

Påvisning av *Listeria* i laksenæringen: Er alternative metoder egnet for bedriftens egenkontroll?

Av Even Heir og Solveig Langsrud
Nofima AS, Ås

Bakterier av typen *Listeria* utgjør en reell trussel for mange matprodusenter. Kontroll med *Listeria* er en av de største mattrygghetsutfordringene for mange produsenter. En vurdering av påvisningsmetoder for *Listeria* som kan egne seg for produsentens egenkontroll er derfor etterspurt. Eventuelt egnede metoder vil kunne gi bedre dokumentasjon på mattrygghet, økt kunnskap om risiko i egen produksjon og bedre grunnlag for innføring av tiltak mot *Listeria*.

Listeria

- Mat som inneholder *Listeria monocytogenes* kan gi listeriose, en sjelden men alvorlig sykdom
- Risikoprodukter er mat som ikke varmebehandles og hvor *Listeria* kan vokse i holdbarhetstiden
- *Listeria* forekommer i produksjonskjeden av laks og kan overføres til for eksempel røkelaks
- Kontroll med *Listeria* i laksenæringen er viktig mht mattrygghet, regelverk, kundekrav, økonomi og omdømme
- Arbeidet er utført som en del av prosjektet "Tiltak for økt kontroll med *Listeria* i laksenæringen." Prosjektet er finansiert av Fiskeri- og havbruksnæringens forskningsfond og foregår i perioden 2010-2014 (prosjektnr. FHF 900521)

Testing og vurdering av to alternative hurtigmetoder for påvisning av *Listeria* i laksenæringen

Vi har i en tidligere utgave av Norsk Sjømat presentert en oversikt over kommersielle metoder for *Listeria*-påvisning. Det finnes et stort mangfold av kommersielt tilgjengelige alternative metoder for påvisning av *L. monocytogenes* og andre *Listeria*-arter. Disse metodene er utviklet for å kunne anvendes som et alternativ til standardmetodene (ISO 11290-1, NMKL 136) som anses som lite egnet for bruk i egenkontroll da de blant annet krever mye håndtering av risikomateriale. Alternative metoder kan ha fordeler som gjør de å foretrekke dersom bruk av standardmetoder ikke er påkrevd. Fordeler kan for eksempel være at de er billigere, gir hurtigere prøvesvar, gir muligheter for samtidig analyser av et stort antall prøver og/eller er enklere å anvende og analysere. Ulike brukere vil ha ulike behov og krav. Dette gjør at metoder som kan være velegnet for bruk av rutinelaboratorier er mindre egnet for bruk i egenkontroll i enkeltbedrifter. For mer utdyping knyttet til viktige kriterier for valg av metoder for påvisning av bakterier vises også til nylig publisert oversiktsartikkel (Jasson et al. 2010) ¹.

Kriterier for valg av metodikk for uttesting ble bestemt i samråd med aktører i næringen. Viktige kriterier var at metodene skulle

- være tilgjengelig for bruk i hele næringen

¹ Jasson V. et al. (2010). Alternative microbial methods: An overview and selection criteria. Food Microbiology, 27, 710-730.

- være rimeligere enn å sende prøver til eksternt analyselaboratorium for prøvesvar (300 – 700 kr/prøve)
- kreve små investeringer i spesialutstyr for prøvetaking og analyser
- være enkle i praktisk bruk
- gi raske prøvesvar (≤ 2 døgn)
- ha høy sensitivitet (kunne påvise lave nivåer *Listeria*)
- være spesifikke (kun påvise *L. monocytogenes* eller andre *Listeria*-arter, ikke andre typer bakterier)
- være trygge å bruke i bedrift (f.eks. ikke kreve håndtering av risikomateriale)

Uttesting av to hurtigmetoder for prøvetaking og påvisning av *Listeria*

Basert på kriteriene beskrevet over ble to dyrkingsbaserte alternative metoder valgt for videre uttesting: InSite Environmental *Listeria* Test (InSite; Hygiene-Americas, USA; Norsk forhandler Labolytic, Trondheim) og Path-Chek Hygiene *Listeria* (Path-Chek; Microgen Bioproducts Ltd, England; norsk forhandler Interfarm, Asker). Begge disse systemene inneholder svabere for prøvetaking og spesialmedium som tilsettes svaberne etter prøvetaking. Prøvene settes ved 30°C eller 37°C og positive prøver avleses visuelt som følge av enzymatisk fargereaksjon i mediet etter 24 eller 48 timer. Både InSite og Path-Chek benyttes i dag av enkelte produsenter i laksenæringen for påvisning av *Listeria*. Det er viktig å merke seg at metoden ikke påberoper seg å være spesifikk for *L. monocytogenes*, men gir fargeomslag for alle typer *Listeria*.

Prøvetaking: Tre foredlingsanlegg for laks/ørret ble besøkt: Ett lakseslakteri og to anlegg som videreforedler laks og ørret til filet og røkte produkter. Prøvetakingpunkter i de tre anleggene var overflater av utstyr og miljø (for eksempel transportbånd, prosesseringsmaskiner, kniver, sluk, gulv) samt råvarer og produkter av laks (gjeller, buk og skinn/filet prøvetatt). Prøvetaking ble gjennomført både under produksjon og før produksjonsstart, dvs. av vaskede og desinfiserte overflater. Prøvetaking ble foretatt med InSite og Path-Chek svaberne. Hvis mulig ble omlag 100 cm² areal svabret i hvert prøvepunkt. Fra noen av de samme prøvepunktene ble det også gjennomført parallell svabring med sterile kluter (Sodibox, 3M Food Diagnostics, Skjetten).

Prøvebehandling: Etter prøvetaking ble alle prøver oppbevart kjølig. Innen 20 timer etter prøvetaking ble svaberne tilsatt tilhørende spesialmedium og satt i varmeskap som anvist fra leverandør. Avlesning av positive og negative fargereaksjoner ble utført etter 24 og 48 timer. Kluter fra prøvetaking ble analysert vha NMKL136 standardmetodikk.

Sjekk om InSite og Path-Chek var spesifikke for *Listeria*: Alle rør hvor det var et fargeomslag til svart/mørk brun etter 48 timer i varmeskap ble analysert ved hjelp av standardmetodikk NMKL 136 for påvisning av *Listeria*. Bakteriekolonier som liknet *Listeria*-kolonier i følge NMKL-metoden ble ytterligere undersøkt for å bekrefte at det var *Listeria*. Dette ble gjort med en genteknologiske metoder (PCR) der man kunne påvise og skille mellom *L. monocytogenes* og andre *Listeria*-arter.

Avklare hvilke bakterier som ga falske positive: Bakterier fra utvalgte InSite og Path-Chek prøver hvor det var positive fargereaksjoner, men hvor *Listeria* ikke ble påvist, ble dyrket opp på næringsagar. Bakteriekolonier ble plukket og tilsatt nye rør med Insite og Path-Chek næringsmedium og satt i varmeskap som anvist fra leverandør. Etter 48 timer ble det dyrket opp bakterier fra rør med positivt fargeomslag. Bakteriene ble identifisert ved bruk av genteknologiske metoder (PCR og sekvensering av ribosomalt 16S DNA).

Resultater

Resultater med InSite og Path-chek

Svaberprøver med *Listeria* skal i følge produsentene gi et fargeomslag i vekstmedium fra lyst brunt til svart/mørkt brunt etter 24-48 timer i varmeskap. Ingen fargereaksjon indikerer fravær av *Listeria* (Figur 1). Totalt ble det tatt 163 prøver med InSite og Path-Chek fra de tre prosesseringsanleggene for laks/ørret. Prøvetakingen ble utført fra steder der bedriftene gjennomfører prøvetaking i henhold til eget prøvetakingsprogram og inkluderte prosessutstyr, miljøprøver (hovedsakelig gulv og sluk) samt fisk (rund laks, filet og røkt laks).

Resultatene er oppsummert i Tabell 1. Det var fargeomslag i 69 av 163 prøver, noe som indikerte en relativt høy forekomst av *Listeria*. Videre analyser av disse prøvene viste imidlertid at kun 16, det vil si bare en fjerdedel av prøvene med fargeomslag virkelig inneholdt *Listeria*. De resterende var falske positive.

Miljøprøvene inneholdt høyest andel ekte positive: 10 av 14 prøver med fargeomslag inneholdt *Listeria*. Dette var prøver fra sluk og gulv hvor det var relativt høy forekomst av *Listeria*. Om lag halvparten av prøvetakingen ble utført på prosessutstyr. Resultatene viste at andelen falske positive var lavere etter prøvetaking fra rengjort utstyr (25%) enn fra utstyr prøvetatt under produksjon (50%). Høy andel falske positive ble også påvist fra fisk hvor kun en (fra røkt laks) av 18 positive prøver inneholdt *Listeria* (Tabell 1).

Andelen falske positive fra de ulike prøvepunktene var om lag likt uavhengig om prøvetakingen var utført med InSite eller Path-Chek. Fra prøvetakingssteder som ble svabret både med InSite/Path-Chek og kluter, ble *Listeria* påvist i 8% av InSite/PathChek-prøvene, mens 16% av klutene var *Listeria*-positive. Dette kan skyldes at man med klutene kunne prøveta et større areal og bruke mer kraft for å løsne bakterier fra underlaget enn det man kunne med svabere.

Identifisering av årsaker til falske positive:

Videre analyser av falske positive prøver hvor *Listeria* ikke var til stede, viste at flere typer bakterier som er vanlig å finne i produksjonsmiljøet kan gi fargeomslag. Melkesyrebakterier av typen Carnobakterier var hyppigste årsak til falske positive.

Konklusjon

Resultatene viser at de alternative, kommersielle metodene InSite og Path-Chek for prøvetaking og påvisning av *Listeria* i prosesseringsanlegg for laks kan påvise *Listeria*, men at de også gir en høy andel falske positive. Metodene er derfor ikke spesifikke nok. Prøvetakingsmetoder basert på kluter vil sannsynligvis være mer

sensitive siden man kan prøveta større arealer og bruke mer kraft i prøvetakingen. Selv om metodene i utgangspunktet scorer høyt på mange kriterier som er viktige for industrien, kan de derfor ikke anbefales.



Figur 1: Eksempler på InSite og Path-Chek prøver etter 48 timer i varmeskap ved hhv 37°C og 30°C. Fargeomslag i vekstmedium indikerer positivt resultat (Listeria-positiv), rør nr. 2, 4 og 5 fra venstre, mens ingen fargeendring i mediet indikerer negativt resultat (rør nr. 1 og 3 f.v.)

Tabell 1: Resultater fra prøvetaking utført med InSite og Path-Chek for påvisning av *Listeria* i prosesseringsanlegg for la

Prøvetakingssted	Antall prøver	Antall positive fargereaksjoner	Antall ekte positive	%-vis falske positive
Prosessutstyr	89	37	5	36
Miljø	30	14	10	13
Fisk	44	18	1	39
Totalt	163	69	16	33