

På jakt etter *Listeria* - med egnede metoder?

Av Even Heir, Therese Hagtvedt og Solveig Langsrud
Nofima AS, Ås

Det settes strenge krav til kontroll med *Listeria* i laksenæringen, ikke minst med hensyn til eksportkrav. For å tilfredsstille slike krav og bidra til økt kontroll og lavere forekomst av *Listeria* i næringen, er det behov for hurtigmetoder som næringen selv kan håndtere.

Listeria

- Bakterier av typen *Listeria monocytogenes* kan gi opphav til listeriose, en alvorlig infeksjon med opptil 30% dødelighet
- Personer med nedsatt immunforsvar og gravide er ekstra sårbare for *Listeria*
- Risikoprodukter er mat som ikke varmebehandles og hvor *Listeria* kan vokse i lagringstiden
- Flere land har null-toleranse for *Listeria* i importert laks
- Det er økt behov for å kunne dokumentere kontroll med *Listeria* i norsk lakseproduksjon
- 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)

Hvorfor er det behov for nye metoder for påvisning av *Listeria*?

Kontroll med bakterier av typen *Listeria* er en stor utfordring for mange matprodusenter. *Listeria* kan være tilstede på råvarene og overleve og etablere seg i ulike matproduksjonsmiljøer. Dermed kan *Listeria* overføres til produktene i produksjonsprosessen. Mat hvor *Listeria* kan vokse og som har lang holdbarhetstid og ikke varmes opp før den spises kan være risikoprodukter. Foredlede fiskeprodukter som røkt og gravet laks/ørret hører til denne kategorien i tillegg til en del kjøttprodukter og myke oster.

For matindustrien utgjør *Listeria* en reell trussel og en stor utfordring. Nytt hygieneregelverk setter krav til produsentenes egen vurdering og håndtering av risiko. I de nye mikrobiologiske kriteriene i Animalieforskriften settes det nå krav mht antall *L. monocytogenes* i enkelte produktgrupper. Dette gjelder produkter som er spiseklare og som ikke skal varmes opp, som for eksempel røkelaks. Antallet av denne bakterien skal ikke overstige 100 pr gram ved endt holdbarhet. Ved eksport til andre deler av verden kan man ha strengere krav via regelverk og kunder. Økte kundekrav har gitt laksenæringen større behov for å kunne gjennomføre egenkontroll og dokumentere kontroll med *Listeria* i hele produksjonskjeden. Håndterbare metoder for påvisning av *Listeria* i produksjonskjeden og som kan egne seg for bruk av og i næringen er derfor etterspurt. Eventuelt egnede metoder vil kunne gi mer effektiv overvåking, økt kunnskap om risiko i egen produksjon og bedre grunnlag for innføring av tiltak mot *Listeria*.

Egenkontroll og valg av metoder

For kvalitetsansvarlige i matindustrien kan det være vanskelig å velge i jungelen av tilgjengelige metoder for prøvetaking og påvisning av *Listeria*. Hvilke metoder er best

egnet for å dekke egne analysebehov? Laksenæringen legger ned mye ressurser i hygieniske tiltak for at produktene skal være trygge. I dette inngår også store ressurser til prøvetaking og analyser som inkluderer *L. monocytogenes*. Analysene utføres som regel ved eksterne laboratorier ved bruk av mikrobiologiske standardmetoder. Analysene gir pålitelige prøvesvar, men tar ofte for lang tid til at de kan anvendes av industrien på en effektiv måte. Produktene kan både være distribuert og spist før resultater foreligger. For å kunne sette inn tiltak for eksempel i forhold til råvareleverandører og hygiene, er det behov for raske, enkle og rimelige analysemetoder. Ideelt sett bør bedriftene selv bruke metodene. Det er også en fordel om analysene har et bredt bruksområde og kan anvendes til overvåking av *Listeria* i både råvarer, produkter, lokaler og utstyr. Egnede hurtigmetoder vil gi mer effektiv overvåking og bidra til å kunne forebygge potensielle *Listeria*-problemer i produksjonsanleggene. For laksenæringen bør metoder være enkle å håndtere og gi raske og pålitelige prøvesvar. Andre viktige faktorer er pris og at prøvene kan håndteres uten risiko for smitte. I mange tilfeller vil det være tilstrekkelig å få vite om bakterier av typen *Listeria* er tilstede eller ikke. I andre tilfeller er det nødvendig med spesifikk påvisning av *L. monocytogenes* eller kvantifisering av alle typer *Listeria* (*Listeria* spp.) i prøven.

Metoder på markedet

Det finnes mange metoder for påvisning av bakterier i mat. Mangfoldet er stort også med hensyn til såkalte hurtigmetoder for påvisning av *Listeria*. Markedsføringen av metodene kan gi inntrykk av at det her bare er å velge og vrake. Virkeligheten er dessverre annerledes, og det krever mye tid og høy fagkunnskap for å vurdere de forskjellige metodene opp mot hverandre. Den ideelle metoden for rask påvisning av *Listeria* i produkter, utstyr og miljø er vanskelig å finne. Selv ved bruk av metoder som utgir seg for å være hurtigmetoder, kan det ta flere dager før pålitelig prøvesvar foreligger. Selv om det finnes internasjonalt anerkjente sertifiseringsorganer og valideringssystemer for mikrobiologiske metoder, er ikke disse alltid i henhold til krav og behov til en spesifikk bransje. Det er vanskelig å gi en komplett oversikt over tilgjengelig metoder for påvisning og bestemmelse av *Listeria* spp. og *L. monocytogenes*. I tabellen under gis en generell oversikt over ulike typer metoder inkludert analyseprinsipp, tid for analysen samt kommentarer inkludert fordeler og ulemper knyttet til bruken av metodene.

Uttesting og evaluering av metoder

Som et ledd i prosjektet "Tiltak for økt kontroll med *Listeria* i laksenæringen" har Nofima testet og vurdert noen aktuelle kommersielle metoder for mulig anvendelse i laksenæringens egenkontroll med *Listeria*. Prosjektet vil komme tilbake med resultater og erfaringer med hensikt å kunne gi noen nyttige og konkrete anbefalinger til laksenæringen innenfor dette området.

Tabell 1 Eksempler på metoder for påvisning av *L. monocytogenes* og andre *Listeria*-arter

Metoder	Analyseprinsipp	Påviser <i>Listeria</i> spp.	Påviser <i>Listeria monocytogenes</i>	Ca. tid i timer (t) for resultat*	Kommentarer Fordeler og ulemper
Referansemetoder	Dyrking for anriking av <i>Listeria</i> etterfulgt av utplating på selektive agarmedier	X	X	FA: 24 t A: 48 t V: 24 t Totaltid: ± 4 dager	Anerkjente og robuste standardmetoder. Metodene tar lang tid. De krever mye håndtering, laboratoriefasiliteter og kunnskap. Smittefarlig materiale må håndteres. Verifisering av presumptive <i>Listeria</i> -positive nødvendig. Kun egnet for laboratorier med spesialkompetanse. Rimelige materialkostnader, men analysene blir likevel dyre for bedriftene. <i>Eksempler:</i> NMKL 136; ISO 11290
Dyrkingsbaserte hurtigmatoder	Prøvetaking, anriking og dyrking i ett system. Enzymatisk reaksjon gir fargeforandring for <i>Listeria</i> -positive prøver	X		A: 48 t V: 24-48 t Totaltid: ± 3 dager	Ofte enkle å utføre, krever lite håndtering og laboratoriestyr. Tolkning av positive (basert på fargereaksjon) i rør kan være vanskelig. Kan være egnet til kartlegging. Verifisering av presumptive positive nødvendig. Leverandører anbefaler ofte ikke metodene for produkt og råvarekontroll. Smittefarlig materiale må håndteres, men anses mulig pga lukket system. Analysene er rimelige. <i>Eksempler:</i> InSite; Path-Chek
Immunologiske hurtigmatoder	Basert på binding mellom antigener og antistoff er	X	X	10 min-1 t Behov for anriking først: A: 48 t V: 24-48 t Totaltid: ± 3 dager	Påvisningstestene er enkle å utføre og avlese og tar kort tid, men de krever foregående trinn for anriking av <i>Listeria</i> . Dette krever tid, håndtering, egnede laboratorielokaler og utstyr mht smittefare. Analysene varierer i pris. <i>Eksempler:</i> DuPont™ Lateral Flow System; RapidChek® <i>Listeria</i> ; Singlepath® L'mono; Reveal® for <i>Listeria</i> One-Step
Molekylærbaserte hurtigmatoder	Basert på påvisning av <i>Listeria</i> -spesifikt DNA eller RNA	X	X	1 – 5 t Behov for anriking først: A = 24-48 t V = 24-48 t Totaltid: ± 3 dager	Metodene er relativt sensitive (svært lite antall <i>Listeria</i> kan påvises) og raske, men krever ofte foregående trinn for anriking av <i>Listeria</i> . Positivt prøveresultat bør verifiseres ved dyrking/annen metodikk. Investeringer i spesialutstyr samt opplæring/kompetanse i slike teknikker kreves. Metodikken anses best egnet ved store rutinemessige analyseserier og er mindre egnet for bruk i enkeltbedrifter. Analysene krever investeringer i utstyr. Analysepris per prøve varierer avhengig av metodikk. <i>Eksempler:</i> BAX® system; iQ-Check™; TaqMan® Detection kit; GeneQuence

