

Forebygging av Listeria i produksjonsanlegg for laks

Faglig sluttrapport

Solveig Langsrud og Trond Møretrø





Nofima er et næringsrettet forskningsinstitutt som driver forskning og utvikling for akvakulturnæringen, fiskerinæringen og matindustrien.

Nofima har om lag 370 ansatte.

Hovedkontoret er i Tromsø, og forskningsvirksomheten foregår på fem ulike steder: Ås, Stavanger, Bergen, Sunndalsøra og Tromsø

Hovedkontor Tromsø:

Muninbakken 9–13
Postboks 6122 Langnes
NO-9291 Tromsø

Ås:

Osloveien 1
Postboks 210
NO-1431 ÅS

Stavanger:

Måltidets hus, Richard Johnsgate 4
Postboks 8034
NO-4068 Stavanger

Bergen:

Kjerreidviken 16
Postboks 1425 Oasen
NO-5844 Bergen

Sunnalsøra:

Sjølsengvegen 22
NO-6600 Sunndalsøra

Alta:

Kunnskapsparken, Markedsgata 3
NO-9510 Alta

Felles kontaktinformasjon:

Tlf: 02140
E-post: post@nofima.no
Internett: www.nofima.no

Foretaksnr.:

NO 989 278 835 MVA



Creative commons gjelder når ikke annet er oppgitt

Rapport

<i>Tittel:</i> Forebygging av Listeria i produksjonsanlegg for laks – faglig sluttrapport	ISBN: 978-82-8296-574-3 (pdf) ISSN 1890-579X
<i>Title:</i> Preventing Listeria establishment in production of Salmon	<i>Rapportnr.:</i> 36/2018
<i>Forfatter(e)/Prosjektleder:</i> Solveig Langsrud og Trond Møretrø	<i>Tilgjengelighet:</i> Åpen
<i>Avdeling:</i> Trygg og holdbar mat	<i>Dato:</i> 30.11.2018
<i>Oppdragsgiver:</i> FHF	<i>Ant. sider og vedlegg:</i> 26
<i>Stikkord:</i> Listeria, Laks, Ørret, Hygiene	<i>Oppdragsgivers ref.:</i> FHF 901330
<i>Sammendrag/anbefalinger:</i> ATP-metoden kan brukes som et supplement til, men ikke erstatte mikrobiologisk renholdkontroll og/eller prøvetaking for Listeria. ATP-metoden for renholdskontroll i produksjonsanlegg for laks/ørret kan benyttes for å påvise rester av smuss fra råvarer/produkt på produksjonsutstyr. Metoden er mindre sensitiv i avdelinger med mye fettrikt smuss eller rester av salt eller røyksyre. ATP-metoden er særlig sensitiv for påvisning av blodrester eller varmebehandlet produkt. Bakterier i nivåer relevant for renholdskontroll har ikke i seg selv nok ATP til at de påvises med å måle ATP. Lave ATP-verdier er ikke en garanti for at bakterievekst ikke kan forekomme og høye ATP-verdier betyr ikke nødvendigvis at man har bakterier tilstede eller at det er et punkt hvor bakterier kan vokse til høye nivåer. ATP-metoden kan anbefales brukt som en rask og relativt rimelig metode for å måle om renholdet er effektivt, men grenseverdier for avvik må tilpasses hver bedrift, avdeling og prøvepunkt. Metoden erstatter ikke ordinære mikrobiologiske analyser for Listeria eller kimtall.	<i>Prosjektnr.:</i> 11843
<i>English summary/recommendation:</i> Possibilities and limitations for the use of ATP-methodology for hygiene control in the salmon/trout processing industry was investigated. The methodology gives an immediate answer to the level of hygiene at a relatively low price, but cannot be regarded as an alternative to ordinary microbiological sampling.	

Forord

Denne sluttrapporten omhandler resultater fra prosjektet «Forebygging av Listeria i produksjonsanlegg for laks». Prosjektet er gjennomført på oppdrag av og er finansiert av FHF.

Dette arbeidet ble initiert av Håkon Rydland Sæbø fra Lerøy og ledet av Solveig Langsrud fra Nofima. En stor takk til styringsgruppen ved Marit Skjærvik (Sinkaberg-Hansen), Anita Rørlien (Lerøy Fossen), Rudi Jakobsen (Lerøy), Sissel Djuvik (Sjøtroll), Kjersti Brakvatne (Lerøy Fossen) og Håkon Rydland Sæbø (Sjøtroll) for alle gode diskusjoner og bidrag til gjennomføringen av prosjektet. Mange takk også til Kristin Prytz ved FHF for gode innspill i alle faser av prosjektet.

Innhold

1	Sammendrag	1
2	Innledning	2
3	Problemstilling og formål	4
4	Prosjektgjennomføring	5
5	Oppnådde resultater, diskusjon og konklusjon	6
5.1	Sammenheng mellom ATP og smuss.....	6
5.1.1	Er det god sammenheng mellom mengde ATP og signalene fra ATP-instrumenter?.....	6
5.1.2	Hvilke forhold i produksjonsmiljøet kan forstyrre ATP-metoden?	7
5.1.3	Hvor mye ATP er det i ulike typer smuss man kan finne etter renhold?	9
5.1.4	Hvor mye bidrar bakterier til ATP-utslag?.....	10
5.2	Sammenheng mellom ATP og etablering av Listeria	11
5.2.1	Hvordan påvirker smuss potensialet for at bakterier fester seg til en overflate?	12
5.2.2	Vekst av Listeria på ulike typer smuss	13
5.3	Metoder for renholdkontroll i praksis.....	14
5.3.1	Er det sammenheng mellom Listeria-nisjer og ATP-utslag i praksis?.....	15
5.3.2	Er det sammenheng mellom høye kimtall og ATP-utslag i praksis?.....	16
5.3.3	Hva er normale ATP-verdier for renholdsprøver i lakse-/ørretproduksjon?.....	19
6	Hovedfunn	20
7	Leveranser	21
8	Vedlegg: Metodikk	22
8.1	Måling av ATP	22
8.2	Smuss, kjemikalier og renholdsmidler brukt til eksperimenter	22
8.3	Bakteriestammer brukt i eksperimenter.....	22
8.4	Festing og biofilmdannelse på kuponger	23
8.4.1	Forsøksoppsett biofilm	23
8.4.2	Analyse	24
8.5	Prøveuttak i bedrifter – prosedyre	24
8.5.1	Prøvetakingsmetodikk.....	25

1 Sammendrag

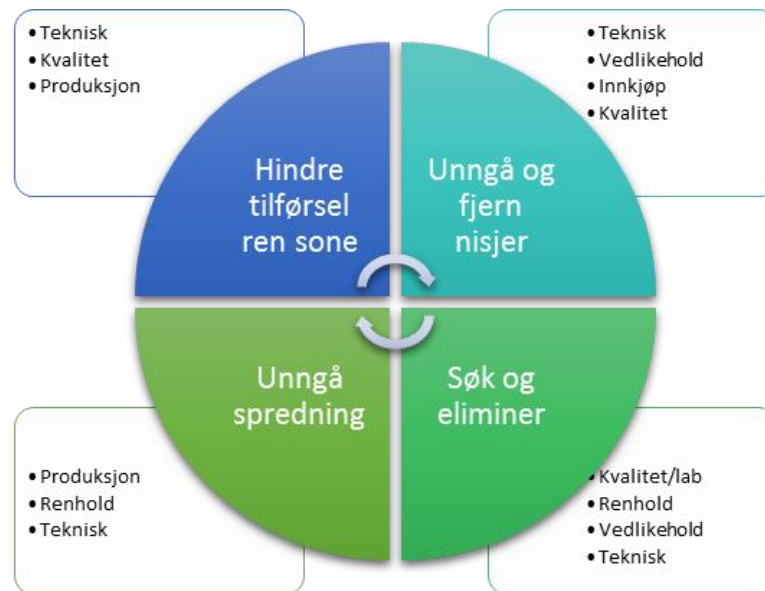
ATP-metoden kan brukes som et supplement til, men ikke erstatte mikrobiologisk renholdkontroll og/eller prøvetaking for Listeria.

ATP-metoden for renholdskontroll i produksjonsanlegg for laks/ørret kan benyttes for å påvise rester av smuss fra råvarer/produkt på produksjonsutstyr. Metoden er mindre sensitiv i avdelinger med mye fettrikt smuss eller rester av salt eller røyksyre. ATP-metoden er særlig sensitiv for påvisning av blodrester eller varmebehandlet produkt. Bakterier i nivåer relevant for renholdskontroll har ikke i seg selv nok ATP til at de påvises med å måle ATP.

Lave ATP-verdier er ikke en garanti for at bakterievekst ikke kan forekomme og høye ATP-verdier betyr ikke nødvendigvis at man har bakterier tilstede eller at det er et punkt hvor bakterier kan vokse til høye nivåer. ATP-metoden kan anbefales brukt som en rask og relativt rimelig metode for å måle om renholdet er effektivt, men grenseverdier for avvik må tilpasses hver bedrift, avdeling og prøvepunkt. Metoden erstatter ikke ordinære mikrobiologiske analyser for Listeria eller kimtall.

2 Innledning

Arbeid for å unngå smitte av laks eller ørret med *Listeria* skiller seg mellom bedrifter som allerede har et problem med husstammer og de som i utgangspunktet har en god situasjon (se figur).



Figur 1 Forebygging og problemløsning for *Listeria*. Laksbedrifter som har kontinuerlige problemer med husstammer jobber hovedsakelig i den nederste delen av sirkelen. Bedrifter uten husstammer legger innsatsen i øverste del av sirkelen

De fleste veiledere for forebygging av *Listeria* anbefaler en omfattende overvåking av produksjonsmiljøet med målrettet prøvetaking for *Listeria* (Søk og eliminer). I situasjoner med hyppig påvisning er dette en god strategi, men det er ikke nødvendigvis mest kostnadseffektive metode for å forebygge husstammer. Forebygging kan basere seg på å identifisere mulige problempunkter og fjerne potensielle nisjer der bakterier kan etablere seg (Unngå og fjern nisjer). Ensidig overvåking av miljøet for *Listeria* og kimtall 1) kan gi en falsk trygghet fordi man ikke detekterer mulige nisjer. 2) egner seg lite til å motivere ansatte fordi de får få og fragmenterte og forsinkede tilbakemeldinger 3) gjør det vanskelig å finne korrigerende tiltak siden situasjonen kan ha endret seg etter prøven ble tatt. 4) er kostbare. Det ville være et stort fremskritt om man fant metoder som ga raskere svar, var billigere og som kunne varsle om avvik før problemer oppsto. Å måle ATP kunne være en slik metode: Den gir et mål på organisk smuss og vi vet at reservoarer for *Listeria* og kvalitetsreducerende bakterier fortrinnsvis utvikler seg i nisjer med fuktighet og smuss. I tillegg gir metoden raskt svar og kostnadene er relativt lave (ca. en tiendedel av kostnader for en *Listeria*-analyse og en femtedel av kostnader for kimtallsanalyser).

ATP for renholdskontroll er ikke nytt og det finnes flere kommersielle systemer. Metoden baserer seg på at ATP finnes i alle celler, så ved å måle ATP får man et mål på renheten av overflate. ATP-nivået i bakterier varierer mye, avhengig av bakterieart og tilstand og det samme vil gjelde smuss fra råvarer. Det er derfor ikke overraskende at ATP-nivåer funnet i produksjonsmiljøet ikke samsvarer direkte med bakterietall (1). I en studie fra 2008 undersøkte man sensitiviteten av metoden for å måle overflatesmuss basert på fisk (fiske-ekstrakt fra torsk, fiskeolje og fiskeprotein) og tilsats av bakterier

(2). Resultatene fra studien er dessverre vanskelig å tolke siden det ble brukt en høy mengde bakterier som totalt overskygget ATP-signalene fra tilsatt smuss. Det er altså lite relevant litteratur for å vurdere nytteverdien av bruk av ATP-metoden for renholdkontroll i laksenæringa.

Prosjektet ble initiert for å få kunnskapsgrunnlag for å vurdere styrker og svakheter ved ATP-metoden. Prosjektet er finansiert av FHF. Ved Nofima sto en prosjektgruppe med forskere, senioringeniører og en masterstudent (Solveig Langsrud (prosjektleder), Trond Møretrø, Tove Maugesten, Anette Wold Aasli, Marius Normann) for planlegging, gjennomføring og rapportering. Bedriftene Sjøtroll, Sinkaberg Hansen og Lerøy Fossen hadde ansvar for prøvetaking og oppfølging ihht plan og var involvert i planlegging og tolking av resultater.

3 Problemstilling og formål

ATP-målinger brukes i dag som et supplement til bakterieanalyser for renholdkontroll i hele prosessen fra brønnbåt til emballert produkt. Det finnes lite systematisert dokumentasjon på egnetheten av metoden for overvåking av renholdet for produksjon av laks og ørret. Det var derfor behov for en avklaring av styrker og svakheter, særlig med formål å undersøke om den kan avdekke nisjer for oppvekst av *Listeria* og andre problembakterier

Hovedmål: Undersøke om renholdkontroll med ATP-metoden kan benyttes som supplement og delvis erstatter for *Listeria* og kimtallsanalyser i bedrifter som i utgangspunktet har en god hygienisk status

Delmål:

1. Finne sensitiviteten av ATP-metoden for å detektere smuss og hvor på prosesslinja den kan brukes.

Er metoden sensitiv nok i alle deler av prosessen? Kan det være tilfeller hvor ATP ikke kan brukes (metoden er basert på enzymer som kan være sensitive for renholdsmidler, pH, salt etc.)? Eksempler på områder i prosess som bør vurderes: i) Smuss i slakteprosess: mye blod, lite fett, ii) Smuss i sløypeprosess: mye fett, lite blod, iii) Smuss i røkelaksprosess: mye fett, lite blod, komponenter fra røykeprosess, salt

2. Finne hvilke grenseverdier i ATP-nivåer man bør ha før man setter inn tiltak.

Hva er sammenhengen mellom smussnivå, smusstype og mulig etablering av *Listeria*. Vil *Listeria* binde seg raskere til en overflate som har belegg av fiskeprotein/fett enn en ren overflate?

3. Vurdere om ATP-metoden helt eller delvis kan erstatte mikrobiologisk prøvetaking

Vurdere om man kan oppnå en bedre overvåking av renhold til samme kostnad ved å erstatte deler av mikrobiologisk prøvetaking med ATP. Her må tap i spesifisitet (f. eks oppdager ikke *Listeria*-positivt punkt pga lav ATP-verdi) måtte bli kompensert med større nedslagsfelt (man får tatt 5-10 ganger så mange prøver med ATP)

Dersom hypotesen om at ATP-metoden delvis kan erstatte nåværende *Listeria*- og kimtallanalyser viste seg å være riktig, ville man kunne anbefale dokumenterte hurtigere og rimelige metoder for overvåking av renhold. Nisjer som kan gi grobunn for oppvekst av bakterier ville kunne påvises på et tidligere tidspunkt, raske svar vil gjøre at dialogen med renholdere blir enklere og man får satt inn tiltak tidligere. Man ville også kunne redusere kostnadene forbundet med prøvetaking.

4 Prosjektgjennomføring

Prosjektet var inndelt i fire arbeidspakker. For detaljer om metoder vises til Vedlegg 1.

Arbeidspakke 1 var laboratoriestudier der man undersøkte hvordan ATP-målinger påvirkes av ulike kombinasjoner og nivåer av smuss (fiskefett, fiskeprotein, blod), bakterier (ulike bakterier fra miljøet inkludert Listeria) og andre komponenter som kan påvirke resultater (salt, renholdsmidler). Denne delen ble i sin helhet gjennomført ved Nofima, men Sjøtroll bidro med smussprøver fra egen produksjon. En masterstudent, Marius Normann, var involvert i en del av dette arbeidet.

Arbeidspakke 2 var laboratoriestudier for å finne sammenheng mellom type smuss, smussnivå og etablering av Listeria på overflater. Det ble benyttet biofilm-modeller etablert ved Nofima i tidligere prosjekter og Listeria-stammer fra lakseproduksjon. Denne delen ble i sin helhet gjennomført ved Nofima

Arbeidspakke 3 besto av prøvetaking i tre bedrifter der man sammenliknet resultater fra ATP-målinger, totalkim og Listeria-prøver. Det ble også foretatt en gjennomgang og analyse av tidligere prøveuttak ved to bedrifter. Denne delen ble gjennomført av tre laksebedrifter og Nofima.

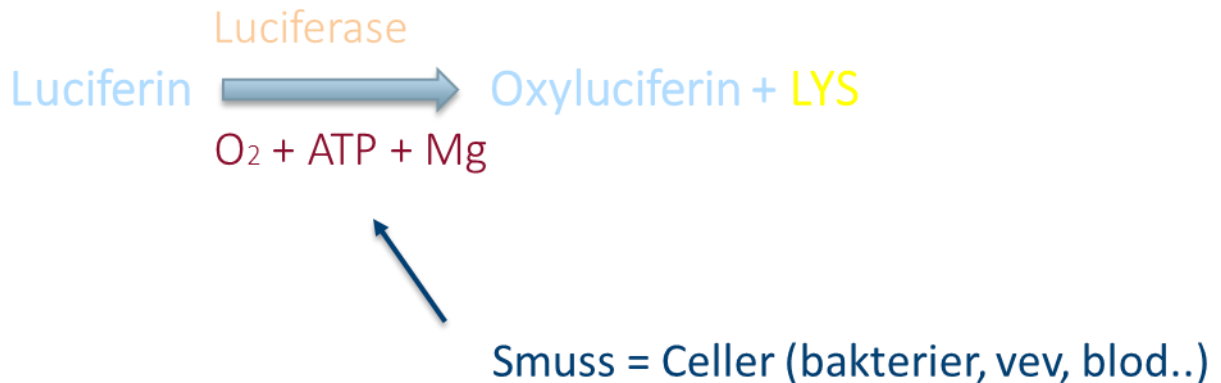
Arbeidspakke 4 besto av utarbeiding av to populærvitenskapelige artikler med resultater, en kort anbefaling om renholdskontroll og presentasjon av resultater på et faglig møte med tilhørere fra bransjen. I tillegg ble det skrevet en mastergrad på arbeidet. Denne delen ble gjennomført av Nofima på grunnlag av innspill og diskusjoner med styringsgruppen.

Det ble avholdt 4 møter i styringsgruppen.

5 Oppnådde resultater, diskusjon og konklusjon

5.1 Sammenheng mellom ATP og smuss

Vi ønsket å undersøke om ATP-utslag i form av lys virkelig gir et direkte mål på hvor mye smuss det er tilstede i produksjonsmiljøet.



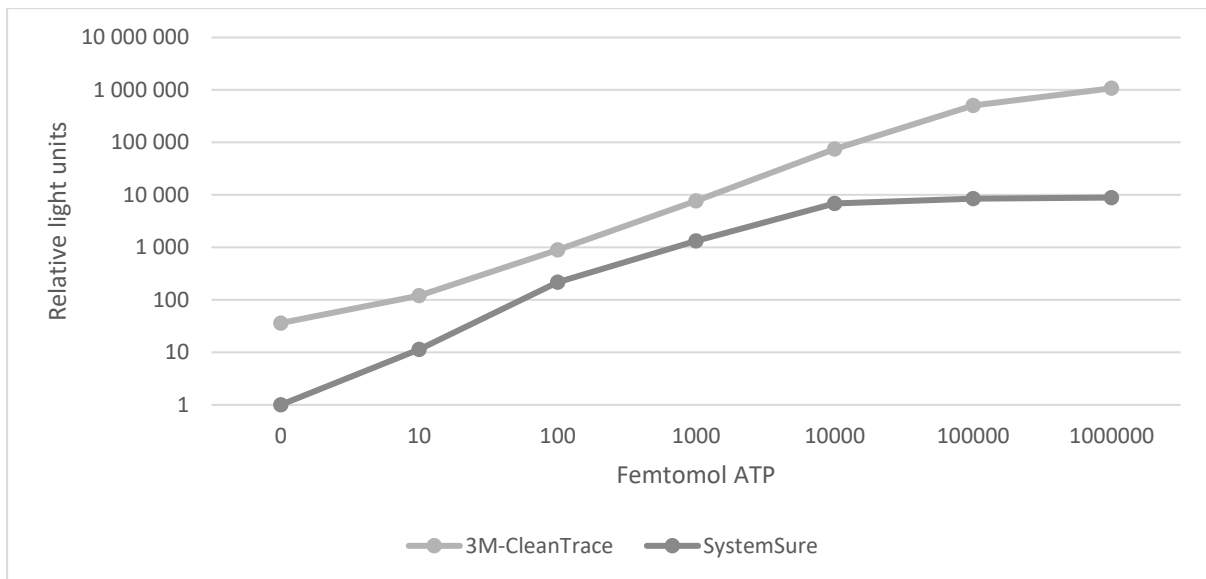
Vi ville altså ha svar på følgende spørsmål:

- Vil ulike ATP-instrumenter gi ulike svar?
- Er det faktorer i produksjonsmiljøet som forstyrrer RLU-utslaget?
- Hva er sammenhengen mellom mengde smuss, bakterier og RLU/ATP-nivå?

5.1.1 Er det god sammenheng mellom mengde ATP og signalene fra ATP-instrumenter?

Det er en lineær sammenheng mellom relative lysenheter og ATP-mengde i ca samme måleområde for SystemSure og 3M-CleanTrace. Det er viktig å være klar over at bedrifter som bruker ulike instrumenter ikke kan sammenlikne sine data direkte. F eks gir Clean-Trace et utslag på over 10 RLU i rent vann.

For å undersøke sammenhengen mellom ATP-mengde og utslag i relative lysenheter lagde vi løsninger med ulike kjente mengder ATP og målte relative lysenheter (RLU) med to ulike instrumenter (SystemSURE plus™ med UltraSnap ATP svabere (Hygiene) og 3M Clean-Trace NG Luminometer med Clean-Trace surface ATP UXL100 svabere). Figur 2 viser sammenhengen i ATP-nivå og utslag på instrumentene. De to instrumentene som ble undersøkt ga ulike utslag ved samme ATP-nivå, men begge ga en lineær sammenheng mellom ATP og Relative lysenheter (RLU).

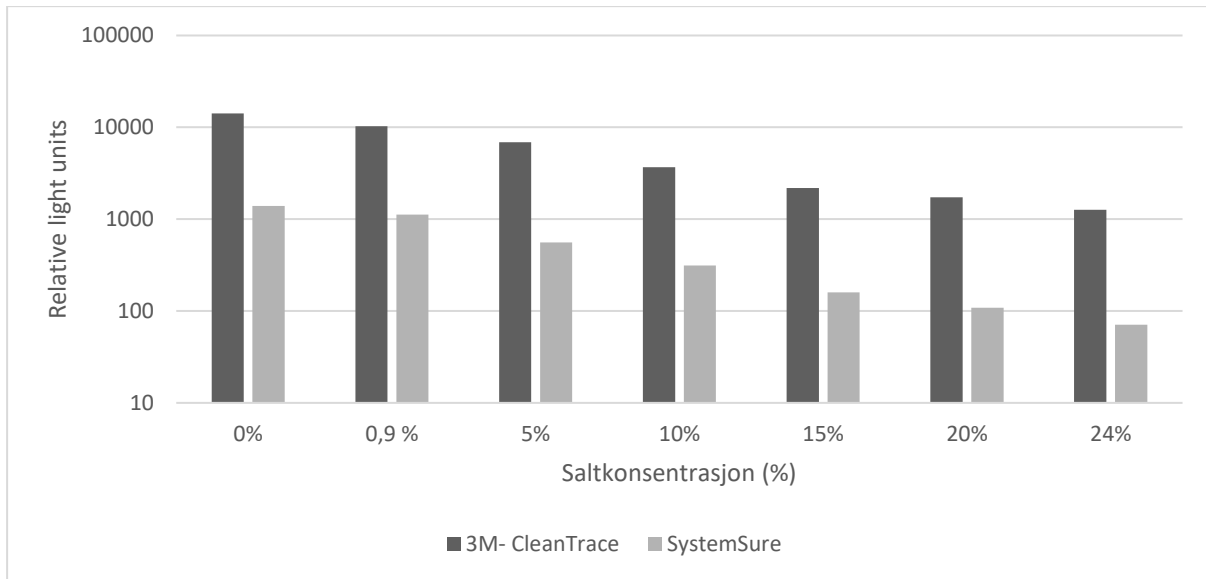


Figur 2 Utslag i relative lysenheter for to ulike ATP-instrumenter

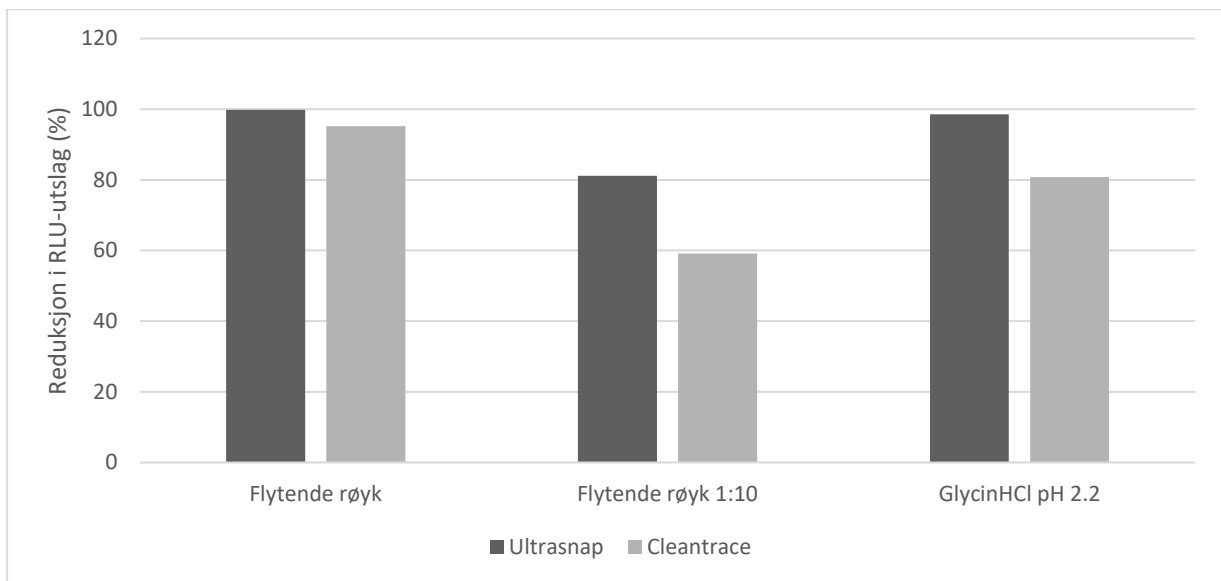
5.1.2 Hvilke forhold i produksjonsmiljøet kan forstyrre ATP-metoden?

Rester av salt og røyksyre kan gjøre at man får et lavere utslag på ATP enn om det er helt rent. Lakseolje eller rester av vaske- og desinfeksjonsmidler forstyrrer i liten grad RLU-signalene.

Produksjonsmiljøet inneholder ulike typer komponenter som potensielt kan påvirke enzymsystemet metoden baserer seg på. Vi undersøkte om ATP sammen med salt, røyksyre og lakseolje gir like høye utslag som ATP i rent vann. Vi fant at salt har relativt stor effekt på målingene (Se Figur 3) og i et miljø der salt ikke er vasket vekk vil metoden ikke egne seg. Røyksyre reduserte også utslaget, noe som skyldes lav pH (Figur 4). Instrumentene hadde om lag lik sårbarhet for miljøfaktorer som potensielt kunne forstyrre signalene.



Figur 3 Effekt av salt på utslag ved ATP-metoden. Antall relative lysenheter plottet mot saltkonsentrasjon. Alle prøver var tilsatt samme mengde ATP



Figur 4 Effekt av flytende røyk på RLU-utslag. Prosent reduksjon vist. Alle prøver var tilsatt samme mengde ATP

Vi undersøkte også hvordan ulike renholdsmidler påvirket utslaget. Her ble det liten effekt på ATP-målingene.

5.1.3 Hvor mye ATP er det i ulike typer smuss man kan finne etter renhold?

Blod, fett- og proteinrike fraksjoner fra ørret inneholdt ATP og ga utslag i form av RLU-utslag. Hvor stort utslag man får med ATP-metoden er ikke likt for ulike fraksjoner og metoden gir relativt lave utslag for fettriakt og rått smuss.

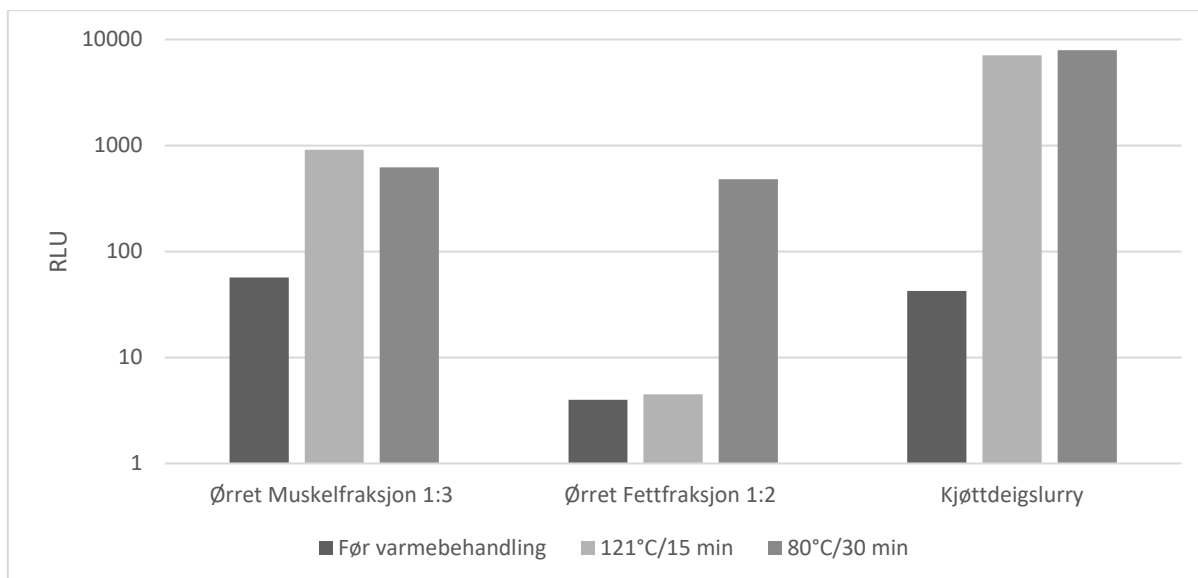
ATP-metoden baserer seg på at alle celler inneholder ATP. Hvor mye ATP cellene inneholder vil selvfølgelig variere. Vi målte ATP-utslag for ulike fraksjoner av ørret for begge instrumenter. Som vist i Tabell 1 var det mye høyere utslag for blod- eller proteinrike enn fettrike fraksjoner.

Vi fant videre at varmebehandling kunne øke signalene fra ATP særlig for fettriakt smuss, men også for proteinrikt (Figur 5). Dette skyldes sannsynligvis at enzymene som skal bryte opp cellene for å få ut ATP ikke er effektive for alle typer smuss. Altså vil man ved samme smussnivå, få høyere utslag med ATP-metoden i en avdeling med varmebehandlet produkt enn i en med rått produkt.

Tabell 1 Utslag i ATP-målinger for ulike fraksjoner av ørret med tilhørende fett, protein og saltinnhold. 10 µl smuss ble målt for alle tre fraksjoner. Til sammenlikning er det også lagt inn resultater for muskelfraksjoner av torsk og storfe

	RLU SystemSure	RLU 3M Clean- Trace	Fett (%)	Protein (%)	Tørrstoff (%)	NaCl (%)	pH
Ørret muskel	3360	16656	11.0	22.8	35.2	0.13	6.2
Ørret fett	24	323	70.9	6.6	87.9	0.15	6.4
Ørret blod	4590	30131	1.8	5.1	11.4	1.18	7.1
Torskebuljong	27	195	0.07	0.8	0.88	0.1	6.4
Kjøttbuljong	3	33	0.11	0.8	0.99	0.2	5.6

Dette betyr at man vil få mye lavere utslag for fettriakt smuss enn blodrikt smuss og høyere utslag for samme mengde smuss om det er varmebehandlet sammenliknet med rått produkt.



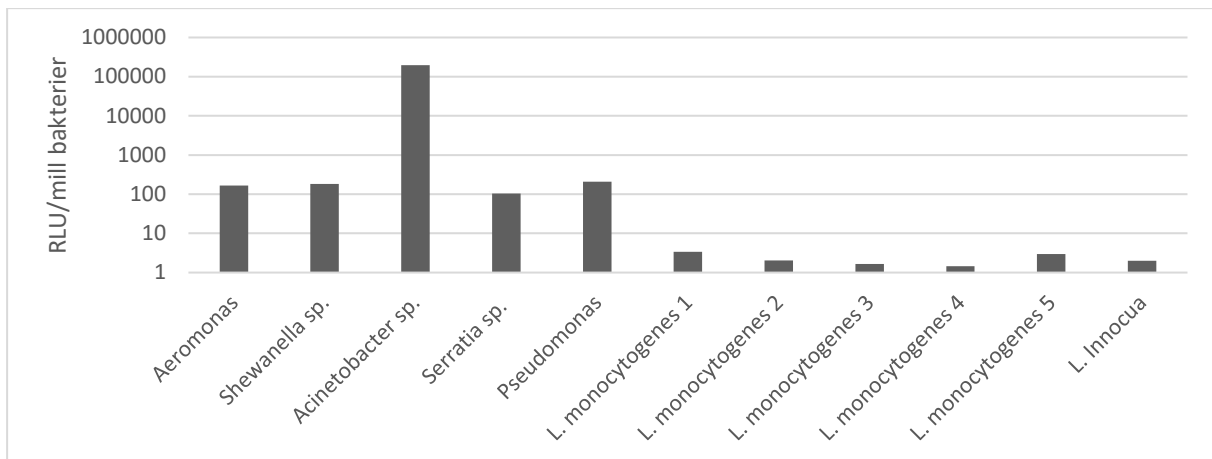
Figur 5 Effekt av varebehandling på ATP-utslag (SystemSure)

ATP-metoden er ikke sensitiv nok til å påvise bakterier i det nivået som er relevant for renholdskontroll

5.1.4 Hvor mye bidrar bakterier til ATP-utslag?

Bakterier inneholder også ATP, men kan høye bakterietall i et prøvepunkt i seg selv gi utslag i ATP-målinger? Vi tenker oss her en nisje der det har vært vekst av bakterier og det er såpass lite smuss igjen at det ikke bidrar til at man får en høy RLU-verdi.

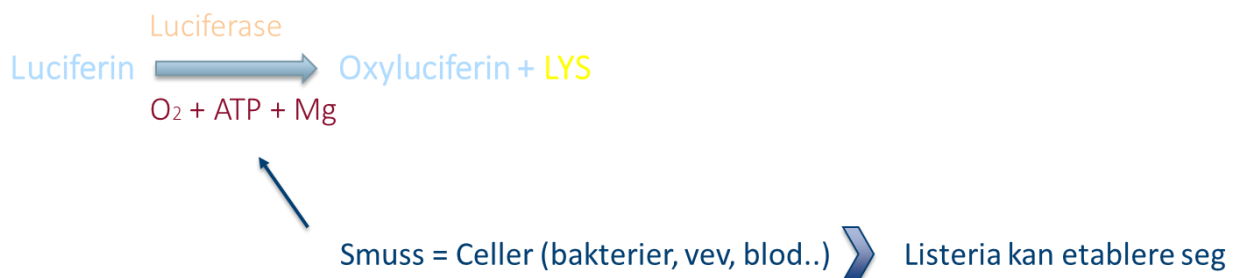
Figur 6 viser at man må ha meget høye bakterietall for å få utslag med ATP-metoden – for *Listeria* vil man få et utslag på mindre enn 10 selv om man har 1 millioner bakterieceller. Andre bakterier fra produksjonsmiljøet hadde høyere nivå ATP, men for de fleste vil man ikke ha noe utslag i ATP selv om det ikke er hygienisk rent (f.eks. 1000 cfu på en 25 cm² svaberprøve). Disse undersøkelsene ble gjort på bakterier som var sultet. For bakterier i god vekst vil utslagene være høyere, men i slike tilfeller vil også smusset selv bidra til ATP-utslag.



Figur 6 ATP-nivå i ulike bakterier man kan finne på utstyr etter renhold i laks- og ørretproduksjon. Relative lysenheter per millioner bakterier vis.

5.2 Sammenheng mellom ATP og etablering av Listeria

Vi ville undersøke hypotesen om at høye ATP-utslag som følge av smuss betyr at man har detektert en nisje der Listeria potensielt kan etablere seg. Vi hadde vist i arbeidspakke 1 at antall lysenheter (RLU) er et mål på ATP-nivået og at det er ATP i smusset man finner etter produksjon av laks/ørret. Altså kan man med ATP-metoden få et mål på smussnivå. Spørsmålet var derfor om denne påvisningen av smuss nødvendigvis betyr at man har funnet en nisje hvor Listeria eller andre bakterier kan etablere seg.



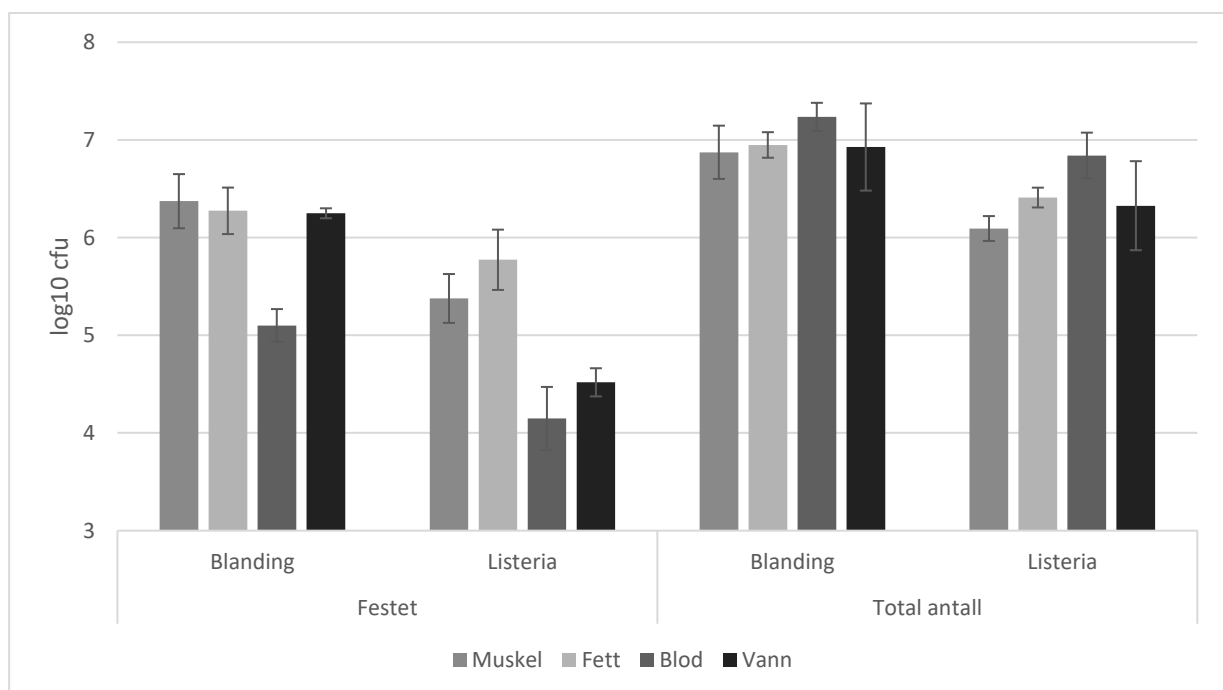
Vi ville altså ha svar på følgende spørsmål:

- Fester Listeria og andre bakterier seg bedre på de ulike typene smuss man finner i produksjon av laks/ørret enn om det er rent? Dette vil bidra til at de kan etablere seg på overflaten.
- Vokser Listeria og andre bakterier på de ulike typene smuss man finner i produksjon av laks/ørret? Dette kan gjøre at de vokser opp i konsentrasjoner man ikke kan fjerne ved vask og desinfeksjon.

5.2.1 Hvordan påvirker smuss potensialet for at bakterier fester seg til en overflate?

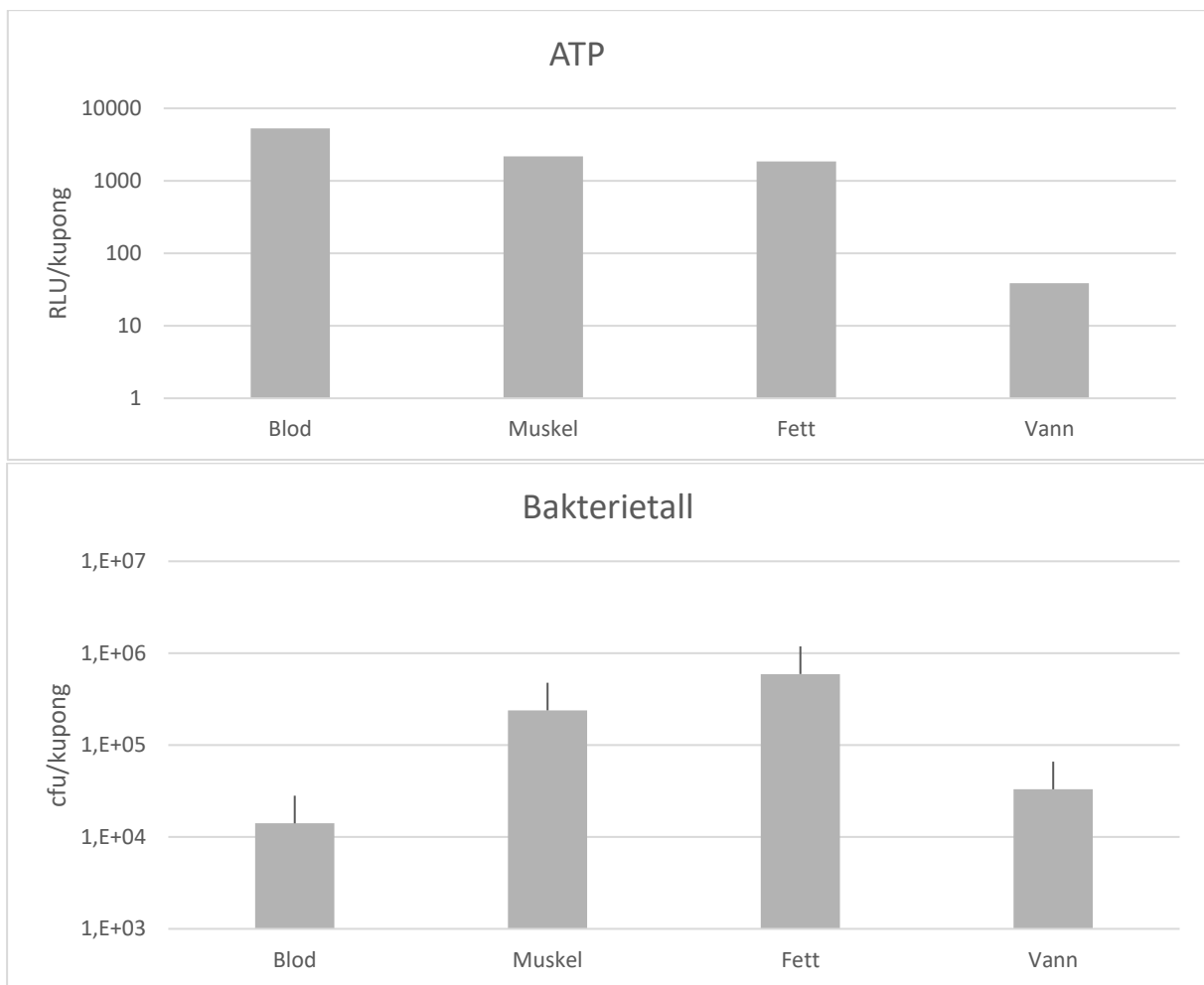
Bakterier fester seg bedre til en overflate med smuss fra buk fett eller filet enn en overflate med blod. Det er ikke en direkte sammenheng mellom antall bakterier som har festet seg til overflaten og utslag i RLU med ATP-metoden siden det først og fremst er mengde smuss man måler.

Vi tørket inn smussløsninger på stål og tilsatte en dråpe med enten en blanding av bakterier fra produksjonsmiljøet (inkludert Listeria) eller en blanding av Listeria. Deretter undersøkte vi hvor mange bakterier som festet seg på to timer. Listeria festet seg i lavere grad enn andre bakterier (Figur 7). Mens fettrikt (buk fett) eller proteinrikt (filet) smuss ga økt feste av Listeria sammenliknet med vann, ga blodsmuss lavere feste.



Figur 7 Antall listeria (angitt i logeneheter) og andre bakterier som fester seg til stålkuponger påført ulike typer smuss; buk fett, ryggmuskel og blod

For blandingskulturene var ATP-nivået meget høyt og det var ikke store forskjeller mellom vann og de ulike smusstypene. For Listeria ser man at for kupongen med blodsmuss får man relativt lav Listeria-festing og høyt ATP-tall. For fett og muskelsmuss får man høyere feste av Listeria, men lavere ATP-utslag. Det er viktig å notere seg at man opererte med høye nivåer smuss i disse forsøkene siden det skulle simulere en nisje hvor man ikke kom til for renhold. Det var også tilsatt meget høye tall Listeria for å kunne detektere forskjeller.

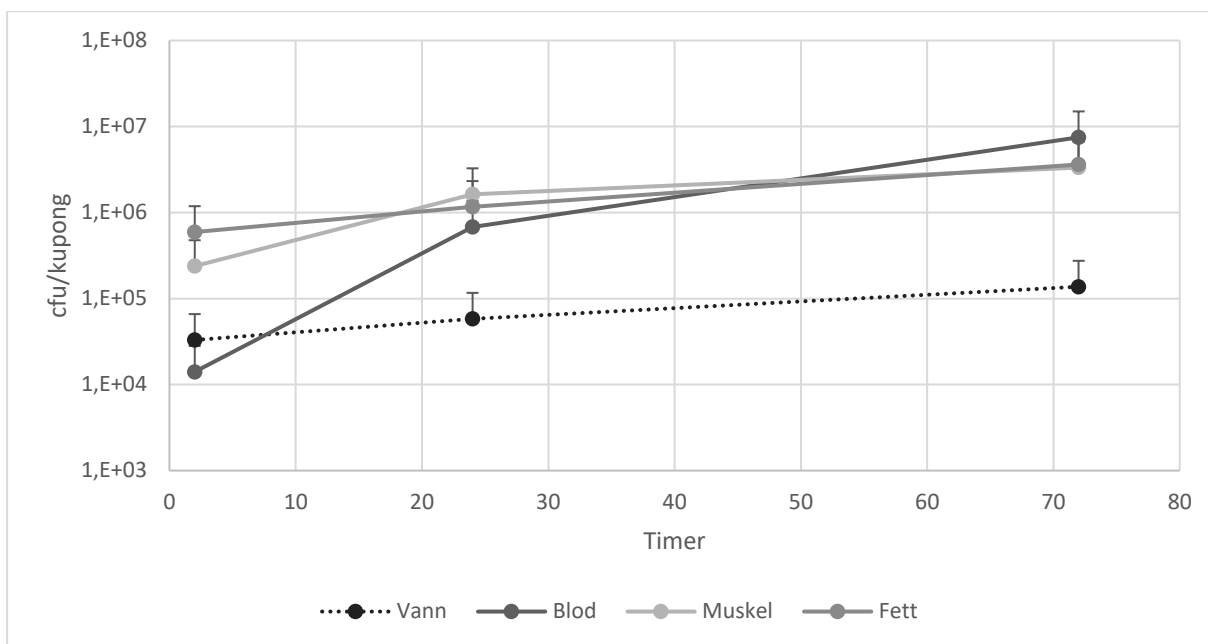


Figur 8 ATP-nivå og tilsvarende Listeria-tall på kuponger hvor man har tørket inn ulike typer smuss

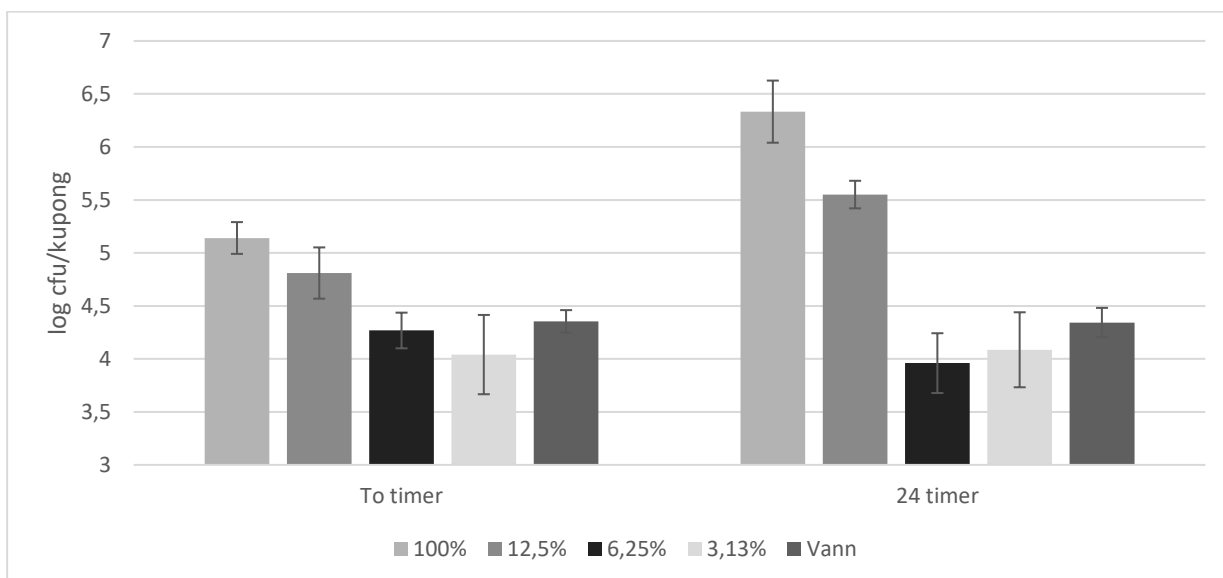
5.2.2 Vekst av Listeria på ulike typer smuss

Listeria vokser godt som biofilm på alle typer råvaresmuss fra ørretproduksjon: Blod, proteinrik og fettrik fraksjon. For fettrikt smuss vil man ikke nødvendigvis få utslag i ATP selv om det er høy nok mengde til at Listeria danner biofilm.

Forsøkene viste altså at Listeria og andre bakterier fester seg dårligere til en overflate med blod-smuss enn fettrikt/proteinrikt smuss. Betyr det at Listeria ikke vil etablere seg i områder med blod? Vi undersøkte biofilmdannelse på ulike typer smuss. Som man ser av figur 9 hadde man etter ett døgn så god vekst på blod at listeria-tallene var like høye som på andre typer smuss. Det var høye nivåer smuss i disse forsøkene og man fikk derfor høye ATP-verdier for alle typer smuss, høyest for blod. Vi undersøkte derfor lavere konsentrasjoner smuss. For fettrikt smuss fikk man økt feste og biofilmdannelse selv i en 12% fortykning av smusset, noe som tilsvarte 3 mg smuss (Figur 10). Denne mengden fettrikt smuss vil gi et ATP-utsalg på kun 8 RLU. Man fikk indikasjoner på at man for blodrikt smuss kan få utslag i ATP selv ved nivåer som ikke gir økt vekst av Listeria.



Figur 9 Biofilmdannelse av *Listeria* som vokser på ulike typer smuss. Kolonidannende enheter per kupong er plottet mot tid



Figur 10 Vekst og biofilmdannelse på kuponger med ulike nivåer fettriakt smuss (bukfett). Bakterietall (i logenheter) per kupong er angitt

5.3 Metoder for renholdkontroll i praksis

Laboratoriestudier kan si noe om styrker og svakheter med en metode, men når det kommer til stykket er det kun etter praktisk bruk man kan få et godt svar på om metoden er egnet. Ulempen med uttesting under praktiske forhold imidlertid er at man ikke kan styre de faktorene man ønsker å undersøke og det kan derfor være vanskelig å si noe om årsakssammenhenger. Selv om *Listeria* har en tendens til å

etablere seg i urene, fuktige nisjer og man har en metode som påviser disse nisjene vil det ikke være slik at man ofte får en Listeria-påvisning etter at en slik nisje har oppstått. I tillegg er typiske nisjer for Listeria ofte vanskelig å komme til, både for prøvetaking og renhold. Altså vil man oppleve at man finner nye nisjer under perioder med problemer som ikke har vært prøvetatt i perioden før problemet oppsto og man ha derfor ingen formening om smuss-nivået i utgangspunktet. Det at Listeria etablerer seg vil være såpass sjeldent at man må ta prøver over mange år for å få nok data til å kunne konkludere noe. Vi visste allerede ved oppstart av prosjektet at det kunne være vanskelig å få nok data for å konkludere fra praktiske studier innenfor rammene til dette prosjektet. Data fra overvåkingsprogrammene og ny systematisk prøvetaking kunne imidlertid si noe om normalnivåer og eventuelt bekrefte/avkrefte funn fra laboratoriestudiene. Vi

- analyserte prøvetakingsdata fra ordinær prøvetaking med ATP, kimtallanalyser og Listeria-analyser for å se på nivået i ulike avdelinger og bedrifter
- analyserte data fra prøveuttak fra tre bedrifter (en bedrift to ganger) der man tok prøver med ATP, kimtall (kontaktagar og svabermetode) og Listeria i samme prøvepunkt

Ved å sammenholde disse dataene var det mulig å forslå grenseverdier for ATP som er rimelige i situasjoner der hygienen er under kontroll. Vi kunne også se om indikasjoner fra laboratoriestudiene passet overens med det man finner i praksis.

5.3.1 Er det sammenheng mellom Listeria-nisjer og ATP-utslag i praksis?

Det er vanskelig å bruke ATP-metoden for å avdekke nisjer for Listeria i praksis

Hva sier ATP-metoden om et prøvepunkt er et Listeria-reservoar eller en nisje der Listeria kan etablere seg? Det var erfaringer fra prøvetaking i en av bedriftene som deltok i studien som indikerte at etter en periode med høye ATP-tall kunne man få et Listeria-funn, altså at man ved å måle renholdseffekten gjennom ATP-metoden kunne påvise nisjer der Listeria kunne etablere seg. Noen av resultatene fra laboratoriestudiene kunne støtte en hypotese om at ATP kan påvise Listeria-nisjer: Listeria kan danne biofilmer på alle typer råvaresmuss og videre fant man at alle typer smuss kunne måles med ATP-metoden. Andre resultater fra laboratoriestudier tydet på at ATP-metoden ikke indikerer en nisje for Listeria: Listeria i seg selv hadde lave nivåer ATP og den festet seg dårligst på smuss med høyt ATP-innhold (blod). Så hvordan vil dette slå ut i praktisk bruk av ATP-metoden?

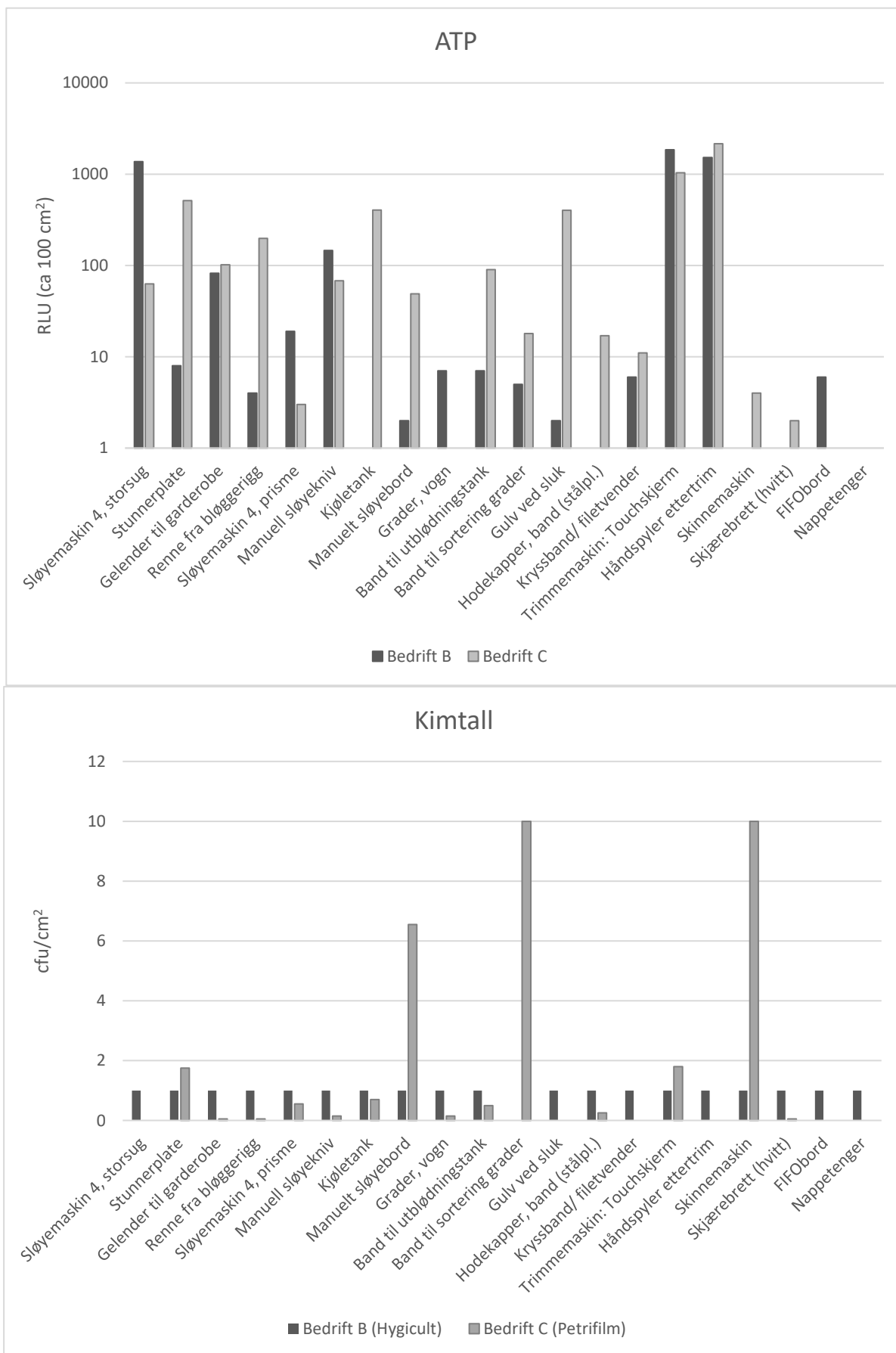
Det er gjort nye analyser på historiske data, men dette ga ufullstendige eller tvetydige svar. For eksempel fikk man at utstyr som generelt hadde lave ATP-nivåer oftere fikk påvisning av Listeria. Umiddelbart kan man tenke at Listeria etablerer seg i områder med lave ATP-nivåer, for eksempel der det er rent eller fettrikt smuss, men det er det for lite datagrunnlag for å påstå. Man kan tenke seg at påvisning av Listeria utløser mer intensivt renhold og derfor vil man tilsynelatende ha gjennomsnittlig lavere ATP-tall på utstyr som har gitt positive prøvesvar. Det var en utfordring med tolking av prøvesvar at man i noen tilfeller ikke hadde prøvetatt med ATP-metoden før Listeria-funn, kun etter. Det er da helt umulig å si noe om sammenhengen. I undersøkelsene der vi systematisk tok Listeria-prøver og ATP-målinger i de samme prøvepunktene (om lag 80 prøver totalt) fant vi ikke Listeria.

5.3.2 Er det sammenheng mellom høye kimtall og ATP-utslag i praksis?

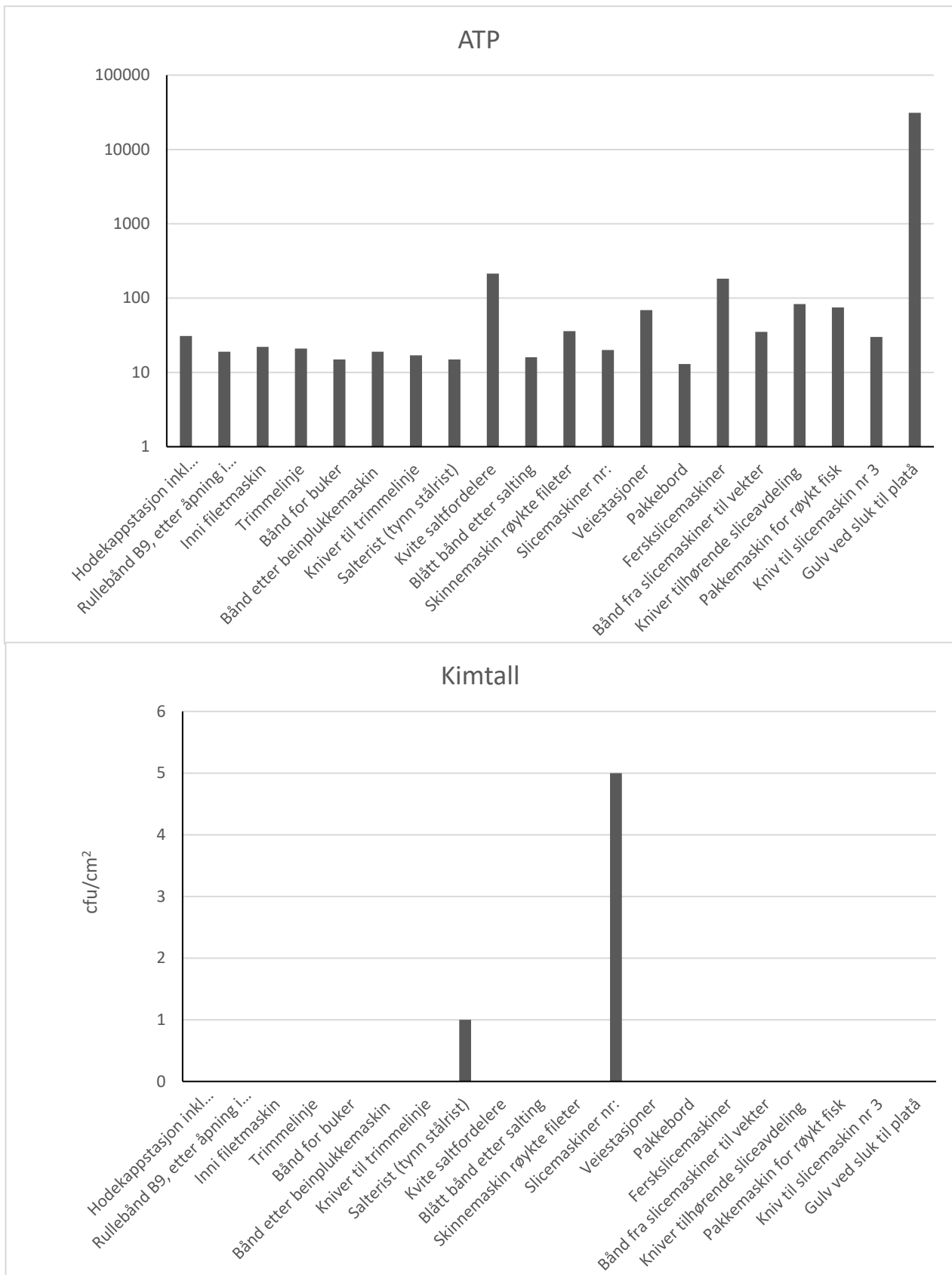
ATP-metoden måler mengde smuss og sier lite om bakterienivået i øyeblikket. Det er rimelig å anta at metoden vil avdekke dårlig renhold og at dette vil kunne slå ut i høyere bakterietall på sikt dersom man ikke gjør tiltak

Er det noen sammenheng mellom ATP-metoden og ordinære hygieneprøver? Vi sammenliknet antall avvik for renholdkontroll med ATP-metoden vs. kontaktagar over tid for historiske data. Vi fant at andel avvik med ATP-metoden (grenseverdi 100) var mye høyere enn for kontaktagar (4-5, Hygicult), særlig i slakteriet. Dette var i en situasjon med gode resultater på produktprøver. Å sette sin lit til ATP-metoden og en grenseverdi på 100 betyr altså at man noterer avvik på renholdet når alle andre parametere tyder på at renholdet er godt nok.

For å samle inn prøvetakingsvar på en mer systematisk måte ble det gjort prøveuttak fra punkter med erfaringsmessige høye og lave tall på ATP og/eller mikrobiologiske svaberprøver samt Listeria-analyser i en bedrift. Alle punkter var Listeria-negative og bakterietallene på overflatene var meget lave, men det var en del variasjon i ATP-nivået. For å få mer data på sammenhengen mellom ulike typer metoder for å måle renholdet ble det tatt parallelle prøver med ATP-metoden og kimtall (Hygicult eller Petrifilm) på 20 prøvepunkter i tre bedrifter. To av bedriftene tok også kimtallsprøver med svabermetode. Figur 11 viser resultater for Bedrift B og C som bruker Systemsure og tilsvarende for bedrift A er gitt i figur 12. Som man ser er det store variasjoner i ATP-målingene mellom prøvepunkter selv om bakterietallet er stort sett meget lavt. Dette tyder på at det først og fremst var smussnivå som ble målt. I disse undersøkelsene og i det første prøveuttaket der bakterienivået ble målt mer nøyaktig fant vi at prøver med høye bakterietall ofte, men ikke alltid, hadde høy ATP. Det kan være flere grunner til at man kan ha høy ATP og lave kimtall. Det kan skyldes tilfeldigheter siden prøvene ikke er like selv om de er i nærheten av hverandre, ferskt eller inntørket smuss vil ikke nødvendigvis inneholde mye bakterier og smuss fordelt på et større område vil ikke være tilgjengelig for bakteriene.



Figur 11 ATP målt med SystemSure og korresponderende kimtall i prøver fra to bedrifter. For kimtall oppgitt til 10 cfu/cm² var nivået høyere enn deteksjonsområdet til metoden (>10 cfu/cm²)



Figur 12 ATP målt med 3M og korresponderende kimtall i prøver fra to bedrifter

5.3.3 Hva er normale ATP-verdier for renholdsprøver i lakse-/ørretproduksjon?

Det er store variasjoner mellom prøvepunkter og avdelinger mht normalverdier for ATP. Som et minimum bør man ha ulike grenser for ulike avdelinger.

Dersom man skal bruke ATP som et grunnlag for å sette inn tiltak på renholdet må man ta utgangspunkt i hva som vil være normalnivå i en situasjon der man har gode resultater på produkt og miljøprøver for øvrig. Hva som er normalnivå varierer mellom bedrifter, avdelinger og spesifikke prøvepunkter. I Tabell 3 er det oppgitt snitt, minimum og maksimumsverdier for ATP-nivå i de tre bedriftene som er beskrevet over. Som forventet ga målingene i bedrift A, som bruker 3M Cleantrace, aldri verdier under 10 (for denne metoden får man utslag på 10 i rent vann). I bedrift B og C, som bruker SystemSure lå verdiene gjennomgående lavere, selv om bakterienivåene var noe høyere (se 5.3.1).

Tabell 3 Måling av ATP etter renhold i tre bedrifter

Bedrift	# Prøver	Snitt	Minimum	Maksimum
Bedrift A	20	1603	13	31136
Bedrift B	19	265	0	1850
Bedrift C	19	271	0	2162

Vi gikk også gjennom historiske data. Utgangspunktet var data fra renholdsprøver fra to av bedriftene, hvorav den ene hadde brukt ATP-metoden i flere år og den andre i noen måneder i forbindelse med ordinær renholdkontroll. Begge brukte SystemSure. For anlegget man hadde tatt ut mer enn 3000 ATP-prøver over tre år lå 10% av prøvene over 300 RLU og 75% under 80 RLU (SystemSure). Det var store forskjeller mellom avdelingene. På filetavdelingen lå 10% av prøvene over 100 RLU og på slakteriavdelingen lå 10% over 1000 RLU. I den andre bedriften var tilsvarende tall hhv 20 og 400.

Hva betyr et utslag på 400 RLU egentlig (SystemSure)? Hvis man tenker seg en grenseverdi på rundt 400 i en slakteavdeling hvor det er mye smuss i form av blod vil man få utslag i en prøve som inneholder om lag 1 ul blod (Tabell 1). Det er altså lite rester etter renhold som skal til for å få et slik utslag i en utblødningstank. I et område med fettriakt smuss vil et utslag på 400 RLU bety en smussmengde i størrelsesorden 100 ul (0.1 ml). Det betyr en klar svikt i renholdet. Konsekvensene av dette for bakterievekst er ikke opplagt. 1 ul blod eller 100 ul fettriakt smuss vil i prinsippet gi næring til et stort antall bakterier. Men det har noe å si om smusset er fordelt utover en større flate som tørker ut eller om det ligger samlet i en fuktig sprekk. Det er kun i det siste tilfellet smusset kan gi opphav til bakterievekst. Derfor er det viktig å ha en prøvetakingsmetode for å ta prøver i fuktige nisjer i utstyret.

For totalt 40 prøvepunkter tok vi prøver med svabring parallelt med kontaktagar for å se om man klarte å løsne flere bakterier. Det var såpass høy hygiene at de fleste prøvepunktene ga lave eller ingen utslag på bakterietall, så det var vanskelig å konkludere mht hvilken metode som gav best svar. Fordelen med svabring er at man kan komme til i områder man ikke kan prøveta med kontaktagar. Utfordringen er å finne en svabermetode hvor man kan bruke mekanisk energi for å løsne bakteriene og som er egnet for bruk i industrien. Kommersielle prøvetakingssystemer er ofte basert på å bruke svaber på en pinne og det er begrenset hvor mye kraft man kan bruke. I denne undersøkelsen brukte vi kompresser, sterile hansker kombinert med rør med nøytraliseringsvæske. Dette systemet er ikke kommersielt tilgjengelig.

6 Hovedfunn

- ATP-metoden gir et mål på smussnivå på overflater etter renhold, men nivået vil variere med type smuss.
- I avdelinger med mye fett, salt og eller røyksyre må man ha lavere avviksgrenser for ATP
- I avdelinger med mye blod eller med varmebehandlet produkt kan man sette høyere avviksgrenser for ATP.
- På tørre områder kan man få utslag i ATP selv om bakterier ikke har mulighet til å vokse og etablere seg.
- ATP-metoden forteller noe om hvor godt renholdet er, men kan ikke erstatte mikrobiologiske analyser.

7 Leveranser

- To populærvitenskapelige artikler
- En kort anbefaling om renholdskontroll
- Presentasjon av resultater på et faglig møte med tilhørere fra bransjen
- En mastergrad

8 Vedlegg: Metodikk

8.1 Måling av ATP

ATP-nivå ble målt ihht leverandørens anbefalinger. To instrumenter ble benyttet: SystemSURE plus™ med UltraSnap ATP svabere (Hygiena) og 3M Clean-Trace NG Luminometer med Clean-Trace surface ATP UXL100 svabere). Standard ATP ble kjøpt inn fra en leverandør av kjemikalier (Sigma).

For måling av ATP i smuss ble det påført 10 ul til svaber. Deretter ble ATP-nivå målt som anbefalt av leverandør. Ellers ble svaber brukt på overflater ihht standard prosedyre.

8.2 Smuss, kjemikalier og renholdsmidler brukt til eksperimenter

Fettsuspensjon

- Fettrand fra ørretbuk ble skåret ut
- Fettet ble tilsatt like deler destillert vann og stomachet 30 sekunder
- Fettsuspensjon ble fordelt på rør og frosset ned ved -20C

Muskelsuspensjon

- Loin ble skåret ut fra ørret
- Muskelen ble skåret i biter, tilsatt like deler destillert vann og stomachet 30 sekunder
- Muskelsuspensjon ble fordelt på rør og frosset ned ved -20C

Blod

- Ørretblod ble fordelt på rør og frosset ned ved -20C

Lakseolje

- H-oil fra Hordafor ble frosset ned ved -20C

Renholdsmidler

- ACO Hygiene fra ACO
- ISS Alkaliform 27 fra Ecolab
- Diverform Active fra Lilleborg

Røyksyre

Røyksyre (Smokez Enviro 24PA) fra Red Arrow International, Manitowoc

8.3 Bakteriestammer brukt i eksperimenter

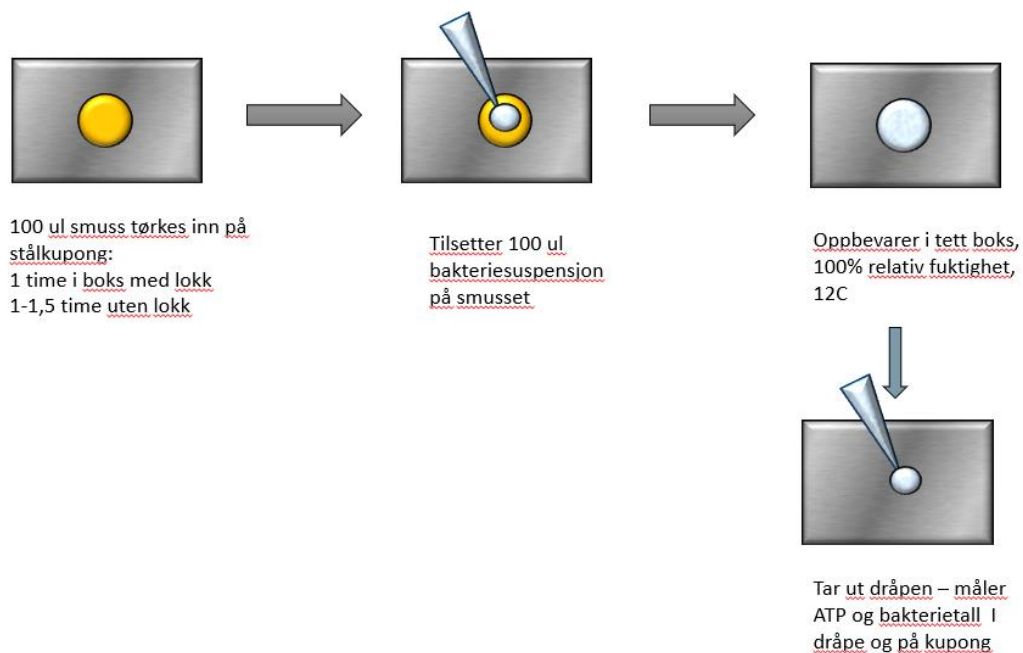
Slekt/art	Kilde i produksjonsmiljø for laks
Aeromonas 1	Sløyemaskin prismer
Aeromonas 2	Plastflipp/transportør
Shewanella putrefaciens	Sløyemaskin prismer
Shewanella sp.	Vektbånd
Acinetobacter sp. 1	Bånd skinnemaskin
Acinetobacter sp. 2	Transportbånd
Serratia sp	Baader, kniv
Serratia liquefaciens	Transportbånd

Slekt/art	Kilde i produksjonsmiljø for laks
Pseudomonas 1	Transportør
Pseudomonas 2	Transportør
L. monocytogenes 1	Transportbånd
L. monocytogenes 2	Sluk
L. monocytogenes 3	Sluk
L. monocytogenes 4	Transportbånd
L. monocytogenes 5	Transportbånd
L. innocua	Transportbånd

Bakteriene ble dyrket i laksebuljong ved 12°C, vasket og oppbevart i fysiologisk saltvann i tre døgn før målingene av ATP ble utført. For biofilmforsøk ble bakteriene dyrket på samme måte og blandet i like deler før påsetting på kupong.

8.4 Festing og biofilmdannelse på kuponger

Figuren under illustrerer metoden for å undersøke festing og biofilmdannelse på kuponger.



8.4.1 Forsøksoppsett biofilm

- Rene kuponger av rustfritt stål plasseres i agarskåler (fire i hver).
- 100 µl smuss pipetteres på hver kupong i sterilbenk
- Sett på lokk og la stå 1 time.
- Lokket tas av og kupongene står ytterligere i 1,5-2 timer i sterilbenk til smusset er tørket.
- Tilsett 100 µl kultur med omtrent log 10 000 000 – 100 000 000 CFU/ml på samme punkt som det tørkede smusset.

- Som kontroll ble det laget kuponger hvor vann ble applisert på tørket smuss istedenfor bakteriekultur.
- Kupongene inkuberes i biofilmkammer uten lokk ved 12 °C og 100 % RH
- Uttak etter 2, 24 og 72 timer
 - Bakterietall og ATP av dråpe (skal illustrere det som blir skylt av)
 - Bakterietall og ATP på kupong (vha svabring)

8.4.2 Analyse

L. mono mix → TSA 30°C/2 døgn

Total mix → RLM 37°C/2 døgn (listeria) og Jernagar 30°C/2 døgn

UTTAK -før skylling (dråpe)

CFU – kupong A: 10 ul pipetteres over i 990 ml sterilt vann før skylling – fortynnes videre til riktig konsentrasjon.

ATP – kupong B: 10 ul pipetteres over på ATP UltraSnap svaber

UTTAK – etter skylling med 10 ml sterilt vann vha stripette (kupong)

CFU – kupong A: Overføres til sonikeringsrør og soniker i 10 minutter. Fortynn videre til riktig konsentrasjon.

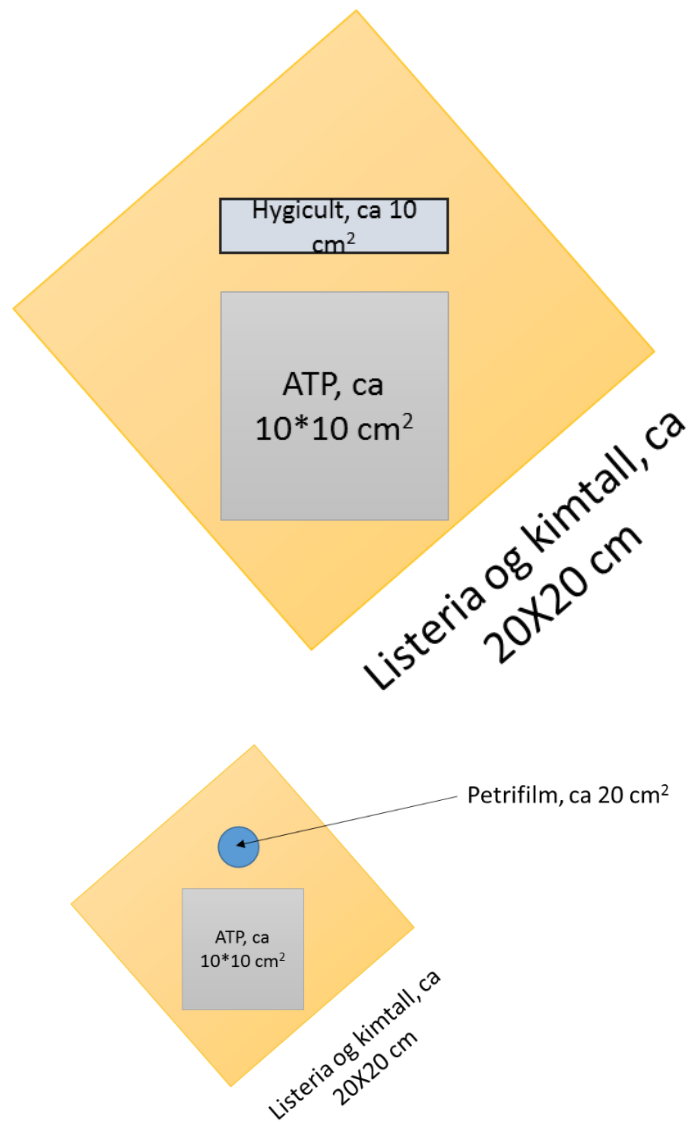
ATP – kupong B: Hele kupongen svabres med UltraSnap svaber og måles direkte

8.5 Prøveuttak i bedrifter – prosedyre

Det tas prøver etter renhold i tre ulike anlegg og i ulike avdelinger. Ideelt sett bør man teste ut alle prøvemethoder i samme prøvepunkt, men det er ikke mulig i praksis:

1. Har man tatt prøve fra et areal han man fjernet bakterier/smuss fra arealet.
2. Det er umulig å bruke kontaktagar på flater som ikke er plane

Prøvetakingen vil derfor bygge på en antakelse om at områder med samme materiale og som ligger nært inntil hverandre har ca. samme nivå smuss/bakterier. Man tar prøver i henhold til figur under:



I noen punkter vil det ikke være mulig å bruke hygicult eller petrifilm – da tar man kun ATP og kimtall/listeria.

I andre punkter kan man ikke ta så stort areal – da noterer man ned omtrentlig areal.

8.5.1 Prøvetakingsmetodikk

Visuell kontroll

Noter ned om det er synlig smuss og fuktighet på området

ATP-prøver

- ATP-måler
- Tilhørende svaber

Prøvetaking ihht leverandørens anbefalinger.

1. Svabre 10*10 cm på samme måte som du pleier.
2. Mål ATP.
3. Noter ned utslag i skjema

Kimtall - kontaktagar

Bruk det du pleier å bruke - Hygicult eller Petrifilm (metodebeskrivelse vedlagt)

1. Prøvetaking ihht leverandørens anbefalinger.
2. Inkuber på benk eller maks 30C
3. Noter ned bakterievekst i skjema

Kimtall og Listeria – svabermetode

- Sterile kompresser (Nofima sender)
- Rør med nøytraliseringsmedium (Nofima sender)
- Petrifilm for totalkim (no. 6478)

