

Tiltak for økt kontroll med Listeria i laksenæringen: status og videre planer

Solveig Langsrud

Et forskningsprosjekt finansiert av
Fiskeri- og havbruksnæringens forskningsfond (FHF)

Oversikt

- Listeria – utbrudd og forekomst
- Hva vet vi om årsaker til Listeria-problemer?
- Prosjekt på Listeria i laksenæringen
 - Mål og delmål
 - Identifisere smitteveier og smittekilder for *Listeria* i hele produksjonskjeden
 - Arbeidsmetodikk for å finne Listeria-kilder
 - Listeria-funn i tre bedrifter – fra mærer til ferdig produkt
 - Anbefale standardiserte metoder for prøvetaking for påvisning av *Listeria* i lakseindustrien
 - Metoder for påvisning – en oversikt
 - Sammenlikning av to hurtigmetoder med referansem metode
 - Videre arbeid

Karakteristika – mat som gir Listeriose

Hva

Hvorfor

Kjølelagring

Listeria vokser ved kjølelagring

Lang holdbarhet

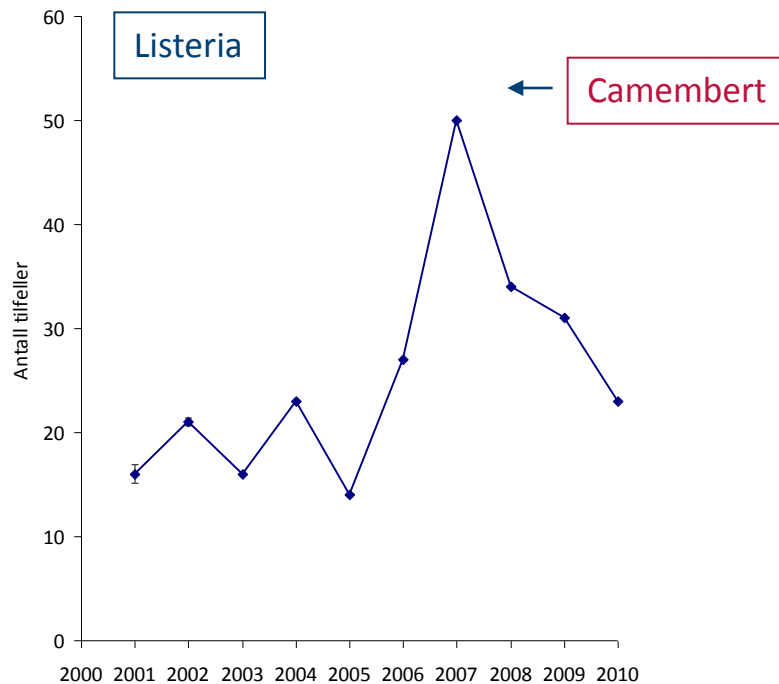
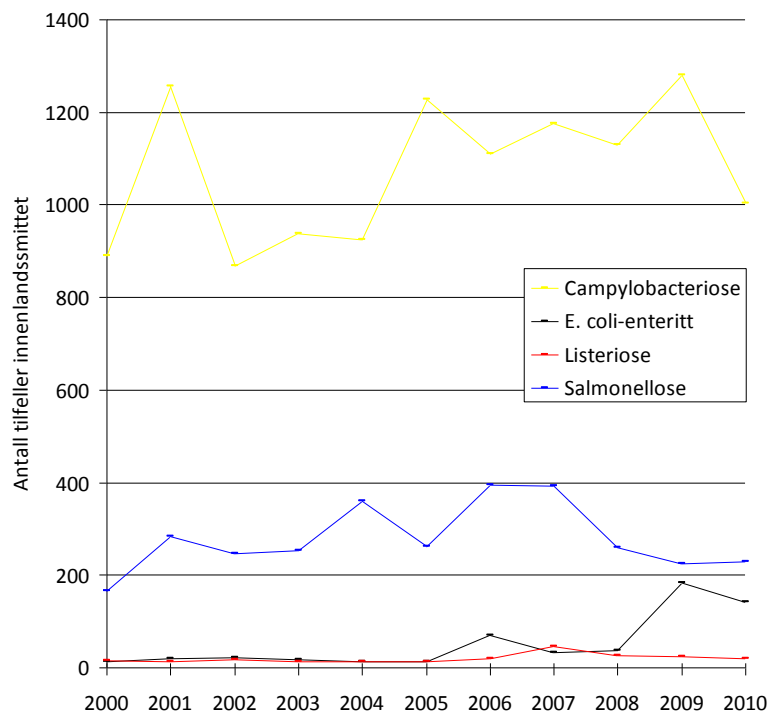
Store doser Listeria nødvendig for sykdom

Vakuumpakket

Listeria vokser uten oksygen



Status sykdom forårsaket av matbårne bakterier



Listeria 2009:

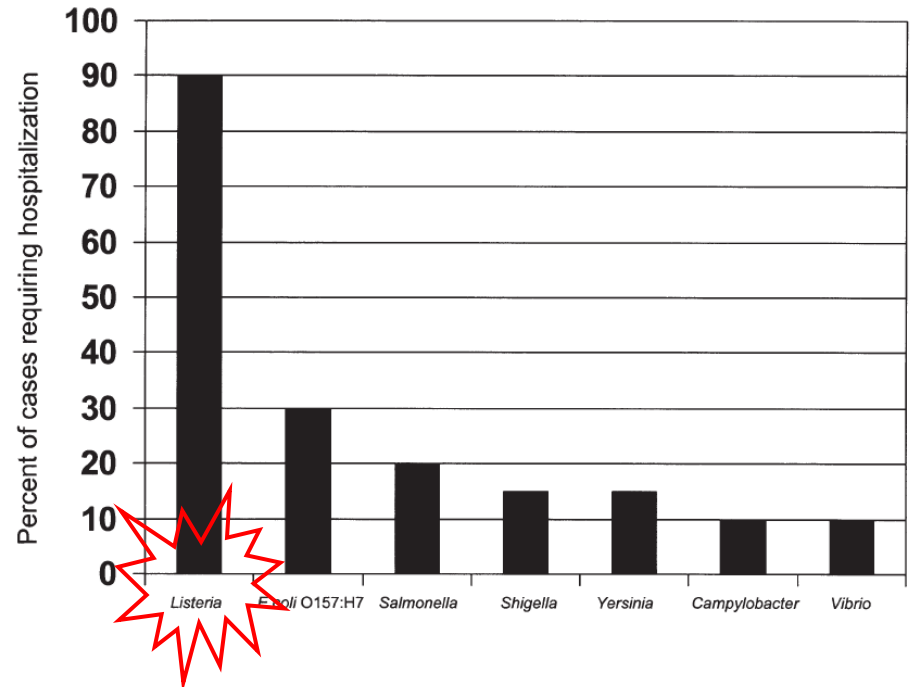
- 21 av 31 tilfeller >60 år
- 28 personer innlagt på sykehus

Kilde: www.fhi.no



Listeria monocytogenes

- Alvorlig matbåren bakterie
 - Ca 30 % dødelighet
- Risikogrupper:
 - Eldre (>60 år)
 - Personer med nedsatt/svekket immunforsvar
 - Gravide (foster)
- Store utfordringer og kostnader knyttet til kontroll og dokumentasjon for industri
- Svært viktig å raskt påvise kilder til Listeria
- Økende forekomst i flere land(?)



Figur: Sykehusbehandling knyttet til ulike matbårene bakterier. (Kilde: Grinstead and Cutter 2007)

Rema 1000 trekker listeria-laks

Av [Lars Kristian Tranøy](#) 22.10.2007 kl. 14:47 Kilde: © NTB

(VG Nett) Rema 1000 har funnet listeriabakterier i et parti skivet gravet laks fra Godehav.



Bakterie-funn i Tsjekkia: Norsk laks forbudt



Tsjekiske helsemyndigheter
Resten av EU er varslet.

Hordaland

Anno 1885 Oppdatert: Fredag 19.02.2010 13:33

Ofte listeria i norsk eksportlaks

(NPK-NTB): Selskapet Suempol Norge, som driver eit lakserøykjeri i Polen, har funne listeriabakteriar i 20 prosent av fisken som er importert frå Noreg.



Publisert: 08.10.09 kl. 14:33
Skrivent: NPK
E-post: npk@npk.no

I eit brev til Mattilsynet skildrar det norske firmaet problemet slik:

«Eg vil påstå at dette er ute av kontroll, og eg synest ikkje internkontrollrutinane hos pakkeria fungerer tilfredsstillande hos mange slakteri.»

I brevet ber dagleg leiar Ståle Høyem om eit møte med faglege ekspertar på området for å diskutere regelverket.

«Både vårt eige system i Polen og kundane våre i Europa vil ha ei forklaring på dette og eventuelt informasjon om kva som kan gjerast å redusere talet på sendingar med listeria.»

Mattilsynet støttar den polske importøren i at listeria er eit problem i norsk laks. (©NPK)



Laks fra Nordlaks. (Arkivfoto) Foto: Hilde Jørgensen

Listeria-bakterier påvist på Børøya

Mattilsynet reiser Nordlaks etter å ha funnet listeriabakterier gjentatte ganger i et produksjonslokale på Børøya i Hadsel. Bedriften har ikke gjort tilstrekkelig for å bli kvitt smitten, mener tilsynet.

L. monocytogenes - positive prøver i røkt fisk

- Polen 29.6%
- Nederland 22.6%
- Canada 20%
- Finland 17.0%
- Italia 14.5%
- Tsjekkia 13.8%
- Sverige 11.5%
- Tyskland 10.4%



”Smoked fish appears to be a food item that most often harbours *L. monocytogenes*, and also the food category that most often contains *L. monocytogenes* in levels exceeding 100 cfu/g”

The EFSA Journal 2009

L. monocytogenes og forekomst i norsk laks

Rapport FHF-prosjekter 2005 og 2008

- Råvarer: 0 - 60%
- Produksjonsmiljø: 9.4 - 30.9%
- Produkter: 5.9 - 61.9%

Forprosjekt 2009, bedrifters selvrappoterering

- Råvarer: 0-25%,
- Produksjonsmiljø: 0-25%, 80% av bedriftene rapporterer <5%.

Zoonose-rapporten (2009) forekomst i røkt laks

1994:	7.8%
1996-97:	3.4%
2003:	8.6% (990 prøver, 1%>100/g)

Stor variasjon i forekomst av *L. monocytogenes*...

...men lav forekomst er mulig!

Tidligere undersøkelser

- Kartlegging av spredningsveier for Listeria i lakseindustrien tidlig på 90-tallet (Liv Marit Rørvik, NVH)
 - Større forekomst av Listeria i produksjonsmiljøet i røykeri enn slakteri
 - Listeria-typene i ferdig produkt var ikke de samme som i sjøen eller i råvarer
 - Faktorer som gir økt risiko for Listeria i røkt laks:
 - Jobbrotasjon, bruk av engangsbekledning, tining og vasking av laks i separate kar, desinfeksjon av fottøy, manuell vakuumpakking, bedrift i landlige omgivelser
 - Faktorer som gir redusert risiko for Listeria i røkt laks
 - God hygiene, hygienisk design, vask av renholdsutstyr, salting i kar
 - Det ble isolert samme type Listeria fra sjømat som hos pasienter med listeriose
- Dansk undersøkelse, 2006 (Lone Gram, DTU)
 - Forekomst av Listeria øker utover kjeden: 2% i opprettsanlegg, 16% i slakteri, 68% i røykeri.
 - Mange Listeria-typer i utemiljøet, få typer i fabrikkene.
 - Listeria overlever dårlig i sjøvann og ytre miljø ikke viktig smittekilde
- Norsk undersøkelse av fem fabrikker (laks) i 2009 (Bjørn Tore Lunestad, NIFES)
 - Stor variasjon i forekomst på råvarer (0% til 60%) og i produksjonsmiljø. Uklart hvor i prosessen råvareprøvene ble tatt. Prøvene fra produksjonsmiljøet tatt under produksjon – vanskelig å tolke om de reflekterer hygiene eller kommer fra råvarene.



Veiledere internasjonalt

- Codex Alimentarius – CAC/GL 61 2007. Guidelines for the application of general principles of food hygiene to the control of *Listeria monocytogenes* in foods
- US. Food and Drug Administration – 2001. Processing parameters needed to control pathogens in cold smoked fish. Potential hazards in cold-smoked fish: *Listeria monocytogenes*
- US. Smoked seafood working group – 2002. *Listeria monocytogenes* control manual
- Tompkin, R. 2002. Control of *Listeria monocytogenes* in the food processing environment. *Journal of Food Protection* **65**:709-725.

Alle veieleder retter seg mot siste leddet i produksjonskjeden
(røyking/varmebehandling)

Prosjekt 2010-2014: Tiltak for økt kontroll med Listeria i laksenæringen

Videreføring av arbeid for å bekjempe Listeria
Dekke kunnskapsbehov



Mål

Hovedmål:

- Oppnå økt kontroll med *Listeria* i laksenæringen

Delmål:

- Anbefale standardiserte metoder for prøvetaking for påvisning av *Listeria* i lakseindustrien
- Identifisere smitteveier og smittekilder for *Listeria* i hele produksjonskjeden
- Sammenlikne *Listeria* påvist i lakseprodukter med *Listeria* fra utbrudd og andre kilder
- Vurdere og identifisere tiltak for økt kontroll med *Listeria* i laksenæringen
- Utarbeide veileder for håndtering og forebygging av *Listeria*-problemer i laksnæringen

Spørsmål vi ønsker å få svar på i første del av prosjektet

- Er viktigste smittekilde for Listeria råvaren eller påføres den under prosessering (brønnbåt – slakting – filetering – røyking – pakking)?
- Er Listeria på laks av samme type som de Listeria-klonene folk blir syke av i Norge?
- Finnes det metoder per i dag som kan brukes for mer effektiv og billig påvisning av Listeria?
- Hvilke forhold gir typisk Listeria-problemer
 - Utstyr, materialer, temperatur, renholdsregime, prosesstrinn, dårlig soneinndeling....

Bedriftsbesøk med prøvetaking

- Tre bedrifter besøkt
- Fra levende laks til potensielt risikoprodukt (røkt laks)
- Før besøk
 - Bedriften sender prosessbeskrivelse, prøvetakingsregime, renholdsplaner, oversikter over funn
- Under besøk
 1. Samtaler med kvalitetleder(e), renholdsledere, vedlikeholdsansvarlige, produksjonsansvarlige
 2. Gjennomgang av dokumentasjon
 3. Gjennomgang av prosess og lokaler
 4. Bestemme prøvetakingspunkter og -metoder
 5. Prøvetaking etter renhold og under produksjon
- Etter besøk
 - Mikrobiologiske analyser
 - Typing av *L. monocytogenes* for å påvise smitteveier og smittekilder
 - Sammenstilling, rapportering

Valg av prøvepunkter

1. Noen faste punkter i alle bedrifter basert på
 - Det som er kjent fra litteraturen som typiske Listeria-nisjer
 - Det som fremkom i for-undersøkelsen hos norske bedrifter som problemområder (spørreundersøkelse + besøk tre bedrifter)
2. Noen punkter bedriften selv anså som problematiske (påvisninger/vanskelig renhold)
3. Noen punkter vi vurderte som mulig Listeria-nisje ved gjennomgangen
 - 50 – 80 prøver fra hver bedrift, flere av dem med flere metoder (referansemetode + hurtigmetoder)

Valg av prøvepunkter

	% bedrifter rapportert positivt funn i dette punktet (2009)	Angitt som Listeria-nisje i litteraturen	Angitt av enkeltbedrifter som problematisk
Sluk	62 %	X	X
Transportbånd	55 %	X	X
Gulv	38 %	X	
Vakuumutstyr	32 %	(x)	X
Trimmebord	28 %		
Slicemaskin	28 %	X	
Kondensflater	27 %	X	
Beinnapper	24 %		
Fileteringsmaskin	21 %		X
Hansker	17 %		
Porsjonskutter	17 %		
Hjul	16 %		
Inj.nåler	13 %	X	
Forkle	10 %	X	
Vegger	8 %	X	
Kniver	7 %		
Vaskeutstyr	5 %	X	
Verktøy	0 %	X	
Bryterpanel, sløyemaskin, motorkasser	-	(x)	

Prøvepunkter - eksempler

- Kontaktflater
 - Transportbånd
 - Vakuumsug
 - Kniver
 - Rist på røykevogn
 - Hansker
 - Rør for pumping av fisk
- Miljø
 - Kondensflater
 - Sluk
 - Gulv
 - Hjul
 - Støvler
- Fisk
 - Skinn/gjeller evt buk på råvare
 - Filet
 - Sliceravfall

Hvor i produksjonskjeden finner man *Listeria monocytogenes*?

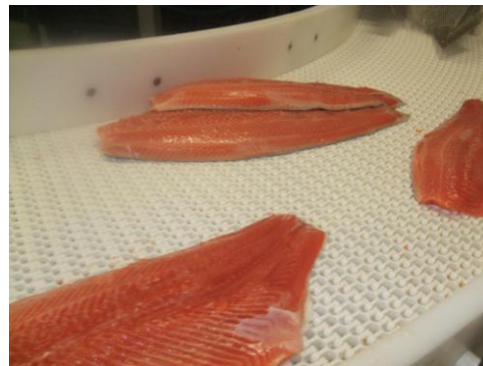
	Total	Listeria mono	Listeria spp	% positive
Miljø				
- Brønnbåt	25	1	0	4
- Prosess	64	21	3	33
Produksjonsutstyr	88	9	4	10
Fisk				
- Brønnbåt/råvare til slakting	41*	0	0	0
- Prosess	43*	5	3	12
- Røkt produkt	2	1**	0	-

*200 fisk

**Sliceravfall

Listeria på fisk

- Bedrift 2 – to partier fisk
 - Begge partier negative før prosessering
 - Begge partier positive fileter
 - Listeria i rester ved filetering
 - Fant Listeria på transportbånd ved sløyemaskin før og under produksjon
 - Transportbånd grader positiv under produksjon



Påvisning i "toppnisjene" for Listeria – sluk og gulv etter renhold

	Antall totalt	Positive totalt	% positive
Sluk	14	6	42
Gulv	8	1	11



Typisk for positive sluk

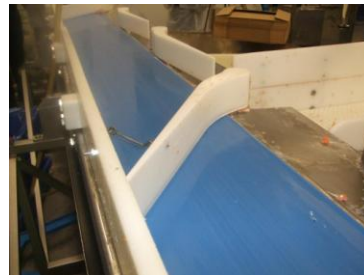
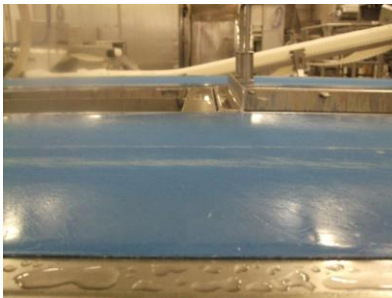
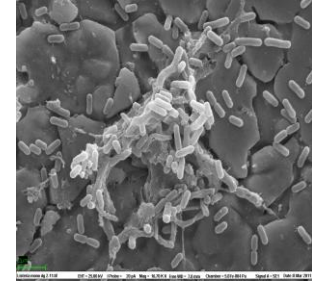
- Betong, korrodert
- Ikke rent



-Positive sluk var gjengangere fra rutineovervåking

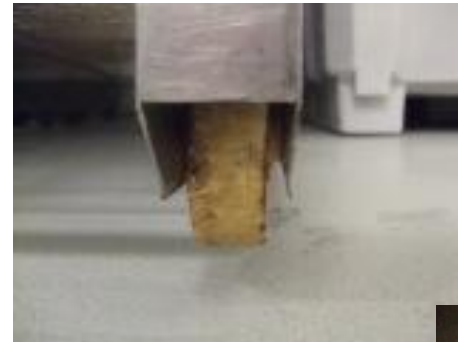
Transportbånd – etter renhold

- 2 av 19 prøver tatt etter renhold positive
- Begge også positive under produksjon
- Ikke synlig smuss

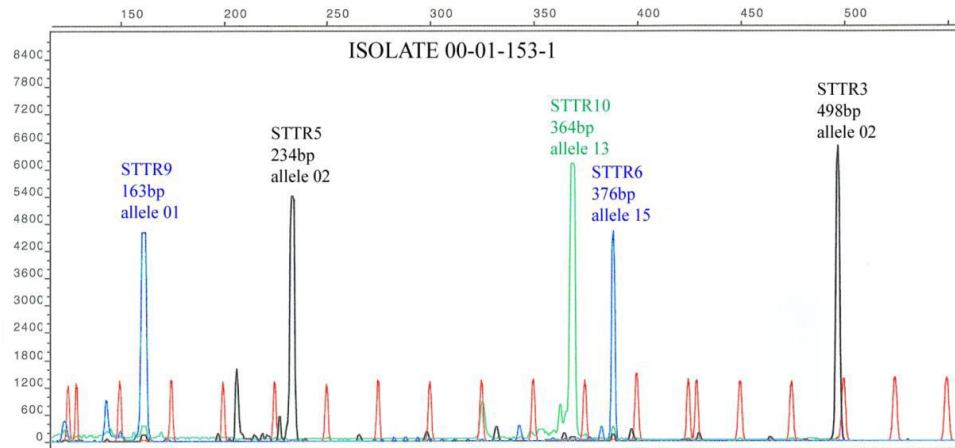


Resultater: Hva kjennetegner en nisje for Listeria i produksjonsanlegget?

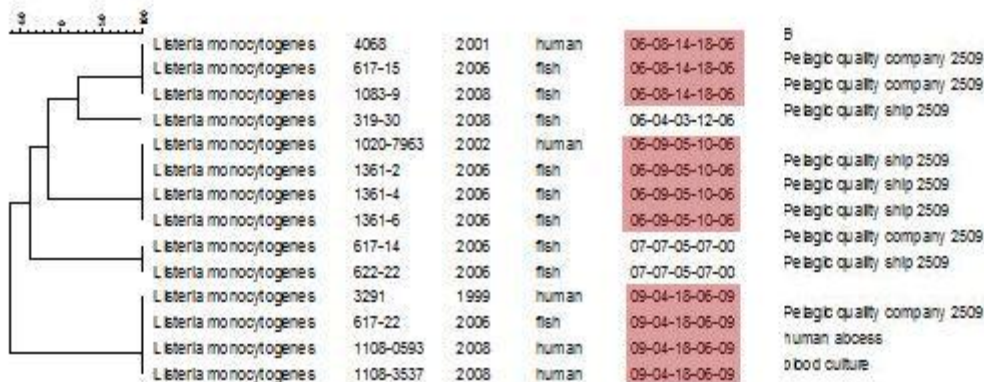
- Fuktighet
 - 30% av fuktige punkter var positive
 - 14% av tørre punkter var positive
- Ikke synlig rent etter renhold
 - 46% av urene punkter positive
 - 18% av rene punkter positive
- Materiale
 - Fant ingen systematiske forskjeller for materialer (metall, plast/gummi/støp)



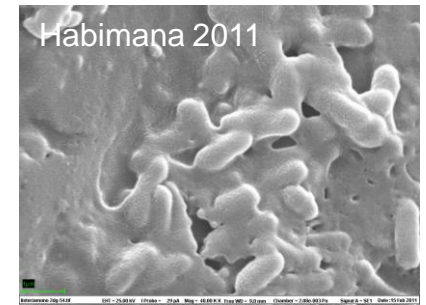
Fingerprinting av *L. monocytogenes*



Profil: 01 –02 –13 –15 –02



Foreløpige konklusjoner



- Funn av *Listeria* er ofte knyttet til punkter som er fuktige og ikke synlig rene
- *L. monocytogenes* er utbredt i miljøet
 - Sluk, gulv, utstyr i kontakt med gulv (traller, hjul, støvler)
 - Også påvist på hansker, vegg, deksel til utstyr, kondensflate, vaskemaskin
- Mindre *L. monocytogenes* på utstyr, men påvist på transportbånd, sløyemaskin, rist til røykvogn
- Lite *L. monocytogenes* på fisk før prosess, men fisk ser ut til å smittes i prosessen
- Andre arter av *Listeria* (non- *L. monocytogenes*) påvises, men i lav forekomst og fra samme steder som *L. monocytogenes*

Metoder Listeria-påvisning

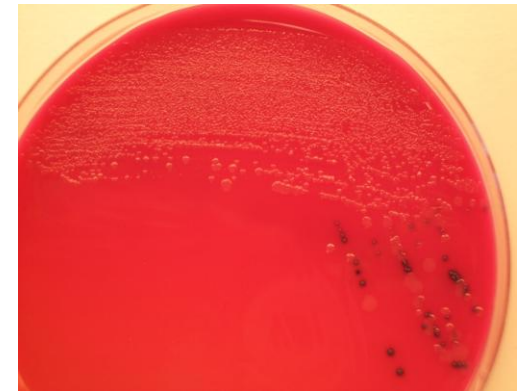
- **Alternativer til standardmetoder for deteksjon av *Listeria* i miljø og produkt**
 1. Oversikt tilgjengelige metoder
 2. Bestemme viktige kriterier for egnethet (innspill fra næringa)
 3. Vurdere egnethet og velge 2 + standardmetodikk for videre uttesting
 - I lakseindustri
 - Benytte harmonisert prøvetaking
 - Sammenligne hurtigmetodikk med standardmetodikk



Metoder for påvisning - referansemetoder

- Prinsipp: Dyrking for anriking av *Listeria* etterfulgt av utplating på selektive agarmedier
- Spesifisitet: *Listeria monocytogenes* + *Listeria* spp.
- Påvisningstid
 - Anriking/oppdyrking: 24 t + 48 t
 - Verifisering: 24 t
 - Totaltid: 4 dager
- Fordeler
 - Anerkjente og robuste standardmetoder.
 - Rimelige materialkostnader
- Ulemper
 - Lang tid før prøvesvar
 - Mye håndtering av smittefarlig materiale
 - Verifisering av presumptive *Listeria*-positive nødvendig.
 - Kun egnet for laboratorier med spesialkompetanse.

- *Eksempler*: NMKL 136; ISO 11290



Metoder for påvisning - Dyrkingsbaserte hurtigmetoder

- Prinsipp: Prøvetaking, anriking og dyrking i ett system. Enzymatisk reaksjon gir fargeforandring for *Listeria*-positive prøver
- Spesifisitet: *Listeria* spp.
- Påvisningstid
 - Anriking/oppdyrking: 48 t
 - Verifisering: 24 t-48 t
 - Totaltid: 3 dager
- Fordeler
 - Enkle å utføre
 - Krever lite håndtering og laboratorieutstyr.
 - Analysene er rimelige
- Ulemper
 - Tolkning av positive (basert på fargereaksjon) kan være vanskelig
 - Verifisering av presumptive positive nødvendig.
 - Leverandører anbefaler ofte ikke metodene for produkt og råvarekontroll.
- *Eksempler*: InSite; Path-Chek



Metoder for påvisning - Immunologiske hurtigmatoder

- Prinsipp: Basert på binding mellom antigener og antistoff er
- Spesifisitet: *Listeria monocytogenes*
- Påvisningstid
 - Anriking/oppdyrking: 48 t
 - Verifisering: 24 t-48 t
 - Totaltid: 3 dager
- Fordeler
 - Enkle å utføre og avlese
- Ulemper
 - krever foregående trinn for anriking av *Listeria*.
 - Krever laboratorieutsyr
 - Håndtering som gir smittefaresmittefare
- *Eksempler*: DuPont™ Lateral Flow System; RapidChek® *Listeria*; Singlepath® L'mono; Reveal® for *Listeria* One-Step

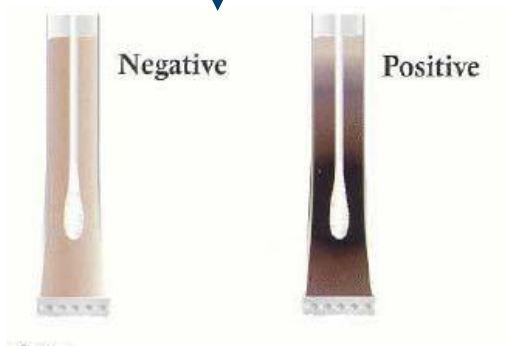


Metoder for påvisning - Molekylærbaserte hurtigmetoder

- Prinsipp: Basert på påvisning av *Listeria*-spesifikt DNA eller RNA
- Spesifisitet: *Listeria monocytogenes* og *Listeria* spp.
- Påvisningstid
 - Anriking/oppdyrking: 24-48 t
 - Verifisering: 24 t-48 t
 - Totaltid: 3 dager
- Fordeler
 - Metodene er relativt sensitive (svært lite antall *Listeria* kan påvises)
 - Analysene krever investeringer i utstyr.
- Ulemper
 - Positivt prøveresultat bør verifiseres ved dyrking/annen metodikk.
 - Investeringer i spesialutstyr samt opplæring/kompetanse i slike teknikker kreves.
- *Eksempler:* BAX[®] system; iQ-CheckTM; TaqMan[®] Detection kit; GeneQuence

”Hurtigmetoder” egnet i lakseindustrien?

PathChek og Insite



Prøvetaking for Listeria

- Prøvetakingsmetoder/mikrobiologisk analyse
 - Chifonette (våt til overflater, tørr til råvarer og produkt)
 - Svabrer godt på et større område (30*30 cm)
 - Referanse-metode
 - Immunologisk metode (single Path mono)
 - Molekylærbiologisk metode (PCR)
 - PathCheck
 - Svabrer godt på mindre område (10*10 cm)
 - Ser etter fargeomslag
 - Verifiserer med referansemetode og molekylærbiologisk metode
 - Insite
 - Svabrer godt på mindre område (10*10 cm)
 - Ser etter fargeomslag
 - Verifiserer med referansemetode og molekylærbiologisk metode

Resultater – Listeriapåvisning

Pathcheck/insite vs referansemetode



		Referansemetode	
		Negativ	Positiv
Pathcheck / Insite	Negativ	53%	9%
	Positiv	31%	7%

- Totalt 45 prøver tatt med alle metoder
 - 14 av 17 positive med hurtigmetode innehold ikke Listeria
 - 4 negative med hurtigmetode, positive med referanse
 - 3 negative med ref-metode, pos med hurtigmetode

Konklusjon hurtigmatoder

- Det finnes mange ulike metoder for å påvise Listeria, men de fleste krever avansert utstyr og/eller håndtering av Listeria
- To hurtigmatoder som allerede brukes i bedrifter ble undersøkt
 - Begge metodene baserer seg på Listeria generelt og ikke *monocytogenens*
 - Mye falske positive
- Det er per i dag ikke gode hurtigmatoder for bruk av bedriftene



Videre arbeid i prosjektet

Hurtigmetodikk

- Slutføre evaluering av hurtigmetodikk mht egnethet for Listeria-kontroll i lakseindustrien

Smittekilder og smitteveier

- Data-analyser
- Ny prøvetaking (utføres av bedriftene)
 - Analyser
 - Påvisning av Listeria
 - Artsbestemmelse, evt serotyping
 - Fingerprinting
- Avklare smittekilder/smitteveier
- Påbegynne tiltak