp. are shown in Table 1.

Table 1. Results of environmental samples taken on date 3 ($n = 36$) and date 4 ($n = 41$) in slaughterhouse A in absolute numbers.

Place of Sampling	Number of Samples Taken		Samples Positive for <i>L. monocytogenes</i>		Samples Positive for <i>L. innocua</i>		Samples Positive for <i>L. welshimeri</i>	
	Date 3	Date 4	Date 3	Date 4	Date 3	Date 4	Date 3	Date 4
Saws	4	4	0	0	0	0	0	0
Tonsil removal device	2	2	0	0	0	0	0	0
Floor drains	5	6	1	1	0	0	0	0
Rubber boots (sole)	7	8	1	0	1	0	1	0
Equipment in slaughter hall	8	8	0	0	0	0	0	0
Cutting plant (product contact surfaces/devices)	5	6	0	2	0	0	0	0
Processing plant (product contact surfaces/devices)	5	7	0	2	0	1	2	1
Total	77		7		2		4	

No *Listeria* spp. was found in samples of saws ($n = 8$), tonsil removal devices ($n = 4$) or other equipment in the slaughter hall with product contact ($n = 16$). On date 3, *L. monocytogenes*, *L. innocua* and *L. welshimeri* were found on soles of rubber boots used within the slaughter hall. *L. monocytogenes* was isolated from the same drain on date 3 and date 4. On date 4, we found samples positive for *L. monocytogenes* in the cutting and processing plant in places with direct product contact, including the mincer. In the cutting plant, *L. monocytogenes*-positive samples were found on the conveyor belt and a cutting tool. Other *Listeria* species, *L. innocua* and *L. welshimeri*, were found in the processing plant on both sampling dates.

3.3. MLST Analyses

The distribution of STs and CCs of the *L. monocytogenes* isolates is presented in Table 2. There were lineage I isolates with ST5 = CC5 ($n = 2$) and ST6 = CC6 ($n = 3$), as well as lineage II isolates with ST7 = CC7 ($n = 1$), ST9 = CC9 ($n = 1$), ST18 = CC18 ($n = 1$), ST20 = CC20 ($n = 1$), ST37 = CC37 ($n = 1$), ST325 = CC31 ($n = 1$), ST412 = CC412 ($n = 2$) and ST451 = CC11 ($n = 1$). Altogether, there were ten different STs and CCs present among the 14 isolates.

Table 2. Characteristics of *L. monocytogenes* isolates found in pigs and in the environment ¹.

Sampled Matrix (Sample Number)	Slaughterhouse	Sampling Date	Lineage	MLST ST	MLST CC	Virulence Genes (Total Number)
Pig tonsil (21-LI00365-0)	A	2	II	451	11	<i>actA, ami, aut, bsh, clpC, clpE, clpP, fbpA, gtcA, hly, hpt, iap/cwhA, inlA, inlB, inlC, inlF, inlJ, inlK, lap, lapB, lntA, lpeA, lpA1, lspA, mpl, oatA, pdgA, plcA, plcB, prfA, prsA2, vip</i> (32)
Pig tonsil (21-LI00512-0)	A	3	II	37	37	<i>actA, ami, aut, bsh, clpC, clpE, clpP, fbpA, gtcA, hly, hpt, iap/cwhA, inlA, inlB, inlC, inlF, inlJ, inlK, lap, lapB, lntA, lpeA, lpA1, lspA, mpl, oatA, pdgA, plcA, plcB, prfA, prsA2</i> (31)
Pig tonsil (21-LI00523-0)	B	5	I	6	6	<i>actA, bsh, clpC, clpE, clpP, fbpA, gtcA, hly, hpt, iap/cwhA, inlA, inlB, inlC, inlF, inlK, lap, lapB, llsA, llsB, llsD, llsG, llsH, llsP, llsX, llsY, lntA, lpeA, lpA1, lspA, mpl, oatA, pdgA, plcA, plcB, prfA, prsA2, vip</i> (37)
Pig tonsil (21-LI00524-0)	B	5	II	325	31	<i>ami, aut, bsh, clpC, clpE, clpP, fbpA, gtcA, hly, hpt, iap/cwhA, inlA, inlB, inlC, inlF, inlJ, inlK, lap, lntA, lpeA, lpA1, lspA, mpl, oatA, pdgA, plcA, plcB, prfA, prsA2</i> (29)
Pig tonsil (21-LI00525-0)	B	5	I	6	6	<i>actA, bsh, clpC, clpE, clpP, fbpA, gtcA, hly, hpt, iap/cwhA, inlA, inlB, inlC, inlF, inlK, lap, lapB, llsA, llsB, llsD, llsG, llsH, llsP, llsX, llsY, lntA, lpeA, lpA1, lspA, mpl, oatA, pdgA, plcA, plcB, prfA, prsA2, vip</i> (37)
Pig tonsil (21-LI00526-0)	B	5	II	7	7	<i>actA, ami, aut, bsh, clpC, clpE, clpP, fbpA, gtcA, hly, hpt, iap/cwhA, inlA, inlB, inlC, inlF, inlJ, inlK, lap, lapB, lntA, lpeA, lpA1, lspA, mpl, oatA, pdgA, plcA, plcB, prfA, prsA2</i> (31)
Pig tonsil (21-LI00527-0)	B	5	II	18	18	<i>actA, ami, aut, bsh, clpC, clpE, clpP, fbpA, gtcA, hly, hpt, iap/cwhA, inlA, inlB, inlC, inlF, inlJ, inlK, lap, lapB, lntA, lpeA, lpA1, lspA, mpl, oatA, pdgA, plcA, plcB, prfA, prsA2, vip</i> (32)
Floor drain (21-LI00513-0)	A	3	II	412	412	<i>actA, ami, aut, bsh, clpC, clpE, clpP, fbpA, gtcA, hly, hpt, iap/cwhA, inlA, inlB, inlC, inlF, inlJ, inlK, lap, lntA, lpeA, lpA1, lspA, mpl, oatA, pdgA, plcA, plcB, prfA, prsA2</i> (30)
Sole of rubber boot (21-LI00517-1)	A	3	II	9	9	<i>actA, ami, aut, bsh, clpC, clpE, clpP, fbpA, gtcA, hly, hpt, iap/cwhA, inlA, inlB, inlC, inlF, inlJ, inlK, lap, lapB, lntA, lpeA, lpA1, lspA, mpl, oatA, pdgA, plcA, plcB, prfA, prsA2, vip</i> (32)

Table 2. Cont.

Sampled Matrix (Sample Number)	Slaughterhouse	Sampling Date	Lineage	MLST ST	MLST CC	Virulence Genes (Total Number)
Floor drain (21-LI00519-0)	A	4	II	412	412	<i>actA, ami, aut, bsh, clpC, clpE, clpP, fbpA, gtcA, hly, hpt, iap/cwhA, inlA, inlB, inlC, inlF, inlJ, inlK, lap, lntA, lpeA, lpA1, lspA, mpl, oatA, pdgA, plcA, plcB, prfA, prsA2</i> (30)
Cutting plant (21-LI00520-0)	A	4	I	5	5	<i>ami, aut, bsh, clpC, clpE, clpP, fbpA, gtcA, hly, hpt, iap/cwhA, inlA, inlB, inlC, inlF, inlK, lap, lapB, lntA, lpeA, lpA1, lspA, mpl, oatA, pdgA, plcA, plcB, prfA, prsA2, vip</i> (30)
Cutting plant (21-LI00521-0)	A	4	I	5	5	<i>ami, aut, bsh, clpC, clpE, clpP, fbpA, gtcA, hly, hpt, iap/cwhA, inlA, inlB, inlC, inlF, inlK, lap, lapB, lntA, lpeA, lpA1, lspA, mpl, oatA, pdgA, plcA, plcB, prfA, prsA2, vip</i> (30)
Processing plant (21-LI00522-0)	A	4	I	6	6	<i>actA, bsh, clpC, clpE, clpP, fbpA, gtcA, hly, hpt, iap/cwhA, inlA, inlB, inlC, inlF, inlK, lap, lapB, llsA, llsB, llsD, llsG, llsH, llsP, llsX, llsY, lntA, lpeA, lpA1, lspA, mpl, oatA, pdgA, plcA, plcB, prfA, prsA2, vip</i> (37)
Processing plant (21-LI00368-0)	A	4	II	20	20	<i>actA, ami, aut, bsh, clpC, clpE, clpP, fbpA, gtcA, hly, hpt, iap/cwhA, inlA, inlB, inlC, inlF, inlJ, inlK, lap, lapB, lntA, lpeA, lpA1, lspA, mpl, oatA, pdgA, plcA, plcB, prfA, prsA2, vip</i> (32)

¹ All the listed isolates showed AMR genes *fosX* and *vgg(G)*, as well as phenotypical resistance to clindamycin and pirlimycin.

3.4. SNP Analyses

The results of the SNP analyses showed great genetic differences between the isolates, consistent with MLST types. Intra-CC diversity showed SNP differences, most likely related to the isolates' epidemiological or evolutionary relationship.

The two *L. monocytogenes* isolates found in the same drain in the slaughter hall of slaughterhouse A on two different dates both belong to CC412 and showed a difference of 62 SNPs, which makes a direct relation unlikely (Figure 1). In the cutting plant, two *L. monocytogenes* isolates found on a conveyor belt and a cutting tool further down the line belong to CC5 and had only one pairwise SNP difference, indicating a possible connection (Figure 1).

The two CC6 isolates found in pig tonsils in slaughterhouse B on the same date but originating from different farms have a pairwise SNP difference of 84, making a direct relation unlikely (Figure 1). In the processing plant of slaughterhouse A, another CC6 isolate was isolated from the meat mincer. The difference in SNPs was 43 to the nearer related CC6 isolate, so no close relationship was assumed. None of the isolated *L. innocua* showed close relationships with one another, as they all differed from each other by more than 90 SNPs (Figure 2).

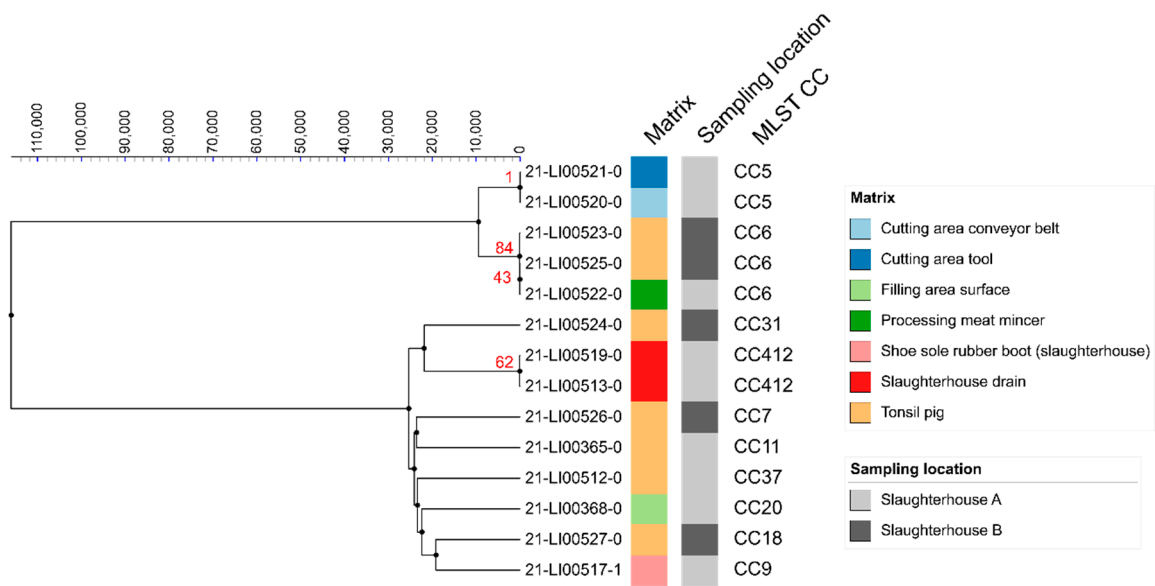


Figure 1. Clustering of 14 *L. monocytogenes* isolates found in pigs and the slaughterhouse environment in a linkage tree with differences of less than 1000 SNPs indicated.

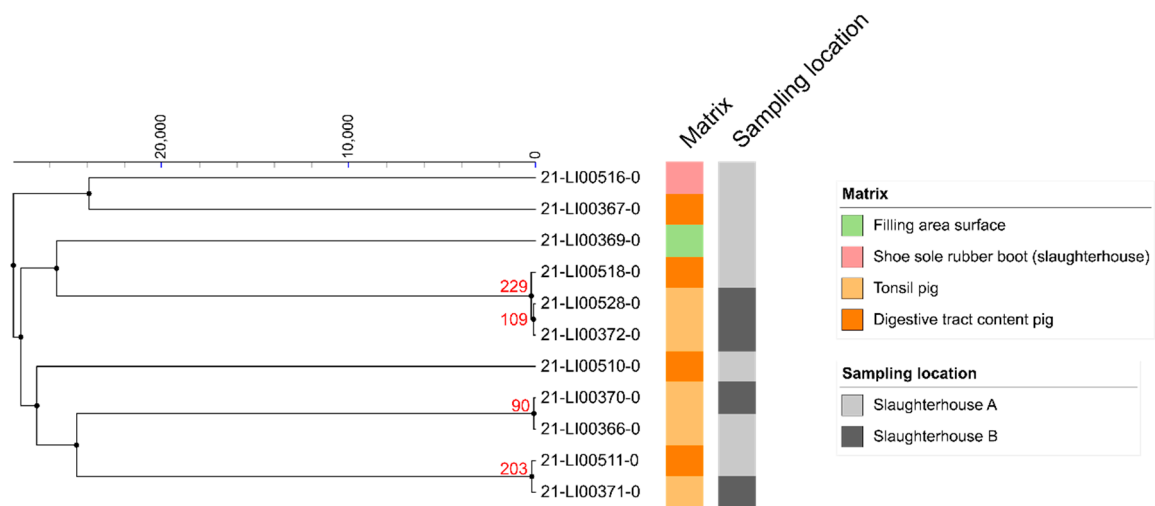


Figure 2. Clustering of 11 *L. innocua* isolates found in pigs and the slaughterhouse environment in a linkage tree with differences of less than 1000 SNPs indicated.

Three clones of *L. welshimeri* isolated from the processing plant (mincer on dates 3 and 4, working surface in filling area on date 3) showed a close relationship to one another, with differences of only three and nine SNPs, respectively (Figure 3).

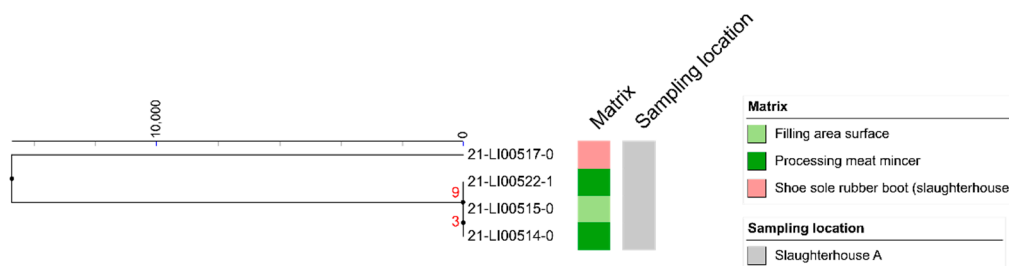


Figure 3. Clustering of 4 *L. welshimeri* isolates found in the slaughterhouse environment in a linkage tree with differences of less than 1000 SNPs indicated.

3.5. Antimicrobial Resistance Genes

All tested *Listeria* spp. isolates carried the AMR gene *fosX* (Tables 2 and 3), which indicates genotypic resistance to fosfomycin.

Table 3. Characteristics of *Listeria* species other than *L. monocytogenes* found in pigs and the slaughterhouse environment.

Sampled Matrix (Laboratory Number)	Slaughterhouse	Sampling Date	Species	AMR Genes	Virulence Genes (Total Number)
Pig intestinal content (21-LI00510-0)	A	1	<i>L. innocua</i>	<i>fosX</i> ; <i>tet(S)</i>	<i>clpC</i> , <i>clpE</i> , <i>clpP</i> , <i>fbpA</i> , <i>gtcA</i> , <i>iap/cwhA</i> , <i>lap</i> , <i>lpeA</i> , <i>lpA1</i> , <i>lspA</i> , <i>oatA</i> , <i>pdgA</i> , <i>prsA2</i> (13)
Pig intestinal content (21-LI00511-0)	A	2	<i>L. innocua</i>	<i>fosX</i>	<i>clpC</i> , <i>clpE</i> , <i>clpP</i> , <i>fbpA</i> , <i>gtcA</i> , <i>iap/cwhA</i> , <i>lap</i> , <i>llsA</i> , <i>llsG</i> , <i>llsH</i> , <i>llsX</i> , <i>lpeA</i> , <i>lpA1</i> , <i>lspA</i> , <i>oatA</i> , <i>pdgA</i> , <i>prsA2</i> (17)
Pig intestinal content (21-LI00518-0)	A	4	<i>L. innocua</i>	<i>fosX</i> ; <i>tet(M)</i>	<i>clpC</i> , <i>clpE</i> , <i>clpP</i> , <i>fbpA</i> , <i>gtcA</i> , <i>iap/cwhA</i> , <i>lap</i> , <i>lpeA</i> , <i>lpA1</i> , <i>lspA</i> , <i>oatA</i> , <i>pdgA</i> , <i>prsA2</i> (13)
Pig intestinal content (21-LI00367-0)	A	4	<i>L. innocua</i>	<i>fosX</i>	<i>clpC</i> , <i>clpE</i> , <i>clpP</i> , <i>fbpA</i> , <i>gtcA</i> , <i>iap/cwhA</i> , <i>lap</i> , <i>llsA</i> , <i>llsG</i> , <i>llsH</i> , <i>llsX</i> , <i>lpeA</i> , <i>lpA1</i> , <i>lspA</i> , <i>oatA</i> , <i>pdgA</i> , <i>prsA2</i> (17)
Pig tonsil (21-LI00366-0)	A	2	<i>L. innocua</i>	<i>fosX</i>	<i>clpC</i> , <i>clpE</i> , <i>clpP</i> , <i>fbpA</i> , <i>gtcA</i> , <i>iap/cwhA</i> , <i>lap</i> , <i>lpeA</i> , <i>lpA1</i> , <i>lspA</i> , <i>oatA</i> , <i>pdgA</i> , <i>prsA2</i> (13)
Pig tonsil (21-LI00528-0)	B	6	<i>L. innocua</i>	<i>fosX</i> ; <i>dfrG</i> ; <i>tet(M)</i> ; <i>ant(6)-Ia</i>	<i>clpC</i> , <i>clpE</i> , <i>clpP</i> , <i>fbpA</i> , <i>gtcA</i> , <i>iap/cwhA</i> , <i>lap</i> , <i>lpeA</i> , <i>lpA1</i> , <i>lspA</i> , <i>oatA</i> , <i>pdgA</i> , <i>prsA2</i> (13)
Pig tonsil (21-LI00370-0)	B	6	<i>L. innocua</i>	<i>fosX</i>	<i>clpC</i> , <i>clpE</i> , <i>clpP</i> , <i>fbpA</i> , <i>gtcA</i> , <i>iap/cwhA</i> , <i>lap</i> , <i>lpeA</i> , <i>lpA1</i> , <i>lspA</i> , <i>oatA</i> , <i>pdgA</i> , <i>prsA2</i> (13)
Pig tonsil (21-LI00371-0)	B	6	<i>L. innocua</i>	<i>fosX</i>	<i>clpC</i> , <i>clpE</i> , <i>clpP</i> , <i>fbpA</i> , <i>gtcA</i> , <i>iap/cwhA</i> , <i>lap</i> , <i>llsA</i> , <i>llsG</i> , <i>llsH</i> , <i>llsX</i> , <i>lpeA</i> , <i>lpA1</i> , <i>lspA</i> , <i>oatA</i> , <i>pdgA</i> , <i>prsA2</i> (17)
Pig tonsil (21-LI00372-0)	B	6	<i>L. innocua</i>	<i>fosX</i> ; <i>tet(M)</i> ; <i>ant(6)-Ia</i>	<i>clpC</i> , <i>clpE</i> , <i>clpP</i> , <i>fbpA</i> , <i>gtcA</i> , <i>iap/cwhA</i> , <i>lap</i> , <i>lpeA</i> , <i>lpA1</i> , <i>lspA</i> , <i>oatA</i> , <i>pdgA</i> , <i>prsA2</i> (13)
Processing plant (21-LI00514-0)	A	3	<i>L. welshimeri</i>	<i>fosX</i>	<i>clpC</i> , <i>clpE</i> , <i>clpP</i> , <i>fbpA</i> , <i>lap</i> , <i>lpeA</i> , <i>lpA1</i> , <i>lspA</i> , <i>prsA2</i> (9)
Processing plant (21-LI00515-0)	A	3	<i>L. welshimeri</i>	<i>fosX</i>	<i>clpC</i> , <i>clpE</i> , <i>clpP</i> , <i>fbpA</i> , <i>lap</i> , <i>lpeA</i> , <i>lpA1</i> , <i>lspA</i> , <i>prsA2</i> (9)
Sole of rubber boot (21-LI00516-0)	A	3	<i>L. innocua</i>	<i>fosX</i>	<i>clpC</i> , <i>clpE</i> , <i>clpP</i> , <i>fbpA</i> , <i>gtcA</i> , <i>iap/cwhA</i> , <i>lap</i> , <i>llsA</i> , <i>llsG</i> , <i>llsH</i> , <i>lpeA</i> , <i>lpA1</i> , <i>lspA</i> , <i>oatA</i> , <i>pdgA</i> , <i>prsA2</i> (16)
Sole of rubber boot (21-LI00517-0)	A	3	<i>L. welshimeri</i>	<i>fosX</i>	<i>clpC</i> , <i>clpE</i> , <i>clpP</i> , <i>fbpA</i> , <i>lap</i> , <i>lpeA</i> , <i>lpA1</i> , <i>lspA</i> , <i>prsA2</i> (9)
Processing plant (21-LI00522-1)	A	4	<i>L. welshimeri</i>	<i>fosX</i> ; <i>vga(G)</i>	<i>clpC</i> , <i>clpE</i> , <i>clpP</i> , <i>fbpA</i> , <i>lap</i> , <i>lpeA</i> , <i>lpA1</i> , <i>lspA</i> , <i>prsA2</i> (9)
Processing plant (21-LI00369-0)	A	4	<i>L. innocua</i>	<i>fosX</i>	<i>clpC</i> , <i>clpE</i> , <i>clpP</i> , <i>fbpA</i> , <i>gtcA</i> , <i>iap/cwhA</i> , <i>lap</i> , <i>llsA</i> , <i>llsG</i> , <i>llsH</i> , <i>llsX</i> , <i>lpeA</i> , <i>lpA1</i> , <i>lspA</i> , <i>oatA</i> , <i>pdgA</i> , <i>prsA2</i> (17)

In addition, all the *L. monocytogenes* isolates carried the gene *vga(G)*, which confers resistance to lincosamides, streptogramin A antimicrobial agents and possibly pleuromutilins [40,41]. This gene has previously been referred to as *lmo0919* [40] and was later tentatively designated *vga(L)* [41]. The designation *vga(G)* was recently approved by the Nomenclature Center for Macrolide–Lincosamide–Streptogramin (MLS) Genes (<https://faculty.washington.edu/marilynr/>; accessed on 9 December 2021). As all *L. monocytogenes* share the same AMR genes, *fosX* and *vga(G)*, and there was no difference in AMR gene content between *L. monocytogenes* of lineage I and II.

Among the 11 *L. innocua* isolates, seven harbored only the *fosX* resistance gene, whereas two isolates carried two, one isolate carried three and one isolate carried four AMR genes. One of these additional resistance genes was the gene *tet(S)*, which codes for resistance to the tetracyclines doxycycline, tetracycline and minocycline. Three isolates carried the *tet(M)* gene, which confers the same resistance phenotype as *tet(S)*. Two of these isolates additionally had the streptomycin resistance gene *ant(6)-Ia*, also known as *ant6* or *aadE*. One isolate harbored the trimethoprim resistance gene *dfpG* as a fourth resistance gene.

In one *L. welshimeri* isolate, the resistance gene *vga(G)* was found in addition to the *fosX* gene.

3.6. Virulence Genes

All *L. monocytogenes* isolates found in our study harbored the major virulence genes *prfA*, *plcA*, *hly*, *mpl*, *plcB*, *inlA* and *inlB*. Three isolates—two CC5s found in the cutting plant and one CC31 in a pig tonsil—carried a truncated version of *actA*. The truncation was of 1024/1920 nt and 1026/1920 nt for CC5 and CC31 strains, respectively, compared to EGD-e *actA* (NCBI gene ID: 987035). The gene *actA* is one of the major virulence genes of pathogenicity island 1. Tables 2 and 3 list the virulence genes for each isolate.

Neither *L. innocua* nor *L. welshimeri* isolates in this study showed any of the abovementioned major virulence genes.

3.7. Antimicrobial Susceptibility Testing Results

The results of antimicrobial susceptibility testing of 14 *L. monocytogenes* isolates are listed in Table 4. All tested isolates were susceptible to penicillin, ampicillin, erythromycin, ciprofloxacin, gentamicin, streptomycin, neomycin, tetracycline, sulfamethoxazole/trimethoprim and vancomycin. For amoxicillin/clavulanic acid, 57% ($n = 8$) of the *L. monocytogenes* isolates tested susceptible, whereas 43% ($n = 6$) were classified as intermediate. All isolates, except of one intermediate isolate, were susceptible to the fluoroquinolone enrofloxacin according to the clinical breakpoints for staphylococci in VET01S. The majority (86%, $n = 12$) of the isolates tested susceptible for marbofloxacin, another fluoroquinolone, two isolates (14%) were classified as intermediate and 11 isolates (79%) had intermediate results recorded for doxycycline, whereas only 21% ($n = 3$) were susceptible. Using the clinical breakpoints for staphylococci in the CLSI documents M100 or VET01S, all tested isolates proved to be resistant to the lincosamides clindamycin and pirlimycin, which is in agreement with the carriage of the resistance gene *vga(G)*.

Table 4. Susceptibility testing results of the 14 *L. monocytogenes* isolates for antimicrobial agents with existing clinical breakpoints.

Antimicrobial Agent(s)	Susceptible		Intermediate		Resistant	
	no.	%	no.	%	no.	%
Penicillin	14	100	0	0	0	0
Ampicillin	14	100	0	0	0	0
Amoxicillin/clavulanic acid	8	57	6	43	0	0
Erythromycin	14	100	0	0	0	0
Clindamycin	0	0	0	0	14	100
Pirlimycin	0	0	0	0	14	100
Ciprofloxacin	14	100	0	0	0	0
Enrofloxacin	13	93	1	7	0	0
Marbofloxacin	12	86	2	14	0	0
Gentamicin	14	100	0	0	0	0
Streptomycin	14	100	0	0	0	0
Neomycin	14	100	0	0	0	0
Tetracycline	14	100	0	0	0	0
Doxycycline	3	21	11	79	0	0
Sulfamethoxazole/trimethoprim	14	100	0	0	0	0
Vancomycin	14	100	0	0	0	0

4. Discussion

We were able to demonstrate a wide distribution of *Listeria* spp.-positive samples within the slaughterhouse and the associated meat production chain, with only five out of 29 *Listeria* spp. isolates being genetically related, including two *L. monocytogenes* and three *L. welshimeri* isolates, in contrast to 24 *Listeria* spp. isolates not being genetically related. This assumes several different sources of entry along the slaughter and processing line. Isolates of *L. monocytogenes* were found in pig tonsil samples, as well as in the slaughter, cutting and processing environment. *L. innocua* was isolated in samples of pig intestinal content, whereas isolates of *L. welshimeri*, in contrast, were only present in samples from the slaughter and processing environment.

In our study, equipment in the slaughter hall was not found to be a carrier of *Listeria* spp., whereas isolates were detected on the soles of rubber boots worn within the slaughter hall. Positive samples in floor drains support the risk of spreading clones within the slaughterhouse via boots or via air during washdown. Berrang and Frank [42] showed that contaminated floor drains in poultry processing plants can be the source of airborne spread of *Listeria* and can cross-contaminate food contact surfaces, equipment, and exposed products. Therefore, the authors recommended that workers act with caution so as to not spray hoses directly into drains.

Maury et al. [27] grouped prevalent CC types into food-associated (CC9 and CC121), infection-associated (CC1, CC2, CC4 and CC6) and intermediate clonal complexes (others), with various origins. In our study, infection-associated isolates (belonging to CC6) were found in two pig tonsil samples originating from separate farms. We found another CC6 isolate in the mincer, which constitutes a threat for the consumer if products get contaminated. These isolates have the same CC but differences in SNPs, which indicates no close relationship. Therefore, we were not able to detect a direct connection between isolates found in pigs and along the slaughter, cutting and processing chain. CC6 and CC5, which we found in the cutting environment, were considered by Félix et al. [24] to be ubiquitous and evenly spread CCs in the pork production chain. In another study, Maury et al. [43] suggested that hypovirulent isolates belonging to CC9 and CC121 are better adapted to the food processing environment, whereas hypervirulent isolates of CC6 are better adapted to the mammalian gut environment. CC9 and CC121 were both reported as the most frequent CCs in the pork processing environment, confirming their adaptation to the conditions of the production environment [24,44]. Demaître et al. [25] suggested the continuous introduction and repeated contamination with the most common CCs via

incoming carcasses and/or that they persist in the concerned cutting plants, likely by genetic determinants contributing to their establishment. We found no CC121 isolate in our study and one CC9 isolate on a sole of a rubber boot. Félix et al. [24] connected CC9 to raw meat processing, from which isolates of this CC may have originated. On a rubber boot, isolates can be easily distributed throughout the whole slaughterhouse and possibly contaminate food. Our finding of a CC37 isolate in a pig tonsil is in accordance with the results of Félix et al. [24], who reported that this CC type is better adapted to pig farms than to the pork production environment. CC11 (ST451) is considered a hypervirulent clonal complex specific to central Europe, as it is found frequently there, mainly in dairy but also in meat products [45], and has also been reported as the cause of human listeriosis cases in Germany [46]. We found one CC11 isolate in a pig tonsil in slaughterhouse A. These findings highlight the potential risk of pigs as a source of pathogenic *L. monocytogenes* in food, as also other studies have suggested [47,48]. Looking at the SNP results, we found closely related *L. monocytogenes* distributed in the cutting plant, indicating a carryover along the processing line, from the conveyor belt to a cutting tool further down the cutting line.

In the processing plant, two *L. welshimeri* clones isolated on date 3 indicate a cross-contamination from a working surface to the mincer. On date 4, the same clone was again isolated from the same mincer. Despite daily disinfection, this clone showed a persistence over a period of two months, or it was reintroduced from the same source. Stoller et al. [49] showed a possible persistence of *L. monocytogenes* isolates belonging to CC9, CC121 and CC204 in meat production plants for at least four years, suggesting disinfectant failures and biofilm formation of the pathogen as possible causes of persistence. Even though *L. welshimeri* is considered non-pathogenic [50], it has similar growth characteristics and can thereby be considered a model of distribution for *L. monocytogenes* [28] and illustrate the risk of persistence and cross contamination in the slaughterhouse environment.

The virulence genes analyzed support the pathogenicity of 11 out of the 14 *L. monocytogenes* isolates found in this study. The three exceptions were due to the truncation of the *actA*, as recently described [51]. The *actA* gene plays a role in intracellular motility and intercellular spreading, a key determinant of *L. monocytogenes* virulence [52]. Domann et al. [52] demonstrated that strains without this gene are incapable of infecting adjacent cells and are distinctly less virulent. In our study, two CC5 isolates found in the cutting plant and a CC31 isolate found in a pig tonsil in slaughterhouse B harbored only a truncated rather than the full-length gene.

All *L. innocua* and *L. welshimeri* isolates found in this study can be considered non-pathogenic. In contrast, atypical, pathogenic *L. innocua* isolates able to cause human disease were shown to have the genes encoding for the pathogenicity island 1 and *inlA* [53]. A study in Brazil [54] found such isolates in the environment of pork processing plants.

The genotypic AMR results showed fosfomycin resistance in all *Listeria* spp. isolates, which is not remarkable, as intrinsic resistance is known [31]. In addition, in all *L. monocytogenes* isolates, a genotypic resistance to lincosamides was found, which has been shown to be a common native resistance in *L. monocytogenes* [33]. Four *L. innocua* isolates in our study had a genetic resistance to tetracyclines, and two were also resistant to the aminoglycoside streptomycin. In addition, one isolate had a fourth resistance gene determining trimethoprim resistance. The *L. innocua* isolates with multiple resistance genes in our study all originated from samples from pigs. Tetracycline is one of the most often used antimicrobial agents in pig production in Germany, and aminoglycosides are also commonly used [55]; therefore, subinhibitory levels of these antimicrobials may be expected in the gastrointestinal tract and promote the occurrence of resistances [33]. Consequently, *L. innocua* isolates can be of concern, as reservoirs of these antimicrobial resistance genes can be transferred to *L. monocytogenes*, for example, in the gastrointestinal tract.

The MIC values of the *L. monocytogenes* isolates of this study provide information about the phenotypic situation of resistance against antimicrobial agents. However, our interpretation of these values was limited, as specific clinical breakpoints for *L. monocytogenes* do not exist for all antimicrobial agents. Therefore, we used existing clinical breakpoints

for erythromycin, clindamycin, ciprofloxacin, gentamicin, tetracycline and vancomycin that are applicable to staphylococci, although not necessarily for staphylococci of porcine origin. As a consequence, the classifications obtained with these breakpoints have to be considered with caution. No *L. monocytogenes* isolate in our study showed a phenotypic resistance against antimicrobial agents commonly used for treatment of human listeriosis, including ampicillin or penicillin alone or in combination with gentamicin, whereas for patients allergic to β -lactams, the combination of trimethoprim and a sulfonamide is recommended. For treatment of listeriosis in pregnant woman, erythromycin is usually used, whereas bacteraemia is usually treated with vancomycin. Other antimicrobial agents, such as rifampicin, tetracycline, chloramphenicol and fluoroquinolones are used to a lesser extent [56]. A small percentage of isolates in our study were classified as intermediate, and no isolate was shown to be resistant. However, Alonso-Hernando et al. [56] reported increasing resistances to the fluoroquinolones enrofloxacin and ciprofloxacin and other antimicrobial agents, such as gentamicin, which is commonly used for treating human listeriosis. These emerging resistances, particularly multidrug resistances, represent a public health concern, as they may result in unsuccessful treatment of human disease cases [33].

5. Conclusions

In this study, we analyzed *Listeria* spp. isolates in the pork production chain, beginning from tonsils and intestinal content of fattening pigs, through the slaughter hall to the cutting and the processing plant in Germany. We found 14 *L. monocytogenes* isolates belonging to ten different clonal complexes. The isolates found in floor drains risk cross-contamination of pork products. Closely related isolates were identified in the cutting plant, suggesting contamination along the cutting line. Additionally, we found hypervirulent CC6 isolates of *L. monocytogenes*, known for causing a high risk of human listeriosis, in pig tonsils, which verifies pigs as a potential entry source into pork products. Closely related *L. welshimeri* isolates found on a working surface and in a nearby mincer on two different sampling dates indicate a risk of cross-contamination and persistence of *Listeria* spp. over a longer period. This highlights the importance of proper cleaning and disinfection procedures.

In our study, *L. monocytogenes* isolates were found to have a low level of antimicrobial resistance, as demonstrated by genotypical analyses and phenotypical antimicrobial resistance tests. No isolate of *L. monocytogenes* from pigs or the slaughterhouse environment showed resistance to commonly used antimicrobials for treatment of human listeriosis. However, we found non-pathogenic *L. innocua* had multiple resistance genes, which poses a risk for public health, as bacteria are able to pass on their resistance genes to related and unrelated species through horizontal transfer mechanisms. Therefore, monitoring of the resistance situation of non-pathogenic species is also required.

In conclusion, for the successful control and treatment of human listeriosis, an one health approach is needed, considering the origin of the food contamination and possible causes of resistances.

Author Contributions: Conceptualization, D.M., V.O. and S.L. (Susann Langforth); methodology, V.O., S.L. (Susann Langforth), S.S., A.T.F. and S.L. (Stefanie Lüth); validation, B.F. and S.L. (Stefanie Lüth); formal analysis, V.O., D.M., S.L. (Susann Langforth), B.F. and S.L. (Stefanie Lüth); investigation, V.O., J.D., A.T.F., S.L. (Stefanie Lüth); resources, D.M., S.S. and B.F.; data curation, V.O., S.L. (Stefanie Lüth), A.T.F. and B.F.; writing—original draft preparation, V.O.; writing—review and editing, all authors; visualization, S.L. (Stefanie Lüth), V.O., S.S. and A.T.F.; supervision, D.M. and S.L. (Susann Langforth); project administration, D.M., S.L. (Susann Langforth) and V.O.; funding acquisition, D.M. and V.O. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by the QS Qualität und Sicherheit GmbH science fund, Freie Universität Berlin Contract Number: 2018000308. We acknowledge support by the Open Access Publication Fund of the Freie Universität Berlin.

Institutional Review Board Statement: Not applicable as no interventions or handling of live animals were conducted in this study.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: The raw NGS data can be found for downloading at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/sra/PRJNA797842>; accessed on 23 January 2022 (BioProject accession number PRJNA797842).

Acknowledgments: The authors thank the slaughterhouses for their cooperation in sampling and the Institut Pasteur teams for curation and maintenance of BIGSdb-Pasteur databases at <http://bigsdatabases.pasteur.fr/>; accessed on 23 January 2022. A big thank you to the whole team of the working group Meat Hygiene, FU Berlin for the laboratory work and help in sampling. Furthermore, many thanks to Jan-Robin Redel at the German Federal Institute for Risk Assessment for his technical assistance and Yves van der Stede from EFSA for his critical comments on the draft article. The publication of this article was funded by Freie Universität Berlin.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript, or in the decision to publish the results. This work is presenting the author's own views and does not represent an EFSA position.

References

1. Buchanan, R.L.; Gorris, L.; Hayman, M.M.; Jackson, T.C.; Whiting, R.C. A review of *Listeria monocytogenes*: An update on outbreaks, virulence, dose-response, ecology, and risk assessments. *Food Control* **2017**, *75*, 1–13. [[CrossRef](#)]
2. Leclercq, A.; Moura, A.; Vales, G.; Tessaud-Rita, N.; Aguilhon, C.; Lecuit, M. *Listeria thailandensis* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **2019**, *69*, 74–81. [[CrossRef](#)]
3. Orsi, R.H.; den Bakker, H.C.; Wiedmann, M. *Listeria monocytogenes* lineages: Genomics, evolution, ecology, and phenotypic characteristics. *Int. J. Med. Microbiol.* **2011**, *301*, 79–96. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Perrin, M.; Bemer, M.; Delamare, C. Fatal Case of *Listeria innocua* Bacteremia. *J. Clin. Microbiol.* **2003**, *41*, 5308–5309. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Favaro, M.; Sarmati, L.; Sancesario, G.; Fontana, C. First case of *Listeria innocua* meningitis in a patient on steroids and eternecept. *JMM Case Rep.* **2014**, *1*, e003103. [[CrossRef](#)]
6. Rocourt, J.; Hof, H.; Schrettenbrunner, A.; Malinverni, R.; Bille, J. Méningite purulente aiguë à *Listeria seeligeri* chez un adulte immunocompétent. *Schweiz. Med. Wochenschr.* **1986**, *116*, 248–251. (In French)
7. Liu, D.; Lawrence, M.L.; Wiedmann, M.; Gorski, L.; Mandrell, R.E.; Ainsworth, A.J.; Austin, F.W. *Listeria monocytogenes* Subgroups IIIA, IIIB, and IIIC Delineate Genetically Distinct Populations with Varied Pathogenic Potential. *J. Clin. Microbiol.* **2006**, *44*, 4229–4233. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
8. Ward, T.J.; Ducey, T.; Usgaard, T.; Dunn, K.; Bielawski, J. Multilocus Genotyping Assays for Single Nucleotide Polymorphism-Based Subtyping of *Listeria monocytogenes* Isolates. *Appl. Environ. Microbiol.* **2008**, *74*, 7629–7642. [[CrossRef](#)]
9. Rasmussen, O.F.; Skouboe, P.; Dons, L.; Rossen, L.; Olsen, J.E. *Listeria monocytogenes* exists in at least three evolutionary lines: evidence from flagellin, invasive associated protein and listeriolysin O genes. *Microbiology* **1995**, *141*, 2053–2061. [[CrossRef](#)]
10. Roberts, A.; Nightingale, K.; Jeffers, G.; Fortes, E.; Kongo, J.M.; Wiedmann, M. Genetic and phenotypic characterization of *Listeria monocytogenes* lineage III. *Microbiology* **2006**, *152*, 685–693. [[CrossRef](#)]
11. Allerberger, F.; Huhulescu, S. Pregnancy related listeriosis: treatment and control. *Expert Rev. Anti-Infect. Ther.* **2014**, *13*, 395–403. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Ragon, M.; Wirth, T.; Hollandt, F.; Lavenir, R.; Lecuit, M.; Le Monnier, A.; Brisse, S. A New Perspective on *Listeria monocytogenes* Evolution. *PLOS Pathog.* **2008**, *4*, e1000146. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Salcedo, C.; Arreaza, L.; Alcalá, B.; de la Fuente, L.; Vázquez, J.A.; Kazor, C.E.; Mitchell, P.M.; Lee, A.M.; Stokes, L.N.; Loesche, W.J.; et al. Development of a Multilocus Sequence Typing Method for Analysis of *Listeria monocytogenes* Clones. *J. Clin. Microbiol.* **2003**, *41*, 558–563. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Chenal-Francisque, V.; Lopez, J.; Cantinelli, T.; Caro, V.; Tran, C.; Leclercq, A.; Lecuit, M.; Brisse, S. Worldwide Distribution of Major Clones of *Listeria monocytogenes*. *Emerg. Infect. Dis.* **2011**, *17*, 1110–1112. [[CrossRef](#)]
15. Iida, T.; Kanzaki, M.; Nakama, A.; Kokubo, Y.; Maruyama, T.; Kaneuchi, C. Detection of *Listeria monocytogenes* in Humans, Animals and Foods. *J. Veter.- Med Sci.* **1998**, *60*, 1341–1343. [[CrossRef](#)]
16. Kanuganti, S.R.; Wesley, I.V.; Reddy, P.G.; Mckean, J.; Hurd, H.S. Detection of *Listeria monocytogenes* in Pigs and Pork. *J. Food Prot.* **2002**, *65*, 1470–1474. [[CrossRef](#)]
17. Hellström, S.; Laukkanen-Ninios, R.; Siekkinen, K.-M.; Ranta, J.; Maijala, R.; Korkeala, H. *Listeria monocytogenes* Contamination in Pork Can Originate from Farms. *J. Food Prot.* **2010**, *73*, 641–648. [[CrossRef](#)]
18. Oswaldi, V.; Dzierzon, J.; Thieme, S.; Merle, R.; Meemken, D. Slaughter pigs as carrier of *Listeria monocytogenes* in Germany. *J. Consum. Prot. Food Saf.* **2021**, *16*, 109–115. [[CrossRef](#)]

19. Figueroa-López, A.M.; Maldonado-Mendoza, I.; López-Cervantes, J.; Verdugo-Fuentes, A.A.; Ruiz-Vega, D.A.; Cantú-Soto, E.U. Prevalence and characterization of *Listeria monocytogenes* isolated from pork meat and on inert surfaces. *Braz. J. Microbiol.* **2019**, *50*, 817–824. [[CrossRef](#)]
20. Wang, Y.; Ji, Q.; Li, S.; Liu, M. Prevalence and Genetic Diversity of *Listeria monocytogenes* Isolated from Retail Pork in Wuhan, China. *Front. Microbiol.* **2021**, *12*, 459. [[CrossRef](#)]
21. Duranti, A.; Sabbatucci, M.; Blasi, G.; Acciari, V.A.; Ancora, M.; Bella, A.; Busani, L.; Centorame, P.; Cammà, C.; Conti, F.; et al. A severe outbreak of listeriosis in central Italy with a rare pulsotype associated with processed pork products. *J. Med. Microbiol.* **2018**, *67*, 1351–1360. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Giovannacci, I.; Ragimbeau, C.; Queguiner, S.; Salvat, G.; Vendevre, J.-L.; Carlier, V.; Ermel, G. *Listeria monocytogenes* in pork slaughtering and cutting plants: use of RAPD, PFGE and PCR-REA for tracing and molecular epidemiology. *Int. J. Food Microbiol.* **1999**, *53*, 127–140. [[CrossRef](#)]
23. Boerlin, P.; Piffaretti, J.C. Typing of human, animal, food, and environmental isolates of *Listeria monocytogenes* by multilocus enzyme electrophoresis. *Appl. Environ. Microbiol.* **1991**, *57*, 1624–1629. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Félix, B.; Feurer, C.; Maillet, A.; Guillier, L.; Boscher, E.; Kerouanton, A.; Denis, M.; Roussel, S. Population Genetic Structure of *Listeria monocytogenes* Strains Isolated from the Pig and Pork Production Chain in France. *Front. Microbiol.* **2018**, *9*, 684. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Demaître, N.; Rasschaert, G.; De Zutter, L.; Geeraerd, A.; De Reu, K. Genetic *Listeria monocytogenes* Types in the Pork Processing Plant Environment: from Occasional Introduction to Plausible Persistence in Harborage Sites. *Pathogens* **2021**, *10*, 717. [[CrossRef](#)]
26. Deurenberg, R.H.; Bathoorn, E.; Chlebowicz, M.A.; Couto, N.; Ferdous, M.; García-Cobos, S.; Kooistra-Smid, A.M.; Raangs, E.C.; Rosema, S.; Veloo, A.C.; et al. Application of next generation sequencing in clinical microbiology and infection prevention. *J. Biotechnol.* **2016**, *243*, 16–24. [[CrossRef](#)]
27. Maury, M.M.; Tsai, Y.-H.; Charlier, C.; Touchon, M.; Chenal-Francisque, V.; Leclercq, A.; Criscuolo, A.; Gaultier, C.; Roussel, S.; Brisabois, S.R.A.; et al. Uncovering *Listeria monocytogenes* hypervirulence by harnessing its biodiversity. *Nat. Genet.* **2016**, *48*, 308–313. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Orsi, R.H.; Wiedmann, M. Characteristics and distribution of *Listeria* spp., including *Listeria* species newly described since 2009. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2016**, *100*, 5273–5287. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Buchrieser, C.; Rusniok, C.; Kunst, F.; Cossart, P.; Glaser, P. The *Listeria* Consortium Comparison of the genome sequences of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua*: clues for evolution and pathogenicity. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **2003**, *35*, 207–213. [[CrossRef](#)]
30. Teuber, M. Spread of antibiotic resistance with food-borne pathogens. *Exp.* **1999**, *56*, 755–763. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
31. Troxler, R.; von Graevenitz, A.; Funke, G.; Wiedemann, B.; Stock, I. Natural antibiotic susceptibility of *Listeria* species: *L. grayi*, *L. innocua*, *L. ivanovii*, *L. monocytogenes*, *L. seeligeri* and *L. welshimeri* strains. *Clin. Microbiol. Infect.* **2000**, *6*, 525–535. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Poyart, C.; Carlier, C.; Trieu-Cuot, P.; Courvalin, P.; Courtieu, A.-L. Transferable plasmid-mediated antibiotic resistance in *Listeria monocytogenes*. *Lancet* **1990**, *335*, 1422–1426. [[CrossRef](#)]
33. Olaimat, A.N.; Al-Holy, M.A.; Shahbaz, H.M.; Al-Nabulsi, A.A.; Abu Ghoush, M.H.; Osaili, T.M.; Ayyash, M.M.; Holley, R.A. Emergence of Antibiotic Resistance in *Listeria monocytogenes* Isolated from Food Products: A Comprehensive Review. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* **2018**, *17*, 1277–1292. [[CrossRef](#)]
34. Deneke, C.; Brendebach, H.; Uelze, L.; Borowiak, M.; Malorny, B.; Tausch, S. Species-Specific Quality Control, Assembly and Contamination Detection in Microbial Isolate Sequences with AQUAMIS. *Genes* **2021**, *12*, 644. [[CrossRef](#)]
35. Letunic, I.; Bork, P. Interactive Tree of Life (iTOL) v4: Recent updates and new developments. *Nucleic Acids Res.* **2019**, *47*, W256–W259. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. CLSI. *Methods for Antimicrobial Susceptibility Testing of Infrequently Isolated or Fastidious Bacteria Isolated from Animals*, VET06, 1st ed.; Clinical and Laboratory Standards Institute: Wayne, PA, USA, 2017.
37. CLSI. *Methods for Antimicrobial Dilution and Disk Susceptibility Testing of Infrequently Isolated or Fastidious Bacteria*, M45, 3rd ed.; Clinical and Laboratory Standards Institute: Wayne, PA, USA, 2016.
38. CLSI. *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing*, M100, 31st ed.; Clinical and Laboratory Standards Institute: Wayne, PA, USA, 2021.
39. CLSI. *Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated from Animals*, VET01S, 5th ed.; Clinical and Laboratory Standards Institute: Wayne, PA, USA, 2020.
40. Chesneau, O.; Ligeret, H.; Hosan-Aghaie, N.; Morvan, A.; Dassa, E. Molecular Analysis of Resistance to Streptogramin A Compounds Conferred by the Vga Proteins of Staphylococci. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2005**, *49*, 973–980. [[CrossRef](#)]
41. Crowe-McAuliffe, C.; Murina, V.; Turnbull, K.J.; Kasari, M.; Mohamad, M.; Polte, C.; Takada, H.; Vaitkevicius, K.; Johansson, J.; Ignatova, Z.; et al. Structural basis of ABCF-mediated resistance to pleuromutilin, lincosamide, and streptogramin A antibiotics in Gram-positive pathogens. *Nat. Commun.* **2021**, *12*, 1–14. [[CrossRef](#)]
42. Berrang, M.E.; Frank, J.F. Generation of Airborne *Listeria innocua* from Model Floor Drains. *J. Food Prot.* **2012**, *75*, 1328–1331. [[CrossRef](#)]

43. Maury, M.M.; Bracq-Dieye, H.; Huang, L.; Vales, G.; Lavina, M.; Thouvenot, P.; Disson, O.; Leclercq, A.; Brisse, S.; Lecuit, M. Hypervirulent *Listeria monocytogenes* clones' adaption to mammalian gut accounts for their association with dairy products. *Nat. Commun.* **2019**, *10*, 1–13. [[CrossRef](#)]
44. Martin, B.; Perich, A.; Gómez, D.; Yangüela, J.; Rodríguez, A.; Garriga, M.; Aymerich, T. Diversity and distribution of *Listeria monocytogenes* in meat processing plants. *Food Microbiol.* **2014**, *44*, 119–127. [[CrossRef](#)]
45. Kubicová, Z.; Roussel, S.; Félix, B.; Cabanová, L. Genomic Diversity of *Listeria monocytogenes* Isolates from Slovakia (2010 to 2020). *Front. Microbiol.* **2021**, *12*, 3223. [[CrossRef](#)]
46. Halbedel, S.; Prager, R.; Fuchs, S.; Trost, E.; Werner, G.; Flieger, A. Whole-Genome Sequencing of Recent *Listeria monocytogenes* Isolates from Germany Reveals Population Structure and Disease Clusters. *J. Clin. Microbiol.* **2018**, *56*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Meloni, D.; Piras, F.; Mureddu, A.; Fois, F.; Consolati, S.G.; Lamon, S.; Mazzette, R. *Listeria monocytogenes* in Five Sardinian Swine Slaughterhouses: Prevalence, Serotype, and Genotype Characterization. *J. Food Prot.* **2013**, *76*, 1863–1867. [[CrossRef](#)]
48. Larivière-Gauthier, G.; Letellier, A.; Kérouanton, A.; Bekal, S.; Quessy, S.; Fournaise, S.; Fravallo, P. Analysis of *Listeria monocytogenes* Strain Distribution in a Pork Slaughter and Cutting Plant in the Province of Quebec. *J. Food Prot.* **2014**, *77*, 2121–2128. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
49. Stoller, A.; Stevens, M.J.A.; Stephan, R.; Guldemann, C. Characteristics of *Listeria Monocytogenes* Strains Persisting in a Meat Processing Facility over a 4-Year Period. *Pathogens* **2019**, *8*, 32. [[CrossRef](#)]
50. Zakrzewski, A.J.; Chajęcka-Wierzchowska, W.; Zadernowska, A.; Podlasz, P. Virulence Characterization of *Listeria monocytogenes*, *Listeria innocua*, and *Listeria welshimeri* Isolated from Fish and Shrimp Using In Vivo Early Zebrafish Larvae Models and Molecular Study. *Pathogens* **2020**, *9*, 1028. [[CrossRef](#)]
51. Lake, F.B.; van Overbeek, L.S.; Baars, J.J.; Koomen, J.; Abee, T.; Besten, H.M.D. Genomic characteristics of *Listeria monocytogenes* isolated during mushroom (*Agaricus bisporus*) production and processing. *Int. J. Food Microbiol.* **2021**, *360*, 109438. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
52. Domann, E.; Wehland, J.; Rohde, M.; Pistor, S.; Hartl, M.; Goebel, W.; Leimeister-Wächter, M.; Wuenscher, M.; Chakraborty, T. A novel bacterial virulence gene in *Listeria monocytogenes* required for host cell microfilament interaction with homology to the proline-rich region of vinculin. *EMBO J.* **1992**, *11*, 1981–1990. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Volokhov, D.V.; Duperrier, S.; Neverov, A.A.; George, J.; Buchrieser, C.; Hitchins, A.D. The Presence of the Internalin Gene in Natural Atypically Hemolytic *Listeria innocua* Strains Suggests Descent from *L. monocytogenes*. *Appl. Environ. Microbiol.* **2007**, *73*, 1928–1939. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Moreno, L.Z.; Paixão, R.; Gobbi, D.D.; Raimundo, D.C.; Ferreira, T.P.; Hofer, E.; Matte, M.H.; Moreno, A.M. Characterization of atypical *Listeria innocua* isolated from swine slaughterhouses and meat markets. *Res. Microbiol.* **2012**, *163*, 268–271. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. QS—Qualitätssicherung. 2. Statusbericht zum Antibiotikamonitoring im QS-System. 2019. Available online: https://www.q-s.de/services/files/mediencenter/publikationen/statusbericht-antibiotika/Statusbericht_QS-Antibiotikamonitoring_2019.pdf (accessed on 14 November 2021). (In German).
56. Alonso-Hernando, A.; Prieto, M.; García-Fernández, C.; Alonso-Calleja, C.; Capita, R. Increase over time in the prevalence of multiple antibiotic resistance among isolates of *Listeria monocytogenes* from poultry in Spain. *Food Control* **2012**, *23*, 37–41. [[CrossRef](#)]

4 Übergreifende Diskussion

Die Ergebnisse dieser Studie zeigen eine geringe Prävalenz von *Listeria* spp. in Mastschweinen im Vergleich zum höheren Vorkommen des Bakteriums in der untersuchten Schlachthofumgebung. Die geringe Anzahl von Carriertieren spricht für einen hohen hygienischen Standard der Herkunftsbetriebe in den beiden untersuchten Regionen Deutschlands, die eine große Rolle in der Schweinefleischerzeugung spielen. Zwischen dem Osten, der durch sehr große Betriebe in geringer Dichte auffällt, und dem Nordwesten, wo eine hohe Dichte großer Betriebe vorherrscht (Merle et al. 2012), wurde kein signifikanter Unterschied in der Anzahl an Carriertieren in den Stichproben festgestellt. Im Einklang mit vorangegangenen Studien (Hellström et al. 2010; Fredriksson-Ahomaa et al. 2009) war auch hier die Prävalenz an *Listeria* spp. in den Tonsillen von Mastschweinen höher als in Kotproben bzw. Darminhalt, was diese Matrix für Untersuchungen auf Carriertiere von *L. monocytogenes* auf Betriebsebene ungeeignet erscheinen lässt. Tonsillenuntersuchungen nach der Schlachtung ergeben laut dieser Studie präzisere Ergebnisse als Untersuchungen des Darminhaltes. Es wurden keine Hinweise in der Literatur gefunden, dass sich die Listerienprävalenz im Mastschwein mit der Zeit in Deutschland verändert hat. Dies ist vor allem interessant, da sich der Antibiotikaeinsatz über die Jahre durch gesetzliche Veränderungen stark gewandelt hat, kein prophylaktischer Einsatz von antimikrobiellen Substanzen seit 2006 mehr erlaubt ist und der Einsatz seit 2011 mit dem Antibiotikaminimierungskonzept noch weiter verringert wurde. Eine Auswirkung dieser Veränderungen auf die Listerieninfektion von Mastschweinen konnte mit der vorhandenen Datenlage nicht überprüft werden.

Es ist unklar, welche Mechanismen Tiere und Menschen asymptomatische Träger dieses Pathogens werden lassen, es scheint aber vom Darmmikrobiom beeinflusst zu sein, welches eine wichtige Abwehrlinie gegen durch Lebensmittel übertragene Pathogene darstellt (Hafner et al. 2021). Außerdem spielen Futter, Haltung, hygienische Bedingungen und Stress, z.B. Haltungsbedingungen oder Transport, eine Rolle bei der fäkalen Ausscheidung (Schoder et al. 2022; Ivanek et al. 2007; Beloeil et al. 2003b). Hafner et al. (2021) stellten fest, dass fäkale Ausscheidung mit Virulenz korreliert. Dies kann in der vorliegenden Studie bei Schweinen nicht beobachtet werden, da aus dem Darm nur apathogene *L. innocua* isoliert wurden. Allerdings konnten in den Tonsillen einige hypervirulente Isolate nachgewiesen werden.

Die genetischen Untersuchungen der nachgewiesenen Isolate deuten auf verschiedene Eintragsquellen in den Schlachthof hin. Ein direkter Eintrag von *L.* durch Mastschweine wurde innerhalb dieser Studie nicht bestätigt. Jedoch wurden hypervirulente Isolate von *L. monocytogenes* (CC6, CC11) aus Tonsillen von Mastschweinen isoliert, was für einen möglichen Eintrag in die Lebensmittelkette und damit einhergehendes potentielles Risiko für den Verbraucher durch das Schwein spricht und die Wichtigkeit guter hygienischer Bedingungen beim Handling von Schlachttierkörpern unterstreicht. Autio et al. (2000) berichteten von positiv getesteten Sägen zur Spaltung der Schlachttierkörper, die zur Kreuzkontamination von Schlachttierkörpern führten. Unsere Untersuchungen des Equipments in der Schlachthalle, darunter auch der mechanischen Sägen in Schlachtbetrieb A, ergaben keine positiven Ergebnisse. Nichtsdestotrotz bergen sie ein Risiko zur Weiterverbreitung des Erregers auf Muskelfleisch nachfolgender Schlachttierkörper. Das Vorhandensein des Bakteriums am Boden in der Schlachthalle bestätigten zwei Isolate von *L. monocytogenes* aus einem Gully (CC412) an verschiedenen Probenahmetagen, ebenso wie je ein von Profilen von Gummistiefeln isolierter Klon von *L. monocytogenes* (CC9), *L. innocua* und *L. welshimeri*. Dies birgt die Gefahr der Verschleppung in andere Bereiche des Schlachtbetriebes. Innerhalb dieser Studie konnte jedoch kein nah verwandtes Isolat an anderer Stelle nachgewiesen werden. Weltweit wird CC9 als einer der häufigsten Komplextypen in der Schweinefleischverarbeitenden Umgebung beschrieben (Félix et al. 2018). Er ist gut an die Umweltbedingungen in diesem Produktionsbereich angepasst. Neben

diesen weltweit ähnlich beobachteten Vorkommen von CCs bzw. STs kommen viele geografische Unterschiede in der Verteilung vor. So wird der, in der vorliegenden Studie in einer Tonsille nachgewiesene, hypervirulente CC11 spezifisch in Zentraleuropa häufig aus Milch- und Fleischprodukten sowie bei humanen Erkrankungen isoliert (Kubicová et al. 2021). In China wiederum ist der hypervirulente ST87 für die meisten humanen klinischen Erkrankungsfälle verantwortlich, dieser scheint in keinem anderen Land eine große Rolle zu spielen (Li et al. 2018).

Die vielen verschiedenen Nischen und Subnischen, die dieses Bakterium besiedelt und auf die es sich spezialisiert, führen neben einer großen Diversität der Spezies zu einer steigenden ökologischen und genomischen Isolation. Persistenz in Nischen in der Umgebung von Lebensmittel produzierenden Betrieben über lange Zeiträume, sogar Jahre bis Jahrzehnte, kommen vor (Harrand et al. 2020). Auch im beprobten Schlachtbetrieb A wurde die Persistenz eines *L. welshimeri*-Isolates in der Verarbeitungsumgebung über einen Zeitraum von zwei Monaten festgestellt. Bei *L. monocytogenes* besteht bei hypovirulenten klonalen Komplextypen wie CC9 oder CC121 eine vermehrte Tendenz zur Persistenz in der Umgebung der Lebensmittelproduktion, hauptsächlich durch Resistenzen gegenüber Desinfektionsmitteln wie quartäre Ammoniumverbindungen (Maury et al. 2019), deren häufiger Einsatz in der Lebensmittelproduktion diese begünstigt.

Wie auch in vorangegangenen Studien führten alle *L. monocytogenes*-Isolate der vorliegenden Studie das Resistenzgen *fosX*, das zu einer intrinsischen Resistenz gegenüber Fosfomycin führt (Mota et al. 2020). Das geringe Vorkommen von erworbenen Resistenzen bei *L. monocytogenes* in der vorliegenden Studie stimmt mit anderen Ergebnissen aus Zentraleuropa überein (Granier et al. 2011; Mayrhofer et al. 2004), widerspricht jedoch den Ergebnissen von Noll et al. (2018), die von 259 *L. monocytogenes*-Isolaten aus Deutschland mehr als die Hälfte als multiresistent einstufen.

Ein hoher Anteil an Kerngenen, der als ‚geschlossenes Genom‘ bezeichnet wird, reduziert die Abhängigkeit, sich fremde Gene bei der Erschließung einer Nische anzueignen (Baquero et al. 2020). Daher wird bei *L.* eine geringere Aneignung von Resistenzgenen erwartet als dies bei anderen Bakterienspezies der Fall ist. Neben der Umgebung kommt *L.* auch im Darm vieler asymptomatischer Tiere und Menschen vor. Dort kommt *L.* mit verschiedenen Spezies von *Enterococcus* und *Streptococcus* in Kontakt, die in großer Zahl im Darm zu finden sind und konjugative Plasmide und Transposons beherbergen. Dies macht den Darm zu einem geeigneten Ort für den direkten Austausch von genetischer Information (Charpentier und Courvalin 1999). Jahan und Holley (2016) konnten den Transfer von Resistenzgenen von *Enterococcus faecium* auf *L. monocytogenes* belegen. Dazu kommt ein in der Praxis üblicher peroraler Antibiotikaeinsatz bei Nutztieren. Die in dieser Studie isolierten *L. innocua*-Isolate aus Schweineproben weisen multiple Resistenzgene auf, was zu einem potentiell hohen Selektionsdruck im Darm von Nutztieren durch Antibiotikaeinsatz passen könnte. So wurde das Gen *tet(M)* dreimal und einmal das Gen *tet(S)* identifiziert, beide kodieren für eine Resistenz gegen Tetrazyklin, ein häufig in der Schweinemedizin eingesetztes Antibiotikum. Diese beiden Gene führen über spezifische zytoplasmatische Proteine zum Schutz der Ribosomen vor Antibiotika und somit zu einer Resistenz (Connell et al. 2003). Das Gen *tet(M)* wird nicht nur in Listerien als häufigstes Gen, das zu einer Tetrazyklinresistenz führt, nachgewiesen, sondern auch in anderen Gram-positiven und einigen Gram-negativen Bakterien (Urban-Chmiel et al. 2022). Es wurde gezeigt, dass der Erwerb dieses Gens von Listerien durch schrittweisen Transfer zwischen anderen Gram-positiven Bakterien vorangetrieben werden könnte (Bertrand et al. 2005).

Davis und Jackson (2009) stellten fest, dass *L. monocytogenes* weniger Resistenzen aufweist als andere Listerienspezies. Walsh et al. (2001) fanden deutlich mehr Resistenzen bei

L. innocua als bei *L. monocytogenes* und keine Resistenzen bei *L. welshimeri* und *L. seeligeri*. Auch in der vorliegenden Studie konnten bei *L. innocua*-Isolaten multiple Resistenzgene festgestellt werden. Hingegen konnten bei keinem *L. monocytogenes*-Isolat erworbene Resistenzen nachgewiesen werden. Die Resistenzsituation variiert sowohl zwischen den verschiedenen Serogruppen von *L. monocytogenes* sowie zwischen Isolaten verschiedener Länder (Obaidat et al. 2015). Internationale Reisen und Transport von Tieren und Lebensmitteln steigern das Risiko für eine Ausbreitung der Resistenzen weltweit.

5 Schlussfolgerungen

Der Nachweis von hypervirulenten Listerienspezies sowohl im Schwein als auch in der Schlachthofumgebung weist auf verschiedene potentielle Eintragsquellen des Bakteriums in die Lebensmittelkette hin. Zur Verhinderung der Kontamination von Lebensmitteln braucht es daher einen komplexen Lösungsansatz und gute hygienische Bedingungen alle möglichen Eintragsquellen betreffend. Bezogen auf das Schwein nehmen die Haltungs- und Fütterungsbedingungen am Herkunftsbetrieb Einfluss auf die Wahrscheinlichkeit einer Listerieninfektion aus der Umwelt, die untersuchten Regionen in Deutschland als unterschiedliche Herkunft der Schweine jedoch nicht. Auf Biosicherheitsstandards sollte im Herkunftsbetrieb geachtet werden. Am Schlachtbetrieb ist eine strikte Einhaltung der Hygiene bei der Herrichtung der Schlachttierkörper, besonders bei der Entfernung der Tonsillen, von großer Wichtigkeit. Aber auch die weitere Verarbeitung birgt viele Risiken der Listerienkontamination des späteren Produktes, sodass die Hygiene entlang der gesamten Verarbeitungskette essentiell ist. Da trotz guter hygienischer Praxis in der Lebensmittelproduktion eine Kontamination mit dem ubiquitär vorkommenden Bakterium nie sicher ausgeschlossen werden kann, ist auch eine Aufklärung des Konsumenten bezüglich des richtigen Umgangs mit Lebensmitteln wie eine gute Küchenhygiene wichtig.

Die Resistenzsituation von verschiedenen Listerienspezies und Serogruppen sowie von *L. monocytogenes* in verschiedenen Ländern erscheint sehr unterschiedlich. Während in Mitteleuropa meist wenig Resistenzen von *L. monocytogenes* gegenüber humanmedizinisch relevanten Antibiotika nachgewiesen werden, liegt der Trend in anderen Erdteilen und für andere Listerienspezies weitaus höher. In Hinsicht auf die hohe Letalität von humanen Listeriosefällen ist somit eine regelmäßige Überwachung der Resistenzsituation von *L. monocytogenes* weltweit nötig, ebenso von *L. innocua*, das genetisch sehr eng mit *L. monocytogenes* verwandt ist und als Reservoir von Resistenzgenen diskutiert wird (Bertrand et al. 2005). Auch *L. welshimeri* sollte gemonitort werden, da diese Spezies zahlreiche durch horizontalen Gentransfer erworbene Gene trägt und so das Potential zum Transfer oder zur Annahme von Resistenzgenen aufweist (Hain et al. 2006). Um dem Problem der antimikrobiellen Resistenzen langfristig zu begegnen, wird eine Strategie zu deren Reduzierung empfohlen, die mehr Forschung zur Rolle der Bakterien in der Übertragung von Resistenzen auf die humane und tierische mikrobielle Flora umfasst. Daneben wird vermehrte Forschung zur erhöhten genetischen Krankheitsresistenz von Tieren sowie die Suche nach neuen antimikrobiellen Substanzen angeraten. Zu den implementierten Strategien zählen alternativer Einsatz von Bakteriophagen und deren Enzyme und die Entwicklung von Impfstoffen der nächsten Generation. Ebenso nehmen neue Fütterungsstrategien für Tiere mit Präbiotika, Probiotika, bakteriellen Nebenprodukten und Phytobiotika eine große Bedeutung ein, um dem Problem der Antibiotikaresistenzen zu begegnen (Ruvalcaba-Gómez et al. 2022). Als Alternative zu Antibiotika besteht auch großes Interesse an Proteinen und Peptiden mit bakterizider Aktivität, die von Bakterien, Pflanzen, wirbellosen Tieren sowie Wirbel- und Säugetieren produziert werden. Dies stützt sich derzeit auf antimikrobielle Peptide, die von allgemein als sicher anerkannten (generally recognized as safe – GRAS) Mikroorganismen stammen, wie *Lactobacillus* spp., *Streptomyces*, *Micrococcus*, *Saccharomyces* und *Candida* (Mourenza et al. 2020). Die weltweite AMR-Problematik wird auf lange Sicht nur mit einem One-Health-Ansatz unter Zusammenarbeit aller beteiligten Bereiche erfolgreich bearbeitet werden können.

6 Zusammenfassung

Untersuchung zum Eintrag von *Listeria monocytogenes* in die Lebensmittelkette von Schlachtschweinen

Das Gram-positive Bakterium *L. monocytogenes* ist der wichtigste Erreger der humanen Listeriose, eine über kontaminierte Lebensmittel übertragene Zoonose mit hoher Letalität. Betroffen von der invasiven Form sind hauptsächlich sehr junge, alte, immunsuppressive und schwangere Personen. Eine Infektion entsteht vorwiegend über sogenannte ready-to-eat Produkte, hierbei vor allem Fisch und Fischprodukte, Fleisch und Fleischprodukte, Milch und Milchprodukte. Schweinefleisch wurde als Ursache für mehrere Ausbrüche bzw. Krankheitsfälle festgestellt. Es kann während der Schlachtung, Verarbeitung und Produktion mit dem ubiquitär vorkommenden Bakterium kontaminiert werden. Schweine können aber auch in der Primärproduktion damit in Kontakt kommen und das Pathogen als asymptomatische Trägertiere (Carrier) mit in den Schlachtbetrieb bringen. Am landwirtschaftlichen Betrieb spielt die Fütterung neben den hygienischen Bedingungen die größte Rolle als Risikofaktor für eine Infektion der Schweine.

In dieser Arbeit wurden 430 Tonsillenproben von Schlachtschweinen zweier deutscher Schweineschlachtbetriebe und zusätzlich von 200 der Schweine vom Schlachtbetrieb A Proben des Enddarminhalt entnommen und auf das Vorhandensein von Listerien untersucht. Dabei betrug die ermittelte Prävalenz an *L. monocytogenes* auf Einzeltierebene 1,6% (7/430) der Tonsillenproben, was 11,6% positiven Herden entsprach, wobei kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden untersuchten Regionen in Deutschland, dem Nordwesten und dem Osten, als Herkunft der Schweine festgestellt wurde. Die Prävalenz der apathogenen Spezies *L. innocua* lag auf Einzeltierebene bei 1,2% (5/430). Im Darminhalt wurde *L. monocytogenes* nicht nachgewiesen, die Prävalenz an *L. innocua* betrug auf Einzeltierebene 2,0% (4/200). Zusätzlich wurden Proben aus der Umgebung und von Equipment aus der Schlachthalle, Zerlegung und Verarbeitung entnommen und dabei sieben *L. monocytogenes*-, zwei *L. innocua*- und vier *L. welshimeri*-Isolate gewonnen. Diese 29 *Listeria* spp.-Isolate wurden mithilfe von NGS weiter untersucht, um ihre MLST STs und CCs, ihre Verwandtschaft mittels SNP-Analyse, ihre antimikrobiellen Resistenzgene und Virulenzgene zu ermitteln. Zusätzlich wurden die phänotypischen antimikrobiellen Resistenzen der 14 *L. monocytogenes*-Isolate mittels Bouillon-Mikrodilutionsverfahren ermittelt. Unter den Isolaten wurden sowohl im Schwein als auch der Umgebung viele unterschiedliche CCs vorgefunden und nur fünf der 29 Isolate als eng verwandt eingestuft, was für mehrere verschiedene Eintragsquellen spricht. So wurden hypervirulente CCs, die mit humanen Erkrankungen in Verbindung gebracht wurden, in Tonsillenproben sowie in Umgebungsproben gefunden, was das Schwein als potenzielle Eintragsquelle humanpathogener Isolate bestätigt und die Wichtigkeit der Einhaltung einer guten Hygienepaxis im Schlachtprozess unterstreicht. Der Nachweis der eng verwandten Isolate entlang der Zerlegungs- und Verarbeitungskette deutet auf eine Kreuzkontamination innerhalb des Betriebs oder Rekontamination aus derselben Quelle hin und unterstreicht die Durchführung einer effizienten Reinigung und Desinfektion. Im Fleischwolf zeigte ein *L. welshimeri*-Isolat eine Persistenz von zwei Monaten. Das Profil der Gummistiefel von Mitarbeitern wurde als Träger von *Listeria* spp. identifiziert, ebenso zeugen positive Ergebnisse in einem Gully vom Vorhandensein des Bakteriums am Boden der Schlachthalle, die Beprobung von Equipment in der Schlachthalle fiel negativ aus. Von den 14 *L. monocytogenes*-Isolaten bestätigte die Analyse der Virulenzgene die Pathogenität von 11 Isolaten, dreien fehlt das Virulenzgen *actA*, ebenso fehlen allen *L. innocua* sowie *L. welshimeri*-Isolaten die hauptsächlich Virulenzgene, was ihre Apathogenität belegt. Die

Analyse der Resistenzgene zeigt in den *L. monocytogenes*-Isolaten nur bereits bekannte, intrinsische Resistenzen. Unter den *L. innocua*-Isolaten wurden jedoch zusätzlich weitere Resistenzgene gefunden, am häufigsten gegenüber Tetrazyklinen. Jene Isolate mit multiplen genotypischen Resistenzen stammten aus Proben vom Schwein, was einen Zusammenhang mit dem Antibiotikaeinsatz in der Schweineproduktion vermuten lässt. Auch wenn die apathogene Spezies *L. innocua* keine direkte Gefahr als Krankheitserreger darstellt, kann sie als Reservoir für Resistenzgene diese an pathogene Spezies durch horizontalen Gentransfer weitergeben. Die phänotypische Resistenztestung der *L. monocytogenes*-Isolate zeigte keine Resistenzen gegenüber Antibiotika, die zur Behandlung der Listeriose eingesetzt werden. Die Interpretation der Ergebnisse blieb durch viele für *L. monocytogenes* fehlende klinische Grenzwerte jedoch limitiert. Da in anderen Studien höhere Resistenzraten festgestellt werden, bleibt eine Überwachung der Resistenzsituation von *Listeria* spp. geboten. Die Überwachung des Vorkommens von *L. monocytogenes* in Lebensmitteln ist ebenso wie eine gute Hygienepraxis entlang der gesamten Lebensmittelkette bis hin zur Aufklärung des Konsumenten und Forschung an zukünftigen Bekämpfungsstrategien im Sinne des One-Health-Konzepts wichtig für die Erhaltung der öffentlichen Gesundheit.

7 Summary

Examination on the introduction of *Listeria monocytogenes* into the food chain via slaughter pigs

The Gram-positive bacterium *L. monocytogenes* is the most important causative agent of human listeriosis, a zoonosis with a high case-fatality rate transmitted via contaminated food. The invasive form mainly affects very young, elderly, immunosuppressed and pregnant persons. Infection occurs primarily via so-called ready-to-eat products, in particular fish and fish products, meat and meat products, milk and milk products, and less frequently vegetables and fruits. Pork has been identified as the cause of several listeriosis outbreaks and cases. It can become contaminated with the ubiquitous bacterium during slaughter, processing, and production, but pigs may also come into contact with it during primary production and bring the pathogen with them to the slaughterhouse as asymptomatic carriers. On the farm, feeding, along with sanitary conditions, plays the most important role in the likelihood of infection of pigs.

In this work, 430 tonsil samples were taken from slaughter pigs in two German pig slaughterhouses and, in addition, samples of the intestinal contents were taken from 200 of the same pigs slaughtered in slaughterhouse A and examined for the presence of *Listeria* spp.. Thereby, the determined prevalence of *L. monocytogenes* on single animal level was 1.6% (7/430) in tonsil samples which corresponded to 11.6% positive herds, with no significant difference between the two different regions in Germany as origin of the slaughter pigs, the Northwest and the East. The prevalence of the apathogenic species *L. innocua* was 1.2% (5/430) on single animal level. *L. monocytogenes* was not detected in the intestinal contents, whereas the prevalence of *L. innocua* on single animal level was 2.0% (4/200). In addition, samples were collected from the slaughterhouse environment and from equipment used in the slaughter hall, yielding seven *L. monocytogenes*, two *L. innocua*, and four *L. welshimeri* isolates. These 29 *Listeria* spp. isolates were further analyzed using Next Generation Sequencing (NGS) to determine with Multilocus Sequence Typing (MLST) their sequence types (STs) and clonal complex types (CCs), relatedness by SNP analysis, antimicrobial resistance genes, and virulence genes. In addition, the phenotypic antimicrobial resistances of the 14 *L. monocytogenes* isolates were determined by broth microdilution. Many different CCs were found among the isolates in both the pigs and the environment, and only five of the 29 isolates were found to be closely related, suggesting multiple different sources of entry. Thus, hypervirulent CCs associated with human disease were found in tonsil samples as well as in environmental samples, confirming pigs as a potential source of human pathogenic isolates and emphasizing the importance of maintaining good hygiene practices in the slaughter process. The detection of closely related isolates along the cutting and processing line indicates cross-contamination within the establishment or recontamination from the same source and necessitates efficient cleaning and disinfection. In the mincer, a *L. welshimeri* isolate showed a persistence of two months. The profile of employees' rubber boots was identified as carrying *Listeria* spp.. Similarly, positive results in a gully testified to the presence of the bacterium on the floor of the slaughter hall, whereas sampling of equipment in the slaughter hall was negative. Of the 14 *L. monocytogenes* isolates, virulence gene analysis confirmed the pathogenicity of 11 isolates, three lack the virulence gene *actA*, and all *L. innocua* as well as *L. welshimeri* isolates lack the major virulence genes, demonstrating their apathogenicity. Analysis of resistance genes reveals only resistance genes encoding already known intrinsic resistance in the *L. monocytogenes* isolates. However, among the *L. innocua* isolates, additional resistance genes were found, most commonly to tetracyclines. Those isolates with multiple genotypic resistances came from samples of pigs, suggesting a link to

antibiotic use in pig production. Although the apathogenic species *L. innocua* does not pose a direct threat as a pathogen, as a reservoir for resistance genes it can pass them on to pathogenic species. The phenotypic resistance testing of *L. monocytogenes* isolates did not reveal resistance to antibiotics used to treat human listeriosis, but interpretation of the results remained limited due to a lack of specific clinical breakpoints. Since higher resistance rates were reported by other studies, monitoring of the resistance situation of *Listeria* spp. remains necessary. The monitoring of the presence of *L. monocytogenes* in food is important for the preservation of public health, as is a good hygiene practice along the entire food chain, up to consumer education and research into future control strategies in line with the One Health concept.

8 Literaturverzeichnis

Acar J, Röstel B (2001):

Antimicrobial resistance: an overview.

Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics) 20, 797–810. doi: 10.20506/rst.20.3.1309.

Adesiyun A A, Krishnan C (1995): Occurrence of *Yersinia enterocolitica* O:3, *Listeria monocytogenes* O:4 and thermophilic *Campylobacter* spp. in slaughter pigs and carcasses in Trinidad. Food Microbiology 12, 99–107. doi: 10.1016/S0740-0020(95)80085-9.

Adorisio E, Tassone D D, Conte A, Sebastiani Annicchiarico L (2003):

Listeria monocytogenes in campioni di suini avviati alla catena alimentare umana.

Annali di igiene: medicina preventiva e di comunita 15, 575–581.

Allerberger F (2007):

Listeria.

In: Foodborne diseases /Hrsg.: Simjee S, S. 27–39.

Totowa, New Jersey: Humana Press Inc - ISBN 978-1-58829-518-7.

Allerberger F, Wagner M (2010):

Listeriosis: a resurgent foodborne infection.

Clin Microbiol Infect, 16, 16–23. doi: 10.1111/j.1469-0691.2009.03109.x.

Allerberger F, Huhulescu S (2015):

Pregnancy related listeriosis: treatment and control.

Expert review of anti-infective therapy 13, 395–403. doi: 10.1586/14787210.2015.1003809.

Alonso-Hernando A, Prieto M, García-Fernández C, Alonso-Calleja C, Capita R (2012):

Increase over time in the prevalence of multiple antibiotic resistance among isolates of *Listeria monocytogenes* from poultry in Spain.

Food Control 23, 37–41. doi: 10.1016/j.foodcont.2011.06.006.

Andre P, Genicot A (1987):

Premier isolement de *Listeria welshimeri* chez l’homme.

Zentralblatt für Bakteriologie, Mikrobiologie und Hygiene. Series A: Medical Microbiology, Infectious Diseases, Virology, Parasitology 263, 605–606. doi: 10.1016/S0176-6724(87)80205-5.

Aras Z, Ardiç M (2015):

Occurrence and Antibiotic Susceptibility of *Listeria* Species in Turkey Meats.

Korean journal for food science of animal resources 35, 669–673. doi: 10.5851/kosfa.2015.35.5.669.

Autio T, Säteri T, Fredriksson-Ahomaa M, Rahkio M, Lundén J, Korkeala H (2000): *Listeria monocytogenes* Contamination Pattern in Pig Slaughterhouses

Journal of Food Protection 63, 1438–1442. doi: 10.4315/0362-028X-63.10.1438.

Autio T, Markkula A, Hellström S, Niskanen T, Lundén J, Korkeala H (2004):

Prevalence and genetic diversity of *Listeria monocytogenes* in the tonsils of pigs.

Journal of Food Protection, 67, 805–808. doi: 10.4315/0362-028X-67.4.805.

Baquero F, Lanza V F, Duval M, Coque T M (2020):

Ecogenetics of antibiotic resistance in *Listeria monocytogenes*.

Molecular microbiology 11,570–579. doi: 10.1111/mmi.14454.

Beloil P-A, Fravalo P, Chauvin C, Fablet C, Salvat G, Madec F (2003a):
Listeria spp. contamination in piggeries: comparison of three sites of environmental swabbing for detection and risk factor hypothesis.
Journal of veterinary medicine, Series B, 50, 155–160. doi: 10.1046/j.1439-0450.2003.00648.x.

Beloil P-A, Chauvin C, Toquin M-T, Fablet C, Le Nôtre Y, Salvat G, Madec F, Fravalo P (2003b):
Listeria monocytogenes contamination of finishing pigs: an exploratory epidemiological survey in France.
Veterinary research 34, 737–748. doi: 10.1051/vetres:2003031.

Bertrand S, Huys G, Yde M, D'Haene K, Tardy F, Vrints M, Swings J, Collard J-M (2005):
Detection and characterization of *tet(M)* in tetracycline-resistant *Listeria* strains from human and food-processing origins in Belgium and France.
Journal of medical microbiology 54, 1151–1156. doi: 10.1099/jmm.0.46142-0.

Blair J M A, Webber M A, Baylay A J, Ogbolu D O, Piddock L J V (2015):
Molecular mechanisms of antibiotic resistance.
Nat Rev Microbiol 13, 42–51. doi: 10.1038/nrmicro3380.

Boscher E, Houard E, Denis M (2012):
Prevalence and distribution of *Listeria monocytogenes* serotypes and pulsotypes in sows and fattening pigs in farrow-to-finish farms (France, 2008).
J Food Prot 75, 889–895. doi: 10.4315/0362-028X.JFP-11-340.

Bunčić S (1991):
The incidence of *Listeria monocytogenes* in slaughtered animals, in meat, and in meat products in Yugoslavia.
International Journal of Food Microbiology 12, 173–180. doi: 10.1016/0168-1605(91)90067-Y.

Castanon J I R (2007):
History of the use of antibiotic as growth promoters in European poultry feeds.
Poultry science 86, 2466–2471. doi: 10.3382/ps.2007-00249.

Celli J, Trieu-Cuot P (1998):
Circularization of Tn916 is required for expression of the transposon-encoded transfer functions: characterization of long tetracycline-inducible transcripts reading through the attachment site
Molecular microbiology 28, 103–117. doi: 10.1046/j.1365-2958.1998.00778.x.

Chakraborty T, Hain T, Domann E (2000):
Genome organization and the evolution of the virulence gene locus in *Listeria* species
International Journal of Medical Microbiology 290, 167–174. doi: 10.1016/S1438-4221(00)80086-7.

Charpentier E, Gerbaud G, Jacquet C, Rocourt J, Courvalin P (1995):
Incidence of antibiotic resistance in *Listeria* species.
The Journal of infectious diseases 172, 277–281. doi: 10.1093/infdis/172.1.277.

Charpentier E, Courvalin P (1999):
Antibiotic Resistance in *Listeria* spp.
Antimicrob. Agents Chemother. 43, 2103–2108. doi: 10.1128/AAC.43.9.2103.

- Charpentier E, Gerbaud G, Courvalin P (1999):
Conjugative mobilization of the rolling-circle plasmid pIP823 from *Listeria monocytogenes* BM4293 among gram-positive and gram-negative bacteria.
Journal of bacteriology 181, 3368–3374. doi: 10.1128/JB.181.11.3368-3374.1999.
- Chenal-Francisque V, Lopez J, Cantinelli T, Caro V, Tran C, Leclercq A, Lecuit M, Brisse S (2011):
Worldwide distribution of major clones of *Listeria monocytogenes*.
Emerging infectious diseases 17, 1110–1112. doi: 10.3201/eid1706.101778.
- Clayton E M, Daly K M, Guinane C M, Hill C, Cotter P D, Ross P R (2014):
Atypical *Listeria innocua* strains possess an intact LIPI-3.
BMC Microbiol 14, 58. doi: 10.1186/1471-2180-14-58.
- Clayton E M, Hill C, Cotter P D, Ross P R (2011):
Real-time PCR assay to differentiate Listeriolysin S-positive and -negative strains of *Listeria monocytogenes*.
Appl Environ Microbiol, 77, 163–171. doi: 10.1128/AEM.01673-10.
- Connell S R, Tracz D M, Nierhaus K H, Taylor D E (2003):
Ribosomal protection proteins and their mechanism of tetracycline resistance.
Antimicrob Agents Chemother, 47, 3675–3681. doi: 10.1128/AAC.47.12.3675-3681.2003.
- Conter M, Paludi D, Zanardi E, Ghidini S, Vergara A, Ianieri A (2009):
Characterization of antimicrobial resistance of foodborne *Listeria monocytogenes*.
International Journal of Food Microbiology, 128, 497–500. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2008.10.018.
- Cornu M, Kalmokoff M, Flandrois J-P (2002):
Modelling the competitive growth of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* in enrichment broths.
International Journal of Food Microbiology, 73, 261–274. doi: 10.1016/S0168-1605(01)00658-4.
- Cossart P, Lecuit M (1998):
Interactions of *Listeria monocytogenes* with mammalian cells during entry and actin-based movement: bacterial factors, cellular ligands and signaling.
The EMBO Journal, 17, 3797–3806. doi: 10.1093/emboj/17.14.3797.
- Cotter P D, Draper L A, Lawton E M, Daly K M, Groeger D S, Casey P G, Ross P R, Hill C (2008):
Listeriolysin S, a novel peptide haemolysin associated with a subset of lineage I *Listeria monocytogenes*.
PLoS pathogens, 4, e1000144. doi: 10.1371/journal.ppat.1000144.
- Curiale M S, Lewus C (1994):
Detection of *Listeria monocytogenes* in Samples Containing *Listeria innocua*.
J Food Prot, 57, 1048–1051. doi: 10.4315/0362-028X-57.12.1048.
- Currie A, Farber J M, Nadon C, Sharma D, Whitfield Y, Gaulin C, Galanis E, Bekal S, Flint J, Tschetter L, Pagotto F, Lee B, Jamieson F, Badiani T, MacDonald D, Ellis A, May-Hadford J, McCormick R, Savelli C, Middleton D, Allen V, Tremblay F-W, MacDougall L, Hoang L, Shyng S, Everett D, Chui L, Louie M, Bangura H, Levett P N, Wilkinson K, Wylie J, Reid J, Major B, Engel D, Douey D, Huszczyński G, Di Lecci J, Strazds J, Rousseau J, Ma K, Isaac L, Sierpinska U (2015):
Multi-Province Listeriosis Outbreak Linked to Contaminated Deli Meat Consumed Primarily in Institutional Settings, Canada, 2008.

Foodborne pathogens and disease, 12, 645–652. doi: 10.1089/fpd.2015.1939.

Dailey R C, Welch L J, Hitchins A D, Smiley R D (2015):
Effect of *Listeria seeligeri* or *Listeria welshimeri* on *Listeria monocytogenes* detection in and recovery from buffered *Listeria* enrichment broth.
Food Microbiology, 46, 528–534. doi: 10.1016/j.fm.2014.09.008.

Davis J A, Jackson, C R (2009):
Comparative antimicrobial susceptibility of *Listeria monocytogenes*, *L. innocua*, and *L. welshimeri*.
Microbial drug resistance (Larchmont, N.Y.), 15, 27–32. doi: 10.1089/mdr.2009.0863.

den Bakker H C, Cummings C A, Ferreira V, Vatta P, Orsi R H, Degoricija L, Barker M, Petrauskene O, Furtado M R, Wiedmann M (2010):
Comparative genomics of the bacterial genus *Listeria*: Genome evolution is characterized by limited gene acquisition and limited gene loss.
BMC genomics, 11, 688. doi: 10.1186/1471-2164-11-688.

Disson O, Grayo S, Huillet E, Nikitas G, Langa-Vives F, Dussurget O, Ragon M, Le Monnier A, Babinet C, Cossart P, Lecuit (2008):
Conjugated action of two species-specific invasion proteins for fetoplacental listeriosis.
Nature, 455, 1114–1118. doi: 10.1038/nature07303.

Disson O, Moura A, Lecuit, M (2021):
Making Sense of the Biodiversity and Virulence of *Listeria monocytogenes*.
Trends in microbiology, 29, 811–822. doi: 10.1016/j.tim.2021.01.008.

Domínguez-Bernal G, Müller-Altrock S, González-Zorn, Scortti M, Herrmann P, Monzó H J, Lacharme L, Kreft J, Vázquez-Boland A (2006):
A spontaneous genomic deletion in *Listeria ivanovii* identifies LIPI-2, a species-specific pathogenicity island encoding sphingomyelinase and numerous internalins.
Molecular microbiology, 59, 415–432. doi: 10.1111/j.1365-2958.2005.04955.x.

Donlan R M, Costerton W J (2002):
Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms.
Clinical Microbiology Reviews, 15, 167–193. doi: 10.1128/CMR.15.2.167-193.2002.

Esteban J I, Oporto B, Aduriz G, Juste R A, Hurtado A (2009):
Faecal shedding and strain diversity of *Listeria monocytogenes* in healthy ruminants and swine in Northern Spain.
BMC veterinary research, 5. doi: 10.1186/1746-6148-5-2.

European Food Safety Authority (EFSA), European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC) (2021):
The European Union One Health 2020 Zoonoses Report.
EFS2, 19. doi: 10.2903/j.efsa.2021.6971.

Facinelli B, Roberts M C, Giovanetti E, Casolari C, Fabio U, Varaldo P E (1993):
Genetic basis of tetracycline resistance in food-borne isolates of *Listeria innocua*.
Appl Environ Microbiol, 59, 614–616. doi: 10.1128/aem.59.2.614-616.1993.

Farber J M, Peterkin P I (1991):
Listeria monocytogenes, a food-borne pathogen.

Microbiological reviews, 55, 476–511.

Farzan A, Friendship R M, Cook A, Pollari F (2010):

Occurrence of *Salmonella*, *Campylobacter*, *Yersinia enterocolitica*, *Escherichia coli* O157 and *Listeria monocytogenes* in swine.

Zoonoses and public health, 57, 388–396. doi: 10.1111/j.1863-2378.2009.01248.x.

Favaro M, Sarmati L, Sancesario G, Fontana C (2014):

First case of *Listeria innocua* meningitis in a patient on steroids and etanercept.

JMM Case Reports, 1. doi: 10.1099/jmmcr.0.003103.

Félix B, Feurer C, Maillet A, Guillier L, Boscher E, Kerouanton A, Denis M, 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: 10.3389/fmicb.2018.00684.

Fosse J, Seegers H, Magras C (2009):

Prevalence and risk factors for bacterial food-borne zoonotic hazards in slaughter pigs: a review.

Zoonoses and public health, 56, 429–454. doi: 10.1111/j.1863-2378.2008.01185.x.

Fredriksson-Ahomaa M, Gerhardt M, Stolle A (2009):

High bacterial contamination of pig tonsils at slaughter.

Meat science, 83, 334–336. doi: 10.1016/j.meatsci.2009.06.004.

Gaillard J L, Berche P, Sansonetti P (1986):

Transposon mutagenesis as a tool to study the role of hemolysin in the virulence of *Listeria monocytogenes*.

Infection and immunity, 52, 50–55. doi: 10.1128/iai.52.1.50-55.1986.

Geoffroy C, Gaillard J L, Alouf J E, Berche P (1987):

Purification, characterization, and toxicity of the sulfhydryl-activated hemolysin listeriolysin O from *Listeria monocytogenes*.

Infection and immunity, 55, 1641–1646. doi: 10.1128/iai.55.7.1641-1646.1987.

George S M, Lund B M, Brocklehurst T F (1988):

The effect of pH and temperature on initiation of growth of *Listeria monocytogenes*.

Lett Appl Microbiol, 6, 153–156. doi: 10.1111/j.1472-765X.1988.tb01237.x.

Gibbons N E (1972):

Listeria Pirie-Whom Does It Honor?

International Journal of Systematic Bacteriology, 22, 1–3. doi: 10.1099/00207713-22-1-1.

Glaser P, Frangeul L, Buchrieser C, Rusniok C, Amend A, Baquero F, Berche P, Bloecker H, Brandt P, Chakraborty T, Charbit A, Chetouani F, Couvé E, de Daruvar A, Dehoux P, Domann E, Domínguez-Bernal G, Duchaud E, Durant L, Dussurget O, Entian K D, Fsihi H, García-del Portillo F, Garrido P, Gautier L, Goebel W, Gómez-López N, Hain T, Hauf J, Jackson D, Jones L M, Kaerst U, Kreft J, Kuhn M, Kunst F, Kurapkat G, Madueno E, Maitournam A, Vicente J M, Ng E, Nedjari H, Nordsiek G, Novella S, de Pablos B, Pérez-Díaz J C, Purcell R, Remmel B, Rose M, Schlueter T, Simoes N, Tierrez A, Vázquez-Boland J A, Voss H, Wehland J, Cossart P (2001):

Comparative genomics of *Listeria* species.

Science, 294, 849–852. doi: 10.1126/science.1063447.

- Godreuil S, Galimand M, Gerbaud G, Jacquet C, Courvalin P (2003):
Efflux pump Lde is associated with fluoroquinolone resistance in *Listeria monocytogenes*.
Antimicrob Agents Chemother, 47, 704–708. doi: 10.1128/AAC.47.2.704-708.2003.
- Gouin E, Mengaud J, Cossart P (1994):
The virulence gene cluster of *Listeria monocytogenes* is also present in *Listeria ivanovii*, an animal pathogen, and *Listeria seeligeri*, a nonpathogenic species.
Infection and immunity, 62, 3550–3553. doi: 10.1128/iai.62.8.3550-3553.1994.
- Granier S A, Moubareck C, Colaneri C, Lemire A, Roussel S, Dao T-T, Courvalin P, Brisabois A (2011):
Antimicrobial resistance of *Listeria monocytogenes* isolates from food and the environment in France over a 10-year period.
App Environ Microbiol, 77, 2788–2790. doi: 10.1128/AEM.01381-10.
- Grau F H, Vanderlinde P B (1990):
Growth of *Listeria monocytogenes* on Vacuum-packaged Beef.
J Food Prot, 53, 739–741. doi: 10.4315/0362-028X-53.9.739.
- Gray M (1960):
A possible link in the relationship between silage feeding and listeriosis.
Journal of the American Veterinary Medical Association, 136, 205–208.
- Gray M L, Killinger A H (1966):
Listeria monocytogenes and listeric infections.
Bacteriological reviews, 30, 309–382.
- Guérin A, Bridier A, Le Grandois P, Sévellec Y, Palma F, Félix B, Listadapt Study Group, Roussel S, Soumet C (2021):
Exposure to Quaternary Ammonium Compounds Selects Resistance to Ciprofloxacin in *Listeria monocytogenes*.
Pathogens, 10. doi: 10.3390/pathogens10020220.
- Hafner L, Pichon M, Burucoa C, Nusser S H A, Moura A, Garcia-Garcera M, Lecuit M (2021):
Listeria monocytogenes faecal carriage is common and depends on the gut microbiota.
Nat Commun, 12, 6826. doi: 10.1038/s41467-021-27069-y.
- Hailu W, Helmy Y A, Carney-Knisely G, Kauffman M, Fraga Dean Rajashekara G (2021):
Prevalence and Antimicrobial Resistance Profiles of Foodborne Pathogens Isolated from Dairy Cattle and Poultry Manure Amended Farms in Northeastern Ohio, the United States.
Antibiotics, 10. doi: 10.3390/antibiotics10121450.
- Hain T, Steinweg C, Kuenne C T, Billion A, Ghai R, Chatterjee S S, Domann E, Kärst U, Goesmann A, Bekel T, Bartels D, Kaiser O, Meyer F, Pühler A, Weisshaar B, Wehland J, Liang C, Dandekar T, Lampidis R, Kreft J, Goebel W, Chakraborty T (2006):
Whole-genome sequence of *Listeria welshimeri* reveals common steps in genome reduction with *Listeria innocua* as compared to *Listeria monocytogenes*.
Journal of bacteriology, 188, 7405–7415. doi: 10.1128/JB.00758-06.
- Hanes R M, Huang Z (2022):
Investigation of Antimicrobial Resistance Genes in *Listeria monocytogenes* from 2010 through to 2021.
International Journal of Environmental Research and Public Health, 19, 5506. doi: 10.3390/ijerph19095506.

Harrand A S, Jagadeesan B, Baert L, Wiedmann M, Orsi R H (2020): Evolution of *Listeria monocytogenes* in a Food Processing Plant Involves Limited Single-Nucleotide Substitutions but Considerable Diversification by Gain and Loss of Prophages. *Appl Environ Microbiol*, 86. doi: 10.1128/AEM.02493-19.

Hellström S, Laukkanen R, Siekkinen K-M, Ranta J, Maijala R, Korkeala H (2010): *Listeria monocytogenes* contamination in pork can originate from farms. *Journal of Food Protection*, 73, 641–648. DOI: 10.4315/0362-028X-73.4.641.

Hoelzer K, Pouillot R, Dennis S (2012): Animal models of listeriosis: a comparative review of the current state of the art and lessons learned. *Vet Res*, 43, 18. doi: 10.1186/1297-9716-43-18.

Hurtado A, Ocejó M, Oporto B (2017): *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* shedding in domestic ruminants and characterization of potentially pathogenic strains. *Veterinary microbiology*, 210, 71–76. doi: 10.1016/j.vetmic.2017.09.003.

Husu J R (1990): Epidemiological studies on the occurrence of *Listeria monocytogenes* in the feces of dairy cattle. *Zentralblatt für Veterinärmedizin. Reihe B. Journal of veterinary medicine. Series B*, 37, 276–282. doi: 10.1111/j.1439-0450.1990.tb01059.x.

Iida T, Kanzaki M, Maruyama T, Inoue S, Kaneuchi C (1991): Prevalence of *Listeria monocytogenes* in intestinal contents of healthy animals in Japan. *Journal of Veterinary Medical Science*, 53, 873–875. doi: 10.1292/jvms.53.873.

Iida T, Kanzaki M, Nakama A, Kokubo Y, Maruyama T, Kaneuchi C (1998): Detection of *Listeria monocytogenes* in Humans, Animals and Foods. *Journal of Veterinary Medical Science* 60, 1341–1343. doi: 10.1292/jvms.60.1341.

Irving W, Boswell T, Ala'Aldeen D A, Szewczyk E, Balcerczak E, Różalski A (2012): *Mikrobiologia medyczna*. Wydawnictwo Naukowe PWN.

Ivanek R, Gröhn Y T, Jui-Jung Ho A, Wiedmann M (2007): Markov chain approach to analyze the dynamics of pathogen fecal shedding—example of *Listeria monocytogenes* shedding in a herd of dairy cattle. *Journal of Theoretical Biology*, 245, 44–58. doi: 10.1016/j.jtbi.2006.09.031.

Iwu C D, Okoh A I (2020): Characterization of antibiogram fingerprints in *Listeria monocytogenes* recovered from irrigation water and agricultural soil samples. *PLOS ONE*, 15, e0228956. doi: 10.1371/journal.pone.0228956.

Jahan M, Holley R A (2016): Transfer of antibiotic resistance from *Enterococcus faecium* of fermented meat origin to *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua*. *Lett Appl Microbiol*, 62, 304–310. doi: 10.1111/lam.12553.

Jamali H, Paydar M, Ismail S, Looi C Y, Wong W F, Radmehr B, Abedini A (2015):

Prevalence, antimicrobial susceptibility and virulotyping of *Listeria* species and *Listeria monocytogenes* isolated from open-air fish markets.
BMC Microbiol, 15, 144. doi: 10.1186/s12866-015-0476-7.

Johnson J, Jinneman K, Stelma G, Smith B G, Lye D, Messer J, Ulaszek J, Evsen L, Gendel S, Bennett R W, Swaminathan B, Pruckler J, Steigerwalt A, Kathariou S, Yildirim S, Volokhov D, Rasooly A, Chizhikov V, Wiedmann M, Fortes E, Duvall R E, Hitchins A D (2004):
Natural Atypical *Listeria innocua* Strains with *Listeria monocytogenes* Pathogenicity Island 1 Genes.
Applied and environmental microbiology, 70, 4256–4266. doi: 10.1128/AEM.70.7.4256-4266.2004.

Jones F T, Ricke S C (2003):
Observations on the history of the development of antimicrobials and their use in poultry feeds.
Poultry science, 82, 613–617. doi: 10.1093/ps/82.4.613.

Jutkina J, Marathe N P, Flach C-F, Larsson D G J (2018):
Antibiotics and common antibacterial biocides stimulate horizontal transfer of resistance at low concentrations.
Science of The Total Environment, 616, 172–178. doi: 10.1016/j.scitotenv.2017.10.312.

Kanuganti S R, Wesley I V, Reddy P G, McKean J, Hurd H S (2002):
Detection of *Listeria monocytogenes* in Pigs and Pork.
Journal of Food Protection, 65, 1470–1474. doi: 10.4315/0362-028X-65.9.1470.

Kljujev I, Raicevic V, Jovicic-Petrovic J, Vujovic B, Mirkovic M, Rothballer M (2018):
Listeria monocytogenes - Danger for health safety vegetable production.
Microbial Pathogenesis, 120, 23–31. doi: 10.1016/j.micpath.2018.04.034.

Koch J, Dworak R, Prager R, Becker B, Brockmann S, Wicke A, Wichmann-Schauer H, Hof H, Werber D, Stark K (2010):
Large listeriosis outbreak linked to cheese made from pasteurized milk, Germany, 2006-2007.
Foodborne pathogens and disease, 7, 1581–1584. doi: 10.1089/fpd.2010.0631.

Kubicová Z, Roussel S, Félix B, Cabanová L (2021):
Genomic Diversity of *Listeria monocytogenes* Isolates From Slovakia (2010 to 2020).
Front Microbiol, 12, 729050. doi: 10.3389/fmicb.2021.729050.

Kuchmina E (2008):
Untersuchungen zur Kälteanpassung bei *Listeria monocytogenes*.
Doktorarbeit. Universität Gießen.

Kutter S, Hartmann A, Schmid M (2006):
Colonization of barley (*Hordeum vulgare*) with *Salmonella enterica* and *Listeria* spp.
FEMS Microbiol Ecol, 56, 262–271. doi: 10.1111/j.1574-6941.2005.00053.x.

Lamont R F, Sobel J, Mazaki-Tovi S, Kusanovic J P, Vaisbuch E, Kim S K, Uldbjerg N, Romero R (2011):
Listeriosis in human pregnancy: a systematic review.
Journal of perinatal medicine, 39, 227–236. doi: 10.1515/jpm.2011.035.

Leclercq A, Moura A, Vales G, Tessaud-Rita N, Aguilhon C, Lecuit M (2019):
Listeria thailandensis sp. nov.
International journal of systematic and evolutionary microbiology, 69, 74–81. doi: 10.1099/ijsem.0.003097.

- Li W, Bai L, Fu P, Han H, Liu J, Guo Y (2018):
The Epidemiology of *Listeria monocytogenes* in China.
Foodborne pathogens and disease, 15, 459–466. doi: 10.1089/fpd.2017.2409.
- Lourenço A, Machado H, Brito L (2011):
Biofilms of *Listeria monocytogenes* produced at 12 °C either in pure culture or in co-culture with *Pseudomonas aeruginosa* showed reduced susceptibility to sanitizers.
Journal of Food Science, 76, M143-8. doi: 10.1111/j.1750-3841.2010.02011.x.
- Luque-Sastre L, Arroyo C, Fox E M, McMahon B J, Bai L, Li F, Fanning S (2018):
Antimicrobial Resistance in *Listeria* Species.
Microbiology Spectrum, 6. doi: 10.1128/microbiolspec.ARBA-0031-2017.
- Lüth S, Kleta S, Al Dahouk S (2018):
Whole genome sequencing as a typing tool for foodborne pathogens like *Listeria monocytogenes* – The way towards global harmonisation and data exchange.
Trends in Food Science & Technology, 73, 67–75. doi: 10.1016/j.tifs.2018.01.008.
- Maury M M, Tsai Y-H, Charlier C, Touchon M, Chenal-Francois V, Leclercq A, Criscuolo A, Gaultier C, Roussel S, Brisabois A, Disson O, Rocha E P C, Brisse S, Lecuit M (2016):
Uncovering *Listeria monocytogenes* hypervirulence by harnessing its biodiversity.
Nature genetics, 48, 308–313. doi: 10.1038/ng.3501.
- Maury M M, Bracq-Dieye H, Huang L, Vales G, Lavina M, Thouvenot P, Disson O, Leclercq A, Brisse S, Lecuit M (2019):
Hypervirulent *Listeria monocytogenes* clones' adaption to mammalian gut accounts for their association with dairy products.
Nature Communications, 10, 2488. doi: 10.1038/s41467-019-10380-0.
- Mayrhofer S, Paulsen P, Smulders F J M, Hilbert F (2004):
Antimicrobial resistance profile of five major food-borne pathogens isolated from beef, pork and poultry.
International Journal of Food Microbiology, 97, 23–29. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2004.04.006.
- McLauchlin J (1997):
The discovery of *Listeria*.
PHLS Microbiology Digest, 14, 76–78.
- McLauchlin J, Aird H, Amar C, B C, D T, Lai S, Painset A, Willis C (2021):
An outbreak of human listeriosis associated with frozen sweet corn consumption: Investigations in the UK.
International Journal of Food Microbiology, 338, 108994. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2020.108994.
- 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.
J Food Prot, 76, 1863–1867. doi: 10.4315/0362-028X.JFP-12-505.
- Merle R, Busse M, Rechter G, Meer U (2012):
Regionalisierung Deutschlands anhand landwirtschaftlicher Strukturdaten.
Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift, 125, 52–59. doi: 10.2376/0005-9366-125-52.

- Mielke M E, Peters C, Hahn H (1997):
Cytokines in the induction and expression of T-cell-mediated granuloma formation and protection in the murine model of listeriosis.
Immunological Reviews, 158, 79–93. doi: 10.1111/j.1600-065X.1997.tb00994.x.
- Milillo S R, Friedly E C, Saldivar C, Muthaiyan A, O’Bryan C, Crandall P G, Johnson M G, Ricke S C (2012):
A review of the ecology, genomics, and stress response of *Listeria innocua* and *Listeria monocytogenes*.
Critical reviews in food science and nutrition, 52, 712–725. doi: 10.1080/10408398.2010.507909.
- Morvan A, Moubareck C, Leclercq A, Hervé-Bazin M, Bremont S, Lecuit M, Courvalin P, Le Monnier A (2010):
Antimicrobial resistance of *Listeria monocytogenes* strains isolated from humans in France.
Antimicrob Agents Chemother, 54, 2728–2731. doi: 10.1128/AAC.01557-09.
- Mota M I, Vázquez S, Cornejo C, D’Alessandro B Braga V Caetano A, Betancor L, Varela G (2020):
Does Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes* Contribute Significantly to the Burden of Antimicrobial Resistance in Uruguay?
Frontiers in veterinary science, 7, 583930. doi: 10.3389/fvets.2020.583930.
- Moura A, Criscuolo A, Pouseele H, Maury M M, Leclercq A, Tarr C, Björkman J T, Dallman T, Reimer A, Enouf V, Larssonneur E, Carleton H, Bracq-Dieye H, Katz L S, Jones L, Touchon M, Tourdjman M, Walker M, Stroika S, Cantinelli T, Chenal-Francisque V, Kucerova Z, Rocha E P C, Nadon C, Grant K, Nielsen E M, Pot B, Gerner-Smidt P, Lecuit M, Brisse S (2016):
Whole genome-based population biology and epidemiological surveillance of *Listeria monocytogenes*.
Nat Microbiol, 2, 16185. doi: 10.1038/nmicrobiol.2016.185.
- Moura A, Disson O, Lavina M, Thouvenot P, Huang L, Leclercq A, Fredriksson-Ahomaa M, Eshwar A K, Stephan R, Lecuit M (2019):
Atypical Hemolytic *Listeria innocua* Isolates Are Virulent, albeit Less than *Listeria monocytogenes*.
Infection and immunity, 87. doi: 10.1128/IAI.00758-18.
- Mourenza Á, Gil J A, Mateos L M, Letek M (2020):
Alternative Anti-Infective Treatments to Traditional Antibiotherapy against Staphylococcal Veterinary Pathogens.
Antibiotics, 9, 702. doi: 10.3390/antibiotics9100702.
- Noll M, Kleta S, Al Dahouk S (2018):
Antibiotic susceptibility of 259 *Listeria monocytogenes* strains isolated from food, food-processing plants and human samples in Germany.
Journal of Infection and Public Health, 11, 572–577. doi: 10.1016/j.jiph.2017.12.007.
- Obaidat M M, Bani Salman A E, Lafi S Q, Al-Abboodi A R (2015):
Characterization of *Listeria monocytogenes* from three countries and antibiotic resistance differences among countries and *Listeria monocytogenes* serogroups.
Lett Appl Microbiol, 60, 609–614. doi: 10.1111/lam.12420.
- Olaimat A N, Al-Holy M A, Shahbaz H M, Al-Nabulsi A A, Abu Ghoush M H, Osaili T M, Ayyash M M, Holley R A (2018):
Emergence of Antibiotic Resistance in *Listeria monocytogenes* Isolated from Food Products: A Comprehensive Review.

Comprehensive reviews in food science and food safety, 17, 1277–1292. doi: 10.1111/1541-4337.12387.

Orsi R H, den Bakker H C, Wiedmann M (2011):

Listeria monocytogenes lineages: Genomics, evolution, ecology, and phenotypic characteristics. International journal of medical microbiology: IJMM, 301, 79–96. doi: 10.1016/j.ijmm.2010.05.002.

Pérez-Díaz J C, Vicente M F, Baquero F (1982):

Plasmids in *Listeria*.

Plasmid, 8, 112–118. doi: 10.1016/0147-619X(82)90049-X.

Perrin M, Bemer M, Delamare C (2003):

Fatal Case of *Listeria innocua* Bacteremia.

Journal of clinical microbiology, 41, 5308–5309. doi: 10.1128/JCM.41.11.5308-5309.2003.

Poyart-Salmeron C, Carlier C, Trieu-Cuot P, Courtieu A-L, Courvalin P (1990):

Transferable plasmid-mediated antibiotic resistance in *Listeria monocytogenes*.

The Lancet, 335, 1422–1426. doi: 10.1016/0140-6736(90)91447-I.

Rahimi E, Ameri M, Momtaz H (2010):

Prevalence and antimicrobial resistance of *Listeria* species isolated from milk and dairy products in Iran.

Food Control, 21, 1448–1452. doi: 10.1016/j.foodcont.2010.03.014.

Ramaswamy V, Cresence V M, Rejitha J S, Lekshmi M U, Dharsana K S, Prasad S P, Vijila H M (2007):

Listeria-review of epidemiology and pathogenesis.

Journal of microbiology, immunology, and infection = Wei mian yu gan ran za zhi, 40, 4–13.

Robert Koch-Institut (RKI) (2021):

Infektionsepidemiologisches Jahrbuch meldepflichtiger Krankheiten für 2020.

Online

verfügbar

unter

https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/Jahrbuch/Jahrbuch_2020.pdf?__blob=publicationFile.

Roberts A J, Wiedmann M (2003):

Pathogen, host and environmental factors contributing to the pathogenesis of listeriosis.

Cellular and molecular life sciences: CMLS, 60, 904–918. doi: 10.1007/s00018-003-2225-6.

Rocourt J, Hof H, Schrettenbrunner A, Malinverni R, Bille J (1986):

Méningite purulente aiguë à *Listeria seeligeri* chez un adulte immunocompétent.

Schweizerische medizinische Wochenschrift, 116, 248–251.

Rocourt J, Buchrieser C (2007):

The Genus *Listeria* and *Listeria monocytogenes*: Phylogenetic Position, Taxonomy, and Identification.

In: *Listeria*, listeriosis, and food safety/Hrsg.: Elliot T R und Elmer H M, 3. Auflage, S. 1-20

Boca Raton, Fla.: CRC Press – ISBN: 9780824757502.

Royer E, Moundy G, Albar J, Martineau G-P (2004):

Descriptive study of the microbiological contamination load of the liquid feeding system in nine pig farms: 1 - Effect of the various parts of the system.

Revue de Médecine Vétérinaire, 155, 609–618.

- Ruvalcaba-Gómez J M, Villagrán Z, Valdez-Alarcón J J, Martínez-Núñez M, Gomez-Godínez L J, Ruesga-Gutiérrez E (2022):
Non-Antibiotics Strategies to Control *Salmonella* Infection in Poultry.
Animals, 12, 102. doi: 10.3390/ani12010102.
- Salcedo C, Arreaza L, Alcalá B, de La Fuente L, Vázquez J A (2003):
Development of a multilocus sequence typing method for analysis of *Listeria monocytogenes* clones.
J Clin Microbiol, 41, 757–762. doi: 10.1128/JCM.41.2.757-762.2003.
- Sarno, E, Fierz L, Zweifel C, Tasara T, Stephan R (2016):
Characteristics of *Listeria monocytogenes* isolated from tonsils of slaughtered fattening pigs in Switzerland.
J Verbr Lebensm, 11, 19–23. doi: 10.1007/s00003-015-0974-4.
- Schlech W F, Lavigne P M, Bortolussi R A, Allen A C, Haldane E V, Wort A J, Hightower A W, Johnson S E, King S H, Nicholls E S, Broome C V (1983):
Epidemic listeriosis-evidence for transmission by food.
N Engl J Med, 308, 203–206. doi: 10.1056/nejm198301273080407.
- Schoder D, Guldimann C, Märtlbauer E (2022):
Asymptomatic Carriage of *Listeria monocytogenes* by Animals and Humans and Its Impact on the Food Chain.
Foods, 11, 3472. doi: 10.3390/foods11213472.
- Scotti M, Han L, Alvarez S, Leclercq A, Moura A, Lecuit M, Vazquez-Boland J (2018):
Epistatic control of intrinsic resistance by virulence genes in *Listeria*.
PLOS Genetics, 14, e1007525. doi: 10.1371/journal.pgen.1007525.
- Seeliger H P R (1955):
Listeriosis. Contributions to hygiene and epidemiology. Leipzig, Germany: Johann Ambrosius Barth.
Beiträge zur Hygiene und Epidemiologie, 154.
- Seeliger H P R, Höhne K (1979):
Chapter II Serotyping of *Listeria monocytogenes* and Related Species.
Methods in Microbiology, 13, 31–49. doi: 10.1016/S0580-9517(08)70372-6.
- Sévellec Y, Ascencio E, Douarre P-E, Félix B, Gal L, Garmyn D, Guillier L, Piveteau P, Roussel S (2022):
Listeria monocytogenes: Investigation of Fitness in Soil Does Not Support the Relevance of Ecotypes.
Front Microbiol, 13, 917588. doi: 10.3389/fmicb.2022.917588.
- Sharkey L K R, Edwards T A, O’Neill A J (2016):
ABC-F Proteins Mediate Antibiotic Resistance through Ribosomal Protection.
mBio 7, e01975. doi: 10.1128/mBio.01975-15.
- Sharma S, Sharma V, Dahiya D K, Khan A, Mathur M, Sharma A (2017):
Prevalence, Virulence Potential, and Antibiotic Susceptibility Profile of *Listeria monocytogenes* Isolated From Bovine Raw Milk Samples Obtained From Rajasthan, India.
Foodborne pathogens and disease 14, 132–140. doi: 10.1089/fpd.2016.2118.
- Skovgaard N, Nørrung B (1989):
The incidence of *Listeria* spp. in faeces of Danish pigs and in minced pork meat.
International Journal of Food Microbiology, 8, 59–63. doi: 10.1016/0168-1605(89)90080-9.

- Skovgaard N (1990):
The impact of the prevalence of *Listeria monocytogenes* in the environment on meat and milk hygiene.
Microbiologie, Aliments, Nutrition, 8, 15–20.
- Smillie C S, Smith M B, Friedman J, Cordero O X, David L A, Alm E J (2011):
Ecology drives a global network of gene exchange connecting the human microbiome.
Nature, 480, 241–244. doi: 10.1038/nature10571.
- Stein H; Stessl B, Brunthaler R, Loncaric I, Weissenböck H, Ruczizka U, Ladinig A, Schwarz L (2018):
Listeriosis in fattening pigs caused by poor quality silage - a case report.
BMC veterinary research, 14, 362. doi: 10.1186/s12917-018-1687-6.
- Troxler R, von Graevenitz A, Funke G, Wiedemann B, Stock I (2000):
Natural antibiotic susceptibility of *Listeria* species: *L. grayi*, *L. innocua*, *L. ivanovii*, *L. monocytogenes*, *L. seeligeri* and *L. welshimeri* strains.
Clinical microbiology and infection: the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, 6, 525–535. doi: 10.1046/j.1469-0691.2000.00168.x.
- Urban-Chmiel R, Marek A, Stępień-Pyśniak D, Wieczorek K, Dec M, Nowaczek A, Osek J (2022):
Antibiotic Resistance in Bacteria—A Review.
Antibiotics, 11, 1079. doi: 10.3390/antibiotics11081079.
- van Hoek A H A M, Mevius D, Guerra B, Mullany P, Roberts A P, Aarts H J M (2011):
Acquired antibiotic resistance genes: an overview.
Front Microbiol, 2, 203. doi: 10.3389/fmicb.2011.00203.
- Vicente M F, Baquero F, Pérez-Díaz J C (1988):
Conjugative acquisition and expression of antibiotic resistance determinants in *Listeria* spp.
J Antimicrob Chemother, 21, 309–318. doi: 10.1093/jac/21.3.309.
- Vilchis-Rangel R E, Del Espinoza-Mellado M R, Salinas-Jaramillo I J, Martinez-Peña M D, Rodas-Suárez O R (2019):
Association of *Listeria monocytogenes* LIPI-1 and LIPI-3 marker IIsX with invasiveness.
Curr Microbiol, 76, 637–643. doi: 10.1007/s00284-019-01671-2.
- Vivant A-L, Garmyn D, Piveteau P (2013):
Listeria monocytogenes, a down-to-earth pathogen.
Front Cell Infect Microbiol, 3, 87. doi: 10.3389/fcimb.2013.00087.
- Volokhov D, George J, Anderson C, Duvall R E, Hitchins A D (2006):
Discovery of natural atypical nonhemolytic *Listeria seeligeri* isolates.
Appl Environ Microbiol, 72, 2439–2448. doi: 10.1128/AEM.72.4.2439-2448.2006.
- Volokhov D V, Duperrier S, Neverov A A, George J, Buchrieser C, Hitchins A D (2007):
The presence of the internalin gene in natural atypically hemolytic *Listeria innocua* strains suggests descent from *L. monocytogenes*.
Applied and environmental microbiology, 73, 1928–1939. doi: 10.1128/AEM.01796-06.
- Wacheck S, Fredriksson-Ahomaa M, König M, Stolle A, Stephan R (2010):
Wild boars as an important reservoir for foodborne pathogens.
Foodborne pathogens and disease, 7, 307–312. doi: 10.1089/fpd.2009.0367.

Walsh D, Duffy G, Sheridan J J, Blair I S, McDowell D A (2001):
Antibiotic resistance among *Listeria*, including *Listeria monocytogenes*, in retail foods.
Journal of applied microbiology, 90, 517–522. doi: 10.1046/j.1365-2672.2001.01273.x.

Yan S, Li M, Luque-Sastre L, Wang W, Hu Y, Peng Z, Dong Y, Gan X, Nguyen S, Anes J, Bai Y, Xu J, Fanning S, Li F (2019):
Susceptibility (re)-testing of a large collection of *Listeria monocytogenes* from foods in China from 2012 to 2015 and WGS characterization of resistant isolates.
The Journal of antimicrobial chemotherapy, 74, 1786–1794. doi: 10.1093/jac/dkz126.

Yin Y, Yao H, Doijad S, Kong S, Shen Y, Cai X, Tan W, Wang Y, Feng Y, Ling Z, Wang G, Hu Y, Lian K, Sun X, Liu Y, Wang C, Jiao K, Liu G, Song R, Chen X, Pan Z, Loessner M J, Chakraborty T, Jiao X (2019):
A hybrid sub-lineage of *Listeria monocytogenes* comprising hypervirulent isolates.
Nat Commun, 10, 4283. doi: 10.1038/s41467-019-12072-1.

Yokoyama E, Saitoh T, Maruyama S, Katsube Y (2005):
The marked increase of *Listeria monocytogenes* isolation from contents of swine cecum.
Comparative immunology, microbiology and infectious diseases, 28, 259–268. doi: 10.1016/j.cimid.2005.03.002.

Zhang Y, Gu A Z, He M, Li D, Chen J (2017):
Subinhibitory Concentrations of Disinfectants Promote the Horizontal Transfer of Multidrug Resistance Genes within and across Genera.
Environmental science & technology, 51, 570–580. doi: 10.1021/acs.est.6b03132.

9 Weitere Publikationen im Rahmen der Promotion

Publikationen in wissenschaftlichen Fachzeitschriften:

Félix, B.; Sevellec, Y.; Palma, F. Douarre, P.E.; Felten, A.; Radomski, N.; Mallet, L.; Blanchard, Y.; Leroux, A.; Soumet, C.; Bridier, A.; Piveteau, P.; Ascensio, E.; Hébraud, M.; Karpíšková, R.; Gelbíčová, T.; Torresi, M.; Pomilio, F.; Cammà, C.; Di pasquale, A.; Skjerdal, T.; Pietzka, A.; Ruppitsch, W.; Ricão Canelhas, M.; Papić, B.; Hurtado, A.; Wullings, B.; Bulawova, H.; Castro, H.; Lindström, M.; Korkeala, H.; Šteingolde, Z.; Kramarenko, T.; Cabanova, L.; Szymczak, B.; Gareis, M.; Oswaldi, V.; Marti, E.; Seyfarth, A.; Leblanc, J.; Guillier, L.; Roussel, S. (2022):

A European-wide dataset to uncover adaptive traits of *Listeria monocytogenes* to diverse ecological niches.

Scientific Data; 9(1), 190

<https://doi.org/10.1038/s41597-022-01278-6>

Poster:

Oswaldi, V.; Dzierzon, J.; Thieme, S.; Merle, R.; Meemken, D. (2019):

The entry of *Listeria monocytogenes* into the food chain via slaughter pigs.

Zoonoses 2019 - International Symposium on Zoonoses Research
Berlin – 16.10.-18.10.2019.

In: Zoonoses 2019 - International Symposium on Zoonoses Research, Joint meeting of the National Research Platform for Zoonoses and the Research Network Zoonotic Infectious Diseases, Program and Abstracts – German Research Plattform for Zoonoses (Hrsg.)
Berlin, S. 113

Vorträge:

Oswaldi, V.; Dzierzon, J.; Merle, R.; Thieme, S.; Meemken, D. (2019):

Eintrag von *Listeria monocytogenes* in die Lebensmittelkette über das Schlachtschwein.

60. Arbeitstagung des Arbeitsgebiets Lebensmittelsicherheit und Verbraucherschutz
Garmisch-Partenkirchen – 24.09.-27.09.2019.

In: Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft. 60. Arbeitstagung des Arbeitsgebiets
Lebensmittelsicherheit und Verbraucherschutz. 24.-27. September 2019 in Garmisch-
Partenkirchen

Verlag der DVG Service GmbH, Gießen; 60, S. 189–190
ISBN: 978-3-86345-492-0

Oswaldi, V.; Dzierzon, J.; Merle, R.; Thieme, S.; Meemken, D. (2019):

The entry of *Listeria monocytogenes* into the food chain via slaughter pigs.

13th SafePork 2019. One Health - Tear down interdisciplinary walls
Berlin – 26.08.-29.08.2019.

In: 13th SafePork 2019: One Health - Tear down interdisciplinary walls: Proceedings –
Safepork-Conference (Hrsg.)

Berlin: MCI Deutschland GmbH, S. 109

ISBN: 978-3-00-063507-6

www.safepork-conference.com/fileadmin/user_upload/MAIN-dateien/web_safepork.pdf

Oswaldi, V.; Dzierzon, J.; Merle, R.; Thieme, S.; Meemken, D. (2019):
Eintrag von *Listeria monocytogenes* in die Lebensmittelkette über das Schlachtschwein.
19. Fachtagung für Fleisch- und Geflügelfleischhygiene
Berlin – 05.03.-06.03.2019.
In: 19. Fachtagung für Fleisch- und Geflügelfleischhygiene, Abstracts – BfR (Hrsg.)
Berlin. BfR Abstracts, S. 25–26
ISBN: 978-3-00-061932-8

10 Danksagung

Ich möchte meinen herzlichen Dank an alle MitarbeiterInnen der FU Berlin, die mir bei der Planung, Durchführung und Erstellung dieser Arbeit geholfen und mich auch mental unterstützt haben, aussprechen. Für all die helfenden Hände von der Probennahme bis zur endlos scheinenden Laborarbeit gilt mein besonderer Dank! Danke auch den beteiligten MitarbeiterInnen des BfR in Berlin und ANSES in Maisons-Alfort für die Kooperation in diesem Projekt und das Einbringen ihrer Expertise.

Ein riesiges Dankeschön gilt all meinen FreundInnen, MitbewohnerInnen sowie Familienmitgliedern, die mich auf diesem langen Weg unterstützt und begleitet haben und mich immer wieder ermutigt haben, weiterzumachen. Dieser Text entstand zu Teilen in Deutschland, in Italien und in Österreich und an jedem dieser Orte gab es Menschen, die mir beistanden, mir Mut machten, sich meine Präsentationen mit endloser Geduld anhörten und wertvolles Feedback gaben, Texte Korrektur lasen, mir Zeitmanagementtechniken (wie die berühmte „Pomodoro-Technik“) näher brachten, sich mit mir zum Schreiben verabredeten („geteiltes Leid ist halbes Leid“) und mir sogar dafür ihre Wohnungen zur Verfügung stellten. Ohne sie alle wäre diese Arbeit wohl nicht zustande gekommen und ich bin jedem Einzelnen unendlich dankbar dafür.

11 Finanzierungsquellen

Diese Forschungsarbeit wurde vom Wissenschaftsfonds der QS Qualität und Sicherheit GmbH finanziell unterstützt (Freie Universität Berlin Vertragsnummer: 2018000308). Die Publikationskosten wurden durch das Projekt DEAL sowie den Open Access Publikationsfonds der Freien Universität Berlin organisiert und übernommen.

12 Interessenskonflikte

Es besteht kein Interessenskonflikt durch die finanzielle Unterstützung der Arbeit.

13 Selbstständigkeitserklärung

Hiermit bestätige ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig angefertigt habe und versichere, dass ich ausschließlich die angegebenen Quellen und Hilfen in Anspruch genommen habe.

Wien, am 06.10.2023

Verena Oswaldi