

# *Listeria monocytogenes*

i lakseprodukter og utprøving av ulike påvisnings metoder

Mona Sæbø u952700

Halvdan Klæboe u952672

*2002-01-21*

# Innholdsfortegnelse

Sammendrag.....	3
Summary .....	5
1. Innledning.....	6
1.1 Genus <i>Listeria</i> .....	8
1.1.1 Taksonomi.....	8
1.1.2 Slektskarakteristikk .....	8
1.1.3 Artsidentifisering.....	10
1.1.4 <i>Listeria</i> i miljøet.....	10
1.1.5 <i>Listeria</i> i sjømat.....	12
1.1.6 Virulensegenskaper .....	12
1.2 Listeriose .....	13
1.2.1 Utbrudd.....	15
2. Materiale og metoder .....	17
2.1 Bedriften.....	17
2.2 Prøveinnsamling.....	17
2.3 Oversikt over anvendte metoder .....	18
2.3.1 NMKL 136, 2. utgave 1999. ....	18
2.3.1 CAMP-test etter NMKL 136, 1. utgave 1990. ....	19
2.3.2 Micro-ID <sup>®</sup> <i>Listeria</i> (Remel): .....	19
2.3.3 VIP- <i>Listeria</i> (Biocontrol).....	20
2.3.4 Rapid L' mono (Sanofi Pasteur).....	20
2.3.5 Probelia <sup>™</sup> <i>Listeria</i> (BIORAD):.....	21
3. Resultater.....	22
3.1 Forekomst av <i>L. monocytogenes</i> og <i>L. spp.</i> .....	22
3.2 Utprøving av ulike metoder.....	26
3.2.1 Micro-ID <sup>®</sup> <i>Listeria</i> .....	26
3.2.2 VIP- <i>Listeria</i> .....	26
3.2.3 Rapid L' mono .....	27
3.2.4 Funksjonstest av Probelia <sup>™</sup> <i>Listeria</i> .....	28
4. Diskusjon.....	29
4.1 Forekomst av <i>L. monocytogenes</i> og <i>L. spp.</i> og vurdering av tiltak.....	29
4.2 Utprøving og vurdering av ulike metoder .....	34
4.2.1 NMKL 136, 2. utgave 1999. ....	34
4.2.2 Micro-ID <sup>®</sup> <i>Listeria</i> .....	36
4.2.3 VIP- <i>Listeria</i> - test.....	37
4.2.4 Rapid L' mono .....	38
4.2.5 Funksjonstest av Probelia <sup>™</sup> <i>Listeria</i> .....	39
Litteraturliste .....	41
Vedlegg .....	51

## Sammendrag

To lokaler (A og B) som produserer ferske laksefileter og røykelaks ble undersøkt med hensyn på *Listeria*-bakterier i miljøet. Prøvene er tatt av fiskeavkutt fra utvalgte foredlingsmaskiner. I tillegg ble det foretatt utprøving av ulike metoder.

For påvisning av *Listeria spp.* ble det brukt en tradisjonell metode med oppformering i næringsbuljong og sekundært utstryk på selektive agarskåler i henhold til NMKL 136 2. utgave 1999. CAMP-test ble brukt til å verifisere *L. monocytogenes*. Resultatene ble brukt som referanse ved sammenligning med andre metoder.

Det ble gjennomført totalt 441 analyser fordelt på de to produksjonslokalene. Fra lokale A ble det analysert 252 prøver. 97 av disse var fra ubehandlet fisk, mens 155 var fra røyket fisk. I den røykte fisken ble det påvist *L. monocytogenes* og *L. spp.* i henholdsvis 15% og 16% av prøvene. I den ubehandlede fisken ble det påvist *L. monocytogenes* og *L. spp.* i henholdsvis 66% og 13% av prøvene. I lokale B ble det analysert 189 prøver fra ferske laksefileter. *L. monocytogenes* og *L. spp.* ble påvist i henholdsvis 33% og 11% av prøvene.

Det ble i alt foretatt syv analyseserier fra uke 6 til uke 37, 2001. I uke 6 ble det i lokale A påvist *L. monocytogenes* i 59% av prøvene og *L. spp.* i 22% av prøvene. I første analyseserie i lokale B (uke 8) ble det påvist *L. monocytogenes* i 63% av prøvene, men det ble ikke funnet *L. spp.* Bedriften har i løpet av perioden foretatt ulike hygieniske tiltak for å bedre lokalenes sanitære forhold. Analysene tyder på at tiltakene har hatt en viss effekt.

Micro-ID<sup>®</sup> *Listeria* er en verifiseringstest som skiller de ulike *Listeria*-artene. Den brukes i kombinasjon med hemolyse og CAMP-test. Testen ble brukt på 28 isolater. *L. monocytogenes* ble påvist i 21 prøver og i 6 prøver ble det påvist *L. innocua*. En av isolatene kunne ikke artsbestemmes. Micro-ID<sup>®</sup> *Listeria* kan være et alternativ til vanlige sukkerforgjæringstester og andre biokjemiske enkelttester.

VIP-*Listeria* er en testbrikke som identifiserer *L. spp.* Ved positivt resultat må prøvene verifiseres med andre metoder for å påvise *L. monocytogenes*. Testen ble brukt på 18 prøver. I en av prøvene viste VIP-*Listeria* et falskt negativt resultat. Det ble undersøkt om oppformering med Fraser-buljong kan brukes til VIP-*Listeria* testen. Det ble undersøkt 33 prøver. Resultatene viste av denne oppformeringsprosedyren ikke er egnet for VIP *Listeria*.

Rapid L'mono, et selektivt kromogent medie, ble brukt parallelt med Oxford- og PALCAM-agar på 80 prøver. Mediet skiller *L. monocytogenes*, *L. ivanovii* og *L. spp.* Med Rapid L'mono ble det isolert *L. monocytogenes* fra en prøve der det kun var funnet *L. spp.* med NMKL 136. Rapid L'mono er et pålitelig og arbeidsbesparende medie som kan ha

fordeler fremfor tradisjonelle medier i de tilfellene der *L. monocytogenes* er i mindretall i blandingskulturer.

Det ble foretatt en funksjonstest av Probelia™ Listeria. Testen baseres på polymerase chain reaction (PCR) og verifisering med ELISA. Metoden kan påvise *L. monocytogenes* etter ett døgn. 20 prøver infisert med *L. monocytogenes* og 20 negative prøver ble testet. *L. monocytogenes* ble korrekt påvist i alle de infiserte prøvene, de ikke-infiserte prøvene gav ikke utslag.

## Summary

### ***Listeria monocytogenes* in Salmon Products and Testing of Various Isolation Methods**

Two processing plants (A and B) producing fresh and smoked salmon were tested with respect to occurrence of *Listeria* in the production environment. A total of 441 samples were examined. At location A, 252 samples were examined, of which 97 were taken from unprocessed fish and 155 from cold-smoked fish. In the unprocessed fish *L. monocytogenes* and *L. spp.* was present in 66% and 13% of the samples respectively. For smoked fish, comparative values were 15% and 16%. At location B, 189 samples were taken of unprocessed fish. At this location, *L. monocytogenes* and *L. spp.* was present in 33% and 11% of the samples respectively. From week 6 to 37, 2001, a total of seven analyses were conducted. In week 6, analyses were done at location A showing the presence of *L. monocytogenes* in 59% of the samples and *L. spp.* in 25% of the samples. In the first analyses at location B in week 8, the presence of *L. monocytogenes* was found in 63% of the samples. No presence of *L. spp.* was found at this stage. During the test period, management at the processing plant initiated various hygiene precautions to improve the sanitary situation.

In the testing for *Listeria spp.* the traditional method of growth in nutritional broth and application to selective agar dishes was employed according to standards in NMKL 136, 2. ed. 1999. The CAMP-test was used for verification of *L. monocytogenes*. The results were used as a reference when comparing with other isolation methods. Micro-ID<sup>®</sup> *Listeria* is a method of verification that differentiates between the various species of *Listeria*. The method is used in combination with hemolyse and CAMP-tests. The method was used on 28 isolates. *L. monocytogenes* was verified in 21 samples and *L. innocua* in 6 samples. VIP *Listeria* is a test application to identify *L. spp.* A total of 18 tests were completed. In one sample, VIP *Listeria* showed a false negative result. The study investigated the possibility of using the same enrichment protocols for the VIP-*Listeria* as used for Oxford- and PALCAM-agar. Results indicated that this procedure was not usable. Rapid L'mono, a selective chromogenic agar dish, was used parallel to Oxford-agar, PACAM-agar and CAMP-test on 80 samples. This medium differentiates between *L. monocytogenes*, *L. ivanovii* and *L. spp.* In this medium, *L. monocytogenes* develops blue color and is easy to distinguish from other *Listeria* species. With the use of Rapid L'mono, the test managed to isolate *L. monocytogenes* from a sample whereas *L. spp.* was detected by the NMKL 136. A functional test was done of Probelia<sup>™</sup> *Listeria*. Twenty negative samples and 20 samples infected by *L. monocytogenes* were tested. All tests showed a correct result.

# 1. Innledning

*Listeria monocytogenes* er en viktig human patogen (Arvantidou et al. 1997) som har fått økt oppmerksomhet de senere årene. Våren 2000 valgte EU-kommisjonen *L. monocytogenes* som den første sykdomsfremkallende bakterien det skal utarbeides harmoniserte grenseverdier for. Det er ventet at disse vil ligge på maksimum 100 bakterier per gram matvare (SANCO 594 2000).

*L. monocytogenes* har evnen til å kolonisere prosessutstyr og danne biofilm, og kan på denne måten kontaminere råmaterialer og det ferdige produktet (Bremer et al. 2001, Fonnesbech et al. 2001). Inntak av mat kontaminert med *L. monocytogenes* kan forårsake sykdommen listeriose. Invasiv listeriose har et alvorlig sykdomsforløp og høy dødelighet (Meier og Lopez 2001). Sykdommen opptrer oftest hos gravide og hos personer med svekket immunforsvar (nyfødte, gamle og syke).

Det første utbruddet forårsaket av *L. monocytogenes* ble beskrevet av Murray og medarbeidere i 1926 (Murray et al. 1926). De observerte 6 tilfeller av plutselig død blant kaniner i 1924. Den første bekreftede diagnosen av listeriose hos mennesker var en soldat som led av meningitis på slutten av første verdenskrig (Cotoni 1942).

Det er først i de siste 20 årene at *Listeria monocytogenes* har fått status som en matbåren patogen (Rørvik 1995). I løpet av de siste ti-årene har det vært flere sykdomsutbrudd på grunn av *L. monocytogenes*, og bakterien er påvist i flere ulike matvarer. Dette skyldes trolig omfattende forandringer i matvareproduksjonen, med store volumer og kjølelagringssystemer. I tillegg er matvanene endret i retning av mer ”ferdig-til-å-spise-retter” som ofte ikke varmebehandles før konsum (Rocourt et al 2000). I Norge er det særlig fiskeprodukter som har vært i fokus. Røykelaks er utsatt fordi fisken skal gjennom mange ulike ledd, for deretter å bli vakumpakket og kjølelagret.

Er bakterien etablert i produksjonsmiljøet kan den kontaminere de ferdige produktene. Dette kan få alvorlige konsekvenser for bedriften da leveringsstopp og tilbakekalling av mat fra markedet kan føre til store kostnader. Det er derfor nødvendig å etablere rutiner som sikrer at det ferdige produktet til enhver tid holder en bakteriologisk standard som gjør det trygt for konsumentene. Miljøprøver må velges ut fra områder der det er sannsynlig at bakterien kan etablere seg. Det er også viktig å bruke metoder som effektivt kan påvise bakterien.

Vi har foretatt undersøkelser i en fiskeforedlingsbedrift for å kartlegge forekomsten av *Listeria* i miljøet. Miljøprøver fra to av produksjonslokalene er blitt analysert over en 8

måneders periode. Hensikten var å identifisere mulige reservoarer og bidra til at bedriften kunne legge om sine rutiner for å oppnå en høyere grad av matvaresikkerhet. Det er benyttet forskjellige påvisningsmetoder med hensyn på hurtighet, pålitelighet, anvendbarhet og arbeidsmengde. Dette er gjort for å se om nyere hurtigmetoder egner seg like godt, eller eventuelt bedre enn tradisjonelle metoder.

## 1.1 Genus *Listeria*

### 1.1.1 Taksonomi

Genus *Listeria* består av 6 arter:

1. *Listeria monocytogenes*
2. *Listeria ivanovii*
3. *Listeria innocua*
4. *Listeria welshimeri*
5. *Listeria seeligeri*
6. *Listeria grayi*

Slekten omfatter to forskjellige linjer (Rocourt et al. 1982, Boerlin et al. 1991):

1. *Listeria grayi*
2. *Listeria monocytogenes*, *Listeria ivanovii*, *Listeria innocua*, *Listeria welshimeri* og  
*Listeria seeligeri*

Artene innen den andre linjen kan deles opp i to grupper:

- a) *Listeria monocytogenes* og *Listeria innocua*
- b) *Listeria ivanovii*, *Listeria seeligeri* og *Listeria welshimeri*

Av artene i slekten *Listeria* er det bare *Listeria monocytogenes* og i sjeldne tilfeller *Listeria ivanovii* som er rapportert å være ansvarlig mikroorganisme i forbindelse med sykdom hos mennesker (Lunestad 1997). Det er 13 serovarianter av *L. monocytogenes* som kan forårsake sykdom, men 95% av de humane isolatene tilhører serovariantene 1/2a, 1/2b og 4b (Doyle et al. 1997).

### 1.1.2 Slechtskarakteristikk

*Listeria* er en liten (0,5 x 1-2 µm), gram positiv, ikke sporedannende kokkoid stavbakterie med runde ender. Cellene kan finnes alene eller i korte kjeder og kan være arrangert i v-form, y-form eller i palisader.



*L. monocytogenes* har en rekke egenskaper som gjør den til en spesiell utfordring i næringsmiddelsammenheng. *L. monocytogenes* kan overleve lenger under forskjellige miljøforhold enn andre ikke- sporedannende bakterier. Bakterien kan vokse under både aerobe, mikroaerobe og anaerobe forhold og trives godt i redusert oksygenatmosfære (Ryser og Marth 1999). *L. monocytogenes* vokser i et bredt temperaturspekter. I laboratorieforsøk har den blitt rapportert å vokse fra 1-45°C, med optimal vekst mellom 30-37°C. Generasjonstiden i kjøleskapstemperatur (4°C) er 25-30 timer (Junttila et al. 1998, Astwood og Wais 1998). Vekst kan forekomme ved en pH mellom 4,4 og 9,6 mens den er optimal ved pH 7,0 (George og Lund 1992). *Listeria* vokser i medier som inneholder 10% NaCl, men den kan overleve ved konsentrasjoner helt opp til 30% (Seeliger og Jones 1986). Overlevelse ved lav pH og høy saltkonsentrasjon er svært temperaturavhengig, med 15°C som optimum (Farber og Peterkin 1991). Bakterien hemmes ikke av de nitritt-konsentrasjoner som er tillatt i mat i Norge (Rørvik et al. 1997). *Listeria* er en av få matbårne patogener som kan vokse ved en vannaktivitet (aw) under 0,93 (Farber et al. 1992). *Listeria* er bevegelig ved 20-25°C, men ikke eller bare svakt bevegelig ved 37°C (Galsworthy et al. 1990). På næringsagar er koloniene 0,2-0,8 mm i diameter. Etter 24 timers inkubering ved 37°C er de svakt hevet, glatte og punktformede (Fig. 1). Etter 5-10 dager kan godt separerte kolonier bli 5mm eller mer i diameter (Gray 1957). *Listeria* vokser på de fleste vanlige dyrkingsmedier. Veksten øker når det er sukker til stede, spesielt glukose.



Fig.1 Oxfordskål med typiske *Listeria*-kolonier etter inkubering i 24 timer. Esculinhydrolyse fører til at dette mediet blir svart rundt koloniene. Foto: Frode Bergan.

### 1.1.3 Artsidentifisering

Alle *Listeria*-artene er fenotypisk veldig like, men de kan skiller fra hverandre med følgende tester: Hemolyse, CAMP-test og syreproduksjon fra D-xylose og mannitol (Rocourt et al. 1983).

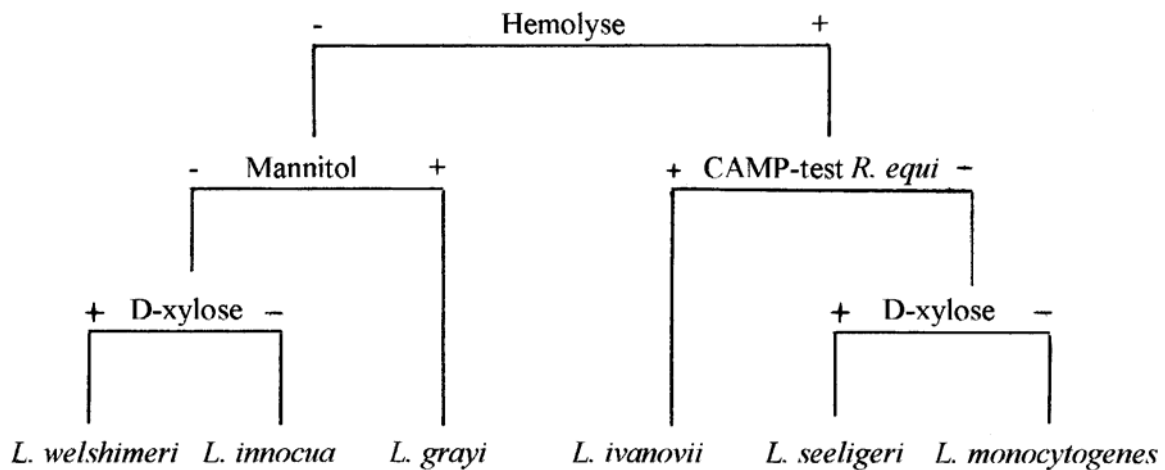


Fig. 2 Identifisering av *Listeria* arter.

### 1.1.4 *Listeria* i miljøet

*L. monocytogenes* er vanlig å finne i jord og vann og på plantemateriale, spesielt under forråtnelse, og disse miljøene anses som det naturlige habitatet til organismen (Rocourt og Seeliger 1985). Man regner ikke naturlig forekommende *Listeria* som en risiko når det gjelder listeriose. Det er først etter oppformering i silo eller i næringsmidler at antallet blir høyt nok til å representere en fare for mennesker og dyr (Ryser og Marth 1999) (Fig. 3).

Oppdyrket mark får tilført råtnende plantemateriale, dyregjødsel og kloakk som alle er godt dokumenterte kilder til *L. monocytogenes*. Råtnende vegetasjon, slik som ødelagt silofôr, kan inneholde store mengder *L. monocytogenes*, og har blitt angitt som kilde til et stort antall utbrudd av listeriose hos gårdsdyr (Ryser og Marth 1999).

*L. monocytogenes* kan finnes i overflatevann (Frances et al. 1991). Bruken av overflatevann for å kvitte seg med kloakk kan føre til at bakterien blir spredd til innsjøer, elver og stryk (Ryser og Marth 1999). I en studie av elven Don i nordøst-Scotland var 42% av prøvene positive for *L. monocytogenes* i mai, mens 53% av prøvene var positive seks måneder senere (Fenlon et al. 1996). I en undersøkelse i Wales ble det påvist *Listeria* i 8 av 30

undersøkte innsjøer. Antallet koliforme bakterier var høyere i de innsjøene der *Listeria* ble påvist. Dette tyder på at det er sammenheng mellom kloakkforurensning og forekomst av *L. monocytogenes* (Frances et al. 1991).

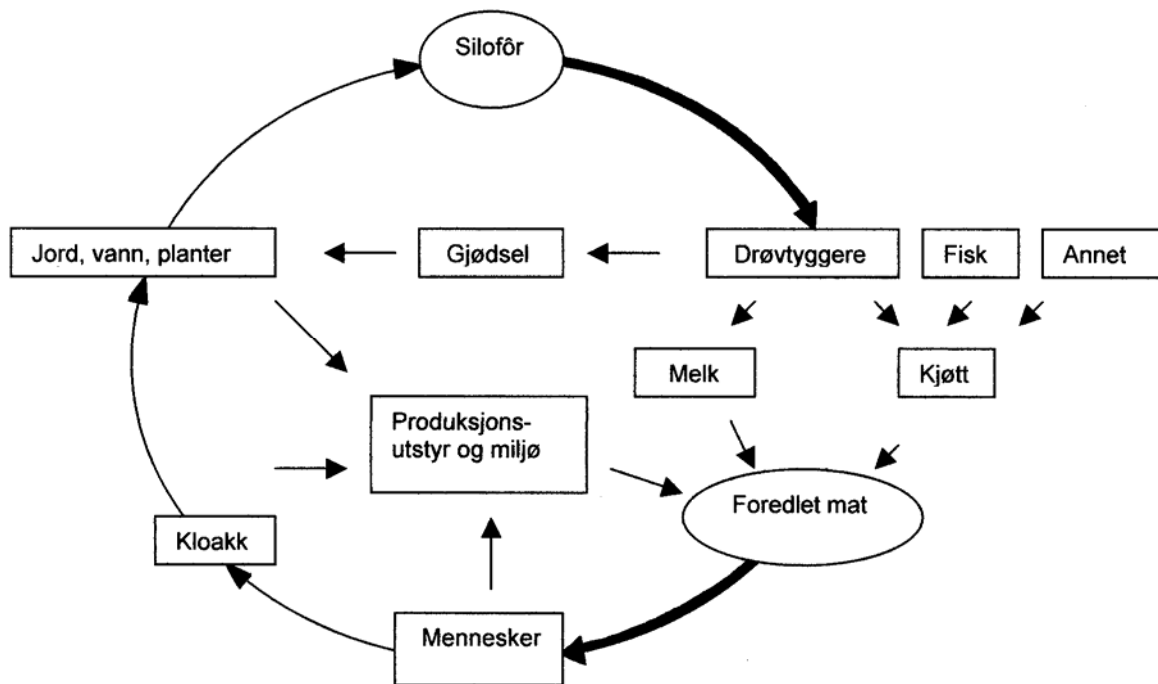


Fig. 3 Spredning av *Listeria monocytogenes* fra miljøet til matvarer.

→ - Kontamineringsvei

○ - Områder med stor fare for oppformering av *Listeria*.

➔ - Risiko for konsumenter

### 1.1.5 *Listeria* i sjømat

*L. monocytogenes* er blitt funnet i mange ulike typer sjømat de senere årene. Både røykelaks og ørret, muslinger, reker, krabbekjøtt og flere andre typer sjømat har vært i søkelyset en rekke ganger (Dillon og Patel 1992).

I Norge ble det i 1991 undersøkt ulike matvarer for å kartlegge forekomst av *L. monocytogenes*. I røykelaks, fiskemasse og reker ble denne bakterien funnet i henholdsvis 9%, 12%, og 18% av prøvene (Rørvik og Yndestad 1991). I undersøkelser av røykelaks i perioden 1988-1992 ble det funnet *L. monocytogenes* i 16% av prøvene (Lunestad 1997). I en undersøkelse av dagligvarer i Japan ble det isolert *L. monocytogenes* i 5,4% av 92 røykelaksprøver (Inoue et al. 2000).

I en undersøkelse i USA i 1987 av importerte frosne reker fra 19 ulike land, ble det funnet *L. monocytogenes* i 5,4% av prøvene, mens 20,3% av prøvene inneholdt *L. spp.* (FDA 1987). En undersøkelse gjort i tidsrommet 1991-1996 av alle typer sjømat i USA, viste at 8,7% av prøvene inneholdt *L. monocytogenes* (Ryser og Marth 1999).

### 1.1.6 Virulensegenskaper

*L. monocytogenes* produserer en eller flere foreløpig ukjente faktorer som påvirker fagocytter og tarmepitelceller til aktivt å ta opp bakterien. Den er i stand til å formere seg intracellulært og kan påvirke vertscellen til aktivt å infisere nye celler (Wegener et al. 1993). Bakterien kan bevege seg i cytoplasma ved at det dannes en aktinhale i den ene enden som skyver bakterien fremover. Slik kan *L. monocytogenes* bevege seg i cellen med en hastighet på opptil 1,5  $\mu\text{m/s}$  (Mounier et al. 1990).

Når den når celleveggen til vertscellen, induserer bakterien dannelsen av en utposning inn i nabocellen (Ryser og Marth 1999). Enzymene listeriolysin O og phospholipase C produseres under bakteriens eksponensielle vekst i cellen og bidrar til lysering av vakuolen (Portnoy et al. 1992). *L. monocytogenes* kan på denne måten bevege seg fra celle til celle uten å komme i kontakt med kroppens immunsystem (Fig. 4). Denne egenskapen gjør også bakterien mer motstandsdyktig mot antibiotika (Watson et al. 1978, Armstrong 1995).

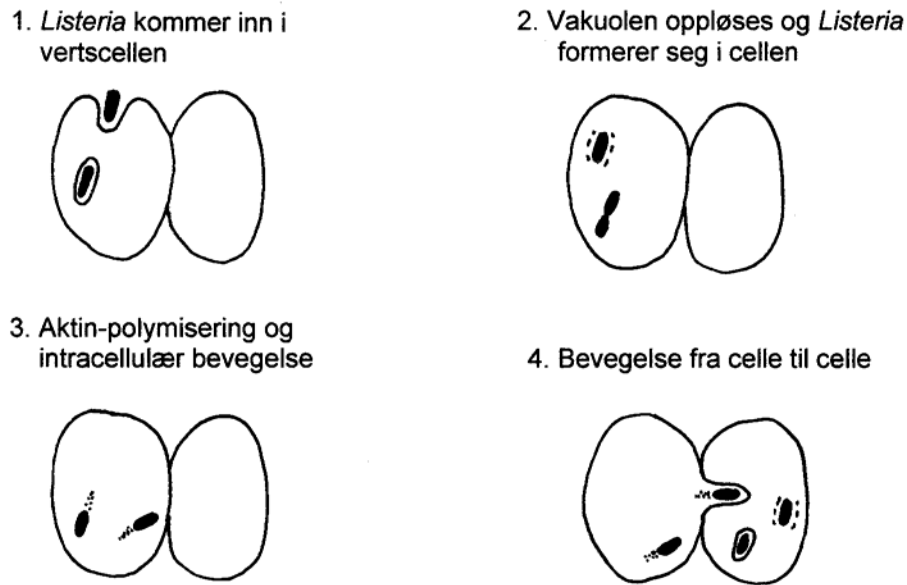


Fig. 4 *Listeria* i vertscellen: Bevegelse og spredning.

Listeriolysin O og phospholipase C gjør også bakterien i stand til å hemolysere blod. Tre arter, *L. monocytogenes*, *L. ivanovii*, og *L. seeligeri* er hemolyserende, men bare *L. monocytogenes* og *L. ivanovii* regnes som patogener (Mainou-Fowler et al. 1988). Man kan derfor ikke gå ut fra at en bakterie er patogen bare basert på observasjon av hemolyse.

## 1.2 Listeriose

*L. monocytogenes* kan forårsake to ulike hovedformer for infeksjon. Den mest alvorlige typen er invasiv listeriose. Denne arten ser seg som sepsis, hjernehinnebetennelse eller hjernebetennelse (Meier og Lopez 2001). Den andre typen infeksjon forårsaket av *L. monocytogenes* er febril gastroenteritt (Schlech 1997). Det finnes flere tilfeller hvor store grupper av mennesker har fått denne type infeksjon etter inntak av mat kontaminert med *L. monocytogenes* (Salamina et al. 1996, Aureli et al. 2000). Det er likevel invasiv listeriose som har fått størst oppmerksomhet på grunn av alvorlig sykdomsforløp og høy dødelighet.

Invasiv listeriose forårsaket av *L. monocytogenes* forekommer vanligvis hos høyrisikogrupper som gravide og personer med svekket immunforsvar (nyfødte, eldre og personer med annen underliggende sykdom) (Meier og Lopez 2001). Utbredelsen av AIDS og bruk av medikamenter i sykdomsterapi og ved organtransplantasjoner har ført til en økt andel av personer med svekket immunforsvar i befolkningen (Goulet og Marchetti 1992). Andelen

av listeriosepasienter som har annen underliggende sykdom varierer i ulike undersøkelser fra 70% til nesten 100% (Bula et al. 1995, Skogberg et al. 1992). Aidspasienter har 300 ganger høyere insidens av listeriose enn resten av befolkningen (Jurado et al. 1993, Schuchat et al. 1991).

Gravide og nyfødte er en utsatt gruppe. Listeriose kan forekomme under hele svangerskapet, men er hyppigst de siste tre månedene. Symptomene ytrer seg oftest som en mild influensa med feber og hodepine (Bortolussi 1990). Smitten kan gå fra mor til barn både gjennom morkaken og ved smitte fra vaginal kolonisering. Ofte fører dette til abort, for tidlig fødsel eller dødfødsel (Hume 1976, Fredriksen 1992). Nyfødte barn kan også utvikle listeriose rett etter fødselen, dette arter seg da oftest som sepsis med komplikasjoner som pustevansker eller lungebetennelse (Gellin et al. 1991). Barn som får symptomene senere utvikler oftest hjernehinnebetennelse (McLauchlin 1990). Dødeligheten ved neonatal listeriose er oppgitt å være omkring 36%, selv når effektiv antimikrobiell behandling er tilgjengelig. Det er også rapportert om tilfeller der gravide er bærere av bakterien uten at fosteret er påvirket (Faber og Peterkin 1991).

De fleste husdyr kan få sykdom forårsaket av *L. monocytogenes* (von Amtsberg et al. 1969), men listeriose er særlig kjent hos drøvtyggere. Bakterien kan blant annet gi infeksjoner i sentralnervesystemet og medføre aborter (Schlech et al. 1983). Listeriose er i "Gruppe C" blant meldepliktige dyresykdommer. I Norge ble det i årene 1977-1986 registrert ca. 2500 småfebesetninger hvert år med klinisk listeriose (Ryser og Marth 1999). Insidensen hos kveg, sau og geit er høy, men de nøyaktige tallene for de senere årene er ikke kjent. Listerioseutbrudd forekommer ofte når en silo eller rundball er nyåpnet. Landbrukets omlegging fra silo til rundballer har ført til at det er mange flere, men mindre utbrudd nå enn tidligere. Disse blir sjelden rapportert (Oland pers. med. 2002). Listeriose kan smitte fra dyr til mennesker. Det er rapportert flere tilfeller der personer er blitt smittet under arbeid med dyr (McLuchlin og Low 1994).

Diagnostisering av listeriose baseres på isolering av *L. monocytogenes* fra blod eller spinalvæske (Ryser og Marth 1999). Det har vist seg at isolering fra feces ikke er egnet, da mange er friske bærere (Gray og Killinger 1966). *L. monocytogenes* har blitt isolert fra feces hos 37 ulike friske pattedyr (Gray og Killinger 1966). Også mennesker kan være friske bærere. En undersøkelse av ulike befolkningsgrupper i USA viste at 1-6% av disse var bærere av bakterien uten å ha symptomer på listeriose (Jensen 1993).

Ved sykdomsutbrudd har det ofte vist seg vanskelig å identifisere kilden til infeksjon. *L. monocytogenes* kan finnes i mange ulike matvarer. Funn av *L. monocytogenes* i en matvare

er derfor ikke alltid nok til trekke sikre konklusjoner om smittevei. På tross av mange funn av *Listeria* i sjømat har det derfor ofte vært vanskelig å påvise en sammenheng mellom konsum og listeriose. Spørreskjemaer som også omfatter sjømat blir nå rutinemessig delt ut til listeriosepasienter i flere stater i USA (Schuchat et al. 1992). I en undersøkelse ble det tatt prøver fra rå fisk, røyket fisk og miljøprøver fra fiskeforedlingsbedrifter. *L. monocytogenes* påvist i disse prøvene ble sammenlignet med isolater fra listeriosepasienter. Analysene viste likhet mellom de isolatene som ble funnet i prøvene og i dem fra humane listeriosetilfeller (Norton et al. 2001).

### 1.2.1 Utbrudd

Selv om det er størst fokus på invasiv listeriose, er *L. monocytogenes* også viktig i forbindelse med febril gastroenteritt. I et utbrudd av gastroenteritt i Italia, fikk 18 av 39 friske personer som hadde deltatt i en privat middag symptomer. 14 personer fikk gastrointestinale symptomer, 4 personer ble sendt til sykehus med akutt febril gastroenteritt. To av disse fikk påvist *L. monocytogenes* i blodet (Salamina et al. 1996).

Et utbrudd av gastroenteritt i USA i 1994 oppstod etter konsum av sjokolademelk under en piknik. De fleste av deltagerne som hadde drukket melken fikk diaré og/eller feber, men også hodepine, kvalme og oppkast var hyppig forekommende. Melken inneholdt *L. monocytogenes* serotype ½ b. Inkubasjonstiden var 9-32 timer. Fire av deltakerne ble innlagt kortvarig på sykehus, de øvrige ble friske uten behandling (Dalton et al. 1997).

I 1997 var det et stort antall tilfeller blant studenter og ansatte på en skole i Italia. Alle hadde spist i skolens kantine. Av de 2189 personene som ble intervjuet, hadde 1566 (72%) symptomer på gastroenteritt. 19 personer ble sendt til sykehus. *L. monocytogenes* ble isolert fra 1 blodprøve og 123 avføringsprøver. Bakterien ble funnet på salat og i miljøet i cateringfabrikken. Alle *Listeria*-isolatene var serotype 4b. Det ble konkludert med at matbåren infeksjon fra *L. monocytogenes* kan forårsake gastroenteritt hos immunkompetente personer (Aureli et al. 2000).

På verdensbasis har det vært flere store utbrudd med invasiv listeriose. I Norge har det vært rapportert 175 tilfeller i perioden 1977-97 (Antal et al. 1999). Årlig blir 10-20 personer smittet (MSIS 1998, 1999, 2000). I år 2000 ble det rapportert om 18 tilfeller i Norge. De fleste av disse tilfellene gjaldt voksne personer, enten gamle eller syke. Fem av pasientene døde. Ett av tilfellene gjaldt en frisk mann som spiste bløt ost. Han ble syk umiddelbart etter å ha spist osten, og døde dagen etter (NRK 26.02 2000).

I perioden 1983-1987 var det i Sveits 122 tilfeller av listeriose (Bille 1990). Smittekilden var mykost. 31 av pasientene døde (Tabell 1). Av de som overlevde fikk 30% nevrologiske senskader. I 1991 var det et utbrudd i Canada der 34 gravide og 7 ikke-gravide voksne ble smittet i løpet av seks måneder. Ingen av disse hadde underliggende sykdom. 27% av barna som ble født døde kort tid etter (Schlech et al. 1983). Smittekilden var sommersalat som var gjødslet med fersk sauegjødsel. Salaten var oppbevart kjølig over vinteren, og dette hadde favorisert vekst av *L. monocytogenes*. Utbruddet satte fokus på rå grønnsaker som smittekilde.

I 1992 ble 279 personer smittet i Frankrike (Goulet et al. 1993). Kilden til smitte var grisetunge i aspik. 85 mennesker døde og 22 aborterte under dette utbruddet (Tabell 1). En del av de smittede hadde spist tunge, andre hadde spist næringsmidler som var blitt kontaminert av grisetungen i kjøledisken (Jacquet et al. 1995).

De fleste store utbrudd er forårsaket av serovar 4, hovedsakelig serovar 4b (Tabell 1). Sporadiske og små utbrudd (< 10 tilfeller) er ofte forårsaket av flere forskjellige stammer enn store utbrudd. Men også her er serovar 4b dominerende (Buchreiser et al. 1993).

Tabell 1. Noen store utbrudd av listeriose mellom 1981 og 1995 ( Rocourt og Bille 1997).

Sted	År	Antall tilfeller	Døde	Serotype	Kilde
Canada	1981	41	17	4b	Kålsalat
USA	1983	49	14	4b	Melk
Sveits	1983-1987	122	31	4b	Mykost
USA	1985	142	48	4b	Mykost
Britiske øyer	1989-1990	300	-	4b	Patè
Frankrike	1992	279	85	4b	Grisetunge
Frankrike	1993	39	-	4b	Grisekoteletter
Frankrike	1995	36	-	4b	Mykost



## **2. Materiale og metoder**

### **2.1 Bedriften**

Undersøkelsene er gjort i to separate produksjonslokaler i en lakseforedlingsbedrift som produserer ferske og røykte lakseprodukter. Produksjonen kan samkjøres eller kan foregå uavhengig av hverandre. Bedriften har 104 ansatte, og den samlede årlige kapasiteten er på 2500-4000 tonn, avhengig av hvilke produkttyper som produseres. Lokalene blir i oppgaven kalt produksjonslokale A og produksjonslokale B.

### **2.2 Prøveinnsamling**

Det ble valgt ut 6 faste uttakspunkter i lokale A og 5 i lokale B. I tillegg til dette ble det tatt sporadiske prøver fra andre steder i produksjonslokalene. Det ble tatt ut mellom 25 og 50 gram fiskeavkutt fra hvert uttakspunkt to ganger daglig. Noen av prøvene var mindre fiskebiter, andre var oppsamlet homogen masse. Prøvene ble samlet inn av samme person og tatt på samme tidspunkt (morgen og ettermiddag). Uttakspunktene ble valgt ut i fra hvor en antok at det var mest sannsynlig at bakteriene kunne danne reservoar, og hvor det var stor fare for krysskontaminering.

Det ble totalt undersøkt 441 prøver. 251 av prøvene ble tatt i lokale A, 189 ble tatt i lokale B. Hver prøve ble pakket separat og oppbevart nedfrosset inntil de ble sendt til Høgskolen i Telemark, institutt for Natur- helse- og miljøvern. Analysene startet samme dag som prøvene ble mottatt. Alle analysene er blitt utført fra uke 6 til uke 37, 2001 ved instituttets mikrobiologiske laboratorium. Det ble sendt rapporter til bedriften etter hver analyserunde. På bakgrunn av blant annet disse resultatene har bedriften i løpet av denne perioden foretatt ulike tiltak for å bedre de hygieniske forholdene.

## 2.3 Oversikt over anvendte metoder

### 2.3.1 NMKL 136, 2. utgave 1999.

Ved videre henvisning til metoden vil den bli beskrevet som NMKL 136.

#### Prinsipp:

Det anvendes en totrinns oppformering i selektiv næringsbuljong. Deretter såes buljongen ut på selektive agarskåler. Det er brukt UVM1- buljong i stedet for LB1-buljongen som er beskrevet i metoden. Disse to buljongene har tilnærmet identisk innhold. Det som skiller dem er konsentrasjonen av acriflavin HCL. UVM1-buljong inneholder 12 mg/l, mens det i LB1-buljong er 12,5 mg/l (Tabell 12).

- 25 gram prøve overføres aseptisk til en Stomackerpose og homogeniseres med 225 ml UVM 1 buljong (Oxoid CM 863 + suppl. SR 142E). Dette inkuberes i 24t (+-3t) ved 30°C (+-1,0°C).
- 0,1 ml av den inkuberte buljongen overføres til et reagensrør med 10 ml Fraser-buljong (Oxoid CM 895 + suppl. SR 156E). Buljongene inkuberes i 48t (+- 4 t) ved 37 °C (+-1,0°C).
- Buljong fra de rørene som blir svartet strykes ut på Oxford-agar (Oxoid CM 856 + suppl. SR 206) og Palcam-agar (Oxoid CM 877 + suppl. SR150. Skålene inkuberes i 24t (+-3 t) / 48 t (+- 4 t) ved 37°C (+-1,0°C).
- Oxford- og Palcam-skålene inkuberes ved 37°C og avleses etter 24t og 48t. *Listeria spp.* vokser med sorte, grå eller mørkebrune kolonier omgitt av en svartet sone. Etter 48t inkubering er de nedsunket på midten( Fig. 1)
- Typiske *Listeria*-kolonier overføres ved nedstikk til et reagensrør med 4 ml bevegelighetsagar. Dette er en næringsagar med et innhold av 5 gram agar per liter gjør det mulig for bakterien å bevege seg. Røret inkuberes i 24t eller lengre ved 25°C (+-1,0°C). Typiske *Listeria*-kolonier strykes også ut på blodagarskåler (Merck 1.13414) for hemolysetest.
- Bevegelighetsrør avleses. *Listeria spp.* har en paraplylignende vekst med tydelig bevegelse ut fra stikket. Blodagarskålene avleses for eventuell hemolyse.

### 2.3.1 CAMP-test etter NMKL 136, 1. utgave 1990.

#### Prinsipp:

Testen kan skille de tre hemolyserende *Listeria*-artene, *L. monocytogenes*, *L. ivanovii* og *L. seeligeri*.

- Fem hemolyserende kolonier overføres til blodagarskål preparert for CAMP-test. CAMP-testen utføres ved å stryke ut en vertikal stripe med  $\beta$ -toksisk *Staphylococcus aureus* på den ene siden av en blodagarskål, og en tilsvarende stripe med *Rhodococcus equi* på den andre siden av skålen. Koloniene som skal undersøkes strykes ut mellom disse.
- CAMP-test avleses. Artene skilles på grunnlag av ulik CAMP-reaksjon (Fig. 7).

### 2.3.2 Micro-ID<sup>®</sup> Listeria (Remel):

#### Prinsipp:

Testen skiller de ulike *Listeria*-artene. Den består av brikett med 15 brønner som inneholder trekkpapi som er impregnert med ulike reagenser som kan detektere enzymer og metabolske produkter som er unike for de ulike *Listeria*-artene. Denne erstatter de tradisjonelle sukkerforgjæringene i reagensrør. Micro-ID<sup>®</sup> testen krever renkultur. Ved avlesing gir resultatene i brønnene en tallverdi som sammen med resultatene fra hemolyse og CAMP-test artsbestemmer *Listeria*. Det er en forutsetning ved bruk av Micro-ID<sup>®</sup> Listeria at mikroben som skal testes er grampositive, katalasepositive og oksidasenegative.

- Enkeltkolonier av *Listeria* såes ut på Oxford-agar for å sikre at det ikke testes på ulike *Listeria*-arter samtidig.
- Koloniene suspenderes i 4,6 ml sterilt fysiologisk saltvann. Suspensjonen skal inneholde nok bakterier til at det er tydelig synlig blekking, tilsvarende minst McFarland standard No. 1. 0,3 ml av suspensjonen overføres til hver av de 15 brønnene på briketten. Micro-ID<sup>®</sup> Listeria inkuberes ved 35-37°C. Brønn E (esculinhydrolyse) og RHAM (rhamnosefermentering) avleses etter 4 timer (Vedlegg 6). Er begge disse positive, mistenker man at bakterien er *L. monocytogenes*. Briketten må da inkuberes i ytterligere 20 timer ved 35-37°C. Er både E og RHAM negative, er bakterien ikke *L. monocytogenes*.
- Alle brønnene avleses, med unntak av VP-brønnen (Voges-Proskauer test) I denne tilsettes 2 dråper 20% KOH, og briketten snus slik at denne reagensen når ned til filterpapiret. En venter 10 minutter før denne avleses.

### 2.3.3 VIP-Listeria (Biocontroll)

#### Prinsipp:

Testen kan påvise *L. spp.* Den består av en liten brikke med to vinduer, som gir en antigen-antistoff - reaksjon etter ELISA-prinsippet (Enzyme Linked Immunosorbent Assay). Dette innebærer at bakteriens antigener festes til antistoffer i briketten. Et fargestoff bindes til bakterien ved en antigen-antistoff-reaksjon. Et enzym spalter så av fargestoffet som kommer til syne som en stripe i det ene vinduet på briketten.

- 25 gram prøve overføres aseptisk til en Stomackerpose og homogeniseres med 225 ml modifisert Fraser-buljong (standard Fraser + 4gr LiCl per liter). Dette inkuberes i 28t ved 30°C.
- 1 ml modifisert Fraser-buljong overføres til reagensrør med 9 ml Buffered Listeria Enrichment Broth (BLEB) (Oxoid CM 897 + suppl. SR 141) som inkuberes i 24t ved 30°C.
- 1 ml BLEB overføres så til et sterilt reagensrør og oppvarmes i 100°C i 5 minutter og kjøles deretter ned til 25-37°C. 0,1ml inaktivert BLEB overføres til brønnen på briketten. Denne inkuberes horisontalt i romtemperatur i 10 minutter før avlesning. Briketten har to "vinduer," der en stripe i det ene vinduet gir positiv test. Det andre vinduet er en validering av testen med en tilsvarende stripe. Uten denne stripen er testen ugyldig.

### 2.3.4 Rapid L'mono (Sanofi Pasteur).

#### Prinsipp:

Agarskåler med kromogent medie som detekterer phospholiphase C som er spesifikt for *L. monocytogenes* og *L. ivanovii*. Disse skilles så ved xylose-fermentering, der *L. monocytogenes* er negativ mens *L. ivanovii* er positiv. Dette vises som fargeforskjeller på koloniene. *L. monocytogenes* blir blågrå, mens *L. ivanovii* blir blå med gul "glorie". Andre *Listeria*-arter blir hvite på dette mediet.

- 25 gram prøve overføres aseptisk til en Stomackerpose og homogeniseres med 225 ml halv Fraser-buljong (Oxoid CM 895 + suppl. SR 166E). Denne inkuberes i 24t ved 30°C.

- Den inkuberte buljongen strykes ut på Rapid L' mono agarskåler med podenål. Med denne prosedyren tar det 2-3 døgn å identifisere *L. monocytogenes*. Alternativt kan det overføres 0,1 ml inkubert buljong til 10 ml Fraser-buljong som oppformerer ytterligere ett døgn.
- Skålene som ble sådd ut etter en dags oppformering avleses. Prøver som er blitt oppformert i to døgn strykes ut på Rapid L' mono agarskåler med podenål.
- I henhold til protokollen kan skålene avleses etter ett og to døgns dyrking. Skåler som ble sådd ut dag to og dag tre avleses.
- Skålene med to dagers oppformering leses av etter 48t.

Metoden er AFNOR-godkjent\* (SDP-07/4-09/98).

AFNOR-godkjenningen innebærer at en positiv prøve kan leses av etter ett eller to døgns oppformering og inkubering i ett eller to døgn. For konfirmasjon av negative prøver skal prøven oppformerer i to døgn og inkuberes på Rapid L' mono i to døgn.

### **2.3.5 Probelia™ Listeria (BIORAD):**

#### Prinsipp:

Testen er basert på genamplifikasjon av spesifikke *L. monocytogenes* DNA-fragmenter ved polymerase chain reaktion (PCR) og hybridisering av PCR-produktet. I testen brukes det primere og prober som er spesifikke for *L. monocytogenes* sammen med en kolometrisk analyse på mikrotiterplater. Deteksjon skjer ved ELISA. Godkjent test avgjøres ved avlesing av en positiv og to negative kontroller.

- 25 gram prøve overføres aseptisk til en Stomackerpose og homogeniseres med 225 ml halv Fraser-buljong. Dette inkuberes i 14-18t ved 30°C.
- 1 ml Fraser-buljong brukes videre til DNA ekstraksjon. 5µl DNA-ekstrakt overføres til PCR-rør sammen med ferdig PCR-miks og amplifiseres i termocycler.
- 25µl av PCR-produktet overføres til mikrotiterplater sammen med hybridiseringsmiks og inkuberes i 1t ved 37°C. Etter inkuberingen tømmes mikrotiterplatene og vaskes med en vaskeløsning. Deretter blir det tilsatt deteksjonsvæske i mikrotiterplatene som så blir inkubert 1/2t ved 30°C. Metoden er AFNOR-godkjent\* (SDP-07/3-01/98).

\*AFNOR er et statlig organ underlagt det franske industridepartementet, som siden 1926 har stått for godkjenning og samordning av standarder i Frankrike. AFNOR's sertifiseringer baseres på franske, europeiske og internasjonale standarder.

### 3. Resultater

#### 3.1 Forekomst av *L. monocytogenes* og *L. spp.*

Av de 441 analysene i produksjonslokale A og B fra faste uttakspunkter, ble det påvist *L. monocytogenes* og *L. spp.* i henholdsvis 34% og 13% av prøvene (Tabell 2).

*L. monocytogenes* ble oftest isolert fra prøver tatt før kaldrøyking, der 44% av prøvene var positive. Etter kaldrøyking ble *L. monocytogenes* påvist i 15% av prøvene (all røyking av laks foregår i produksjonslokale A).

Tabell 2. *Listeria monocytogenes* og *Listeria spp.* påvist i produksjonslokalene A og B.

Sted for prøveuttak	Antall prøver	Antall prøver som inneholder	
		<i>L. monocytogenes</i>	<i>L. spp.</i>
Fiskeavkutt tatt før kaldrøyking:			
Ved hodekapping	42	11 (26%)	5 (12%)
Baader 2000 (filetering)	45	7 (16%)	6 (13%)
Napping	20	9 (45%)	1 ( 5%)
Sortering	44	19 (43%)	4 ( 9%)
Fintrimming	38	17 (45%)	4 (11%)
Salteri	4	2 (50%)	-
Skinnemaskin i produksjonen	47	27 (57%)	7 (15%)
Porsjonskutter i produksjonen	46	35 (76%)	6 (13%)
<b>Totalt fiskeavkutt før kaldrøyking</b>	<b>286</b>	<b>127 (44%)</b>	<b>33 (12%)</b>
Fiskeavkutt fra kaldrøyt fisk :			
Skinnemaskin i pakkeriet	52	7 (14%)	9 (17%)
Slicer i pakkeriet	52	12 (23%)	4 ( 8%)
Renskjæring hel filet i pakkeriet	51	4 ( 8%)	12 (24%)
<b>Totalt fra kaldrøyt fisk</b>	<b>155</b>	<b>23 (15%)</b>	<b>25 (16%)</b>
<b>Totalt antall prøver fra faste kontrollpunkter</b>	<b>441</b>	<b>150 (34%)</b>	<b>58 (13%)</b>

I produksjonslokale A ble det foretatt 252 analyser fra faste uttakspunkter. Det ble totalt påvist *L. monocytogenes* og *L. spp.* i henholdsvis 35% og 15% av prøvene. I prøvene tatt før kaldrøyking ble det påvist *L. monocytogenes* i 66% og *L. spp.* i 13%. I prøvene tatt etter kaldrøyking ble *L. monocytogenes* og *L. spp.* påvist i henholdsvis 15% og 16% av prøvene (Tabell 3).

Tabell 3. *Listeria monocytogenes* og *Listeria spp.* i produksjonslokale A.

Sted for prøveuttak	Antall prøver	Antall prøver som inneholder	
		<i>L. monocytogenes</i>	<i>L. spp.</i>
Fiskeavkutt tatt før kaldrøyking :			
Salteri	4	2 (50%)	-
Skinnemaskin i produksjonen	47	27 (57%)	7 (15%)
Porsjonskutter i produksjonen	46	35 (76%)	6 (13%)
<b>Totalt fra prøver tatt før kaldrøyking i lokale A</b>	<b>97</b>	<b>64 (66%)</b>	<b>13 (13%)</b>
Fiskeavkutt fra kaldrøykt fisk :			
Skinnemaskin i pakkeriet	52	7 (14%)	9 (17%)
Slicer i pakkeriet	52	12 (23%)	4 (8%)
Renkjøring hel filet i pakkeriet	51	4 (8%)	12 (24%)
<b>Totalt fra kaldrøykt fisk i lokale A</b>	<b>155</b>	<b>23 (15%)</b>	<b>25 (16%)</b>
<b>Totalt antall prøver produksjonslokale A</b>	<b>252</b>	<b>87 (35%)</b>	<b>38 (15%)</b>

Fig. 5 viser funn fra hver analyseserie i lokale A. I uke 6 og uke 8 ble det påvist *L. monocytogenes* i henholdsvis 59% og 39% av prøvene. Dette er den høyeste andelen positive prøver påvist i lokale A. Det ble ikke foretatt analyser i uke 10. I de resterende analysene (uke 21, 24, 27 og 37) ble det påvist *L. monocytogenes* i henholdsvis 27%, 22%, 30% og 20% av prøvene (Vedlegg 1-3).

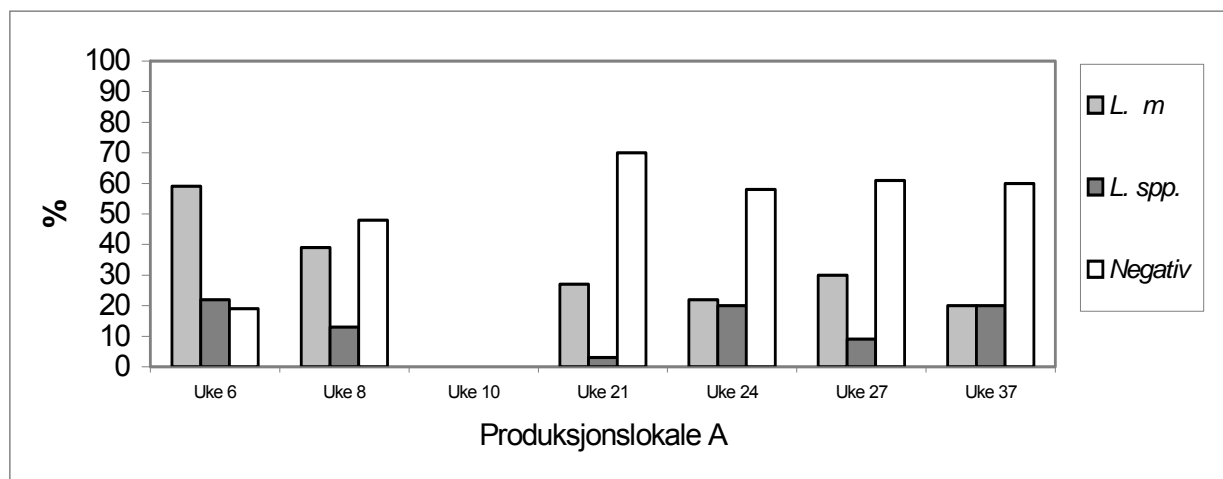


Fig. 5 Analyseresultater i produksjonslokale A.

I produksjonslokale B ble det foretatt 189 analyser fra faste uttakspunkter. Alle prøvene er tatt før kaldrøyking. *L. monocytogenes* og *L. spp.* ble påvist i henholdsvis 33% og 11% av prøvene (Tabell 4).

Tabell 4. *Listeria monocytogenes* og *Listeria spp.* i produksjonslokale B.

Sted for prøveuttak	Antall prøver	Sted for prøveuttak	
		<i>L. monocytogenes</i>	<i>L. spp.</i>
Fiskeavkutt tatt før kaldrøyking:			
Hodekapping	42	11(26%)	5(12%)
Baader 2000 (filetering)	45	7 (16%)	6(13%)
Napping	20	9 (45%)	1( 5%)
Sortering	44	19(43%)	4 (9%)
Fintrimming	38	17(45%)	4(11%)
<b>Totalt antall prøver produksjonslokale B</b>	<b>189</b>	<b>63(33%)</b>	<b>20(11%)</b>

Fig. 6 viser funn fra hver analyseserie i produksjonslokale B. Det ble ikke foretatt analyser i uke 6. I uke 8 og uke 10 ble *L. monocytogenes* påvist i 63% og 56% av prøvene. Dette er den høyeste andelen positive prøver påvist i lokale B. I de resterende analyseseriene (uke 21, 24, 27 og 37) ble det påvist *L. monocytogenes* i henholdsvis 16%, 26%, 23% og 50% av prøvene (Vedlegg 4-5).

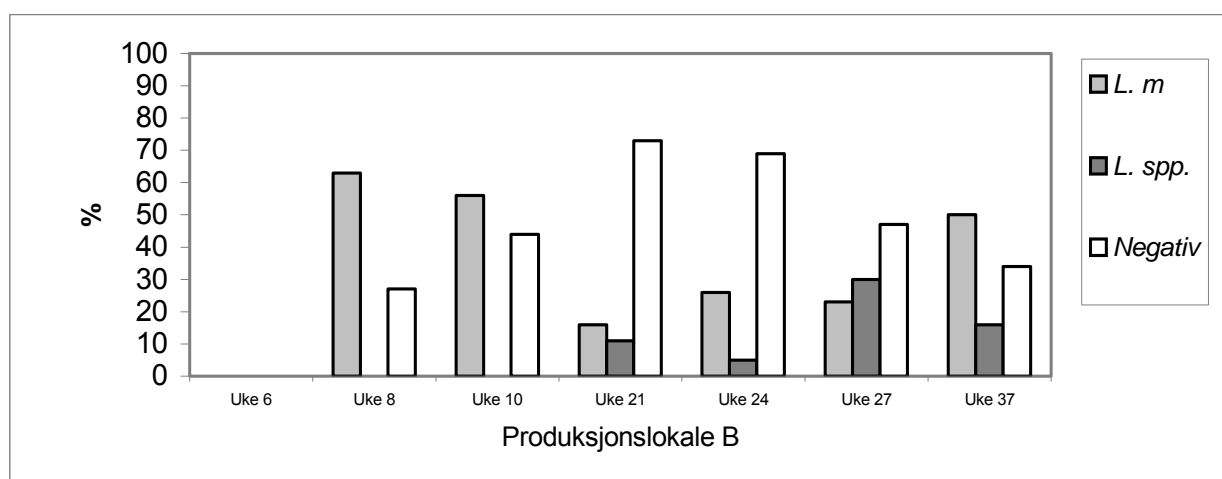


Fig. 6. Analyseresultater i produksjonslokale B.



I tillegg til prøvene fra de faste uttakspunktene, ble 19 andre prøver analysert. I disse ble *L. monocytogenes* påvist i 37%, mens *L. spp.* ikke ble påvist (Tabell 5).

Tabell 5. *Listeria monocytogenes* og *Listeria spp.* i annet prøvemateriale fra begge produksjonslokalene.

Sted for prøveuttak	Antall prøver	Antall prøver som inneholder	
		<i>L. monocytogenes</i>	<i>L. spp.</i>
Fiskeavkutt fra produktprøve (Sashimi)	6	2 ( 33%)	-
Filet-filet linja	2	-	-
Avkutt etterkutter	1	-	-
Etterkutter porsjoner	2	2 (100%)	-
Avkutt pakkeri	1	-	-
Avkutt renskåret hel filet	5	1 ( 20%)	-
Isoporklosser	2	2 (100%)	-
<b>Totalt antall prøver</b>	<b>19</b>	<b>7 ( 37%)</b>	<b>-</b>

## 3.2 Utprøving av ulike metoder

### 3.2.1 Micro-ID<sup>®</sup> Listeria

Dette er en verifiseringstest som kan artsbestemme ulike typer *Listeria*. Testen utføres fra rendyrkede *Listeria*-kolonier. Testen ble brukt på kolonier tatt fra 28 Oxford skåler. *L. monocytogenes* ble påvist i 21 av prøvene og *L. innocua* ble påvist i 6 av prøvene. En av koloniene kunne ikke artsbestemmes med Micro-ID<sup>®</sup>. De samme prøvene ble parallelt verifisert ved bruk av NMKL 136 sammen med CAMP-test (Tabell 6).

Tabell 6. Sammenligning av verifiseringsmetodene av Micro-ID<sup>®</sup> og NMKL 136 / CAMP-test.

Verifiseringsmetode	Antall tester	Antall prøver som inneholder		
		<i>L. monocytogenes</i>	<i>L. spp.</i>	<i>L. innocua</i>
Micro-ID <sup>®</sup> Listeria	28	21	1	6
NMKL 136 og CAMP-test	28	21	7	-

### 3.2.2 VIP-Listeria

Denne testen består av en brikett som kan påvise *L. spp.* Etter oppformering i henhold til prosedyren overføres 0,1 ml buljong til en brønn på briketten. Briketten har to "vinduer". Det ene vinduet gir resultatet og det andre er en kontroll av testen. Testen ble brukt på 18 vilkårlige prøver. NMKL 136 er utført parallelt på samtlige prøver, og ble brukt som referanse. VIP-testen påviste *L. spp.* i 15 av prøvene mens NMKL 136 påviste *L. spp.* i 16 av prøvene (Tabell 7).

Tabell 7. Sammenligning av påvisningsmetoder for *Listeria spp.* i fiskeavkutt.

Påvisningsmetode	Antall prøver	Test resultater	
		<i>L. spp.</i>	Negative
VIP - <i>Listeria</i>	18	15	3
NMKL 136	18	16	2

Det ble undersøkt om VIP-Listeria kunne brukes med samme oppformeringsprosedyre som NMKL 136 (UVM1- og Fraser-buljong). Det ble valgt ut 33 prøver fra svertede Fraser-rør. Alle prøvene ble parallelt testet med VIP-Listeria og NMKL 136. Halvparten av VIP-testene hadde fravær av stripe i brikettens kontrollvindu. De resterende fravek sterkt sammenlignet med resultatene etter NMKL 136 metoden (Tabell 8).

Tabell 8. Sammenligning av modifisert VIP listeria og NMKL 136 metoden.

Oppformeringsbuljong	Antall prøver	NMKL 136		Modifisert VIP		
		Positive	Negative	Positive	Negative	Ugyldig test
UVM1 + Fraser	33	31	2	10	7	16

### 3.2.3 Rapid L'mono

Rapid L'mono er en selektiv, kromogen agar som kan påvise og skille *L. monocytogenes*, *L. ivanovii* og *L. spp.* Det ble valgt ut 20 prøver der det var påvist *L. monocytogenes* med CAMP-test. Prøvene ble oppformert i både ett og to døgn i henhold til prosedyren før utsæd på Rapid L'mono. Alle skålene ble lest av etter ett og to døgns dyrking (Tabell 9).

Det ble undersøkt om Rapid L'mono kunne brukes med samme oppformeringsbuljong som NMKL 136 (UVM1- og Fraser-buljong). Resultatene her var identiske med de resultatene vi fikk når foreskrevet oppformeringsbuljong ble brukt (Tabell 9).

Tabell 9. Påvisning av *Listeria monocytogenes* i fiskeavkutt ved bruk av Rapid L'mono med ulike oppformerings-prosedyrer.

Oppformeringsbuljong	Oppformerings-tid (døgn)	Antall prøver	Påvist <i>L. monocytogenes</i>	
			Avlesing etter 1.døgn	Avlesing etter 2.døgn
1/2 Fraser	1	20	20 (100%)	20 (100%)
1/2 Fraser + Fraser	1 + 1	20	20 (100%)	20 (100%)
UVM1	1	20	20 (100%)	20 (100%)
UVM1 + Fraser	1 + 1	20	20 (100%)	20 (100%)

60 prøver ble testet parallelt med Rapid L'mono og NMKL 136 sammen med CAMP-test. Det ble brukt samme oppformering som NMKL 136 beskriver. Prøver fra svertede Fraser-rør ble testet på Rapid L'mono (Tabell 10). Med NMKL 136-metoden sammen med CAMP-test ble det påvist *L. monocytogenes* i 48 av prøvene og *L. spp.* i 10 av prøvene. På Rapid L'mono ble det i de samme prøvene påvist 49 *L. monocytogenes* og i 9 prøver ble det påvist *L. spp.*. Det ble ikke påvist blandingskulturer med noen av metodene.

Tabell 10. Sammenligning av Rapid L'mono og NMKL 136 / CAMP-test.

Påvisningsmetode	Antall prøver	Antall prøver som inneholder		
		<i>L. monocytogenes</i>	<i>L. spp.</i>	Negative
Rapid L'mono	60	49 (82%)	9 (15%)	2 (3%)
NMKL 136 og CAMP-test	60	48 (80%)	10 (17%)	2 (3%)

### 3.2.4 Funksjonstest av Probelia™ Listeria

Metoden er basert på genamplifikasjon ved bruk av PCR og påvisning med ELISA. *L. monocytogenes* kan påvises etter ett døgn oppformering. Det ble testet 40 fiskeprøver, hvorav halvparten av dem var infisert med *L. monocytogenes*. De resterende prøvene var negative etter NMKL 136. Prøvene ble inkubert over natten i 30°C. Dette er ikke en følsomhetstest, men utprøving av en ny metode.

*L. monocytogenes* ble korrekt påvist i alle de infiserte prøvene. Det ble ikke påvist *L. monocytogenes* i de prøvene som ikke var infisert (Tabell 11).

Tabell 11. Funksjonstest av Probelia™ Listeria.

	Antall prøver	Påvist <i>L. monocytogenes</i>
Infiserte prøver	20	20 (100) %
Negative prøver	20	-

## 4. Diskusjon

### 4.1 Forekomst av *L. monocytogenes* og *L. spp.* og vurdering av tiltak.

Bedriften har ved tidligere undersøkelser fått påvist *L. monocytogenes* i sine produkter. For å sikre effektiv rengjøring og hindre kontaminering av det ferdige produkt, er det avgjørende at man får identifisert eventuelle reservoarer av *Listeria*. Bedriften produserer røykelaks til eksport og for salg her i landet. I tillegg produseres ferske laksefileter som eksporteres til Japan. Det er en samproduksjon mellom de to undersøkte produksjonslokalene, ved at fisk fra produksjonslokale B blir røyket i produksjonslokale A. Det er derfor viktig å overvåke begge lokalene.

*L. monocytogenes* har evnen til å vokse på produksjonsutstyr og danne biofilm. Den kan på denne måten overleve på produksjonsutstyr i flere år. Evnen til å overleve er større der det er andre bakterier til stede (Bremer et al. 2001). Det er derfor viktig å holde produksjonsutstyret mest mulig fritt for alle typer bakterier. For å oppnå dette må man identifisere de primære kildene til kontaminering og sørge for å minske mulighetene for rekontaminering via redskaper og personell. Det kan likevel være vanskelig å eliminere *L. monocytogenes* helt fra produksjonslinjen. Det er derfor viktig at det ferdige produktet lagres på en slik måte at vekst av *L. monocytogenes* hemmes (Huss et al. 2000).

Både lokale A og lokale B ble totalt nedvasket i løpet av januar 2001, altså før prøvetakingen startet. Dette innebærer at maskinene demonteres så langt det lar seg gjøre og at alle transportbånd blir desinfisert i klor. I tillegg skummes gulv, vegger og maskiner med desinfiserende skum. Dette er tiltak som kommer i tillegg til den daglige vasken. Alle analysene ved første analyseperiode ble foretatt i produksjonslokale A. Her ble *L. monocytogenes* og *L. spp.* påvist i henholdsvis 59% og 22% av prøvene. Dette er den høyeste andel positive prøver i analyseperioden i produksjonslokale A. Dette indikerer at den nedvaskingen og de hygieniltakene bedriften har brukt tidligere ikke har vært effektive nok.

I løpet av prøvetakningsperioden ble det påvist *L. monocytogenes* i begge lokalene og på alle prøvetakningspunktene. Det første foredlingstrinnet er "hodekapping". Analyser av avskjær fra denne maskinen i produksjonslokale B påviste *L. monocytogenes* i 26% av prøvene. Dette kan gi en indikasjon på at *L. monocytogenes* er til stede i fisken før den kommer inn i bedriften. I en undersøkelse av laks fra et oppdrettsanlegg i Bergen, ble det imidlertid ikke funnet *Listeria* i noen av de 199 undersøkte fiskene (Embarek et al. 1997). Heller ikke i andre liknende undersøkelser er det blitt funnet *Listeria* i levende laks. En studie

i flere produksjonslokaler som foredler kaldrøyst laks, viste at hovedkilden til kontaminasjon av *L. monocytogenes* var overflaten til frossen eller fersk fisk som kom inn i produksjonslokalene. Ettersom fisken blir transportert til de ulike produksjonsavdelingene under foredlingen, blir også *L. monocytogenes* overført til andre prosessområder og disse blir sekundære kilder til bakterien (Eklund et al. 1995). Fisken blir sannsynligvis kontaminert med *L. monocytogenes* under slakteprosessen eller under transport. Råmateriale som brukes i foredlingsbedrifter blir dermed kontaminert, og dette fører til en konstant reintroduksjon av organismen i fabrikkmiljøet (Doyle 1988).

Analysen som er gjort etter *Listeria*-relaterte tilbakekallinger av mat på det amerikanske markedet tyder imidlertid på at smitten stammer fra kontaminasjon under viderebehandling (Ryser og Marth 1999). I en undersøkelse i Portugal ble *Listeria*-isolater fra fersk fisk, råmateriale, fabrikkmiljø og ferdig produkt sammenlignet. *L. monocytogenes* påvist i fersk fisk hos lakseleverandører ble ikke funnet i foredlingsprosessen eller i det ferdige produkt. Ingen klar kilde til kontamineringen ble funnet (Vaz-Velho et al. 2001). I Danmark ble kontamineringsruten til *Listeria* undersøkt i to bedrifter som foredler kaldrøyst laks. Produktkontamineringen i den ene bedriften varierte fra 31- 85%, mens det ikke ble funnet *L. monocytogenes* i rå fisk (30 prøver). I den andre bedriften varierte kontamineringen av ferdig produkt fra 0-25%, men i rå fisk fant man *L. monocytogenes* i 16 av 185 prøver. Ved bruk av random amplified polymorphic DNA-teknikk (RAPD) ble det påvist 55 ulike profiler. De RAPD-profilene som ble funnet på produktet var identiske til dem som ble funnet på prosessutstyr og i miljøprøvene, men var ikke de samme som ble funnet på rå fisk. Dette indikerte at kontaminering av det ferdige produkt i begge bedriftene skyldes foredlingsprosessen og ikke rå fisk. Imidlertid kunne ikke muligheten utelukkes for at rå fisk var en kontamineringskilde til prosessutstyr og miljø (Fonnesbech et al. 2001).

Alle disse undersøkelsene belyser problemene rundt kilden til kontaminering av det ferdige produkt. Kontamineringen kan skyldes både fisk og produksjonsmiljø eller en kombinasjon av disse. Det er derfor nødvendig å sikre at råvarene holder høy kvalitet, samt at bedriften har gode rengjøringsrutiner. I Norge er det ikke tillatt å behandle råvarer med desinfeksjonsmidler for å hindre bakterievekst. Det er derfor viktig at leverandørene begrenser kontamineringen av fersk fisk etter at den er høstet.

I denne undersøkelsen er det tatt prøver av materiale før, under og etter røyking. Resultatene er delt opp i fiskeavkutt fra urøyst fisk og fiskeavkutt fra kaldrøyst fisk (Tabell 2, 3 og 4). Det ble isolert *L. monocytogenes* og *L. spp.* fra alle prøvepunktene. *L. monocytogenes*

ble hyppigst isolert i prøver tatt før røykeprosessen, mens det var liten forskjell i resultatene for *L. spp.* Det ble påvist *L. monocytogenes* og *L. spp.* i henholdsvis 45% og 12% av prøvene fra urøyket fisk. Etter røyking ble *L. monocytogenes* påvist i 15% av prøvene, mens *L. spp.* ble påvist i 16% av prøvene. Effekten av kaldrøyking har vært publisert med varierende resultat. I en undersøkelse konkluderes det med at denne prosessen ikke genererer nok varme til å inaktivere *Listeria*-organismer (Eklund et al.1995). I en annen undersøkelse er det rapportert at flytende røyk har en antimikrobiell effekt på *L. monocytogenes* (Messina et al. 1988). Også Guyer og Jemmi (1990) fant at den rå fisken før røyking var mye mer kontaminert med *L. monocytogenes* (28,6%) enn det ferdige produkt (6,3%).

Bedriften i den foreliggende undersøkelsen bruker en røyketemperatur på 18-19°C. Dette er gunstig, da kaldrøyking av laks har vist seg å kunne eliminere *L. monocytogenes* i temperaturområdet 17,1-21,1°C. Ved røyking ved temperaturer opp mot 30°C har *L. monocytogenes* større overlevelse (Rørvik 2000). *L. spp.* har større evne enn *L. monocytogenes* til å overleve røyking (Sabanadesan et al. 2000). Også våre resultater indikerer at kaldrøykingsprosessen kan ha en viss effekt på *L. monocytogenes*, men ikke på *L. spp.*

I analyseserie 3 fikk vi tilsendt to teipede isoporklosser som bedriften ønsket analysert. På begge klossene ble det funnet *L. monocytogenes* (Tabell 5). Klossene var blitt brukt uautorisert av de ansatte i lengre tid for å stabilisere en fileteringsmaskin (baader 2000). Disse ble oppdaget under en rutinekontroll i produksjonslokalet. Dette viser at det er nødvendig med grundig opplæring av alle ansatte for å gi forståelse av bakterievekst- og spredning. God personlig hygiene er også avgjørende for å hindre kontaminasjon av fisken. Bedriften har i løpet av våren utarbeidet ny hygieneinstruks for å bedre disse forholdene.

Bedriften har i løpet av de 8 månedene analysene foregikk gjennomført er rekke strakstiltak ved de to anleggene for å oppnå redusert kontaminering med *L. monocytogenes*. Tiltakene er basert på dagens produksjonsmetode. Begge bedriftene er blitt gjennomgått for å identifisere områder der det er særlig risiko for at bakterien kan etablere seg. Deler av produksjonsutstyret ble byttet ut eller forbedret for å gjøre vask og demontering lettere. Formålet med tiltakene har vært å få personalet til å ha gode rutiner i produksjonen, at bedriften lukkes for all trafikk utenfra, at personell, råvarer, ingredienser og ferdig produkt sluses inn og ut, og å sikre at renhold og desinfeksjon kommer opp på et nivå som hindrer bakterien i å etablere seg i fabrikkene.

Det er særlig to områder det bør fokuseres på for å oppnå gode hygieniske forhold i en fiskeforedlingsbedrift. Det første er å hindre bakterier i å etablere seg i lokalet ved å foreta

regelmessig vask og desinfeksjon av alt utstyr mens arbeidet foregår. Det andre er å hindre kontaminasjonssyklusen ved å foreta fullstendig vask av maskiner og utstyr på slutten av hver arbeidsdag. Hvis dette siste og mest avgjørende trinnet ikke lykkes, vil ethvert forsøk på å hindre bakteriens utvikling i løpet av arbeidsdagen bli underminert. Flere av maskinene som ble brukt i lokalene i denne undersøkelsen kan ikke tas helt fra hverandre. Andre maskiner er så kompliserte at det bare blir foretatt total nedvasking av disse når mekaniker er til stede. Dette gjør vask og desinfeksjon tid- og arbeidskrevende.

Det er i løpet av undersøkelsesperioden etablert soneinndeling i begge produksjonsanleggene. Dette er nødvendig for å skille mellom områder for råvarer, produksjon, pakking og utsendelse av ferdig vare. Ulike soner bør merkes med forskjellige farger, dette gjelder også alt utstyr som brukes i de ulike sonene. Utilstrekkelig separering mellom rå og ferdige produkter på grunn av dårlig fabrikkdesign og likegyldig holdning blant de ansatte regnes som de områder som oftest fører til dårlig mikrobiell kvalitet i produktene (Ryser og Marth 1999). Også jobbrotasjon regnes som en viktig årsak til kontaminasjon (Rørvik et al. 1997).

For å sikre at rengjøringen er effektiv, bør man kontrollere hygienetilstanden ved å foreta daglige mikrobiologiske analyser både av produktene og av miljøprøver fra alle deler av produksjonen. Effekten av rengjøring kontrolleres lettest ved å bruke ATP bioluminescence overvåkingssystem (Flowers et al. 1997). ATP testen gir ikke svar på hvilke mikrober som eventuelt finnes, men den viser om rengjøringen er effektiv nok til å fjerne alle levende bakterier. Det bør i tillegg være rutiner for jevnlig analyser som identifiserer *Listeria*.

Undersøkelsen viser en nedgang i antall positive prøver i løpet av analyseperioden. Dette skyldes trolig de ulike tiltakene bedriften har satt i gang for å bedre hygienetilstanden. I produksjonslokale A ble det i første og siste analyseserie påvist *L. monocytogenes* i henholdsvis 59% og 20% av prøvene. Tilsvarende tall for lokale B er 63% og 50%. Det er imidlertid liten forskjell i antallet prøver som er positive for *L. spp.* (Figur 5 og 6). Ikke-patogene *Listeria*-arter kan kolonisere de samme økologiske nisjene i en fiskeforedlingsbedrift, funn av harmløse *Listeria*-arter bør derfor generelt ses på som en indikasjon på at også *L. monocytogenes* kan være til stede (Ryser og Marth 1999). Men det har også i tidligere undersøkelser vist seg at det ikke nødvendigvis er en sammenheng mellom funn av *L. monocytogenes* og funn av *L. spp.* (Rørvik et al. 1997).

Det skjer stadig tilfeller av matbårne sykdommer. Dette kan tyde på at tradisjonell tilnærming til hygienekontroll ikke er tilstrekkelig. Nødvendigheten av bedre sikkerhetstiltak førte til utviklingen av HACCP (Hazard Analysis Critical Control Point). Denne metoden kan



kontrollere både råmateriale, produksjon, håndtering, foredling, distribusjon og konsum av det ferdige produktet (Bauman 1992). Dette er en ”føre-var kontroll” som sikrer produktenes kvalitet. Men bedrifter som videreforedler fiskeprodukter er helt avhengige av at også leverandører av råvarer har denne typen kvalitetskontroll. En videre oppfølging vil være å følge fiskene fra de ulike leverandørene for å se om det er forskjell i kontamineringen med *L. monocytogenes*. I de undersøkte produksjonsanleggene har dette ikke vært mulig, da fisk fra forskjellige leverandører blir tatt inn og foredlet samtidig.

## 4.2 Utprøving og vurdering av ulike metoder

Det er mange ulike selektive buljonger på markedet for påvisning av *L. monocytogenes*, og disse brukes i ulike kombinasjoner. Valg av buljong ser ofte ut til å ha sammenheng med buljongens opprinnelsesland. Andre ganger kan det virke litt tilfeldig.

Det er vanlig å bruke en svakt selektiv buljong første døgn, for så å oppformere i en mer selektiv buljong andre døgn. I Canada brukes Fraser-buljong første døgn, mens det er valgt UVM1 andre døgn. Dette er motsatt av NMKL-metoden, som anbefaler LB1(≈UVM1) første døgn og LB2/Fraser andre døgn. Men det er også flere land som bruker kun én buljong. I Italia brukes bare Fraser, mens det i Australia brukes bare LEB (Post 1995). Ofte er det bare små nyanser som skiller de ulike alternativene fra hverandre (Tabell 12).

Tabell 12. Selektive komponenter i noen vanlig brukte *Listeria*-buljonger. Konsentrasjoner er i mg/l der annet ikke er oppgitt.

Selektive komponent	Listeria Enrichment Broth (LEB)	Buffret LEB (BLEB)	UVM1	LB1	UVM2	LB2	Halv Fraser	Fraser	Mod. Fraser
Acriflavin HCL	15	15	12	12.5	25	25	12.5	25	-
Nalidixic syre	40	40	20	20	20	20	10	20	-
Cyclheximid	50	50	-	-	-	-	-	-	-
Litium kloride	-	-	-	-	-	-	3 gram/l	3 gram/l	4 gram/l

### 4.2.1 NMKL 136, 2. utgave 1999.

Påvisning av *Listeria* etter NMKL 136 er en meget tidkrevende og omfattende metode. Metoden påviser mistenkelige *L.spp.* kolonier etter oppformering på Oxford- og PALCAM-agar. Begge agarene inneholder esculin og jernammoniumsitratt, slik at esculinhydrolyse fører til at mediet blir svart rundt koloniene. Dette gjør det enkelt å identifisere *L. spp.* (Fig. 1). Det blir valgt ut 10 typiske *Listeria*-kolonier fra Oxford- og PALCAM-agar til hemolysetest. *L. monocytogenes*, *L. ivanovii* og *L. seeligeri* er hemolyserende. Ønsker man å bruke denne metoden til å få identifisert *L. monocytogenes*, må koloniene testes ytterligere ved sukkerforgjæring (rhamnose og xylose). I våre analyser ble NMKL 136 brukt til å påvise *L. spp.* og eventuell hemolyse.

Ved bruk av NMKL 136 er det mulig å velge mellom ulike typer buljong til 2. døgn oppformering. Alternativene er LB2/UVM2 eller Fraser-buljong. En fordel ved å bruke

Fraser-buljong i stedet for LB2/UVM2, er at NMKL 136 kun krever at man sår ut fra de rørene som er blitt svertet. Årsaken til de svertede rørene er at *Listeria* hydrolyserer esculin som sammen med jern-ammoniumsitratt danner svart farge (Vedlegg 6).

For å unngå falske negative resultater må Fraser-buljong innkuberes i 48 timer for å gi denne reaksjonen tilstrekkelig tid. Ved bruk av LB2/UVM2 er det tilstrekkelig med et døgn før man sår ut alle rørene. Svertede rør behøver ikke bety at prøven inneholder *Listeria*. Det finnes også andre mikroorganismer som kan hydrolysere esculin og gi svertede rør. Det er kjent at blant andre enterokokker har denne egenskapen (Post 1995). I denne undersøkelsen har det vært flere tilfeller av svertede rør uten at *L. spp.* har vært til stede. Bakteriene som gav denne reaksjonen var katalase-positive, oksydase-negative og gramnegative staver. Bakteriene ble ikke videre artsdiagnostisert.

#### **4.2.1.1 CAMP-test (NMKL 136 1. utgave 1990)**

Alle koloniene som viste hemolyse etter å ha blitt analysert med NMKL 136 ble videre undersøkt for CAMP-reaksjon. Denne metoden kan brukes til å skille mellom de tre hemolyserende *Listeria*-artene.

CAMP-reaksjon innebærer en sone med forsterket  $\beta$ -hemolyse i det området der bakterienes metabolske produkter interfererer. Alle de tre hemolyserende *Listeria*-artene gir CAMP-reaksjon mot  $\beta$ -toksisk *S. aureus*. De kan artsbestemmes på grunnlag av reaksjonen mot *R. equi* (Ryser og Marth 1999). *L. ivanovii* gir alltid CAMP-reaksjon mot *R. equi*, mens ulike stammer av *L. monocytogenes* og *L. seeligeri* kan gi både positiv og negativ CAMP-reaksjon (Rocourt et al. 1983, Vazquez-Boland et al. 1992). Dette antas å komme av at ulike stammer av *L. monocytogenes* og *L. seeligeri* skiller ut varierende mengder listeriolysin O. En annen årsak kan være at forskjellige stammer av *R. equi* har ulik evne til å skille ut kolesterol oxidase. Det er dette enzymet som sammen med listeriolysin O kan gi CAMP-reaksjon mellom *L. monocytogenes*, *L. seeligeri* og *R. equi*.

Hvis alle de tre hemolyserende *Listeria*-artene gir positiv CAMP-reaksjon mot *R. equi*, kan de skilles fra hverandre på selve  $\beta$ -hemolysereaksjonen. Reaksjonen til *L. ivanovii* er stor, spadeformet og meget kraftig. Den skilles fra *L. monocytogenes* ved at denne reaksjonen er vesentlig mindre og løkformet (Fig. 7). *L. seeligeri* skilles fra *L. monocytogenes* ved at den gir svakere hemolyse (Fernandez-Garayzabal et al. 1996).



Fig. 7 CAMP-test. Øverst *L. monocytogenes*, i midten *L. ivanovii*, nederst en ikke-hemolyserende *Listeria*-art. Foto: Frode Bergan.

Det ble utført CAMP-test på referansebakterier fra Høgskolens laboratorium før analysene startet. *L. monocytogenes* ga her en tydelig løkformet CAMP-reaksjon mot *R. equi*. I våre analyser viser alle de hemolyserende koloniene samme tydelige løkformede CAMP-reaksjon mot *R. equi* som *L. monocytogenes*' referansestamme (Fig.7). På bakgrunn av disse resultatene ble CAMP-testen brukt i påvisning av *L. monocytogenes*.

#### 4.2.2 Micro-ID<sup>®</sup> Listeria

Micro-ID<sup>®</sup> Listeria er en identifikasjonstest som skiller ulike typer *Listeria*. Testen utføres på renkultur, og artsbestemming skjer i kombinasjon med hemolyse og CAMP-test. Resultatene viser at alle de 21 isolatene der det var påvist *L. monocytogenes* etter CAMP-test, også ble påvist *L. monocytogenes* med Micro-ID<sup>®</sup> Listeria testen.

NMKL 136 kan ikke artsdifferensiere *Listeria*-kolonier som ikke hemolyserer. Micro-ID<sup>®</sup> kan brukes til å artsbestemme slike kolonier. Av de 7 prøvene der det var påvist *L. spp.* etter NMKL 136, ble 6 av prøvene artsbestemt til *L. innocua* med Micro-ID<sup>®</sup>. En av prøvene kunne ikke artsbestemmes fordi avlesningen var usikker.

Fra man har oppnådd renkultur, tar det 4 timer å få avkreftet eventuell tilstedeværelse av *L. monocytogenes*. Er det positivt resultat i E- (esculinhydrolyse) og RHAM-brønnene (rhamnosefermentering) (Vedlegg 6), mistenker man at *L. monocytogenes* er til stede, og det

kreves ytterligere 20 timer inkubering for å bekrefte dette. Den forlengede inkuberingen er også nødvendig for å stadfeste tilstedeværelse av andre *Listeria*-arter.

Positive reaksjoner gir en tallverdi, mens negativt resultat gir verdien 0. Til sammen får man da et 5-sifret tall som sammen med hemolyse-reaksjonen og CAMP-test er inngang i en tabell som skal gi et entydig svar på hvilken *Listeria*-art prøven inneholder. Testen egner seg godt til å identifisere *L. monocytogenes* og andre *Listeria*-isolater.

#### 4.2.3 VIP-*Listeria* - test

Testen kan påvise *L. spp.* etter oppformering i to døgn, og er dermed raskere enn tradisjonell metode som krever utsæd på agar etter oppformering. Resultatene avleses på en liten brikett. Av de 18 prøvene som ble undersøkt med anbefalt oppformering, var 1 (5%) prøve falsk negativ sammenlignet med NMKL 136. Det var ingen falske positive resultater (Tabell 7).

Testen kan brukes alene eller være et supplement til andre mer spesifikke tester. VIP-*Listeria* er enkel å gjennomføre og gir et resultat som er lett tolkbart. Testen kan være aktuell der hensikten er å klarere et parti før utsendelse. Det er imidlertid en ulempe at den kun gir *L. spp.* som sluttresultat. Ved positive funn må man undersøke prøven ytterligere med andre metoder for å bekrefte om *L. monocytogenes* er til stede.

Det er praktisk hvis man kan bruke de samme oppformeringsprosedyrer ved bruk av ulike metoder. Det gjør arbeidsmengden mindre og sikrer at man tester på det samme prøvemateriale. For å undersøke om VIP testen kan brukes med samme oppformeringsbuljong som brukes til NMKL 136 (UVM1 + Fraser), ble 33 prøver fra svertede Fraser-rør undersøkt (Tabell 8). Den svertede buljongen gjorde at deteksjonsstripen var vanskelig å lese av, og halvparten av resultatene ga ugyldige testresultater. De gyldige testresultatene fraviker i tillegg sterkt sammenlignet med NMKL 136. Dette kan tyde på at det i Fraser-buljong finnes stoffer som forstyrrer reaksjonen. Denne oppformeringen er derfor ikke egnet til VIP-testen.

#### 4.2.4 Rapid L' mono

Ved bruk av denne kromogene agaren kan en påvise *L. monocytogenes* etter to døgn. Prosedyren for påvisning er ett døgn i 1/2 Fraser-buljong og ett døgn dyrking på agarskål. Man kan også lese av agarskålen etter to døgn dyrking. Alternativ prosedyre er to døgn oppformering (1/2 Fraser + Fraser) og avlesing etter ett eller to døgn dyrking på Rapid L' mono. Prøvene skal oppformeres i to døgn og dyrkes i to døgn på Rapid L' mono før man kan konfirmere negative prøver.

Hurtighet kan være av avgjørende betydning ved valg av metode. For å undersøke om det var forskjell i resultatene ved bruk av de alternative oppformeringsprosedyrene for Rapid L' mono, ble det brukt 20 prøver der det var påvist *L. monocytogenes* med CAMP-test. Alle prøvene ble testet med ett og to døgn oppformering og avlesning etter ett og to døgn. I samtlige prøver ble *L. monocytogenes* påvist etter ett døgn oppformering (Tabell 9), men to døgn oppformering gav tettere vekst. Skålene ble avlest etter ett og to døgn. Ved avlesing etter to døgn var koloniene blitt større. Forventer man at det er svært få bakterier til stede, kan det dermed være en fordel å bruke to døgn oppformering. Skålene er lette å lese av da *L. monocytogenes*-koloniene har en blågrå farge (Fig. 8).

De samme 20 prøvene ble i tillegg oppformert med UVM1- og Fraser-buljong som brukes til Oxford- og PALCAM-agar, før utsæd på Rapid L' mono. Resultatene her var identiske med de resultatene vi fikk når foreskrevet oppformeringsbuljong ble brukt (Tabell 9). Rapid L' mono kan påvise *L. monocytogenes* direkte fra oppformeringsbuljong i motsetning til Oxford- og PALCAM-agar som kun påviser mistenkelige *L.spp.* Siden man kan bruke samme oppformering, kan Rapid L' mono være et aktuelt medie å bruke i tillegg til, eller som et alternativ til Oxford- og PALCAM-agar.

I én av de 60 prøvene som ble parallelt testet med Rapid L' mono og NMKL 136, ble det påvist *L. monocytogenes* med Rapid L' mono, mens det ble påvist *L. spp.* med NMKL 136. Årsaken til dette kan være at det kun er 10 kolonier som blir plukket ut fra Oxford- og PALCAM-agar for videre identifikasjon med hemolyse og CAMP-test i NMKL 136. Er antallet *L. monocytogenes* i prøven svært lavt i forhold til *L. spp.*, vil det være en risiko for at disse ikke blir funnet.

Undersøkelsen har vist at Rapid L' mono er et pålitelig medie som er svært tid- og arbeidsbesparende. Dette mediet har klare fordeler i forhold til Oxford- og PALCAM-agar ved at det påviser *L. monocytogenes* direkte. Skålene er enkle å avlese, da *L. monocytogenes*

tydelig skiller seg fra de andre bakteriene (Fig. 8). Ved blandingskulturer, og særlig der andelen *L. monocytogenes* er lav, vil dette mediet ha fordeler framfor tradisjonelle medier.



Fig. 8 Rapid L' mono med typiske *Listeria monocytogenes* og *L. spp.* kolonier.

Foto: Frode Bergan

#### 4.2.5 Funksjonstest av Probelia™ Listeria

Bruk av Probelia™ Listeria er nytt i Norge. Vi har gjort en funksjonstest, der det er fokusert på hurtighet, anvendelighet og resultatenes pålitelighet. PCR-Probelia testsettet ble utprøvd ved å bruke fiskeprøver som ble infisert med *L. monocytogenes*. Det ble slemmet opp rikelig med *L. monocytogenes* i 25g fiskeprøve og 225 ml 1/2 Fraserbuljong som ble inkubert i 18 timer ved 30°C.

For å påvise *Listeria* krever de tradisjonelle metoder en konsentrasjon på  $10^6$ - $10^8$  bakterier per gram, mens PCR- metoden kan påvise bakterien ved nivåer helt ned til  $10^2$  -  $10^3$ /g (Fellous 2001). Probelia™ Listeria gir resultatet samme dag som oppformeringen er ferdig. Den praktiske utførelsen med amplifisering ved PCR og konfirmering med ELISA tar ca. 8 timer.

Probelia™ *Listeria* er svært brukervennlig, ved at testsettet inneholder en ferdig ”PCR-miks” med taq-polymerase, primere, dNTP, magnesium og buffer. PCR-teknologi er ekstremt sensitivt, og kontamineringsfaren fra tidligere amplifiserte prøver er noe man må være spesielt oppmerksom på. Amplifikasjon av et enkelt molekyl kan i prinsippet generere millioner av identiske kopier av den aktuelle sekvens. Disse kopiene kan være flyktige i form av aerosoler som kan smitte i laboratoriet. Testen krever derfor at man har et eget rom der man setter opp prøver og et annet der man arbeider videre med PCR-produktet.

PCR skiller ikke mellom DNA fra levende eller døde organismer. Det er derfor teoretisk mulig å få positive resultater selv om alle bakteriene er døde. Denne testen krever en viss oppformering før det er mulig å detektere bakterien. Dermed eliminerer man i praksis muligheten for falske positive funn som stammer fra døde bakterier.

Det er viktig å sikre at PCR-reaksjonen har gått som den skal for ikke å få falske negative resultater. For å kontrollere dette, er ”PCR-miksen” i testsettet tilsatt et syntetisk DNA-fragment som blir amplifisert opp sammen med prøvene. Denne amplifiseringen blir detektert i egne kontrollbrønner. Dette gjør at man ikke vil få falske negative resultater på grunn av feil under amplifiseringen. I tillegg amplifiseres også en positiv og to negative kontroller som skal ha bestemte verdier for at resultatene skal være gyldige.

I de prøvene vi undersøkte ble *L. monocytogenes* påvist i alle de infiserte prøvene, men ikke i prøvene som ikke var infisert (Tabell 11). Testen egner seg godt til rask klarering av fravær av *L. monocytogenes* på fiskeprodukter før utsendelse. Testen gir entydige resultater som er lette å lese av. Testen har den fordel at den bare påviser *L. monocytogenes*.



## Litteraturliste

- Antal E-A, E.M. Løberg, V.B. Wyller, P. Bracht 1999. Hjernestammeinfeksjon med *Listeria monocytogenes*, Tidsskr. for Den no. lægef. nr. 3, 1999. s.373-374.
- Armstrong D. 1995. *Listeria monocytogenes*. In: G.L. Mandall, J.E. Bennet, R. Dolin, eds. Mandell, Douglas and Bennett's principles and Practice of Infectious Diseases. New York, NY: Churchill Livingstone, s.1880-1885.
- Arvanitidou M.A., T.C Papa. V. Constantinidis, V. Danielides, V. Katsouyannopoulos. 1997. The occurrence of *Listeria spp.* and *Salmonella spp.* in surface waters. Microbiol. Res. 1997. Des; 152(4): 395-397.
- Astwood A.C., A.C. Wais. 1998. Psychrotrophic bacteria isolated from a constantly warm tropical environment. Curr. Microbiol. 1998. Mar:36(3):148-151.
- Aureli P., G.C. Fiorucci, D. Caroli, G. Marchiaro, O. Novara, L. Leone og S. Salmaso. 2000. An outbreak of febril gastroenteritis associated with corn contaminated with *Listeria monocytogenes*. N. Engl.J.Med.2000.April 27; 342(17): 1236-1241.
- Bauman H.E., 1992. In: M.D. Pierson og d.A. Corlett, eds. Introduction to HACCP. In HACCP: Principles and Applications. New York: Van Nostrand Reinhold, s. 1-5.
- Bille J. 1990. Epidemiology of human listeriosis in Europe, with special reference to the Swiss outbreak. In: A.J. Miller, J.L. Smith., og G.A. Somkuti, eds. Foodborne Listeriosis. Amsterdam. Elsevier, s. 71-74.
- Boerlin P., J. Rocourt, J.C. Piffaretti. 1991. Taxonomy of the genus *Listeria* by using multilocus enzyme electrophoresis. Int. J. syst. Bacteriol. 1991 Jan;41 (1): 59-64.
- Bortolussi R. 1990. Neonatal listeriosis. Semin. Perinatol. 14(suppl.): 44-48.

- Bremer P.J., I. Monk, C.M. Osborne. 2001. Survival of *Listeria monocytogenes* attached to stainless steel surfaces in the presence or absence of *Flavobacterium spp.*, J Food Prot 2001 Sep; 64(9): 1369-1376.
- Buchreiser C.R., R. Brosch, B. Catimel, og J. Rocourt. 1993. A new view of human listeriosis epidemiology: Pulsed field gel electrophoresis applied for comparing *Listeria monocytogenes* strains involved in outbreaks. Can. J. Microbiol. 36: 395-401.
- Büla J.C., J. Bille og M.P. Glanser. 1995. An epidemic of food-borne listeriosis in Western Switzerland: Description of 57 cases involving adults. Clin.Infect.Dis. 20: 66-72.
- Cotoni L. F. 1942. A propos des bactéries dènommées Listerella-Rappel d'une observation ancienne de mènìngite chez l'homme. Ann. Inst. Pasteur 68: 92-95.
- Dalton C.B., C.C. Austin, J. Sobel, P.S. Hayes, W.F. Bibb, L.M. Graves, B. Swaminathan, M.E. Proctor og P.M. Griffin. 1997. Listeriosis from chocolate milk: Linking of an outbreak of febrile gastroenteritis and "sporadic" invasive disease. N. Engl. J. Med. 336: 100-105.
- Dillon R.M. og T.R. Patel. 1992. *Listeria* in seafood: a review. J. Food Prot. 55:1009-1015.
- Doyle M.P. 1988. Effect of enviromental and prosessing conditions on *Listeria monocytogenes*. Food Technol. 42: 169-171.
- Doyle P.M., L. R. Beuchat og T.J. Montville (eds). 1997. Food microbiologi. Fundamentals and Frontiers. American Society for Microbiology. Massachusetts, Washington. ISBN 1-55581-117-5.
- Eklund M.E., F.T. Poyski, R.N. Paranjpye, L.C. Lashbrook, M.E. Petersen og G.A. Pelroy. 1995. Incidence and sources of *Listeria monocytogenes* in cold-smoked fishery products and processing plants. J. Food Prot. 58: 502-508.

- Embarek P.K.B., L.T. Hansson, O. Enger og H.H. Huss. 1997. Occurrence of *Listeria spp.* In farmed salmon and during subsequent slaughter: Comparisom of Listertest® lift and the USDA method. *Int. J. Food Microbiol.* 14: 39-46.
- Farber J.M. og Peterkin. 1991. *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen. *Microbiol. Rev.* 55: 476-511.
- Farber J.M., F. Coates og E. Daley. 1992. Minimum water activity requirements for the growth of *Listeria monocytogenes*. *Lett. Appl. Microbiol.* 15: 103-105.
- FDA 1987. Program 7303.030. Pathogen monitoring of selected high risk foods. (FY 88/89). In Department of Health and Human Services. FDA (ed.), U.S. Food and Drug Administration Compliance Program. Guidance Manual. U.S. Government Printing Office, Pittsurgh, PA.
- Fenlon D.R., J. Wilson og W. Donachie. 1996. The incidence and level of *Listeria monocytogenes* contamination of food sources at primary production and initial processing. *J. Appl. Bacteriol.* 81: 641-650.
- Fellous M. 2001. PCR Applied to Food Testing. Probelia generations. BioRad. 2001.
- Fernandez-Garayzabal J.F., C. Delgado, M.M. Blanco, G. Suarez og L. Dominguez. 1996. Cholestrol oxidase from *Rhodococcus equi* is likely the major factor involved in the cooperativ lytic prosess (CAMP-reaction) with *Listeria monocytogenes*. *Lett. Appl. Microbiol.* 22: 249-252.
- Flowers R., L. Milo, E. Myers og M.S. Curiale. 1997. An evaluation of five ATP bioluminescence systems. *Food Quality June/July*: 23-33.

- Fonnesbech V. B., H.H. Huss, B. Ojeniyi, P. Ahrens, L. Gram, 2001. Elucidation of *Listeria monocytogenes* contamination route in cold-smoked salmon processing plants detected by DNA-based typing methods. *Appl. Environ. Microbiol.* 2001 Jun ; 67(6): 2586-2595.
- Frances N., H. Hornby, P.R. Hunter. 1991. The isolation of *Listeria* species from fresh-water sites in Cheshire and North Wales. *Epidemiol. Infect.* 1991. Auf;107(1):235-258.
- Fredriksen B. 1992. Maternal septicemia with *Listeria monocytogenes* in second trimester without infection of fetus. *Acta Obst. Gynecol. Scand.* 71: 313-315.
- Galsworthy S.B., S. Girdler, og S. F. Koval. 1990. Chemotaxis in *Listeria monocytogenes*. *Acta Microbiol. Hung.* 37: 81-85.
- Gellin B.G., C.V. Bromme, W.F. Bibb, R.E. Weaver, S. Gaventa, L. Mascola and Listeriosis Study Group. 1991. The epidemiology of listeriosis in the United States, 1986. *Am. J. Epidemiol.* 133: 392-401.
- George S.M. og B. M.Lund 1992. Defect and culture medium and aeration on growth of *Listeria monocytogenes* at pH 4,5. *Let. Appl. Microbiol.* 15: 49-52.
- Goulet V. og P. Marchetti 1992. Listeriosis in 225 non-pregnant patients in 1992: Clinical aspects and outcome in relation to predisposing conditions. *Scand. J. Infect. Dis.* 28: 367-374
- Goulet V., A. Lepoutre, J. Rocourt, A.L. Courtieu, P. Dehaumont og P. Veit. 1993. Epidémie de listeriose en France: Bilan final et résultats de l'enquête épidémiologique. *Bull. Epidémiol. Hebdom.* 4: 13-14.
- Gray M.L. 1957. A rapid method for the detection of colonies of *Listeria monocytogenes*. *Zbl. Bakteriol. Parasit. Infekt. Hg. I Orig.* 169: 373-377.

- Gray M.L. og A.H. Killinger. 1966. *Listeria monocytogenes* and listeric infection. *Bacteriol. Rev.* 30: 308-382.
- Guyer S. og T. Jemmi. 1991. Behaviour of *Listeria monocytogenes* during fabrication and storage of experimentallt contaminated smoked salmon. *Appl. Environ. Microbiol.* 57, 1523-1527.
- Hume O.S. 1976. Maternal *L. monocytogenes* septicemia with sparing the fetus. *Obset. Gynecol.* 48(suppl.), s. 33-34.
- Huss H.H, L.V. Jorgensen, B.F. Vogel. 2000. Control options for *Listeria monocytogenes* in seafoods. *Int. J. Food Microbiol.* 2000 Dec. 20; 62(3): 267-274.
- Inoue S., A.Nakama, Y. Kokubo, T. Maruyaa, A. Saito, T. Yoshida, M. Terao, S. Yamamot og S. kumagai. 2000. Prevalence and contamination levels of *Listeria monocytogenes* in retail food in Japan. *Int. Food Microbiol.* 2000 Jul 25,59(1-2): 73-77.
- Jacquet C., B. Catimel, R. Broch, C. Buchreiser, P. Dehaumont, V. Goulet, A. Lepoutre, P.Veit og J. Rocourt. 1995. Investigations related to the epidemic strain involved in the French listeriosis outbreak in 1992. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 2242-2246.
- Jensen A. 1993. Excretion of *L. monocytogenes* in faces after listeriosis: rate, quantity and duration. *Med. Microbiol. Lett.* 57: 176-182.
- Junttila J.R., S.I. Niemelä og J. Hirn. 1998. Minimum growth of *Listeria monocytogenes* and non- haemolytic *Listeria*. *J. Appl. Bacteriol.* 1988. Oct:65(4): 321-327.
- Jurado R.L., M.M. Farley, E. Pereira, R.C. Harvey, A. Schuchat, J.D. Wenger og D.S. Stephens. 1993. Increased risk of meningitis and bacteremia due to *Listeria monocytogenes* in patients with human immunodeficiency virus infection. *Clin. Infect. Dis.* 17: 224-227.

- Lunestad T.L. 1997. Forekomst av *Listeria monocytogenes* i enkelte næringsmidler. Sentrallaboratoriet, Fiskeridirektoratets kontrollverk. August 1997.
- Mainou-Fowler T., A.P. MacGowan, og R. Postlethwaite. 1988. Virulence and *Listeria spp*: Course of infection in resistant and susceptible mice. J. Med. Microbiol. 27: 131-140.
- Meier J. og L. Lopez. 2001. Listeriosis: an emerging food-borne disease. Clin. Lab. Sci. 2001. Summer: 14(3): 187-92; quiz 194.
- Messina M.C., H.A. Ahmad, J. A. Marchello, C.P. Gerba, og M.W. Paquette. 1988. The effect of liquid smoke on *Listeria monocytogenes*. J. Food Protect. 51, 629-631.
- McLauchlin J.S. 1990. Human listeriosis in Britain, 1967-85. A summary of 722 cases. Listeriosis in non-pregnant individuals, a changing pattern of infection and seasonal incidence. Epidemiol. Infect. 104: 191-201.
- McLauchlin J.S. og J.C. Low. 1994. Primary cutaneous listeriosis in adults: an occupational disease of veterinarians and farmers. Vet. Rec. 1994. Dec. 24-31; 135(26): 615-617
- Mounier J., A. Ryter, M. Coquis og P.J. Sansonetti. 1990. Intracellular and cell-to-cell spread of *Listeria monocytogenes* involves interaction with F-actin in the enterocyte-like cell line Caco-2. Infect. Immun. 58: 1048-1058.
- MSIS årsrapport 1998, 1999, 2000. Meldesystem for infeksjonssykdommer. Statens institutt for folkehelse. Oslo.
- Murray E.G.D., R.A. Webb, og M.B.R. Swann. 1926. A disease of rabbit characterised by large mononuclear leucocytosis, caused by a hitherto undescribed bacillus *Bacterium monocytogenes* (n.sp.). J. Pathol. Bacteriol. 29: 407-439.
- NMKL nr.136, 1.utgave 1990. Nordisk metodekomité for næringsmidler. *Listeria monocytogenes*. Påvisning i levnedsmidler.

- NMKL nr.136, 2. utgave 1999. Nordisk metodekomitè for næringsmidler. *Listeria monocytogenes*. Påvisning i levnedsmidler.
- Norton D. M., J. M. Scarlett, K. Horton, D. Sue, J. Thimothe, K. J. Boor, M. Wiedmann. 2001. Characterization and pathogenic potensial of *Listeria monocytogenes* isolates from the smoked fish industry. *Appl. Environ. Microbiol.* 2001 Feb;67(2) :646-653.
- NRK 26.02, 2000. Intervju med smittevernoverlege Terje Hoel.
- Oland, G. 2002. Dyrehelsetilsynet i Seljord. Personlig meddelelse, 2002.
- Portnoy D.A., T. Chakraborty, W. Goebel og P. Cossart. 1992. Molecular determinants of *Listeria monocytogenes* pathogenesis. *Infect. Immun.* 60: 1263-1267.
- Post D.E., 1995. Food-borne pathogens. Monograph number 2: *Listeria*. Oxoid Technical Support Manager. 1995.
- Rocourt J., F. Grimont , P.A.D. Grimont, og H.P.R. Seelliger. 1982. DNA relatedness among serovars of *Listeria monocytogenes sensu lato*. *Vurr. Microbiol.* 7: 383-388.
- Rocourt J., A. Schrettenbrunner, og H.P.R. Seeliger. 1983. Diffèrenciation biochemique des groupes gènòmiques de *Listeria monocytogenes (sensu lato)*. *Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur)* 134: 65-71.
- Rocourt J. og H.P.R. Seeliger. 1985. Distribution des especes du genre *Listeria*. *Zentral. Bakteriol. Mikrobiol. Hyg. A.* 259: 317-330.
- Rocourt J. og J. Bille 1997. Foodborne listeriosis. *Wld. Hlth. Statist. Quart.* 50: 67-73.
- Rocourt J., C. Jacquet, A. Reilly. 2000. Epidemiologi and human listeriosis and seafood. *Int. J. Food. Microbiol.* 2000 Des. 20;62 (3) ;197-209.

- Ryser T.E og E.H Marth (eds). 1999. *Listeria*, Listeriosis and Food Safety. Second edition, revised and expanded. Eastern Hemisphere Distribution. ISBN 0-8247-0235-2.
- Rørvik L.M og M. Yndestad, 1991. *Listeria monocytogenes* in foods in Norway. Int. J. Food Microbiol. 13: 97-104.
- Rørvik L.M., D.A. Caugant, M. Yndestad. 1995. Contamination pattern of *Listeria monocytogenes* and other *Listeria spp.* in a salmon slaughterhouse and smoked salmon processing plant. Int. J. of Food Microbiol. 25: 19-27.
- Rørvik L.M., E. Skjerve, B.R. Knutsen, M. Yndestad. 1997. Risk factors for contamination of smoked salmon with *Listeria monocytogenes* during processing. Int. J. Food Microbiol. 1997. Jul. 22:37, 23: 215-219.
- Rørvik L.M., 2000. *Listeria monocytogenes* in the smoked salmon industry. Int. J. Food Microbiol. 2000. Dec. 20: 62.
- Sabanadesan S., A.M. Lammerding, M.W. Griffiths. 2000. Survival of *Listeria innocua* in salmon following cold-smoke application. J. of Food Prot. Vol. 63, nr. 6, Jun. 2000, s. 715-720.
- Salamina G., E. Dalle Donne, A. Nicoclini, G. Poda, D. Cesaroni, M. Bucci, R. Fini, M. Maldini, A. Schuchat, B. Swaminathan, W. Bib, J. Rocourt, N. Binkin og S. Salmaso. 1996. A foodborne outbreak of gastroenteritis involving *Listeria monocytogenes*. Epidemiol. Infect. 1996. Dec; 117(3): 429-436.
- SANCO 594. 2000. Rev.1. Commission of the European communities.
- Seeliger H.P.R. og D. Jones. 1986. Genus *Listeria* Pirie 1940. In: P.H.A. Sneath, N.S. Mair, N.E. Sharpe og J.G. Holt (eds.), Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Vol. 2 Baltimore: Williams & Wilkins. s. 788-795.



- Schlech W.F., P.M. Lavigne, R.A. Bortolussi, A.C. Allen, E.V. Haldane, A.J. Worth, A.W. Hightower, S.E. Johnson, S.H. King, E.S. Nicolls og C.V. Bromme. 1983. Epidemic listeriosis-evidence for transmission by food. *N. Engl. J. Med.* 308: 203-206.
- Schlech W.F. 1997. *Listeria* gastroenteritis - old syndrome, new pathogen. *N. Engl. J. Med.* 336: 130-132.
- Scuchat A., R.W. Pinner, K. Deaver, B. Swaminathan, R. Weaver, P.S. Hayes, M. Reeves, P. Pierce, J.D. Webger, C.V. Bromme og *Listeria* Study Group. 1991. Epidemiology of listeriosis in the USA, s.69-73. In A. (ed.), *Listeria* and food safety. ASEPT, Laval, France.
- Schuchat A., K.A. Deaver, J.D. Wenger, B.D. Plikaytis, L.Mascola, R.W. Pinner, A.L. Reingold, C.V. Broome og *Listeria* study group.1992. Role of foods in sporadic listeriosis. Case-control study of dietary risk factors. *JAMA* 267: 2041-2045.
- Skogberg K., J. Syrjanen, M. Jahkola, O.V. Renkonen, J. Paavonen, J. Ahnonen, S. Kontiainen, P. Ruutu og V. Valtonen.1992. Clinical presentation and outcome of listeriosis in patients with and without immunosuppressive therapy. *Clin. Infect. Dis.* 14: 815-821.
- Vaz-Velho M., G. Duarte, P.Gibbs. 2001. Evaluation of enhanced hemolysis agar for detection og *Listeria spp.* and *L. monocytogenes* from production lines of fresh to cold-smoked fish. *J. Microbiol. Methods.* Aug. 46(2): 157-163.
- Vazquez-Boland J.A., L. Dominguez, J.F. Fernandez-Garayzabal og G. Suarez. 1992. *Listeria monocytogenes* CAMP-reaction. *Clin. Mikrobiol. Rev.* 5: 343.
- von Amtsberg G.A., A. Elsner, H.A. Grabbar og W. Winkenwerder. 1969. *Animal Health Yearbook.* 1986. Food and Agriculture Organization of the United States, World Health Organization and International office of epizootics, Rome.

Watson G.W., T.J. Fuller, J. Elms og R.M. Kluge. 1978. *Listeria cerebritis*: Relapse of infection in renal transplant patients. Arch. Intern. Med. 138: 83-87.

Wegener H.C., B. Nørrung, A. Jensen, P.K. Embarek og A. Tolstoy. 1993. *Listeria monocytogenes* – en oversikt. Dansk vet. tidsskr. 76: 501-509.

## Vedlegg

VEDLEGG 1 - Analyseresultater fra produksjonslokale A i uke 6 og uke 8.

### *Analyseserie nr 1. uke 6*

Sted for prøveuttak	Antall prøver	Antall prøver som inneholder	
		<i>L. monocytogenes</i>	<i>L. spp.</i>
Fiskeavkutt tatt før kaldrøyking :			
Salteri	1	1 (100%)	-
Skinne maskin i produksjonen	10	8 (80%)	2 (20%)
Porsjonskutter i produksjonen	10	8 (80%)	2 (20%)
Totalt fra prøver tatt før kaldrøyking	21	17 (81%)	4 (19%)
Fiskeavkutt fra kaldrøykt fisk :			
Skinne maskin i pakkeriet	10	5 (50%)	3 (30%)
Slicer i pakkeriet	10	6 (60%)	1 (10%)
Renskjæring hel filet i pakkeriet	10	2 (20%)	3 (30%)
Totalt fra kaldrøykt fisk i lokale A	30	13 (43%)	7 (23%)
Totalt antall prøver	51	30 (59%)	11(22%)

### *Analyseserie nr 2. uke 8*

Sted for prøveuttak	Antall prøver	Antall prøver som inneholder	
		<i>L. monocytogenes</i>	<i>L. spp.</i>
Fiskeavkutt tatt før kaldrøyking :			
Salteri	-	-	-
Skinne maskin i produksjonen	8	7 (86%)	1 (13%)
Porsjonskutter i produksjonen	8	6 (75%)	2 (25%)
Totalt fra prøver tatt før kaldrøyking i lokale A	16	13 (81%)	3 (19%)
Fiskeavkutt fra kaldrøykt fisk :			
Skinne maskin i pakkeriet	10	-	2 (20%)
Slicer i pakkeriet	10	4 (40%)	-
Renskjæring hel filet i pakkeriet	10	1 (10%)	1 (10%)
Totalt fra kaldrøykt fisk i lokale A	30	5 (17%)	3 (10%)
Totalt antall prøver produksjonslokale A	46	18 (39%)	6 (13%)

## VEDLEGG 2 - Analyseresultater fra produksjonslokale A i uke 21 og uke 24

### *Analyseserie nr 4. uke 21*

Sted for prøveuttak	Antall prøver	Antall prøver som inneholder	
		<i>L. monocytogenes</i>	<i>L. spp.</i>
Fiskeavkutt tatt før kaldrøyking :			
Salteri	3	1 (33%)	-
Skinne maskin i produksjonen	8	4 (50%)	-
Porsjonskutter i produksjonen	5	4 (80%)	-
<b>Totalt fra prøver tatt før kaldrøyking i lokale A</b>	<b>16</b>	<b>9 (56%)</b>	<b>-</b>
Fiskeavkutt fra kaldrøyt fisk :			
Skinne maskin i pakkeriet	7	-	-
Slicer i pakkeriet	7	1 (14%)	-
Renskjæring hel filet i pakkeriet	7	-	1 (14%)
<b>Totalt fra kaldrøyt fisk i lokale A</b>	<b>21</b>	<b>1 (5%)</b>	<b>1 (5%)</b>
<b>Totalt antall prøver produksjonslokale A</b>	<b>37</b>	<b>10 (27%)</b>	<b>1 (3%)</b>

### *Analyseserie nr 5. uke 24*

Sted for prøveuttak	Antall prøver	Antall prøver som inneholder	
		<i>L. monocytogenes</i>	<i>L. spp.</i>
Fiskeavkutt tatt før kaldrøyking :			
Salteri	-	-	-
Skinne maskin i produksjonen	9	3 (33%)	1 (11%)
Porsjonskutter i produksjonen	9	5 (55%)	1 (11%)
<b>Totalt fra prøver tatt før kaldrøyking i lokale A</b>	<b>18</b>	<b>8 (44%)</b>	<b>2 (11%)</b>
Fiskeavkutt fra kaldrøyt fisk :			
Skinne maskin i pakkeriet	9	1 (11%)	3 (33%)
Slicer i pakkeriet	9	-	2 (22%)
Renskjæring hel filet i pakkeriet	9	1 (11%)	2 (22%)
<b>Totalt fra kaldrøyt fisk i lokale A</b>	<b>27</b>	<b>2 (7%)</b>	<b>7 (26%)</b>
<b>Totalt antall prøver produksjonslokale A</b>	<b>45</b>	<b>10 (22%)</b>	<b>9 (20%)</b>

VEDLEGG 3 - Analyseresultater fra produksjonslokale A i uke 27 og uke 37

***Analyseserie nr 6. uke 27***

Sted for prøveuttak	Antall prøver	Antall prøver som inneholder	
		<i>L. monocytogenes</i>	<i>L. spp.</i>
Fiskeavkutt tatt før kaldrøyking :			
Salteri	-	-	-
Skinne maskin i produksjonen	6	4 (66%)	-
Porsjonskutter i produksjonen	8	8(100%)	-
<b>Totalt fra prøver tatt før kaldrøyking i lokale A</b>	<b>14</b>	<b>12 (86%)</b>	<b>-</b>
Fiskeavkutt fra kaldrøykt fisk :			
Skinne maskin i pakkeriet	10	-	1 (10%)
Slicer i pakkeriet	10	1 (10%)	1 (10%)
Renskjæring hel filet i pakkeriet	9	-	2 (22%)
<b>Totalt fra kaldrøykt fisk i lokale A</b>	<b>29</b>	<b>1 (3%)</b>	<b>4 (14%)</b>
<b>Totalt antall prøver produksjonslokale A</b>	<b>43</b>	<b>13 (30%)</b>	<b>4 ( 9%)</b>

***Analyseserie nr 7. uke 37***

Sted for prøveuttak	Antall prøver	Antall prøver som inneholder	
		<i>L. monocytogenes</i>	<i>L. spp.</i>
Fiskeavkutt tatt før kaldrøyking :			
Salteri	-	-	-
Skinne maskin i produksjonen	6	1 (16%)	3 (50%)
Porsjonskutter i produksjonen	6	4 (67%)	1 (16%)
<b>Totalt fra prøver tatt før kaldrøyking i lokale A</b>	<b>12</b>	<b>5 (42%)</b>	<b>4 (33%)</b>
Fiskeavkutt fra kaldrøykt fisk :			
Skinne maskin i pakkeriet	6	1 (16%)	-
Slicer i pakkeriet	6	-	-
Renskjæring hel filet i pakkeriet	6	-	2 (33%)
<b>Totalt fra kaldrøykt fisk i lokale A</b>	<b>18</b>	<b>1 ( 6%)</b>	<b>2 (11%)</b>
<b>Totalt antall prøver produksjonslokale A</b>	<b>30</b>	<b>6 (20%)</b>	<b>6 (20%)</b>

VEDLEGG 4 - Analyseresultater fra produksjonslokale B i uke 8, 10 og 21.

**Analyseserie nr 2. uke 8**

Sted for prøveuttak	Antall prøver	Sted for prøveuttak	
		<i>L. monocytogenes</i>	<i>L. spp.</i>
Fiskeavkutt tatt før kaldrøyking:			
Hodekapping	3	1(33%)	-
Baader 2000 (filètering)	4	-	-
Napping	4	3 (75%)	-
Sortering	4	4(100%)	-
Fintrimming	4	4(100%)	-
<b>Totalt antall prøver</b>	<b>19</b>	<b>12 (63%)</b>	<b>-</b>

**Analyseserie nr 3. uke 10**

Sted for prøveuttak	Antall prøver	Sted for prøveuttak	
		<i>L. monocytogenes</i>	<i>L. spp.</i>
Fiskeavkutt tatt før kaldrøyking:			
Hodekapping	8	2(25%)	-
Baader 2000 (filètering)	9	1 (11%)	-
Napping	9	6 (67%)	-
Sortering	9	9(100%)	-
Fintrimming	8	6 (75%)	-
<b>Totalt antall prøver</b>	<b>43</b>	<b>24(56%)</b>	<b>-</b>

**Analyseserie nr 4. uke 21**

Sted for prøveuttak	Antall prøver	Sted for prøveuttak	
		<i>L. monocytogenes</i>	<i>L. spp.</i>
Fiskeavkutt tatt før kaldrøyking:			
Hodekapping	7	3(43%)	1(14%)
Baader 2000 (filetering)	8	1(13%)	1(13%)
Napping	7	-	1(14%)
Sortering	7	-	1(14%)
Fintrimming	7	2(29%)	-
<b>Totalt antall prøver produksjonslokale B</b>	<b>36</b>	<b>6(17%)</b>	<b>4 (11%)</b>

VEDLEGG 5 - Analyseresultater fra produksjonslokale B i uke 24, 27 og 37.

**Analyserunde nr 5. uke 24**

Sted for prøveuttak	Antall prøver	Sted for prøveuttak	
		<i>L. monocytogenes</i>	<i>L. spp.</i>
Fiskeavkutt tatt før kaldrøyking:			
Hodekapping	10	2(20%)	1(14%)
Baader 2000 (filetering)	10	1(10%)	1(10%)
Napping	-	-	-
Sortering	10	5(50%)	-
Fintrimming	9	2(22%)	-
<b>Totalt antall prøver produksjonslokale B</b>	<b>39</b>	<b>10(26%)</b>	<b>2( 5%)</b>

**Analyseserie nr 6. uke 27**

Sted for prøveuttak	Antall prøver	Sted for prøveuttak	
		<i>L. monocytogenes</i>	<i>L. spp.</i>
Fiskeavkutt tatt før kaldrøyking:			
Hodekapping	10	1(10%)	2(20%)
Baader 2000 (filetering)	10	1 (10%)	4(40%)
Napping	-	-	-
Sortering	10	5(50%)	2(20%)
Fintrimming	10	2(20%)	4(40%)
<b>Totalt antall prøver produksjonslokale B</b>	<b>40</b>	<b>9(23%)</b>	<b>12(30%)</b>

**Analyseserie nr 7. uke 37**

Sted for prøveuttak	Antall prøver	Sted for prøveuttak	
		<i>L. monocytogenes</i>	<i>L. spp.</i>
Fiskeavkutt tatt før kaldrøyking:			
Hodekapping	4	2(50%)	1(25%)
Baader 2000 (filetering)	4	3(75%)	-
Napping	-	-	-
Sortering	4	1(25%)	1(25%)
Fintrimming	-	-	-
<b>Totalt antall prøver produksjonslokale B</b>	<b>12</b>	<b>6(50%)</b>	<b>2(17%)</b>

## VEDLEGG 6 - Micro-ID<sup>®</sup> Listeria reaksjoner

VP (Voges-Proskauer): Glukose og pyruvat konverteres til acetylmetylkarbinol, som oksideres til diacetyl med KOH. Deretter dannes et farget kompleks med arginine og  $\alpha$ -naphthol. Alle *Listeria*-arter er VP-positive.

N (nitrat reduktase): Nitrat reduseres til nitritt som reagerer med sulfanic syre. Sammen med  $\alpha$ -naphthylamin dannes et farget kompleks. Ingen *Listeria*-arter gir positiv N-reaksjon.

PD (fenylamin deaminase): Fenylamin deamineres til fenylypyruvat som sammen med jernioner gir fargeomslag. Ingen *Listeria*-arter gir positiv PD-reaksjon.

H<sub>2</sub>S (hydrogensulfid): Natrium tiosulfat reduseres til H<sub>2</sub>S som sammen med blyacetat danner svart jernsulfid. Alle *Listeria*-arter er H<sub>2</sub>S positive.

I (indol): Tryptofan metaboliseres til indol som danner et farget kompleks med p-dimetylaminobenzaldehyd. Ingen *Listeria*-arter gir positiv I-reaksjon.

OD (Ornitin-dekarboksylase): Ornitin dekarboksyleres til putreskin som hever pH, og gir fargeomslag i pH-indikatoren bromkresol-lilla. Ingen *Listeria*-arter gir positiv OD-reaksjon.

LD (lysin dekarboksylase): Lysin dekarboksyleres til cadaverin som øker pH og gir fargeomslag i pH-indikatoren bromkresol-lilla. Ingen *Listeria*-arter gir positiv LD-reaksjon.

M (malonat): Malonat oksideres til et basisk produkt som gir fargeomslag i pH-indikatoren bromtymol-blå. Ingen *Listeria*-arter gir positiv M-reaksjon.

U (urease): Urea hydrolyseres til ammonium og karbon dioksid. Dette øker pH, og gir fargeomslag i pH-indikatoren indol-rød. Ingen *Listeria*-arter gir positiv U-reaksjon.

E (esculin hydrolyse): Esculin hydrolyseres til glukose og esculetin som reagerer med jernioner og gir svart fargeomslag. Alle *Listeria*-arter er E- positive.



ONPG ( $\beta$ -galaktosidase): o-nitrofenyl- $\beta$ -galaktopyranosid hydrolyseres av  $\beta$ -galaktosidase til o-nitrofenyl og  $\beta$ -D-galaktose som gir gult fargeomslag. Men unntak av *L. monocytogenes* er ingen *Listeria*-arter ONPG-positive. *L. monocytogenes* kan gi både positiv og negativ reaksjon.

XYL (xylose-fermentering): Syreproduksjon ved fermentering av xylose gir fargeomslag i pH-indikatoren bromkresol-lilla. *L. monocytogenes*, *L. grayi*, og *L. innocua* er XYL-negative, mens *L. seeligeri*, *L. ivanivii* og *L. welshimeri* er XYL-positive.

RHAM (rhamnose-fermentering): Syreproduksjon ved fermentering av rhamnose gir fargeomslag i pH-indikatoren bromkresol-lilla. *L. monocytogenes* er RHAM-positiv, mens *L. seeligeri*, *L. ivanivii* og *L. grayi* er RHAM-negative. *L. innocua* og *L. welshimeri* kan gi både negativ og positiv reaksjon.

MANN (mannitol-fermentering): Syreproduksjon ved fermentering av mannitol gir fargeomslag i pH-indikatoren bromkresol-lilla. *L. monocytogenes*, *L. seeligeri*, *L. ivanivii*, *L. welshimeri* og *L. innocua* er MANN-negative, mens *L. grayi* er MANN-positiv.

SORB (sorbitol fermentering): Syreproduksjon ved fermentering av sorbitol gir fargeomslag i pH-indikatoren bromkresol-lilla. Alle *Listeria*-arter kan gi både negativ og positiv SORB-reaksjon.