

Jørgen Lerfall¹, Sunniva Hoel¹, Anita Nordeng Jakobsen¹, Atle Hannisdal¹, Elisabeth Hassel Kjønvik², Susanne Knøchel³, Lukaz Krych³, Bjørn Tore Lunestad⁴, Lisbeth Mehli¹

¹ Institutt for bioteknologi og matvitenskap, NTNU, Norge

² Lerøy Midt AS, Norge

³ Institutt for fødevarevitenskap, Københavns Universitet, Danmark

⁴ Havforskningsinstituttet, Norge

TraceListeria - Kartlegging av *Listeria monocytogenes* i sjøfasen ved produksjon av atlantisk laks

Trondheim 08.04 2022



NTNU

Kunnskap for en bedre verden

Sluttrapport FHF 901591

TraceListeria - Kartlegging av *Listeria monocytogenes* i sjøfasen ved produksjon av atlantisk laks

VERSJON

1

DATO

08.04.2022

FORFATTER(E)

Jørgen Lerfall¹
Sunniva Hoel¹
Anita Nordeng Jakobsen¹
Atle Hannisdal¹
Elisabeth Hassel Kjønvik²
Susanne Knøchel³
Lukaz Krych³
Bjørn Tore Lunestad⁴
Lisbeth Mehli¹

PROSJEKTNUMMER

FHF 901591

¹ Institutt for bioteknologi og matvitenskap, NTNU, Norge

² Lerøy Midt AS, Norge

³ Institutt for fødevarevitenskap, Københavns Universitet, Danmark

⁴ Havforskningsinstituttet, Norge

OPPDRAGSGIVER

Fiskeri og havbruksnæringens forskningsfinansiering
(FHF)

OPPDRAGSGIVER REF.

FHF 901591

Sammendrag

Laks spises ofte rå eller som lettprosesserte produkter og forekomst av den patogene bakterien *Listeria monocytogenes* er derfor en av de største utfordringene i lakseindustrien. Kontamineringsnivået av *L. monocytogenes* i norsk rå laks er svært lavt, men bakterien påvises jevnlig i produksjonsmiljøet, noe som utgjør en potensiell risiko for kontaminering av produkter. Påvisning av *L. monocytogenes* i ferdigpakkede produkter kan også føre til kostbare tilbaketrekkinger av hele produksjonsparti. Det er kjent at *L. monocytogenes* kan introduseres til produksjonsmiljøet fra flere kilder, inkludert personell, sjøvann og fra miljøet. Derimot er potensielle kontaminasjonsveier gjennom verdikjeden til Atlantisk laks, fra fôrfabrikker via oppdrettsanlegg og inn i slakteri/prosesseringsanlegg lite dokumentert.

Prosjektets forsøksdesign og valg av prøvetakingspunkter ble bestemt på grunnlag av en innledende fareanalyse av prosesser i hele verdikjeden ved hjelp av befaringer, arbeidsmøter med aktører i hele verdikjeden, samt litteratursøk. Tre fôrprodusenter (inkludert fôrbåter) og tre oppdrettsanlegg for laks (inkludert fôrflåter) ble fulgt med prøvetaking av fôr, fisk og miljøprøver fra fôr/oppdrett gjennom en periode på ca. ett år. Når fisken nådde sin kommersielle slaktevekt ble det tatt prøver ved brønnbåttransport, slakting, filetering og pakking. Totalt ble det tatt 1727 prøver fordelt på følgende hovedprosesser: 339 prøver fra verdikjede fôr, 1022 prøver fra sjøfase/brønnbåttransport og 366 prøver fra prosessering av fisken. Fordelingen av prøver fra miljø og fra fôr/fisk var henholdsvis 20 og 80 %. *Listeria* spp. og *L. monocytogenes* ble påvist i henholdsvis 8,0 og 2,3 % av prøvene.

Totalt 418 *Listeria*-isolater innsamlet fra positive prøver fra ulike deler av verdikjeden, og i tillegg 76 isolater innsamlet i forbindelse med bedriftens egen kvalitetskontroll, ble sekvensert med ON-rep-seq som en pre-screeningsmetode for utvelgelse av isolater til helgenomsekvensering (WGS). Helgenomsekvenseringen av isolater klassifisert som *L. monocytogenes* fra ON-rep-seq resulterte i 11 ulike MLST sekvenstyper (ST). De mest dominerende sekvenstypene i dette materialet er ST37, 8, 20 og 394. Størst sekvensdiversitet (8 sekvenstyper) ble funnet blant isolater fra fôr og fôrmiljø sammenlignet med isolater fra filetavdeling der kun ST8, 37 og 637 ble funnet. *L. monocytogenes* isolert fra levende og død fisk i sjøfasen ble identifisert som ST20, 394 og 91, sekvenstyper som ikke ble gjenfunnet i prosesseringsmiljøet. ST20 ble også påvist i produksjonsmiljøet til en av fôrprodusentene.

Resultatene indikerer en mulig link mellom kontaminert fôr og prosesseringsmiljøet. På grunn av få positive prøver i sjøfasen er det ikke mulig å avdekke spesifikke kontaminasjonsveier for *L. monocytogenes* fra fôr/fôrmiljø og inn til prosesseringsmiljø, men denne sammenhengen bør undersøkes nærmere i fremtidige prosjekt.

Abstract

Salmon products are often eaten raw or mildly processed, putting the foodborne pathogen *Listeria monocytogenes* as one of the salmon industry's most severe food safety concerns. The prevalence of *L. monocytogenes* in raw salmon products is low. However, *L. monocytogenes* is regularly detected in salmon slaughterhouses and pose a potential risk. Furthermore, detecting *L. monocytogenes* in prepackaged products can lead to costly withdrawals of whole batches. Previous research has stated contamination of *L. monocytogenes* through several pathways, including personnel, seawater, and the external environment. However, scant information exists about contamination pathways in the production chain of Atlantic salmon, from the feed factories, via production farms to slaughtering/processing.

The project design and sampling plan were selected based on an initial qualitative risk assessment of the production chain by using on-site inspections, stakeholder workshops, and literature research as data input. Three feed producers (including feed boats) and three salmon farms (including their feeding barges) were followed for approximately one year. When the fish reached the commercial size, sampling was performed during well-boat transport, slaughtering, filleting, and packaging. In total, 1727 samples were collected, 339 from the feed/feeding chain, 1022 from production/well-boat transport, and 366 from the processing plant. The average share between environmental and feed/fish samples was 20% and 80%, respectively. *Listeria* spp. and *L. monocytogenes* were detected in 8.0 and 2.3% of the samples.

A total of 418 *Listeria* isolates representing the different parts of the value-chain, and 76 isolates originating from the company's own quality control were selected for ON-rep-seq as a pre-screening method prior to whole-genome sequencing (WGS). WGS on selected isolates taxonomically classified as *L. monocytogenes* revealed 11 different multilocus sequence typing (MLST) sequence types (ST). Highest ST diversity (8 different) was found among isolates from the feed samples and within the feed environment compared to the filleting department, where only ST8, 37, and 637 were detected. *L. monocytogenes* isolated from alive and self-dead fish in the sea cages were identified as ST20, 394, and 91 showing no link to the processing plant. However, ST20 was found in the feed environment, whereas ST394 and 91 were not.

The results indicate a potential link between contaminated feed and the processing environment. However, the contamination path between the feed environment and the processing plant is still unknown and should be elucidated in future studies

Forord

Denne rapporten er en oppsummering av prosjektet «Kartlegging av *Listeria monocytogenes* i sjøfasen ved produksjon av atlantisk laks (TraceListeria)» finansiert av Fiskeri og havbruksnæringens forskningsfond (FHF) prosjekt 901591. Rapporten et sammendrag av Hannisdal et al. (2020); Lerfall et al. (2020), og Hoel et al. (2021) samt at den inneholder resultater fra prosjektets to siste arbeidspakker (AP); AP5 (kartlegging av *L. monocytogenes* i prosesseringsanlegg og produkt) og AP6 (sporing av *L. monocytogenes* i hele verdikjeden).

Prosjektets hovedmål var å øke kunnskapen om fôr og oppdrett og dets betydning for kontaminering av *L. monocytogenes* i verdikjede laks. Prosjektet er et samarbeid mellom NTNU – Norges teknisk naturvitenskapelige universitet, Københavns Universitet (KU), Lerøy Midt AS, og Havforskningsinstituttet (HI), og har hatt et totalt budsjett på NOK 4.465.000. Prosjektets varighet var fra 01.01.2020 til 31.03.2022.

Vi ønsker å takke Gunn Merethe Bjørge Thomassen, Tore Brembu og John-Kristian Jameson for utmerket teknisk støtte i prosjektet. Videre retter vi en stor takk til alle samarbeidspartnere ved fôrfabrikkene, fôrbåtene og oppdrettsanleggene for omfattende hjelp til prøveinnsamling.

Innholdsliste

Sammendrag	iv
Abstract	v
Forord	vi
1 Introduksjon	1
1.1 Kontamineringsveier for <i>Listeria monocytogenes</i> i verdikjeden for produksjon av atlantisk laks	1
1.2 <i>Listeria</i> i spiseklare sjømatprodukter	2
2 Materialer og metoder	3
2.1 Forsøksdesign og prøvetakingspunkter	3
2.2 Opparbeidelse, påvisning av <i>Listeria</i> og verifisering av PCR positive prøver	5
2.3 Bakterieisolater utvalgt for genetisk karakterisering	5
2.4 Pre-screening av bakterieisolater	5
2.5 Taksonomisk identifisering av <i>L. monocytogenes</i> med Whole Genome Sequencing (WGS)	5
3 Resultater og diskusjon	6
3.1 Fareanalyse	6
3.2 Forekomst av <i>Listeria</i> i verdikjede fôr	7
3.3 Forekomst av <i>Listeria</i> i verdikjede sjø	8
3.4 Forekomst av <i>Listeria</i> i prosesseringsanlegg	9
3.5 Sporing av <i>Listeria</i> i verdikjeden for Atlantisk laks	10
4 Konklusjon	12
5 Videre arbeid og anbefalinger	13
Referanser	14
Vedlegg	17
Vedlegg 1: Oversikt over prøvepunkt og prøveomfang fra produksjon, distribusjon og lagring av fôr, samt prøver fra fôr tatt i perioden august 2020 til juni 2021	17
Vedlegg 2: Oversikt over prøvepunkt og prøveomfang fra sjøanlegg i perioden august 2020 til juni 2021	18
Vedlegg 3: Oversikt over prøvepunkt og prøveomfang fra prosessanlegg	19

1 Introduksjon

Den norske oppdrettsnæringen er verdensledende, og i 2019 utgjorde den norske produksjonen av atlantisk laks (*Salmo salar*) omtrent 53 % av den globale produksjonen på ca. 2,6 millioner tonn (FAO, 2020). Til tross for et krevende år preget av den globale pandemien eksporterte Norge i fjor 1,3 millioner tonn laks med en samlet verdi på NOK 81,4 milliarder, noe som er den høyeste eksportverdien og volum som er registrert (Norges Sjømatråd, 2022).

Forekomst av *Listeria monocytogenes* er en kjent utfordring i lakseindustrien og denne bakterien kan utgjøre en risiko for forbrukeren, spesielt ved konsum av spiseklare produkter. Rå laks er en populær ingrediens i sushi, sashimi og sjømatosalater, og fersk laks kan anses som et spiseklart produkt (Skjerdal et al., 2014). Kaldrøkte lakseprodukter er også mattrygghetsmessig utfordrende med tanke på forekomst av *Listeria*, noe som synliggjøres med flere bekreftede tilfeller av listeriose med dødelig utfall i Europa de siste årene (EFSA, 2018).

Listeriose er en matbåren zoonose som forårsakes av *L. monocytogenes*, og rammer primært personer med nedsatt immunforsvar, eldre, fostre og nyfødte, og kan gi hjernehinnebetennelse og blodforgiftning (Lyngstad et al., 2019). Bakterien kan overføres fra mor til foster under graviditet og føre til abort og dødfødsel. Underliggende sykdom som kreft og diabetes predisponerer også for listeriose (FHI, 2010). Personer som tilhører en risikogruppe, kan utvikle alvorlig sykdom og dødeligheten ligger vanligvis mellom 20-30 % hos pasienter i disse gruppene (Wang & Orsi, 2013). Et økende antall meldte tilfeller av listeriose (både sporadiske tilfeller og utbrudd) i Europa er registrert, spesielt hos personer over 75 år og blant kvinner i aldersgruppen 25-44 år (EFSA, 2018). Smitte skjer hovedsakelig ved inntak av kontaminert mat hvor bakterien kan oppformeres til et høyt antall under lagring. I 2020 ble det i EU/EØS-området rapportert i underkant av 2000 tilfeller av listeriose. Flest tilfeller per 100 000 innbyggere ble rapportert fra Island, Finland og Danmark (EFSA og ECDC, 2021).

1.1 Kontamineringsveier for *Listeria monocytogenes* i verdikjeden for produksjon av atlantisk laks

Kunnskap om forekomst, kontamineringspunkter og smitteveier for *L. monocytogenes* ved produksjon av atlantisk laks er viktig for å kunne oppnå økt kontroll med *Listeria*, og krever en systematisk kartlegging av hele verdikjeden. Bransjens utfordringer med *Listeria* har i all hovedsak hatt søkelys på lokaler og utstyr i slakteri- og prosesseringsanlegg (Heir et al., 2015; Heir & Langsrud, 2013; Heir et al., 2018). Risikoen for kontaminering med *L. monocytogenes* er i vesentlig mindre grad kartlagt i sjøfasen hos lokalitetene for oppdrett. Produsentene melder selv om såkalte «problemlokaliteter» der forekomsten av *Listeria* er høyere i slakterier eller ferdig prosesserte produkter når det slaktes fra disse lokalitetene, men denne sammenhengen er i liten grad dokumentert.

Denne rapporten presenterer funn i prosjektet «Kartlegging av *Listeria monocytogenes* i sjøfasen ved produksjon av atlantisk laks» (FHF 901591), og er avgrenset til verdikjeden fra produksjon av fôr og fôrets verdikjede frem til fôringssystemer på lokalitetene, via fisk i sjø til brønnbåttransport av fisk til slakteri og frem til ferdig pakket hel fisk. For å øke datagrunnlaget for sporing valgte vi også å samle isolater fra fileteringsavdelingen og isolater samlet inn av bedriftens egen kvalitetsavdeling. For å sikre et robust prøvedesign, ble det i forkant av prøvetaking utført en fareanalyse (Hannisdal et al., 2020; Lerfall et al., 2020). En oppsummering av fareanalysen (AP2) er presentert i kapittel 3.1.

Bakgrunnen for dette prosjektet er det tidligere finansierte FHF-prosjektet «Kartlegging av forekomst av *Listeria monocytogenes* i sjø» (FHF 901492, Mowi ASA) som frembrakte behov for en mer omfattende kartlegging av betydningen av laksefôr, fisk i sjøfasen og brønnbåter som mulige kontamineringsveier for *L. monocytogenes* inn i primærprosesseringsanlegg. Når stammer av *Listeria* først har etablert seg i produksjonsmiljøet er det vanskelig å bli kvitt og derfor er det viktig å ha kontroll på smitekilder og forsøke å redusere innførsel av *Listeria* i produksjonen.

Kontaminering med *L. monocytogenes* kan komme fra flere kilder, da både friske mennesker, dyr og miljø kan være et reservoar for bakterien (Linke et al., 2014). Det er vist at *L. monocytogenes* kan introduseres til slakteri- og prosessanlegg fra sjøvann, brønnbåttansport og via råmaterialet eller gjennom prosessering ved krysskontaminasjon fra miljø, utstyr eller personell (Haldorsen, 2019; Møretrø et al., 2016). Over tid kan persistente *Listeria*-stammer etablere reservoar i produksjonsmiljøet (Aspholm & Rørvik, 2015), og derfra rekontaminere både råmaterialet og det ferdige produktet under videre prosessering fram til forbruker (Fagerlund et al., 2016). Det er derfor viktig å ha en så presis identifisering og karakterisering som mulig slik at bedriftene kan være i forkant i beslutningsprosesser som gjelder trygg mat.

På grunn av naturlig forekomst av *Listeria* i sjøvann vil introduksjon av bakterien i produksjonsmiljøet være nærmest uunngåelig, og for å unngå kontaminering av sluttproduktet kreves hygienisk produksjon (Jordan et al., 2018). Det er likevel antatt at levende fisk i merder og sjøvann utgjør en mindre kontamineringsfare for *L. monocytogenes* inn i prosesseringsanlegg og at *L. monocytogenes* i betydelig større grad forekommer på død fisk og på utstyr som er i kontakt med død fisk i merden (Haldorsen, 2019; Zaremba, 2018). En mulig forklaring kan være at død fisk som blir liggende i dødfisk-håven kan fungere som et reservoar for smitte til levende fisk, men denne sammenhengen er ikke dokumentert. Hyppig fjerning av dødfisk er foreslått som et mulig tiltak for å redusere risikoen for overføring av *L. monocytogenes* fra død fisk i sjøfasen. Værforhold, slik som perioder med intensivt regn, er pekt på som en mulig medvirkende faktor for økt påvisning av *L. monocytogenes* i produksjonsanlegg for fisk (Miettinen & Wirtanen, 2006). Bekker, elver og avrenning fra omkringliggende områder (f.eks. beiteområder) er mulige kilder til kontaminering av miljøet i sjøfasen.

Betydningen av laksefôr som en mulig smittekilde til *L. monocytogenes* har i liten grad blitt kartlagt, men funn i det tidligere omtalte kartleggingsstudiet indikerer at også laksefôr kan være en mulig kilde til *Listeria* i matfiskproduksjon (Haldorsen, 2019). Da fôret gjennomgår en kraftig varmebehandling er det lite trolig at fôret er kontaminert med *Listeria* etter ekstrudering. Det er behov for mer kunnskap om hvilke(n) del(er) av fôrproduksjon, distribusjon og lagring på fôrflåte som kan utgjøre en kilde til *L. monocytogenes* i slakterier og prosesseringsanlegg for laks.

1.2 *Listeria* i spiseklare sjømatprodukter

Spiseklar mat, inkludert rå laks, er spesielt utfordrende med hensyn til *L. monocytogenes* da slike produkter skal spises uten videre bakteriereduserende behandling. Krysskontaminering fra produksjonsmiljø er ansett som den vanligste kilden til *Listeria* i spiseklare produkter (Jordan et al., 2018). Bakterien har evne til å overleve og vokse ved lave temperaturer, i ferske og prosesserte lakseprodukter og i produksjonsmiljøet. Påvisning av *L. monocytogenes* i fersk laks utgjør ikke bare en risiko for forbrukeren, men er også knyttet til omfattende tilbaketrekninger og potensielt store økonomiske tap for produsenter (Heir et al., 2021). Rå fisk og spiseklare måltider er rangert på toppen av listen over rapporterte matrelaterte utbrudd eller tilbaketrekninger i Europa (Soon et al., 2020), og påvisning av *L. monocytogenes* er den viktigste årsaken til tilbaketrekninger av produkter på markedet (Lüth et al., 2019).

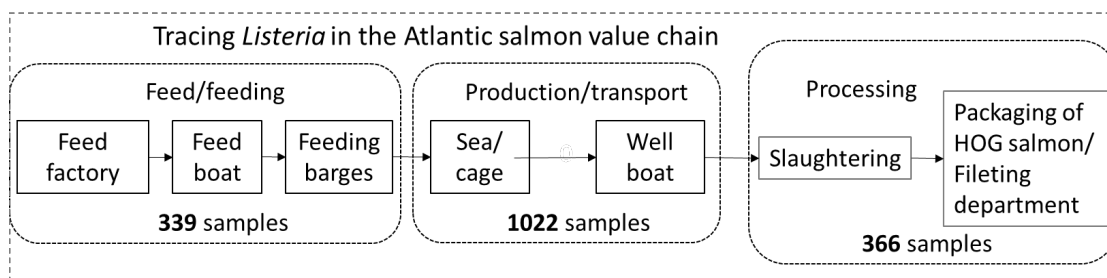
Studier av norske spiseklare sjømatprodukter viser at kontaminasjonsnivået av *L. monocytogenes* generelt er svært lavt, men det er sannsynligvis store variasjoner. I undersøkelser av kjølelagret, butikkjøpt sushi med tre dagers holdbarhet ble det ikke påvist *L. monocytogenes* (Hoel et al., 2017; Hoel et al., 2015; Lunestad & Skjerdal, 2008). En større studie av kaldrøkt laks på det europeiske markedet viste en forekomst av *L. monocytogenes* i 10 % av produktene i butikk (EFSA, 2013). Forekomst i rå laks er i mindre grad kartlagt, men det er likevel antatt at rå laks er en potensiell kilde til *L. monocytogenes* (Heir et al., 2021). Mattilsynet gjennomfører i 2021 en tilsynskampanje i norske lakseslakteri for å undersøke tiltak og rutiner for å hindre at fisk blir kontaminert med *Listeria*. Mattilsynet peker på at det er svært viktig at produsentene har effektive tiltak mot *Listeria* da laks i stor grad blir spist uten videre varmebehandling og blir brukt i andre spiseklare produkter som sushi, sashimi, røkt- og gravet fisk (Mattilsynet, 2021).

Selv om både prevalens og nivået av *L. monocytogenes* i fersk laks generelt er lavt, er laks et utmerket vekstmedium for denne bakterien (Skjerdal et al., 2014). For å unngå å overskride gjeldende grenseverdier for spiseklare produkter på < 100 CFU/g *L. monocytogenes* ved produktets utløpsdato (EU forordning 2073/2005) er det helt nødvendig å holde kontamineringen i råstoffet på et lavt nivå. Tilgjengelige vekstmodeller for *L. monocytogenes* i laks viser at det ikke bør være mer enn 0,5-10 CFU/g *L. monocytogenes* ved prosesseringstidspunkt, men dette estimatet forutsetter at den ferdigpakke lasken ikke utsettes for svingninger i lagringstemperatur, det vil si at kjølekjeden må holdes konstant på $\leq 4^{\circ}\text{C}$ helt frem til konsum (Skjerdal et al., 2014). I 2018 og 2019 var det flere alvorlige listerioseutbrudd i Europa som kan knyttes til røkte, gravede eller marinerte fiskeprodukter tilvirket med norsk råstoff. Produktene ble sporet tilbake til foredlingsanlegg i Polen og Estland, men kontaminering av råstoffet i Norge kunne ikke utelukkes (ECDC og EFSA, 2019; EFSA og ECDC, 2018).

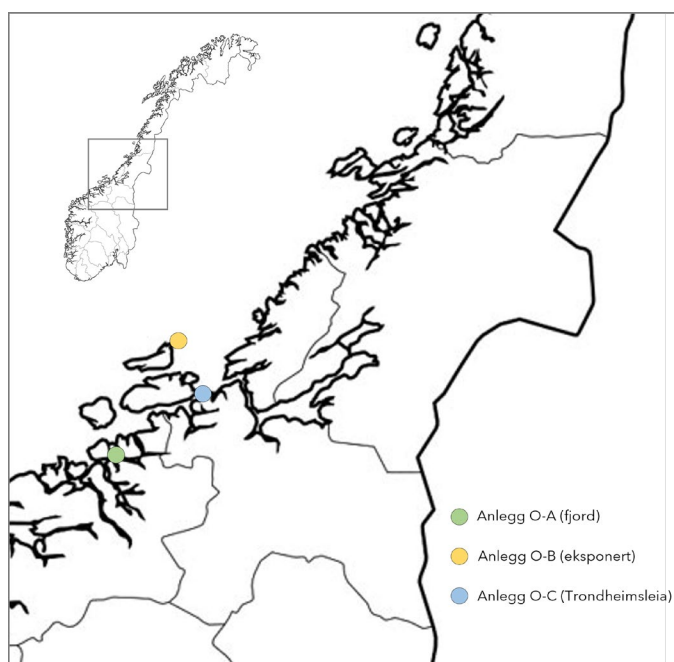
2 Materialer og metoder

2.1 Forsøksdesign og prøvetakingspunkter

Ved prosjektets oppstart ble det utført en innledende fareanalyse (Kap. 3.1) for å peke på kritiske punkt i verdikjeden hvor kontaminering av *L. monocytogenes* fra miljø til fisk, og videre til ferdig prosessert produkt kan oppstå (Hannisdal et al., 2020; Lerfall et al., 2020). Grunnlaget for fareanalysen var et felles arbeidsmøte med inviterte aktører som representerte hele verdikjeden (fôrprodusenter, brønnbåtrederi og lakseprodusent), litteraturstudier, samt befaringer av flere ledd i verdikjeden: oppdrettsanlegg, brønnbåt og slakteri. Prosjektets omfang ble avgrenset til verdikjeden for produksjon av laks gjennom distribusjonsveier for fôr, produksjon av laks i sjøanlegg, brønnbåttransport av slakteklar fisk, og i primærprosesseringsanlegg til ferdig sløyd fisk pakket i emballasje for transport og eksport eller til ferdig emballert *pre-rigor* prosessert filet (Figur 1).



Figur 1: Hovedprosesser i verdikjeden for produksjon av atlantisk laks som ligger til grunn for valg av prøvetakingspunkter.



Figur 2: Beliggenhet for de tre produksjonsanleggene for laks i prosjektet. Fra hver av disse lokalitetene ble det prøvetatt laks fra 3 merder.

Tre produksjonsanlegg for laks i Midt-Norge ble valgt ut på bakgrunn av ulik beliggenhet langs kysten. De tre anleggene representerer antatt ulik eksponering for menneskelig aktivitet i og rundt sjøen, samt vær- og strømforhold (uten at dette ble undersøkt nærmere). De tre anleggenes plassering er vist i Figur 2, og inkluderer ett anlegg lokalisert inne i en fjord (O-A, antatt minst eksponert), ett i Trondheimsleia (O-C, middels eksponert) og ett ved ytre del av kysten (O-B, mest eksponert). En detaljert prøvetakingsplan ble utarbeidet i prosjektets startfase (AP2) på bakgrunn av kunnskap opparbeidet gjennom fareanalysen, i dialog med aktørene i verdikjeden, og befaringer ved anleggene (Hannisdal et al., 2020; Lerfall et al., 2020). I perioden august 2020 til juni 2021 ble det tatt ut prøver fra tre ulike produksjonsanlegg for fôr, fem ulike

fôrbåter, tre ulike produksjonsanlegg for laks (tre merder fra hvert anlegg) og fire brønnbåter. På grunn av restriksjoner knyttet til COVID-19 ble prøvedesignet noe amputert, samt at ansatte ved de ulike anleggene måtte utføre selve prøvetakingen. Det ble derimot utarbeidet detaljerte protokoller for prøvetaking, samt at alle involverte gjennomgikk en digital opplæring på hvordan prøvetakingen skulle utføres, og på prosedyrer for innsending av prøvene. De største avvikene i forhold til planlagt prøveplan ble i antall prøver var for oppdrettsanlegg O-B og O-C, samt i verdikjede fôr, der antall gjentak ble noe lavere enn opprinnelig planlagt.

Det ble i prosjektperioden analysert 339 prøver fra verdikjede fôr (Vedlegg 1). Fôrprøvene i fabrikk ble tatt rett etter produksjon (**F-A** og **F-B**) og ved lasting til fôrbåt (**F-A**, **F-B** og **F-C**), i fôrbåt og på topp og bunn av fôrflåten silo. I tillegg ble det gjennomført prøvetaking av fôringsslanger ved alle sjøanleggene.

Det ble i prosjektet analysert 1022 prøver fra sjøfase (Figur 2, Vedlegg 2). De fleste prøvene som ble tatt i sjøfasen var fra overflaten av levende fisk (459 prøver) og ved rutinemessig oppsamling av død fisk (416 prøver) der én prøve representerer ett individ. Det ble tatt totalt 147 prøver i forbindelse med transport av levende, slakteklar fisk til prosessanlegget.

Det ble i prosjektet analysert 366 prøver fra prosessanlegget, prøvene ble tatt da fisk som var fulgt i sjøfasen og under transport fra de spesifikke anleggene ble slaktet. De fleste prøvene ble tatt fra fisk etter sløyning (170 prøver) og etter at de var ferdig pakket på is i EPS bokser (110 prøver). Det ble også tatt miljøprøver fra sluk under utblødningstank (26 prøver) og av sløyemaskin (30 prøver) (Vedlegg 3). For å sikre flere prøvepunkt fra prosessanlegget ble 115 *Listeria*-isolater fra filetavdelingen (opparbeidet som del av et parallelt pågående masterprosjekt) og 76 isolater fra bedriftens egen kvalitetskontroll inkludert i studien.

2.2 Opparbeidelse, påvisning av *Listeria* og verifisering av PCR positive prøver

En detaljert beskrivelse av prosedyrer for opparbeidelse, påvisning og verifisering av positive prøver er beskrevet i Hoel et al. (2021). Kort oppsummert ble det først utført en preanrikning av prøvene i 24 Listeria Enrichment Broth (LEB) (Oxoid) tilsatt 24 LEB Selective Supplement (Oxoid) ved 37°C i 24 ± 2 timer. *Listeria* spp. og *L. monocytogenes* ble deretter påvist kvalitativt ved real-time PCR ved å bruke SureTect Listeria species PCR Assay (Thermo Fisher Scientific) som kontroll. Ved positiv PCR for *Listeria* spp. og/eller *L. monocytogenes* ble 10 µL fra den primære oppformeringsvæsken strøket ut på Brilliance Listeria Agar (BLA) (Oxoid) og inkubert ved 37°C i 24 ± 2 timer. Tre til fem presumptive *Listeria* spp. eller *L. monocytogenes* kolonier ble plukket fra hver positiv prøve, rendyrket og kryopreservert ved -80°C for videre analyser.

2.3 Bakterieisolater utvalgt for genetisk karakterisering

Ved bruk av plateutstryk på selektiv agar ble prøvene fra AP3, 4 og 5 foreløpig identifisert til 155 isolater av presumptive *L. monocytogenes* og 120 isolater av mulige andre *Listeria* spp. I tillegg ble 115 *Listeria*-isolater fra filetavdelinge og 76 isolater fra bedriftens egen kvalitetskontroll inkludert i studien. Det gir totalt 466 isolater der opp til 5 er tatt fra samme prøve avhengig av vekst. Det ble i tillegg plukket kolonier fra positive prøver som etter hvert viste seg ikke å være *Listeria* spp. eller *L. monocytogenes*. Hver flow-celle kan analysere opp til 192 forskjellige prøver samtidig. Det ble derfor sendt ekstra prøver for å utnytte kapasiteten slik at det totale antallet prøver til ON-rep-seq ble 494.

2.4 Pre-screening av bakterieisolater

En innledende klassifisering / identifisering av isolatene (AP6) ble utført med ON-rep-seq analyse av totalt 494 prøver/isolater. Metoden baserer seg på klassisk rep-PCR kombinert med NGS-sekvensering av de oppnådde PCR-fragmentene. Disse sekvensene kan benyttes til taksonomisk klassifisering av prøven. Metoden kan også differensiere på stammenivå (Thomassen et al., 2021). Sekvenseringsmetoden er basert på Oxford Nanopore-teknologi (ONT) (Krych et al., 2019), og i dette prosjektet er det KU som har analysert prøvene. ON-rep-seq ble utført med to PCR-reaksjoner; en rep-PCR der produktet er templat for påfølgende barkodings-PCR. Her settes ONT-kompatible adaptore inn i en to-trinns PCR. Etter rep-PCR reaksjon nummer to, blir PCR produktet rensert og kvantifisert før sekvensering i en R9.4.1 flow celle (Krych et al., 2019; Thomassen et al., 2021). Kvalitet og metode for DNA-isolering er spesielt kritisk når nedstrømsanalysemetoder er ON-teknologi. Det viktigste er å få DNA med høy molekylvekt (HMW DNA) som er utgangspunktet for ON-sekvenseringen. Derfor ble derfor valgt et kit som kombinerer filtrering og tyngdekraft, noe som sikrer integritet av DNA. DNA isoleringen ble utført med Genomic Micro AX Bacteria+ Gravity-kit (102–100 M, A&A Biotechnology) i henhold til produsentens anbefalinger. Kvaliteten på DNA ble analysert på agarosegel og konsentrasjon ble bestemt spektrofotometrisk med BioTek PowerWave XS, Take3 plate.

2.5 Typing av *L. monocytogenes* med helgenomsekvensering (Whole Genome Sequencing; WGS)

ON-rep-seq ble brukt som en innledende screening av isolatene. Alle prøver ble sekvensert, også parallell og duplikat. Basert på resultatene fra denne pre-screeningen ble unike isolater fra ulike uttak og prøvepunkter i verdikjeden valgt ut for helgenomsekvensering (Tabell 1). Det ble isolert nytt DNA med samme metode som tidligere nevnt med følgende modifikasjon; proteinase K ble inkubert sammen med prøven i 30 min.

Tabell 1: Oversikt over prøvepunkt og antall isolater som ble analysert med helgenomsekvensering (WGS)

Prøvepunkt	Antall isolater sekvensert med WGS
Fôr	11
Miljøprøver fôr og fôrslanger	15
Levende fisk (produksjonsanlegg)	6
Selvdød fisk (produksjonsanlegg)	7
Slakteriavdeling (egne prøver)	2
Slakteriavdeling (bedriftens egne kontrollrutiner)	5
Filetavdeling	10

Helgenomsekvenseringen av 56 unike isolater ble utført med protokollen til Rapid Barcoding Sequencing Kit (SQK-RBK004) (Oxford Nanopore technology, ONT). Kitet lager sekvenseringsbibliotek fra genomisk DNA i en to-trinns protokoll der en transposase kutter DNA og fester adaptere til endene. I neste trinn festes sekvenseringsadaptere til de merkede adapterendene. Dersom det er lange fragmenter i det DNA som skal sekvenseres vil det bli produsert lange lesbare fragmenter. Ferdig preparert DNA ble lastet i en SpotON Flow Celle og videre analysert i en MinION Mk1B.

I de innledende analyser av helgenomsekvensene ble det benyttet web-verktøy utviklet ved Center for Genomic Epidemiology (CGE, 2022). Multi locus sequence types MLST 2.0.4 (Larsen et al., 2012), ble brukt for å bestemme sekvenstype basert på 7 konvensjonelle MLST loci. For å vise sammenhengen mellom utvalgte representanter av isolatene ble det konstruert et fylogenetisk tre basert på SNP (single nukleotide polymorphism; enkeltbase-polymorfier) ved å bruke web-verktøyet CSI Phylogeny 1.4 (Kaas et al., 2014). To referansegenomer ble inkludert i treet. For bedre visualisering ble resultatfilen i newick-format lastet opp i iTol (Letunic & Bork, 2019).

3 Resultater og diskusjon

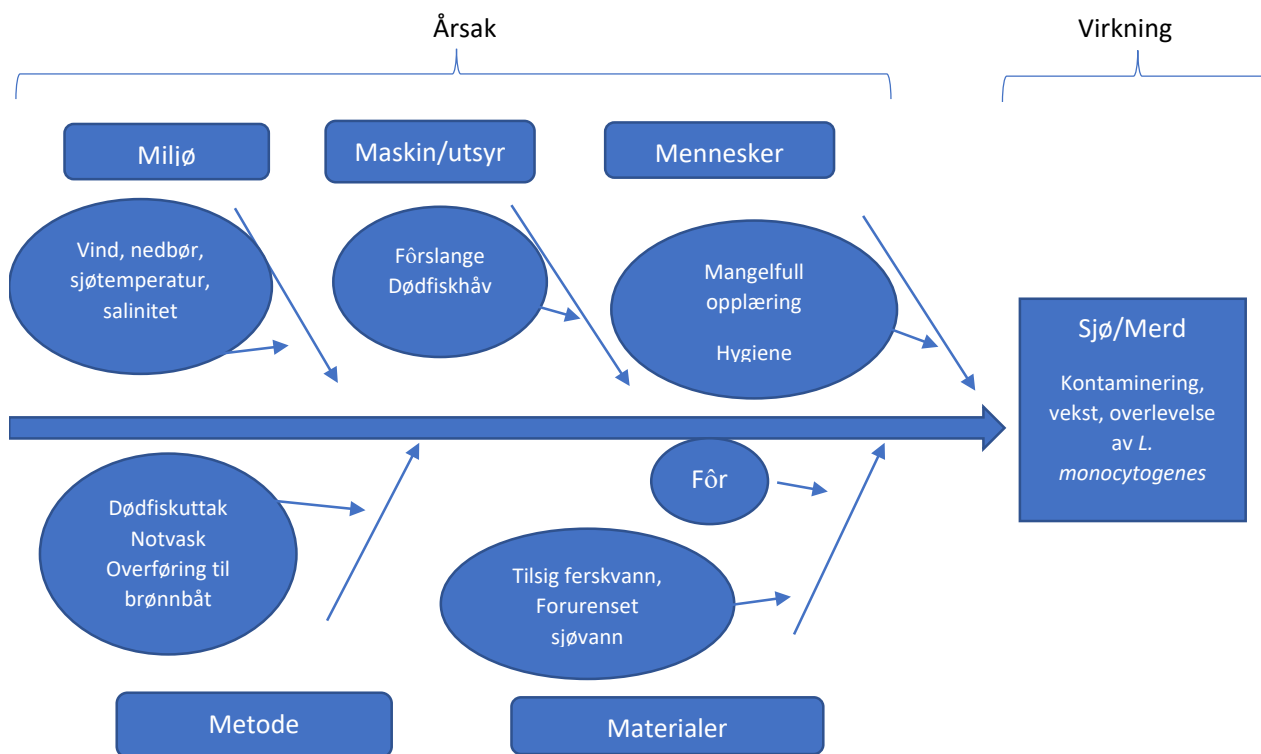
Prosjektets resultater presenteres og diskuteres fortløpende med bakgrunn i prosjektets arbeidspakkestruktur. Først presenteres prosjektet innledende *fareanalyse* (AP2), etterfulgt av resultater fra de ulike leddene i verdikjeden; *fôr* (AP3), *sjø og brønnbåt* (AP4), og *slakteri og produkt* (AP5). Resultat og diskusjonskapittelet avsluttes deretter med å presentere sekvenseringsresultatene som bygger grunnlaget for sporingsanalysene (AP6).

3.1 Fareanalyse

Analyseobjektet (verdikjeden) ble delt i seks ulike hovedprosesser som hver for seg ble vurdert til å innebære stor risiko for kontaminering av *Listeria* til prosessmiljø og produkt (Hannisdal et al., 2020; Lerfall et al., 2020). Prosessene som ble vurdert var fôrfabrikk, fôrbåt, fôrflåte, produksjon (sjø/merd), brønnbåt, og slakteri/pakking av hel fisk.

Som et ledd i fareanalysene ble alle årsaker og påfølgende konsekvenser identifisert for hvert enkelt trinn/prosess i verdikjeden. Et eksempel på en slik analyse er vist i Figur 3, der potensielle kontamineringsveier for *Listeria* ved et sjøanlegg er beskrevet. Dette arbeidet var en del av AP2 i prosjektet og fullt ut beskrevet i (Hannisdal et al., 2020). Fareanalysen ble benyttet til å utarbeide en prøvetakingsplan vist i detalj i Lerfall et al. (2020). På grunn av de ulike trinnenenes kompleksitet med hensyn til potensielle kontamineringsveier, ble det besluttet å innhente prøver før og etter hvert prosessstrinn samt supplere med ekstra prøver ved behov.

Sannsynligheten for kontaminasjon, overlevelse og eller vekst av *L. monocytogenes* i analyseobjektet ble vurdert til å være stor gjennom hele verdikjeden. Det vil med stor sannsynlighet også kunne medføre en kontaminering av *Listeria* til foredlingsanlegg og videre tilsluttprodukt med påfølgende store konsekvenser for virksomhet, kunder og forbrukere.



Figur 3. Fiskebeinsdiagram som viser mulige årsaker/årsakssammenhenger til den uønskede hendelsen «Kontaminering og/eller vekst/overlevelse av *L. monocytogenes*» i prosessstrinn Sjø/Merd.

3.2 Forekomst av *Listeria* i verdikjede fôr

Det ble tatt prøver av fôr (n=197) og produksjonsmiljø (n=142) igjennom verdikjede fôr fra tre norske fôrprodusenter (**F-A**, **F-B** og **F-C**), via fôrbåter til fôrflåtene hos de involverte produksjonsanleggene av laks (**O-A**, **O-B** og **O-C**). Resultatene finnes i sin helhet i delrapporten som omhandler funn i AP3 og AP4 (Hoel et al., 2021).

Det ble påvist *Listeria*-arter og *L. monocytogenes* i henholdsvis 18 og 8 % av prøvene (Tabell 2). Forekomst av *L. monocytogenes* varierte mellom de tre fôrfabrikkene. Hos produsent **F-A** ble ikke *L. monocytogenes* påvist i fôr, kun i miljøprøver. Også hos produsent **F-B** var påvisningsfrekvensen for *L. monocytogenes* lavere i fôr (3 %) enn i miljøprøver (8 %). Fôr og miljøprøver fra produsent **F-C** hadde vesentlig høyere forekomst av *L. monocytogenes*, henholdsvis 13 % og 25 %. Spesielt var det prøver fra lastetut som viste høy påvisningsfrekvens av *L. monocytogenes*. I fôrprøver fra de ulike fôrflåtene varierte forekomsten av *L. monocytogenes* fra ikke påvist til 10 %, mens prøvetakingen fra fôringsslangene viste en variasjon fra ikke påvist til 33 %.

Resultatene fra verdikjede fôr indikerer høyere forekomst av *L. monocytogenes* i miljøprøver enn i fôrprøver, mens det ikke ble funnet noen sammenheng mellom påvisningsfrekvens i fôrfabrikk og

på fôrflåte. Tallmaterialet er begrenset og bør tolkes med varsomhet, men funnene kan tyde på at fôringslangene er et område som bør undersøkes ytterligere.

Laksefôret gjennomgår en kraftig varmebehandling i produksjonsleddet og det var som forventet lav påvisningsgrad av *L.monocytogenes* rett etter produksjon. Resultatene viser imidlertid at det skjer en betydelig kontaminering av fôret igjennom distribusjonskjeden.

Tabell 2: Forekomst av *Listeria* spp. og *Listeria monocytogenes* i fôrprøver i verdikjede fôr

Produsent	Prøvepunkter	Antall prøver	<i>Listeria</i> spp. (%)	<i>L. monocytogenes</i> (%)
F-A	Miljøprøver	54	2	4
	Fôrprøver fabrikk	48	0	0
	Fôrprøver fra fôrflåte O-C	20	20	10
	Svamp fôrslange forflåte O-C	3	33	33
F-B	Miljøprøver	36	25	8
	Fôrprøver fabrikk	30	17	3
	Fôrprøver fra fôrflåte O-B	29	7	7
	Fôrprøver fra fôrflåte O-C	10	10	0
	Fôrprøver fôrflåte O-A	10	0	0
	Svamp fôrslange fôrflåte O-C	3	0	0
	Svamp fôrslange fôrflåte O-B	7	14	14
	Svamp fôrslange fôrflåte O-A	3	33	0
F-C	Miljøprøver	36	42	25
	Fôrprøver fabrikk	15	33	13
	Fôrprøver fôrflåte O-A	35	49	9
Totalt		339	18	8

3.3 Forekomst av *Listeria* i verdikjede sjø

Det ble tatt prøver av levende (n= 459) og død (n= 416) fisk i sjøfasen hos tre ulike oppdrettsanlegg i Midt-Norge (**O-A**, **O-B**, **O-C**) samt prøver fra fire ulike brønnbåter i forbindelse med tømning av merder fra anleggene (n=147). Resultatene er presentert i sin helhet i tidligere omtalte delrapport (Hoel et al., 2021).

Av 875 prøver tatt av levende og død fisk ble det påvist *Listeria* spp. og *L. monocytogenes* i hhv. 7 og 1 % av prøvene (Tabell 3). Forekomsten av *Listeria* spp. i død og levende fisk var høyere i anlegg **O-C** (14 %) sammenlignet med anlegg **O-A** (4 %) og anlegg **O-B** (ikke påvist). *L. monocytogenes* ble kun påvist i anlegg **O-C**, i 5 % av prøvetatt fisk. Prøvene ble tatt over en periode på nesten ett år, men på grunn av den generelt lave påvisningsgraden var det ikke mulig å konkludere med forskjeller i forekomst av *Listeria* i død og levende fisk eller sesongvariasjon.

Tabell 3: Forekomst (% andel positive prøver) av *Listeria* spp. og *Listeria monocytogenes* i prøver fra overflaten av levende fisk og fra overflate og gjeller hos død fisk i tre ulike oppdrettsanlegg for atlantisk laks

Anlegg	Beliggenhet	Prøvepunkt	Antall prøver	<i>Listeria</i> spp. (%)	<i>L. monocytogenes</i> (%)
O-A	Fjord	Levende fisk	180	6	0
		Død fisk	180	2	0
		Totalt anlegg O-A	360	4	0
O-B	Eksponert	Levende fisk	159	0	0
		Død fisk	116	0	0
		Totalt anlegg O-B	275	0	0
O-C	Trondheimsleia	Levende fisk	120	14	3
		Død fisk	120	14	6
		Totalt anlegg O-C	240	14	5
Totalt			875	7	1

Miljø- og vannprøver fra totalt fire brønnbåter viste lav forekomst av *Listeria* også i denne delen av verdikjeden og ingen *L. monocytogenes* ble påvist i brønnbåter. Det ble påvist *Listeria* arter i totalt 5 % av prøvene fra organisk materiale i vannskorpen i brønnbåttank og i 6 % av prøver tatt fra vann i brønnbåttank. Majoriteten av de positive prøvene (80 %) kom fra én båt, noe som kan indikere at brønnbåt kan fungere som et reservoar og potensielt kontamineringspunkt for *Listeria* dersom bakteriestammer etablerer seg i båtens miljø. Risikobasert prøvetaking, overvåkning, og rengjøring kan være viktige tiltak for å hindre etablering eller oppkonsentrering av *L. monocytogenes* i brønnbåter, noe som igjen kan medføre økt risiko for overføring av bakterien til primærprosesseringsanlegget.

I et tilsvarende Norsk kartleggingsstudie av *L. monocytogenes* i verdikjeden til laks ble det konkludert med at brønnbåttransport kan ha en betydning for spredning av *Listeria* fra sjøfase og inn i slakteri- og prosesseringslokaler for laks (Haldorsen, 2019). Selv om denne hypotesen ikke kunne bekreftes i det nåværende prosjektet, kan det ikke utelukkes at brønnbåtene utgjør en potensiell smittekilde for *Listeria* inn til slakteri. Påvisningsfrekvensen for *Listeria* på levende og død fisk var også markant lavere i det nåværende prosjektet, noe som kan ha betydning for funnene i brønnbåt.

3.4 Forekomst av *Listeria* i prosesseringsanlegg

Slakteklar laks fra de ulike oppdrettsanleggene (O-A, O-B og O-C) ble transportert til slakteriet i brønnbåt. Det ble totalt tatt ut 366 prøver fra slakteri og pakking av hel fisk i kasse i perioden. Forekomst av både *Listeria* spp. og *L. monocytogenes* var veldig lav i slakteriet (Tabell 4A). Det var kun klutprøver av hel fisk som ga positive prøver med *Listeria* spp. eller *L. monocytogenes*, eller begge. For å øke sannsynligheten for positive prøver ble filetavdelingen derfor inkludert i prosjektet før prøvetakingsperioden var ferdig. Prøvepunktene ble valgt på bakgrunn av erfaringer fra prøvetaking i en tidligere studie (Thomassen et al., 2022) og i samråd med kvalitetskoordinator ved fabrikken. Det hadde tidligere vært utfordringer i forbindelse med kvalitetsscanner og Infeed filetmaskin slik at disse punktene ble inkludert i prøvetakingen. *Listeria* spp. ble påvist ved alle prøvepunkter i filetavdelingen (Tabell 4B), og *L. monocytogenes* ble påvist i nevnte kvalitetsscanner og Infeed filetmaskin, i klutprøver på filetens kjøttside og i sluk under filetmaskin. Dette viser at *L.*

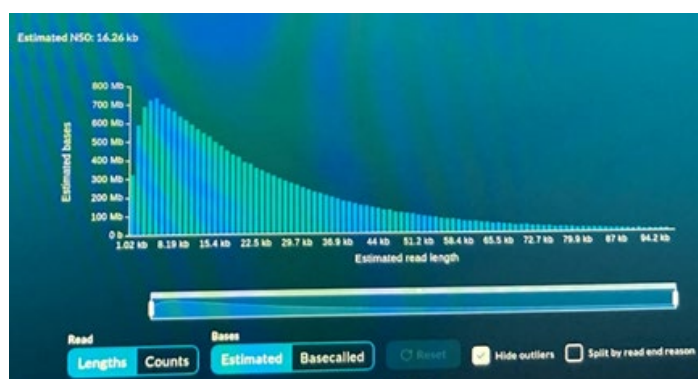
monocytogenes er tilstede i produksjonsmiljøet og på råvare som er klar for utkjøring til forbruker. I et overvåkningsprogram på oppdrag av Mattilsynet ble det konkludert med at *L. monocytogenes* er tilstede både i produksjonsmiljøet og i råvare, men at råvare inneholdt lave verdier (< 10 CFU/g) (Svanevik et al., 2021). I sistnevnte studie ble det analysert for *L. monocytogenes* i 60 ulike slakteribedrifter og bakterien ble påvist med en frekvens på totalt 9,2% i produksjonsmiljøene, altså noe høyere enn det som ble funnet i dette prosjektet. En annen studie der prøvetakingen ble utført etter vask, påviste veldig lite *Listeria* spp. i produksjonsmiljøet (Thomassen et al., 2022).

Tabell 4: Forekomst (% antall positive prøver) av *Listeria* spp. og *L. monocytogenes* fra ulike prøvepunkt i slakteriet (A) og i filetavdeling (B)

A Prøver fra slakteri				
Anlegg	Prøvepunkt	Antall prøver	<i>Listeria</i> spp. (%)	<i>L. monocytogenes</i> (%)
O-A	Hel fisk bløgget	80	4	1
	Sluk u. helix	8	0	0
	Sløyemaskin	12	0	0
	Hel fisk i kasse	70	0	0
O-B	Hel fisk bløgget	60	0	0
	Sluk u. helix	9	0	0
	Sløyemaskin	9	0	0
	Hel fisk i kasse	40	0	3
O-C	Hel fisk bløgget	30	3	0
	Sluk u. helix	9	0	0
	Sløyemaskin	9	0	0
	Hel fisk i kass	30	0	0
B Prøver fra filetavdeling				
Anlegg	Prøvepunkt	Antall prøver	<i>Listeria</i> spp. (%)	<i>L. monocytogenes</i> (%)
O-A	Filet kjøttside	17	35	6
	Filet skinnside	17	29	0
	Sluk under filetmaskin	13	61	8
	Hodekappemaskin	15	7	0
	Infeed filetmaskin	15	67	33
	Kvalitetsskanner	15	53	27

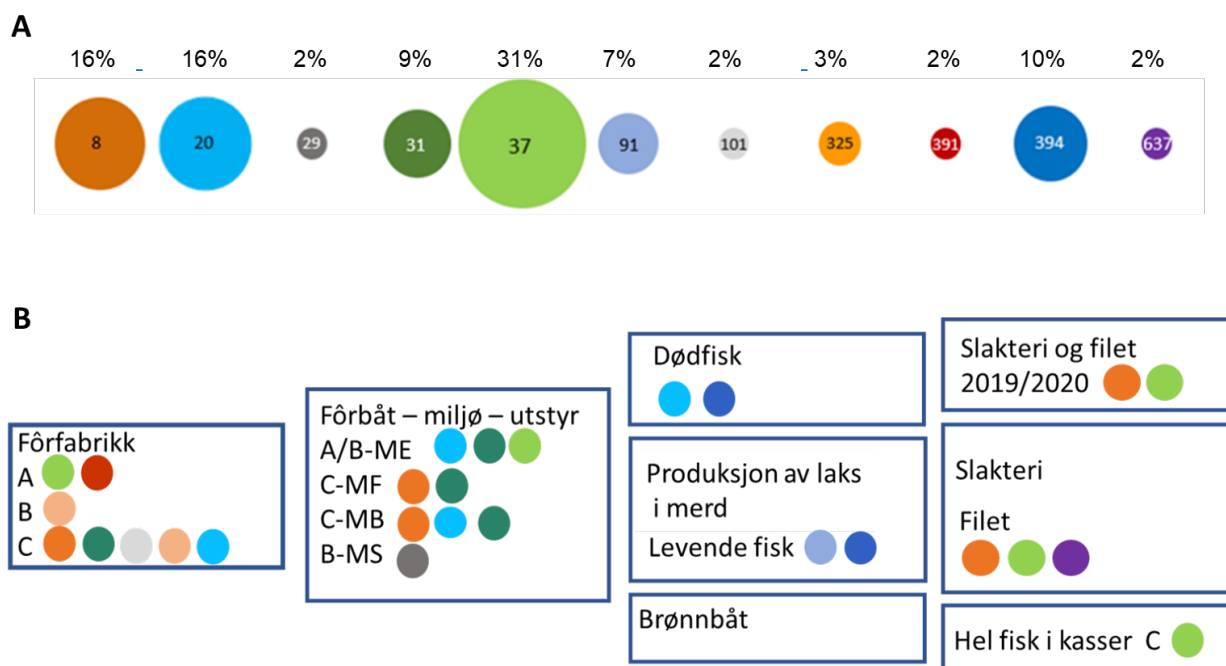
3.5 Sporing av *Listeria* i verdikjeden for Atlantisk laks

Resultatene fra ON rep-seq viser at 161 (33%) av de innsendte prøvene ble klassifisert som *L. monocytogenes*. De resterende prøvene (antatt ikke *L. monocytogenes*) ble klassifisert som *L. innocua* (56%) og *L. seeligeri* (3%). Basert på disse resultatene ble 56 unike isolater valgt til helgenomsekvensering fra ulike uttak og prøvepunkter. Fordeling av oppnådde leselengder ved sekvensering av flowcelle (05) er vist i Figur 4.



Figur 4: Minlon histogram over fordeling av leselengder i helgenomsekvensering (05) fra *L. monocytogenes* med ONT.

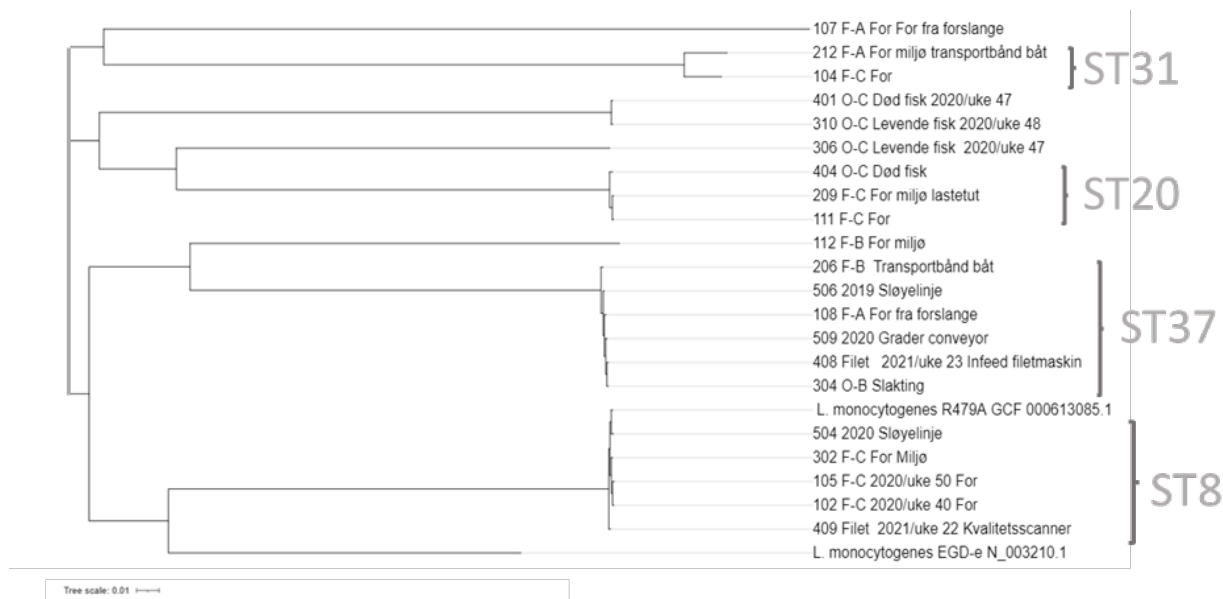
Det kunne identifiseres 11 ulike MLST varianter blant de 56 helgenomsekvensene. De mest dominerende var ST37 (31%), ST8 og 20 (begge 16%) og ST394 (10%) (Figur 5A) mens ST29, 101, 391 og 637 bare forekom i enkeltisolater.



Figur 5 A: Forekomst av MLST varianter i helgenomsekvenser i unike isolater av *L. monocytogenes* fra verdikjeden. Hver variant har sin respektive farge og sirklenes størrelse representerer en prosentvis forekomst. **B:** Fordeling av MLST varianter påvist i de ulike delene av verdikjeden.

ST8 er en MLST-variant som ofte rapporteres i forbindelse med utbrudd av listeriose (Fagerlund et al., 2016). ST8 varianter inneholder de fleste viktige virulensgener som identifiseres i *L. monocytogenes*. MLST varianten er tidligere påvist både i sløyemaskin, fileteringsutstyr, i filet fra lakseprosessering og i kliniske isolater (Løvdal et al., 2021; Thomassen et al., 2021). *L. monocytogenes* ST37 er funnet i matprodukter og produksjonsmiljø fra både kjøtt, melk og grønnsaksbedrifter (Stessl et al., 2020; Tomášťíková & Karpíšková, 2020). Den er sannsynligvis ikke like persistent som ST8 (Muhterem-Uyar et al., 2018).

Den største variasjonen av sekvenstyper ble i dette prosjektet påvist i fôrfabrikk og i miljø og utstyr før fôret kom til merd (Figur 5B). Sekvenstypene med størst forekomst, ST8 og ST37 ble identifisert i isolatene fra dette miljøet. Disse sekvenstypene som ble funnet i produksjonsmiljøet (filetavdeling og hel fisk pakket i kasser). Dette kan tyde på at *L. monocytogenes* kan overføres fra fôr og fôrmiljø inn til fabrikk og at disse sekvenstypene kan overleve med økt stress i et produksjonsmiljø.



Figur 6: Fylogenetisk tre konstruert med 21 helgenomsekvenser fra utvalgte representanter (alle MLST typer) og to referanseisolater basert på SNP (enkeltbasepolymorfi). Isolatene fra *L. monocytogenes* grupperte seg i henhold til MLST sekvenstype. Referansen *L. monocytogenes* R479a (ST8) grupperte seg sammen andre isolater med samme sekvenstype. De fire største gruppene er markert på figuren.

Isolater med samme MLST sekvenstype fra ulike prøveuttak og ulike prøvepunkt grupperte seg sammen, og stor likhet innen gruppene ble observert (Figur 6). Videre analyser av sekvensene vil avdekke om det er en eller flere kilder til kontamineringen. MLST differensierer isolatene bedre enn serotyping, men dårligere enn andre differensieringsanalyser som PFGE (puls-felt-gel-elektroforese) og cgMLST (kjernegenomanalyser) (Halbedel et al., 2018). Videre analyser av helgenomsekvensene vil være nødvendig for økt differensiering mellom isolatene som eksempelvis cgMLST som baserer seg på rundt 1700 loci (Ruppitsch et al., 2015).

4 Konklusjon

Prøvetakingen i prosjektet har identifisert fôret, og transport og fordeling av fôr som den delen av verdikjeden med hyppigst påvisning av *Listeria* sp. og *L. monocytogenes*. Verdikjeden for fôr skiller seg også ut med en betydelig større variasjon i MLST-varianter (8 varianter) sammenlignet med det som ble observert i sjøfasen (3 varianter) og i prosessanlegget (3 varianter). Det ble påvist en link mellom verdikjeden for fôr og prosesseringsanlegget, der MLST variantene ST8 og ST37 var felles. Generelt ble det påvist få positive prøver med *L. monocytogenes* i sjø og sekvensvariantene som ble påvist ble ikke gjenfunnet i prosessanlegget eller i filetavdelingen. To av variantene som ble identifisert fra fisk i sjøfasen (ST91 og 394) ble ikke observert i andre deler av verdikjeden.

Basert på funnene i prosjektet kan vi konkludere med at MLST variantene som dominerer i lakseslakteriet også eksisterer i fôret og verdikjeden for fôr. Smitteveien er derimot ukjent idet prosjektet ikke klarte å identifisere disse variantene hverken på levende eller selvdød fisk i sjø, eller i prøver fra brønnbåt. Med et større antall prøver fra sjø og brønnbåt, samt prøvetaking fra laksetarm ville vi trolig fått bedre kunnskap om en eventuell smittevei fra fôr til slakteri og videre til ferdig produkt.

5 Videre arbeid og anbefalinger

Prosjektet har identifisert fôr som en mulig kontamineringskilde for sekvensvarianter av *L. monocytogenes* som ble påvist i filetavdeling, og på produkt. En eventuell smittevei fra fôret/verdikjeden til fôr er derimot ikke bekreftet. For å kunne bekrefte disse funnene bør prøvetaking intensiveres i brønnbåt, og ikke minst i sjøfasen, der prøver fra fiskens tarm og innvoller også må inkluderes. En hypotese som peker seg ut, er at *Listeria* kan befestes seg i fiskens tarm/innvoller og videre kontaminere overflater i prosessmiljøet og deretter ferdig produkt.

Det anbefales derfor å utrede fôrets betydning videre, samt etablere tiltak for hygienisk kontroll igjennom verdikjede fôr, inkludert transportbånd i fabrikk, fôrbåt, fôrsilo på fôringsflåten, og i slangene som fordeler fôr til de ulike merdene. Det anbefales videre å igangsette aktiviteter som kan øke kompetansenivået på hvordan *L. monocytogenes* potensielt overføres fra fôr til prosesseringsmiljø.

Referanser

- Commission Regulation (EC) No 2073/2005 of 15 November 2005 on microbiological criteria for foodstuffs, p. 1–26 (2005).
- Aspholm, M., & Rørvik, L. M. (2015). *Listeria monocytogenes*. In P. E. Granum (Ed.), *Matforgiftning : smitte gjennom mat og vann* (4. utg ed.). Cappelen Damm akademisk.
- CGE. (2022). *Center for Genomic Epidemiology [Online]*.
- ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control) and EFSA (European Food Safety Authority). (2019). Multi-country outbreak of *Listeria monocytogenes* clonal complex 8 infections linked to consumption of cold-smoked fish products. *EFSA supporting publication*(2019:EN-1665), 20 pp.
- EFSA (European Food Safety Authority). (2013). Analysis of the baseline survey on the prevalence of *Listeria monocytogenes* in certain ready-to-eat foods in the EU, 2010–2011 Part A: *Listeria monocytogenes* prevalence estimates. *Efsa Journal*, 11(6), 3241.
- EFSA (European Food Safety Authority) and ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control). (2018). Multi-country outbreak of *Listeria monocytogenes* sequence type 8 infections linked to consumption of salmon products. *EFSA supporting publication*(2018:EN-1496), 16 pp.
- EFSA BIOHAZ Panel. (2018). *Listeria monocytogenes* contamination of ready-to-eat foods and the risk for human health in the EU. *Efsa Journal*, 16(1).
- European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control (EFSA and ECDC). (2021). The European Union One Health 2020 Zoonoses Report. *Efsa Journal*, 19(12).
- Fagerlund, A., Langsrud, S., Schirmer, B. C. T., Møretrø, T., & Heir, E. (2016). Genome Analysis of *Listeria monocytogenes* Sequence Type 8 Strains Persisting in Salmon and Poultry Processing Environments and Comparison with Related Strains. *PLoS ONE*, 11(3), e0151117-e0151117.
- FAO. (2020). *GLOBEFISH Highlights January 2020 ISSUE, with Jan. – Sep. 2019 Statistics – A quarterly update on world seafood markets* (Globefish Highlights Issue no. 1).
- FHI. (2010, 17.04.19). *Listeriose - veileder for helsepersonell* Folkehelseinstituttet.
- Halbedel, S., Prager, R., Fuchs, S., Trost, E., Werner, G., Flieger, A., & Diekema, D. J. (2018). Whole-Genome Sequencing of Recent *Listeria monocytogenes* Isolates from Germany Reveals Population Structure and Disease Clusters. *Journal of Clinical Microbiology*, 56(6), e00119-00118.
- Haldorsen, R. N. (2019). *Kartlegging av forekomst av Listeria monocytogenes i sjø. Sluttrapport, FHF prosjekt nr. 901492*.
- Hannisdal, A., Jakobsen, A. N., Hoel, S., Mehli, L., & Lerfall, J. (2020). Fareanalyse fra fôr til bord. *Norsk Sjømat*, (3), 46-49.
- Heir, E., Holck, A. L., & Langsrud, S. (2015). *Nye verktøy for kontroll med Listeria i laks og lakseprodukter*. NOFIMA Rapport.
- Heir, E., & Langsrud, S. (2013). *Smitteveier og smittekilder for Listeria i produksjonskjeden for sløyd og røkt laks* NOFIMA Rapport.
- Heir, E., Moretro, T., Simensen, A., & Langsrud, S. (2018). *Listeria monocytogenes* strains show large variations in competitive growth in mixed culture biofilms and suspensions with bacteria from food processing environments. *International Journal of Food Microbiology*, 275, 46-55.

- Heir, E., Solberg, L. E., Carlehög, M., Moen, B., Jensen, M. R., & Holck, A. L. (2021). Improved control of *Listeria monocytogenes* during storage of raw salmon by treatment with the fermentate Verdad N6 and nisin. *International Journal of Food Microbiology*, 336, 108895.
- Hoel, S., Jakobsen, A. N., Mehli, L., & Lerfall, J. (2021). Kartlegging av *Listeria monocytogenes* i fôr og sjøfase ved produksjon av atlantisk laks (*Salmo salar*). NTNU Rapport.
- Hoel, S., Jakobsen, A. N., & Vadstein, O. (2017). Effects of storage temperature on bacterial growth rates and community structure in fresh retail sushi. *Journal of Applied Microbiology*, 123(3), 698-709.
- Hoel, S., Mehli, L., Bruheim, T., Vadstein, O., & Jakobsen, A. N. (2015). Assessment of Microbiological Quality of Retail Fresh Sushi from Selected Sources in Norway. *Journal of Food Protection*, 78(5), 977-982.
- Hoel, S., Nordeng, A. N., Mehli, L., & Lerfall, J. (2021). Kartlegging av *Listeria monocytogenes* i fôr og sjøfase ved produksjon av atlantisk laks (*Salmo salar*). NTNU Rapport.
- Jordan, K., Hunt, K., Lourenco, A., & Pennone, V. (2018). *Listeria monocytogenes* in the Food Processing Environment. *Current Clinical Microbiology Reports*, 5(2), 106-119.
- Krych, L., Castro-Mejia, J. L., Forero-Junco, L. M., Moesby, D. N., Mikkelsen, M. B., Rasmussen, M. A., Sykalski, M., & Nielsen, D. S. (2019). DNA enrichment and tagmentation method for species-level identification and strain-level differentiation using ON-rep-seq. *Communications Biology*, 2, 369.
- Kaas, R. S., Leekitcharoenphon, P., Aarestrup, F. M., & Lund, O. (2014). Solving the problem of comparing whole bacterial genomes across different sequencing platforms. *PLoS ONE*, 9(8), e104984.
- Larsen, M. V., Cosentino, S., Rasmussen, S., Friis, C., Hasman, H., Marvig, R. L., Jelsbak, L., Sicheritz-Pontén, T., Ussery, D. W., Aarestrup, F. M., & Lund, O. (2012). Multilocus sequence typing of total-genome-sequenced bacteria. *J Clin Microbiol*, 50(4), 1355-1361.
- Lerfall, J., Hannisdal, A., Hoel, S., Jakobsen, A. N., Mehli, L., & Kjønvik, E. (2020). Fareanalyse for å finne mulige kontamineringspunkter og smitteveier for *L. monocytogenes* ved produksjon av atlantisk laks (*Salmo salar* L.). NTNU Rapport.
- Letunic, I., & Bork, P. (2019). Interactive Tree Of Life (iTOL) v4: recent updates and new developments. *Nucleic Acids Res*, 47(W1), W256-w259.
- Linke, K., Rückerl, I., Brugger, K., Karpiskova, R., Walland, J., Muri-Klinger, S., Tichy, A., Wagner, M., & Stessl, B. (2014). Reservoirs of listeria species in three environmental ecosystems. *Applied and Environmental Microbiology*, 80(18), 5583-5592.
- Lunestad, B. T., & Skjerdal, T. (2008). *Listeria i sushi - sluttrapport fra prosjekt gjennomført av Veterinærinstituttet (Oslo) og Nasjonalt institutt for ernærings- og sjømatforskning (Bergen)*.
- Lyngstad, T. M., Krosness MM, Valcarcel SB, Lange H, Nygård K, Jore S, Kapperud G, MacDonald E, Brandal LT, Feruglio SL, Grøneng GM, Blystad H, & L., V. (2019). Årsrapport 2018, Overvåkning av sykdommer som smitter fra mat, vann og dyr, inkludert vektorbårne sykdommer. Rapport 2018. Folkehelseinstituttet.
- Lüth, S., Boone, I., Kleta, S., & Al Dahouk, S. (2019). Analysis of RASFF notifications on food products contaminated with *Listeria monocytogenes* reveals options for improvement in the rapid alert system for food and feed. *Food Control*, 96, 479-487.
- Løvdal, T., Brandal, L. T., Sundaram, A. Y. M., Naseer, U., Roth, B., & Lunestad, B. T. (2021). Small-Scale Comparative Genomic Analysis of *Listeria monocytogenes* Isolated from Environments of Salmon Processing Plants and Human Cases in Norway. *Hygiene*, 1(1).
- Mattilsynet. (2021, 07.01.21). Tilsynskampanje 2021: Listeriatiltak i lakseslakteri. Mattilsynet.

- Miettinen, H., & Wirtanen, G. (2006). Ecology of *Listeria* spp. in a fish farm and molecular typing of *Listeria monocytogenes* from fish farming and processing companies. *International Journal of Food Microbiology*, 112(2), 138-146.
- Muhterem-Uyar, M., Ciolacu, L., Wagner, K.-H., Wagner, M., Schmitz-Esser, S., & Stessl, B. (2018). New Aspects on *Listeria monocytogenes* ST5-ECVI Predominance in a Heavily Contaminated Cheese Processing Environment [Original Research]. *Frontiers in Microbiology*, 9.
- Ruppitsch, W., Pietzka, A., Prior, K., Bletz, S., Fernandez, H. L., Allerberger, F., Harmsen, D., & Mellmann, A. (2015). Defining and Evaluating a Core Genome Multilocus Sequence Typing Scheme for Whole-Genome Sequence-Based Typing of *Listeria monocytogenes*. *Journal of Clinical Microbiology*, 53(9), 2869-2876.
- Skjerdal, T., Reitehaug, E., & Eckner, K. (2014). Development of performance objectives for *Listeria monocytogenes* contaminated salmon (*Salmo salar*) intended used as sushi and sashimi based on analyses of naturally contaminated samples. *International Journal of Food Microbiology*, 184, 8-13.
- Soon, J. M., Brazier, A. K. M., & Wallace, C. A. (2020). Determining common contributory factors in food safety incidents – A review of global outbreaks and recalls 2008–2018. *Trends in Food Science & Technology*, 97, 76-87.
- Stessl, B., Szakmary-Brändle, K., Vorberg, U., Schoder, D., & Wagner, M. (2020). Temporal analysis of the *Listeria monocytogenes* population structure in floor drains during reconstruction and expansion of a meat processing plant. *Int J Food Microbiol*, 314, 108360.
- Svanevik, C. S., Lunestad, B.-T., & Storesund, J. (2021). *Listeria monocytogenes* in salmonid slaughter facilities - Screening program for the Norwegian Food Safety Authority (Rapport fra havforskningen nr. 15600, Issue.
- Thomassen, G. M. B., Krych, L., Knøchel, S., & Mehli, L. (2021). ON-rep-seq as a rapid and cost-effective alternative to whole-genome sequencing for species-level identification and strain-level discrimination of *Listeria monocytogenes* contamination in a salmon processing plant. *MicrobiologyOpen*, 10(6), e1246.
- Thomassen, G. M. B., Krych, L., Knøchel, S., & Mehli, L. (2022). Bacterial community development and diversity during the first year of production in a new salmon processing plant. [Submitted manuscript]. .
- Tomášťíková, Z & Karpíšková, R. (2020). Population structure of *Listeria monocytogenes* isolated from human listeriosis cases and from ready-to-eat foods in the Czech Republic [2019]. *Journal of Food and Nutrition Research*, 58(2), 99-106.
- Wang, S., & Orsi, R. H. (2013). *Listeria*. In J. G. J. Morris & M. E. Potter (Eds.), *Foodborne Infections and Intoxications*. Elsevier Inc.
- Zaremba, S. (2018). *Listeria monocytogenes* in Norwegian fish farms from September to January [Master thesis, Universitetet i Stavanger].

Vedlegg

Vedlegg 1: Oversikt over prøvepunkt og prøveomfang fra produksjon, distribusjon og lagring av fôr, samt prøver fra fôr tatt i perioden august 2020 til juni 2021

Produsent	Prøve	Prøvepunkt	Antall prøveuttak	Antall prøver	Lokasjon
F-A	Miljø	Glidetrakt	6	18	Fôrfabrikk
		Transportbånd	6	18	Fôrfabrikk
		Transportbånd	6	18	Fôrbåt
	Fôr	Svamp gjennom føringsslange	1	3	Fôrflåte O-C
		Ferdigvaresikt	6	24	Fôrfabrikk
		Shuten	6	24	Fôrfabrikk
		Topp av silo	2	10	Fôrflåte O-C
		Bunn av silo	2	10	Fôrflåte O-C
F-B	Miljø	Transportbånd	6	18	Fôrfabrikk
		Transportbånd	6	18	Fôrbåt
		Svamp gjennom føringsslange	1	3	Fôrflåte O-C
		Svamp gjennom føringsslange	1	7	Fôrflåte O-B
		Svamp gjennom føringsslange	1	3	Fôrflåte O-A
	Fôr	Fôrstrøm lastetut	6*	30	Fôrfabrikk
		Fôrflåte silo -topp	4	19	Fôrflåte O-B
		Fôrflåte silo -bunn	2	10	Fôrflåte O-B
		Fôrflåte silo -topp	1	5	Fôrflåte O-A
		Fôrflåte silo -bunn	1	5	Fôrflåte O-A
		Fôrflåte silo -topp	5	5	Fôrflåte O-C
		Fôrflåte silo -bunn	5	5	Fôrflåte O-C
F-C	Miljø	Landsilo	4	11	Fôrfabrikk
		Lastetut	4	9	Fôrfabrikk
		Fôrsekk	3	5	Fôrfabrikk
		Båtsilo	1	3	Fôrbåt
		Lossetut	4	8	Fôrbåt
	Fôr	Forstrøm lastetut	3	15	Fôrfabrikk
		Fôrflåte silo -topp	4	20	Fôrflåte O-A
		Fôrflåte silo-bunn	4	15	Fôrflåte O-A
Totalt antall prøver fra fôr, fôrfabrikker og fôrflåter				339	

Vedlegg 2: Oversikt over prøvepunkt og prøveomfang fra sjøanlegg i perioden august 2020 til juni 2021

Anlegg	Prøve	Prøvepunkt	Antall prøveuttak	Antall prøver
O-A	Miljø	Kulerekke merd	2	10
		Levende fisk	6	180
	Fisk	Død fisk	6	180
		Brønnbåt 1	Slange, lasting av fisk	2
	Organisk materiale i tank		2	13
	Vann i tank		2	4
	Lusefilter		2	2
	Slangekobling til fabrikk		2	4
	Brønnbåt 2	Slange, lasting av fisk	1	3
		Organisk materiale i tank	1	5
		Vann i tank	1	2
		Lusefilter	1	1
	Brønnbåt 3	Slange, lasting av fisk	1	3
		Organisk materiale i tank	1	5
		Vann i tank	1	2
		Lusefilter	1	1
O-B	Fisk	Levende fisk	6	159
		Død fisk	5	116
	Brønnbåt 1	Slange, lasting av fisk	2	2
		Organisk materiale i tank	2	20
		Vann i tank	2	4
		Lusefilter	2	2
		Slangekobling til fabrikk	2	6
	Brønnbåt 4	Slange, lasting av fisk	1	3
		Organisk materiale i tank	1	5
		Vann i tank	1	2
		Lusefilter	1	1
		O-C	Fisk	Levende fisk
Død fisk	4			120
Brønnbåt 1	Slange, lasting av fisk		2	2
	Organisk materiale i tank		2	10
	Vann i tank		2	12
Brønnbåt 3	Slange, lasting av fisk		1	1
	Organisk materiale i tank		1	5
	Vann i tank		1	10
	Slangekobling til fabrikk		1	3
Totalt antall prøver fra sjøfasen og brønnbåt				1022

Vedlegg 3: Oversikt over prøvepunkt og prøveomfang fra prosessanlegg

Produsent	Prøve	Prøvepunkt	Antall prøveuttak	Antall prøver	Totalt
O-A	Miljø	Sluk under utblødningstank	4	2	8
		Bader sløyemaskin	4	3	12
	Fisk	Hel sløyet fisk (HOG)	4	20	80
		Ferdig pakket (på is)	4	10	40
O-B	Miljø	Sluk under utblødningstank	3	3	9
		Bader sløyemaskin	3	3	9
	Fisk	Hel sløyet fisk (HOG)	3	20	60
		Ferdig pakket (på is)	3	10	40
O-C	Miljø	Sluk under utblødningstank	3	3	9
		Bader sløyemaskin	3	3	9
	Fisk	Hel sløyet fisk (HOG)	3	10	30
		Ferdig pakket (på is)	3	10	30
Totalt antall prøver fra prosessanlegg					366

