

# Metoder for påvisning av *Listeria* i mat og produksjonsmiljø

## Delrapport 2: Nye metoder og teknologier



Foto: Jon-Arne Berg

Birgitte Moen, Solveig Langsrud og Annette Fagerlund

Nofima er et ledende matforskningsinstitutt som driver med forskning og utvikling for akvakulturnæringen, fiskerinæringen og matindustrien. Vi leverer internasjonal anerkjent forskning og løsninger som gir næringslivet konkurransefortrinn langs hele verdikjeden.

«Bærekraftig mat til alle» er vår visjon.

### Kontaktinformasjon

Telefon: 77 62 90 00

post@nofima.no

www.nofima.no

NO 989 278 835 MVA



#### Hovedkontor Tromsø

Muninbakken 9–13

Postboks 6122

NO-9291 Tromsø



#### Stavanger

Måltidets hus

Richard Johnsensgate 4

Postboks 8034

NO-4068 Stavanger



#### Sunndalsøra

Sjølsengvegen 22

NO-6600 Sunndalsøra



#### Ås

Osloveien 1

Postboks 210

NO-1433 ÅS



#### Bergen

Kjerreidviken 16

Postboks 1425 Oasen

NO-5844 Bergen

## Rapport

<i>Rapportnummer:</i> 6/2024	<i>ISBN:</i> 978-82-8296-776-1	<i>ISSN:</i>
<i>Dato:</i> 30. januar 2024	<i>Antall sider + sider vedlegg:</i> 29+0	<i>Prosjektnummer:</i> 13991
<i>Tittel:</i> <b>Metoder for påvisning av Listeria i mat og produksjonsmiljø – Delrapport 2: Nye metoder og teknologier</b>		
<i>Title:</i> Methods for Listeria detection in food and food processing environment – Report 2: New methods and technologies		
<i>Forfatter(e):</i> Birgitte Moen, Solveig Langsrud og Annette Fagerlund		
<i>Avdeling:</i> Trygg og holdbar mat		
<i>Oppdragsgiver:</i> FHF		
<i>Eksternt prosjektnummer/Oppdragsgivers ref.:</i> 901822		
<i>Stikkord:</i> Hurtigmetoder, Listeria, sjømatindustri		
<i>Sammendrag/anbefalinger:</i> Det er et stort ønske fra aktører i sjømatindustrien å få en raskere metode for påvisning av listeria. Som en del av et FHF prosjekt så er det vurdert om det er faglig og teknisk mulig å utvikle en metode for påvisning av listeria i løpet av 20-30 minutter. Selv om det er framskritt på forskningsfronten på hurtigmetoder så er det fortsatt mangler på enten sensitivitet, selektivitet eller robusthet. Med dagens regelverk og teknologi vil det ikke være mulig å utvikle en hurtigstest som tar 20-30 minutter. Det er likevel rom for forbedring av dagens metoder i form av kortere og mer selektiv oppformering, mer presise metoder (f.eks. skille mellom levende og døde bakterier), samt få mer informasjon i form av typing. Det kan kanskje være mulig å oppnå en metode som tar 8-10 timer, noe som ville være veldig nyttig for sjømatindustrien. Rapporten inneholder en oppsummering av en brukerundersøkelse, og en oversikt over nye metoder fra vitenskapelige publikasjoner.		
<i>English summary/recommendation:</i> There is great interest from stakeholders in the seafood industry to get a faster method for detecting listeria. As part of an FHF project, it has been assessed whether it is scientifically and technically feasible to develop a method for detecting listeria within 20-30 minutes. Although there is progress on the research front in rapid methods, there is still a lack of either sensitivity, selectivity, or robustness. With current regulations and technology, it will not be possible to develop a rapid test that takes 20-30 minutes. However, there is still room for improvement of current methods in the form of shorter and more selective enrichment, more precise methods (e.g. separation between live and dead bacteria) and obtaining more information in the form of typing. It might be possible to achieve a method that takes 8-10 hours, which would be very useful for the seafood industry. The report contains a summary of a user survey and an overview of new methods from scientific publications.		

## Innhold

<b>1</b>	<b>Sammendrag</b>	<b>5</b>
<b>2</b>	<b>Innledning</b>	<b>6</b>
2.1	Bakgrunn og målsetning	6
2.2	Fremgangsmåte	6
<b>3</b>	<b>Kartlegging av industriens behov</b>	<b>7</b>
3.1	Om spørreundersøkelsen	7
3.2	Resultater fra undersøkelsen	8
3.2.1	Hvilke områder tas det listeriaprøver?	8
3.2.2	Hva er beste måte å redusere listeria?	9
3.2.3	Benyttes hurtigmetode på råvare, sluttprodukt eller miljø?	10
3.2.4	Erfaringer med hurtigmetoder	10
3.2.5	<i>Listeria</i> spp. versus <i>L. monocytogenes</i> test	10
3.2.6	Hvor rask må en hurtigmetode være?	11
3.2.7	Betalingsvilje	12
3.3	Intervju med bransjeaktører	12
<b>4</b>	<b>Nye metoder for hurtigere påvisning av <i>L. monocytogenes</i></b>	<b>13</b>
4.1	Fremgangsmåte for litteraturstudium	13
4.2	Oppformering i selektivt medium	14
4.3	Oppkonsentrering av listeriaceller fra prøve eller selektivt medium	15
4.3.1	Magnetisk separasjon	15
4.3.2	Filtrering og sentrifugering	16
4.4	Nukleinsyre (DNA/RNA) baserte metoder	16
4.5	CRISPR-Cas baserte biosensorer	18
4.6	Bakteriofag-baserte biosensorer	19
4.7	Overflate-forsterket Raman spektroskopi (SERS)-baserte biosensorer	20
4.8	Gass-sensorer og elektroniske neser	21
4.9	Forbedringer av lateral flow kromatografisk analyse (LFA)	22
4.10	Automatiserte system	22
<b>5</b>	<b>Genotyping</b>	<b>23</b>
5.1	Quasimetagenomikk	23
5.2	LamPORE	23
5.3	PCR-basert typing	23
5.4	Typing med real-time PCR	24
<b>6</b>	<b>Hva tenker analyseleverandørene?</b>	<b>24</b>
<b>7</b>	<b>Oppsummering og konklusjon</b>	<b>26</b>
<b>8</b>	<b>Referanser</b>	<b>28</b>

# 1 Sammendrag

Denne rapporten beskriver et mulighetsstudium for å utvikle en hurtigmetode for på å påvise *Listeria monocytogenes* (listeria). Vurderingene bygger på en spørreundersøkelse av 55 laks- og ørretbedrifter (de fleste fra Norge, Frankrike og Chile), søk i vitenskapelig litteratur og intervjuer av analyseleverandører og lakseprodusenter.

For å redusere problemer med listeria er en god hurtigmetode rangert høyt på ønskelista til lakseprodusenter. Flere produsenter hadde dårlige erfaringer med dagens hurtigmetoder, på grunn av falske positive eller negative svar. Dagens 'hurtigmetoder' er heller ikke spesielt raske. Selv om det ville være ønskelig med en metode som erstatter ISO-metoden som myndighetene spør etter, mener de fleste fabrikkene at en ikke-validert metode også er nyttig. Dette gjenspeiles i at de fleste ikke være villig til å betale mye mer for en validert analyse enn en ikke-validert.

En metode som gir raskere svar ville kunne betyr mye for mattryggheten. Dersom man hadde en test som tok under 30 minutter ville det for mange bety at de kunne vaske på nytt dersom det viste seg at renholdet ikke var tilstrekkelig. I dag er raskeste (validerte) analysetid for listeria 20 timer hvorav om lag 90% av tiden er oppformeringstrinnet og 10% påvisningstrinnet. I tillegg må mange legge til tid for transport til eksternt laboratorium. I praksis betyr dette at man i beste fall får man svar på prøvene innen et døgn etter at de er tatt.

Det forskes mye på DNA-baserte påvisningsmetoder for å raskere og sikrere påvise listeria, noe som kan redusere påvisningstid fra dagens 1-2 timer ned til 30 minutter. Det forskes også på metoder som er enda hurtigere, for eksempel basert på kromatografi eller biosensorer, men deteksjonsgrensene er så langt fra det man trenger for listeria-analyser at de ikke er relevante.

Det største potensialet for å redusere analysetiden for listeria ligger i en kombinasjon av 1) trygge, automatiserte analysesystemer med høy kapasitet (mer enn ~20 prøver om gangen) som gjør at listeria-analyser kan utføres på fabrikkene og 2) oppformeringsmetoder (listeriaceller, DNA og/eller separasjon for å oppkonsentrere bakterieceller) som betydelig korter ned de 18 timene man per i dag bruker på oppformering. Dersom teknologiske barrierer overkommes og markedet etterspør det, kan det kanskje i fremtiden være mulig å komme ned på en analyse tid på 8-10 timer. Dette vil for om lag halvparten av laks- og ørretbedriftene bety at de vil kunne varsle renholdere før neste renhold og holde tilbake produkter før de når markedet. Dette vil være et viktig fremskritt for bedre kontroll med listeria.

For å finne listeriareservoarer og -spredningsveier eller ved risikovurderinger er det ofte behov for mer høyoppløselige identifiseringsmetoder enn å påvise art. Her er også analysetid en viktig begrensende faktor siden det i praksis ofte tar flere uker fra man sender en prøve til man får svar. På dette området er det flere lovende teknologier på vei, og i prinsippet vil det kunne være mulig å utvikle teknologi som gir mer høyoppløselig informasjon (dog presumptiv) på samme tid som påvisning. Det er her viktig å notere seg at mens en listeriapåvisning gir et enkelt svar å tolke (positiv/negativ), vil typingsdata kreve brukervennlig programvare og tolkingen kan ta mer tid.

Per i dag synes det mest hensiktsmessig å utvikle metoder som forkorter oppformeringstrinnet kombinert med en genetisk deteksjonsmetode, gjerne en som kan tilpasses behov for mer høyoppløselig informasjon enn art. Det kan være nødvendig å utvikle en metode som er skreddersydd laksenæringens forhold og behov.

## 2 Innledning

### 2.1 Bakgrunn og målsetning

Fiskeri- og Havbruksnæringens Forskningsfond (FHF) ønsker at havbruksnæringen skal inneha bedre kunnskap om nye løsninger for forebygging og håndtering av listeria. FHF har i den forbindelse finansiert et mulighetsstudium for å avklare om det er faglig og teknisk mulig å utvikle en metode/metodikk som påviser eventuell forekomst av listeria i løpet av 20-30 minutter. Prosjektet '*Utvikling av hurtigtest for påvisning av Listeria – Et mulighetsstudium*' skal kartlegge om det er teknologisk mulig å få påvisningstiden ned til 20-30 minutter og anslå hva det vil koste å utvikle en slik hurtigmetode.

I et hav av nye metoder og teknologier er det viktig for næringen å få en oversikt over fordeler og ulemper, utfordringer og muligheter, samt retningslinjer for validering av nye metoder opp mot de godkjente ISO-standardene. I delrapport 1 [1] finner man en oversikt over metoder på markedet i tillegg til regelverk og referansemetoder, trinnene i en mikrobiologisk påvisning og validering, samt prinsippene bak eksisterende teknologier for metoder på markedet. Denne rapporten er andre delrapport i prosjektet og inneholder en **oversikt over nye metoder og teknologier**.

### 2.2 Fremgangsmåte

For å sørge for nytteverdi for næringen, har vi gjennomført en spørreundersøkelse blant bedrifter i flere land og gjort dybdeintervjuer med norske bransjeaktører.

**Spørreundersøkelsen** ble gjennomført mellom juni og november 2023 i samarbeid med FHF prosjekt 901821. Undersøkelsen var webbasert og ble sendt ut til et bredt utvalg av bedrifter (fisk, kjøtt og ost) i flere land og var tilgjengelig på flere språk (norsk, engelsk, spansk, portugisisk og fransk). Alle besvarelser var anonyme. Det var kun bedrifter innen laks- og ørretproduksjon som fikk spørsmål knyttet til listeria hurtigmetoder. Totalt fikk vi inn 55 besvarelser fra disse bransjene, og disse resultatene er presentert i denne rapporten. Resultater fra den komplette spørreundersøkelsen vil bli publisert i FHF prosjekt 901821.

**Undersøkelse av vitenskapelig litteratur.** Nye gjennombrudd i teknologi blir ofte først publisert i akademiske tidsskrift. For å undersøke hvilke nye metoder som kan være relevante ble det gjort en kartlegging av vitenskapelig litteratur 21.09.2023.

Resultatene fra spørreundersøkelsen og litteraturgjennomgangen ble diskutert med tre representanter fra bransjen. Ut fra svarene fra spørreundersøkelsen og tilbakemeldinger fra referansegruppen ble tre **utstysrleverandører** kontaktet for intervju. Intervjuene var godkjent av etisk råd i Nofima og i SIKT ([www.sikt.no](http://www.sikt.no)).

### 3 Kartlegging av industriens behov

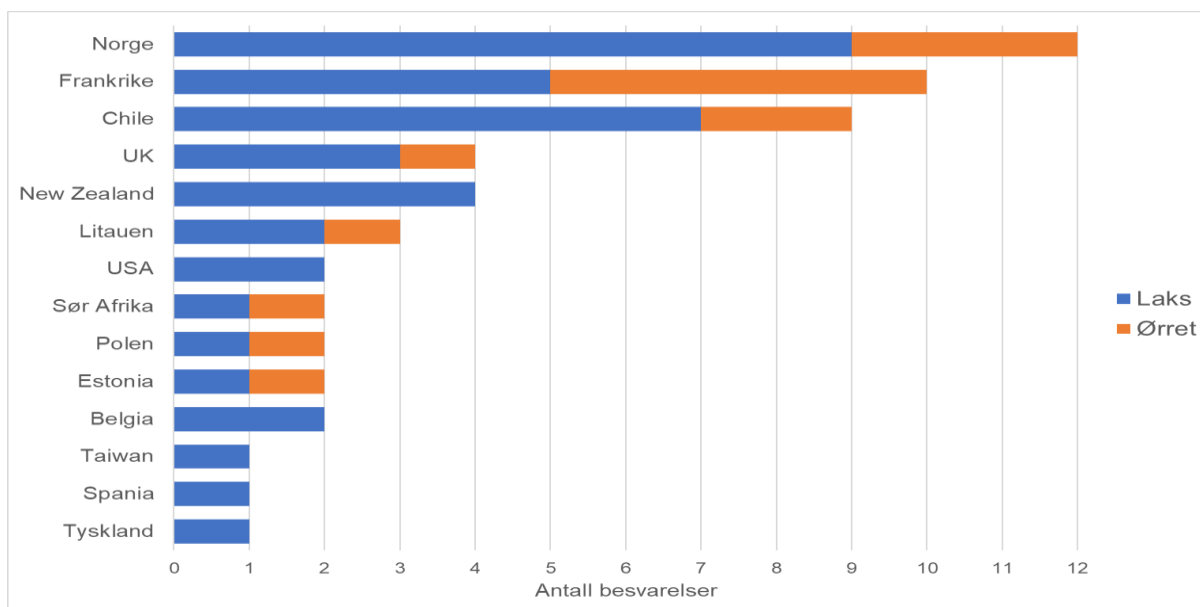
#### 3.1 Om spørreundersøkelsen

I spørreundersøkelsen ble bedrifter innen laks- og ørretproduksjon spurt om hvilke områder de tar listeriaprøver av, hvilke metoder de benytter for listeriaanalyser, om de benytter hurtigmetoder (og i så fall, hvilke) og om hvilke erfaringer de har med hurtigmetoder for å påvise listeria.

I tillegg ble de spurt om hvor rask en hurtigmetode må være for å kunne sette inn risikoreduserende tiltak: vaske på nytt før produksjonen starter, avvise råvarer fra en leverandør, omrokere produksjonsplan, holde tilbake produkter inntil verifisert prøvesvar er klart, unngå at varene kommer ut i butikk før verifisert prøve, varsle kunder om mulig positiv prøve, osv.

Videre ble det spurt om betalingsvilje for ulike tider for en hurtigtest for validert og ikke-validert metode, samt om en *Listeria spp.* test kunne være tilfredsstillende i noen scenarioer.

Totalt fikk vi inn 55 besvarelser fra bedrifter i bransjene laks- og ørretproduksjon (40 fra laks og 15 fra ørret). Ikke alle spørsmålene i undersøkelsen var obligatoriske, og antall besvarelser (n=) vil derfor variere. De fleste besvarelser var fra Norge, Frankrike og Chile (Figur 1). De fleste besvarelsene var fra store (>100 årsverk, n=25) eller mellomstore (10-100 årsverk, n=12) bedrifter, mens seks var fra små bedrifter (<10 årsverk).

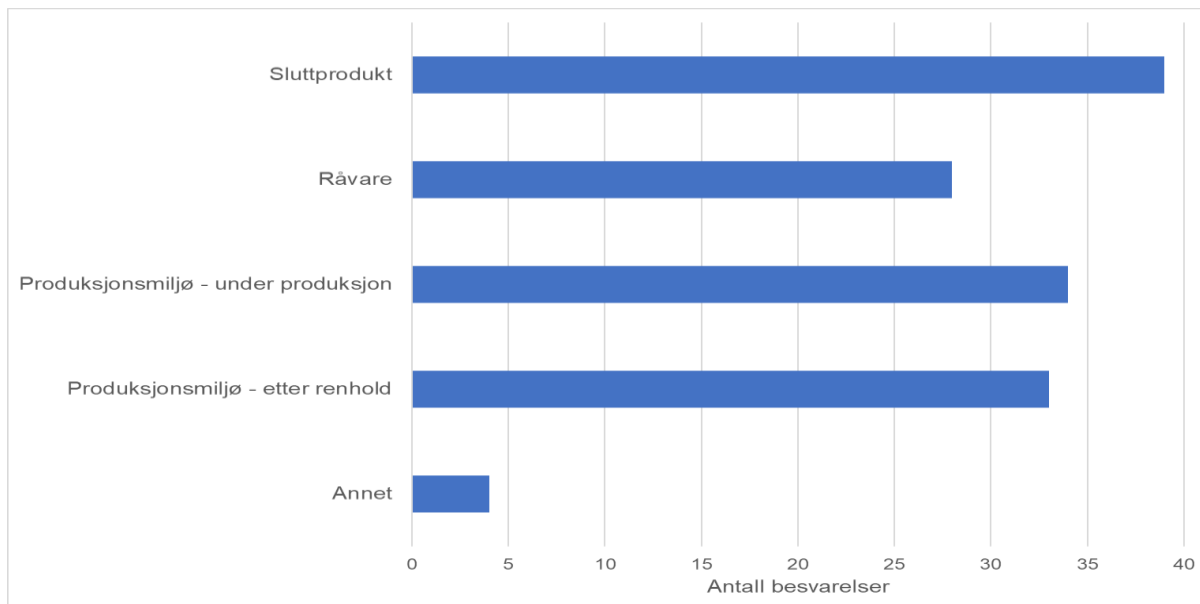


**Figur 1.** Oversikt over antall besvarelser fordelt på land og type råstoff (laks og ørret).

## 3.2 Resultater fra undersøkelsen

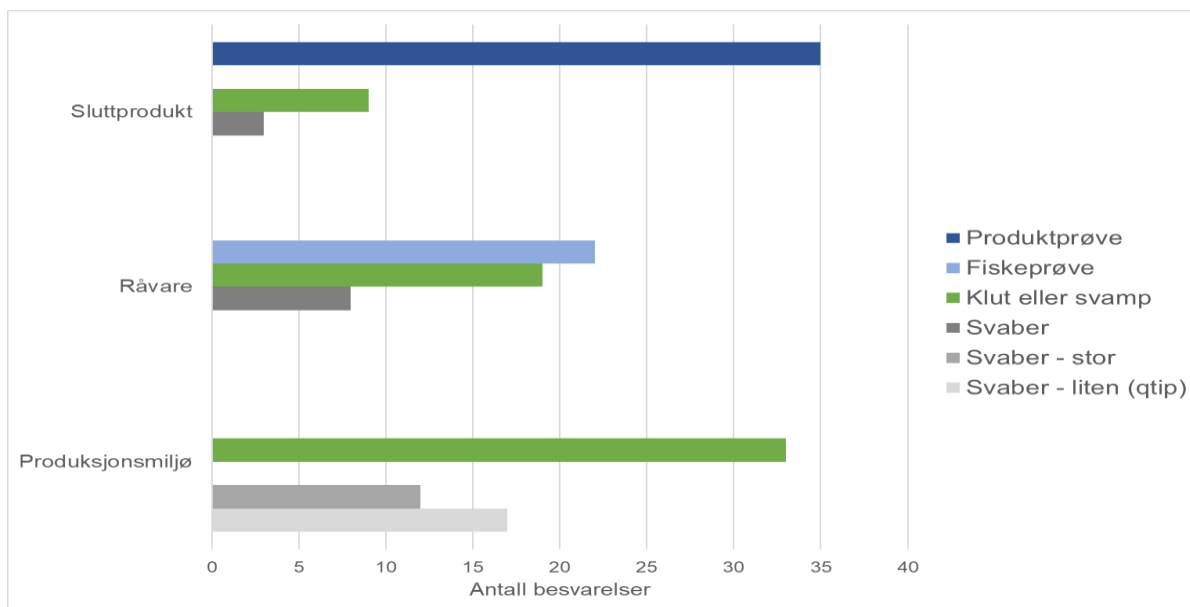
### 3.2.1 Hvilke områder tas det listeriaprøver?

De fleste laks- og ørretprodusentene oppgir at de tar listeriaprøver fra sluttprodukt, råmateriale, produksjonsmiljø under produksjon og produksjonsmiljø etter renhold (Figur 2).



**Figur 2.** Oversikt over hvor produsentene tar listeriaprøver. Figuren viser kun de som svarte at de produserer laks eller ørret (n=43), men disse kan også produsere andre typer fisk.

Når de ble spurt om hvordan de tar listeriaprøver på de ulike områdene så svarte de fleste at de tok produktprøve av sluttprodukt, fiskeprøve eller svabret råvarer med klut eller svamp, mens for produksjonsmiljø ble både klut og svamp, og svaber på pinne (liten og stor) benyttet (Figur 3).



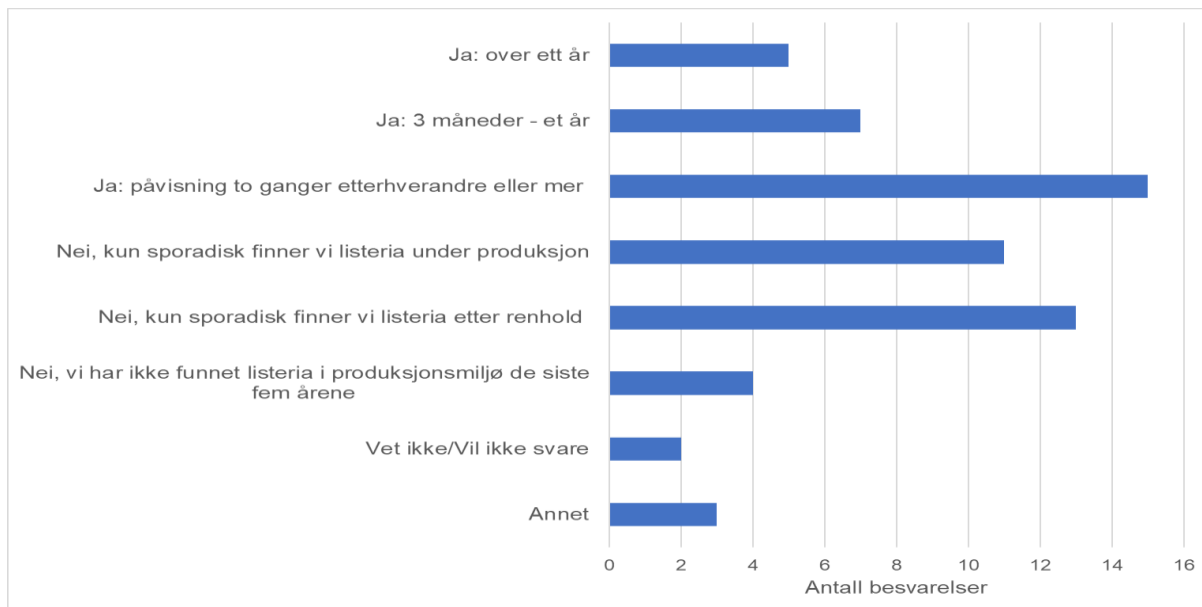
**Figur 3.** Oversikt over hvilke prøvetakingsmetoder som blir benyttet på de ulike prøvetypene (n=43).

Flere av de spurte brukte flere typer prøvetaking på de ulike områdene eller produktene. Av de spurte så var det 18 som kun brukte klut/svamp på produksjonsmiljø, fem på råvare og to på sluttprodukt. Det var ingen som kun brukte svaber på råvare, mens det var åtte som oppga at de kun brukte svaber på



produksjonsmiljø. En av de spurte oppga å kun bruke svaber også på sluttprodukt. Dette var en bedrift som produserte kaldrøkt laks og som kun tok sluttproduktprøver og ikke råvare eller produksjonsmiljø.

Når de ble bedt om å tenke på de siste fem årene så svarte omtrent halvparten at de hadde påvisning på samme prøvepunkt over en lengre periode, det vil si at de muligens har persistente listeriestammer (husstammer) som de ikke klarer å bli kvitt, eller som kommer gjentatte ganger inn i bedriften via råvarer (Figur 4).



**Figur 4.** Oversikt over frekvensen av listeria påvisninger i samme prøvepunkt over de siste fem årene (n=43).

### 3.2.2 Hva er beste måte å redusere listeria?

Deltagerne i spørreundersøkelsen ble spurt om å velge fem tiltak de mente var de beste for å redusere listeria (man kunne velge så mange tiltak man ville). På topp så kom det å lettere kunne komme til for rengjøring, mens en metode for raskere påvisning av listeria kom som nummer tre på denne listen (Figur 5). Blant 'annet' så svarte én helgenomsekvensering, noe som er interessant opp mot at det er flere bedrifter som oppgir at de har gjentagende problemer med listeria.



**Figur 5.** Rangering av de beste tiltakene for å redusere listeria (n=41).

### 3.2.3 Benyttes hurtigmetode på råvare, sluttprodukt eller miljø?

Mange brukere svarer nei på spørsmål om de bruker hurtigmetoder, men noen svarer også at de benytter eksternt laboratorium. Eksterne laboratorier benytter stort sett metoder basert på real-time PCR som krever minimum 18 timers oppformering før analyse, altså en totaltid på 20 timer og oppover. Tar man med forsendelse så tar dette fort ett-to døgn før man har et presumtivt positivt svar. De som benyttet hurtigmetoder brukte følgende:

<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>RESIST Food <i>Listeria monocytogenes</i> deteksjon kit [2]</b> (Kura Biotech) basert på isotermisk amplifisering<sup>1</sup> av DNA med oppformering 18-24 timer. Deteksjonsgrensen oppgis til å være 1 bakteriecelle per mikroliter</li> </ul>	<b>≥19 timer</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>PCR</b> (antar at dette er real-time PCR, ukjent leverandør). <i>ISO 16140-2 validert</i></li> </ul>	<b>≥20 timer</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>SwabSure</b> (Labolytic), <b>InSite Listeria</b> (Hygiene) eller <b>Listeria-Path-Check</b> (Microgen Bioproducts Ltd) er svabertester basert på påvisning av enzymaktivitet (fosfolipase C (<i>L. monocytogenes</i> og <i>L. ivanovii</i>) og β-glukosodase (<i>Listeria</i> spp., kun InSite)</li> </ul>	<b>&gt;24 timer</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>VIDAS LMX</b> (bioMérieux) er en immunologisk metode (ELFA – enzym-linket fluorescent assay) med et patentert oppformeringsmedium (Imx) med 26 timers oppformering. <i>ISO 16140-2 validert</i></li> </ul>	<b>≥28 timer</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>3M-MDS</b> (molecular detection system) er basert på isotermisk oppformering av DNA (her er LAMP benyttet) med 40 timer to-trinnsoppformering. <i>ISO 16140-2 validert</i></li> </ul>	<b>≥42 timer</b>

<sup>1</sup> Isotermisk oppformering er oppformering av nukleinsyrer (DNA/RNA) under konstant temperatur. Oversikt over vanlige isotermiske metoder er gitt i Tabell 2.

Noen nevner også selektive agarskåler som hurtigmetode, f.eks. ALOA, COMPASS, RLM, samt en bruker nevner ATP på miljøprøver. Ingen av de overnevnte metodene tar under 20 timer. Grunnen til at metoder som ikke er raskere enn det som normalt brukes av eksterne laboratorier (real-time PCR og 18 timer oppformering) av mange regnes som hurtigmetode er nok at den tradisjonelle ISO 11290-1 referansemetoden tar 4 døgn.

### 3.2.4 Erfaringer med hurtigmetoder

Flere svarer at et problem med hurtigmetodene de har testet er at man får mange **falske positive og falske negative svar**. En respondent svarte at de har sluttet å bruke hurtigttester på grunn av falske positive. Dette gjør at usikkerheten er altfor stor til at de kan stole på det som er på markedet i dag. Siden de uansett må utføre ekstra analyser så blir ikke kostnaden redusert. En annen oppga at de ikke dyrker listeria i egen bedrift grunnet fare for krysskontaminering. De oppga at de tidligere har brukt en hurtigtest, men at denne ikke ga et godt sluttresultat/konklusjon. Grunnet god logistikk til eksternt lab, og at de derfor får raske prøvesvar, så anser de bruk av eksternt lab som tryggest. Dersom real-time PCR er å regne som hurtigmetode så er flere fornøyde med det og mener at dette er et bra verktøy for å kunne gjøre tiltak dersom antatt positiv prøve. En annen respondent nevner også at de bruker en eksternt lab siden dagens hurtigtest tar like lang tid som med akkreditert tredjepart og kostnadene er omtrent like når man tar med timekostnad for ansatte.

Noen norske bedrifter nevner at de venter på at Sensilist-metoden skal bli kommersielt tilgjengelig. Det er viktig å poengtere at Sensilist ikke er en hurtigmetode eller en erstatning for påvisningsmetoden ISO 11290-1, men skal være et mer sensitivt alternativ til kvantifiseringsmetoden ISO 11290-2.

### 3.2.5 *Listeria* spp. versus *L. monocytogenes* test

Med begrunnelsen at man får raskere svar og en hypotese om at en nisje for *Listeria* spp. også er en nisje for *Listeria monocytogenes* har det vært foreslått å bruke metoder som ikke er selektive på artsnivå [3, 4]. Det ble spurt om en *Listeria* spp. test ville vært nyttig dersom en rask *L. monocytogenes* test ikke

var mulig, og eventuelt i hvilke tilfeller hadde det vært nyttig. Av de som svarte var det en blanding av positive og negative svar.

De som svarer at en *Listeria* spp. test vil kunne være nyttig sier at det primært allerede benyttes eller er tenkt brukt til miljøprøver, f.eks. etter vask for å kunne kontrollere kvaliteten på renholdet. Noen nevner også bruk av *Listeria* spp. test til kontroll av råvarer for å kunne allokere råvaren til annen produksjon, samt at det er bedre å sjekke for *Listeria* spp. der det er lave verdier av *L. monocytogenes*. En nevner at *Listeria* spp. på miljøprøver kan gi en pekepinn på hva som er til stede og at man antar at *L. monocytogenes* kan ligge i bakgrunnen. En positiv *Listeria* spp. test ville føre til iverksettelse av tiltak uten å vente på verifisering. En annen nevner at kunder i EU har begynt å se på dette (UK/Frankrike), spesielt de som kjøper røkelaks, men at det er få laboratorier i Norge som tilbyr akkreditert metode for annet enn *L. monocytogenes*.

En av de som ikke mener at en *Listeria* spp. test vil kunne være nyttig, skriver videre at en mulig positiv test vil føre til en unødvendig tilbaketrekking som vil kunne få store konsekvenser med tanke på kostnader, omdømme og ikke minst uro i markedet.

Ifølge en rapport fra FAO og WHO [5] tester ofte matbedrifter for *Listeria* spp. i stedet for *L. monocytogenes* siden det kan gi raskere svar og er mer kostnadseffektivt. Analysen kan gi svar på om bedriften har betingelser som mest sannsynlig kan støtte overlevelse og vekst av *L. monocytogenes* dersom den er kommet inn. *Listeria* spp. brukes i denne sammenhengen som en indikator på hygiene og kontroll av vask og desinfeksjon. Ifølge rapporten kan det være godt samsvar mellom tilstedeværelse av *Listeria* spp. og *L. monocytogenes* i noen typer matprosesseringsanlegg, men ikke alle. Det er blant annet vist at tilstedeværelsen mellom *Listeria* spp. ikke var en god indikator for *L. monocytogenes* i sjømat foredlingsanlegg [6].

### 3.2.6 Hvor rask må en hurtigmetode være?

I spørreundersøkelsen ble de spurt om maksimum analysetid for en metode for å kunne iverksette ulike tiltak (se Tabell 1).

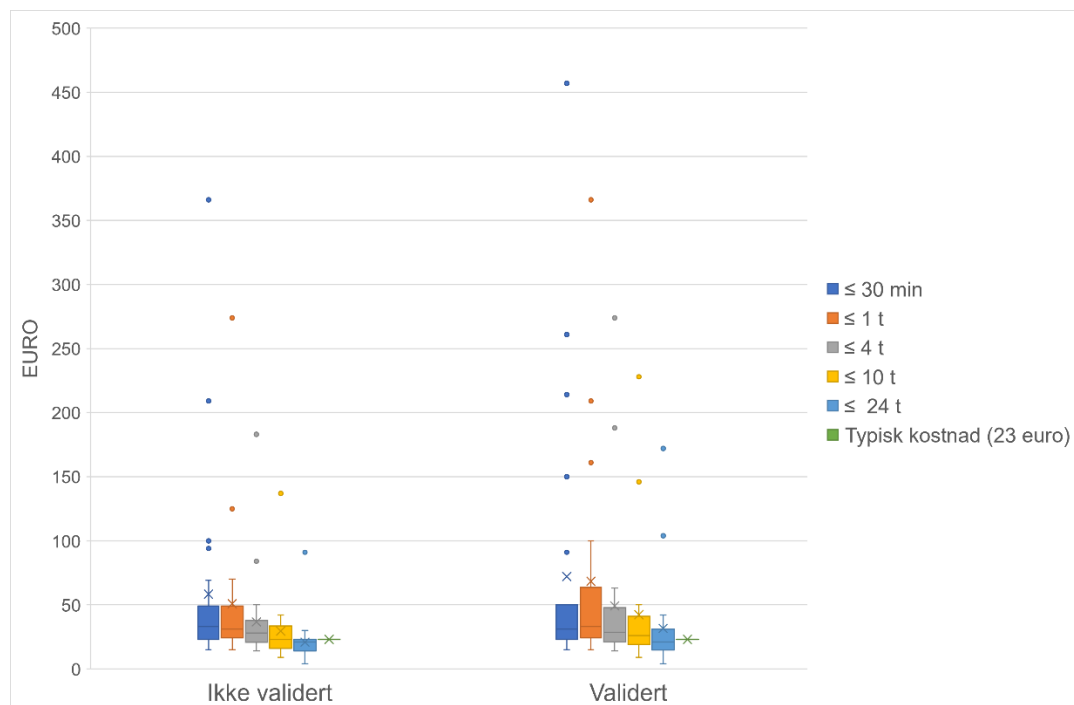
**Tabell 1.** Responser på spørsmålet 'Hva er maksimum analysetid for en metode for at du skal kunne oppnå følgende tiltak?'. Tabellen er illustrert med prosent ved å akkumulere svarene fra de ulike tidsintervallene. Dvs. det prosentantallet som kan gjøre et tiltak med en test som tar 1 time kan også gjøre det tiltaket med en test som tar 30 minutter. I tabellen så er prosentandel høyere enn 40% markert i uthevet skrift. Antall besvarelser var 41.

Tiltak	≤30 min	≤1t	≤4t	≤10t	<24t	NA
Kan bruke listeria-positive råvarer til andre produkter	83	<b>51</b>	32	20	10	17
Iverksette tiltak for å redusere/fjerne listeria på råmateriale	76	<b>49</b>	34	17	12	24
Kan avvise råvare fra leverandør	88	<b>46</b>	37	20	10	12
Kan vaske på nytt før produksjonsstart	98	<b>44</b>	32	22	15	2
Kan gi tilbakemelding til renholdere før neste rengjøring	100	90	<b>78</b>	56	17	0
Kan tilbakeholde produkt inntil verifisert prøveresultat foreligger	93	80	<b>61</b>	39	24	7
Kan sende produktene neste dag til andre kunder/annen prosessering (f.eks., varmebehandling)	78	68	<b>59</b>	29	15	22
Kan redusere holdbarhetsdatoen for listeria-positive produkter	73	54	<b>46</b>	27	15	27
Kan endre produksjonsrekkefølgen slik at positive råvarer brukes på slutten av dagen	85	59	<b>44</b>	22	12	15
Kan advare kunder om antatt positiv test	85	68	66	<b>46</b>	29	15
Kan hindre at produkt kommer for salg i butikk før verifisert prøveresultat foreligger	93	71	56	<b>41</b>	24	7

Det var stor variasjon i besvarelsene, men over 40% svarer at de trenger en test som tar en time eller mindre for å kunne: bruke listeria-positive råvarer til andre produkter; iverksette tiltak for å redusere/fjerne listeria på råmateriale; avvise råvare fra leverandør eller vaske på nytt før produksjonsstart (se Tabell 1). Dersom man har en test som tar maksimum 10 timer, vil 56% kunne gi renholdere tilbakemelding før neste rengjøring. Omlag 40% av fabrikkene kunne advare kunder om en positiv test, tilbakeholde produkt eller hindre at det kommer i butikk før endelig prøvesvar foreligger.

### 3.2.7 Betalingsvilje

De ble også spurt om betalingsvilje for hurtigtest med ulik tidsbruk, både ikke-validert og validert (Figur 6).



**Figur 6.** Betalingsvilje for en ikke validert hurtigmetode og validert hurtigmetode (n=26). Lokal valuta fra besvarelsene ble omgjort til euro. Det ble antatt at dagens test koster 23 euro.

Det var stor spredning i betalingsviljen med noen ekstreme verdier på over 250 euro. De mest ekstreme verdiene var ikke fra norske bedrifter. Ikke uventet så er de spurte villig til å betale mer jo raskere testen er og noe mer for en metode som er validert av myndighetene. Det kom fram at gjennomsnittlig betalingsvilje for en test som tok 30 minutter eller mindre var 58 og 71 euro, for en ikke validert og en valider metode. For de andre tidsintervallene var gjennomsnittlig betalingsvilje for en ikke validert og en validert metode henholdsvis 50 og 68 euro ( $\leq 1t$ ); 37 og 49 euro ( $\leq 4t$ ); 30 og 42 euro ( $\leq 10t$ ) og 21 og 32 euro ( $\leq 24t$ ).

### 3.3 Intervju med bransjeaktører

For å få mer informasjon rundt behov og bruk av hurtigmetoder ble det gjennomført intervjuer med tre kvalitetsledere fra norsk lakseindustri. Intervjuene ble gjennomført som semi-strukturerte kvalitative samtaleintervjuer basert på de samme spørsmålene som i spørreundersøkelsen. Intervjuobjektene ble i tillegg forelagt resultatene fra spørreundersøkelsen og det ble poengtert av intervjueren at det med dagens regelverk og teknologi kan vise seg vanskelig å få til en metode som kan påvise listeria på under 30 minutter. Samtalene ble gjennomført med en fleksibel struktur hvor intervjuobjektene fikk rom for å reflektere rundt problemstillingene og resultatene fra spørreundersøkelsen.

Som det kom fram fra spørreundersøkelsen så mente også intervjuobjektene at hygienisk design for lettere rengjøring og demontering er det viktigste tiltaket i kampen mot listeria i lakseindustrien. Med utgangspunkt i at en hurtigmetode på rundt 30 minutter ikke ser ut til å være mulig med dagens regelverk og teknologi ble intervjuobjektene spurt om hvor rask en metode må være for å kunne ha nytteverdi for deres bedrift. Intervjuobjektene svarte at dersom man kan få til en kortere oppformering på for eksempel 10-15 timer så ville dette være svært nyttig. Da kan man for eksempel sette prøver til oppformering ved produksjonsslutt som kan analyseres neste morgen. Som kommentar til betalingsviljen for raskere en metode så ble det kommentert at de spurtes ulike roller vil kunne påvirke resultatet, for eksempel vil en som har ansvar for innkjøp av analyser ikke alltid se det store bildet og påfølgende kostnader for listeria problemer. En nulltoleranse for listeria ville nok også mest sannsynlig også gitt høyere betalingsvilje

Det ble poengtert at selv om en raskere metode er et stort ønske, så vil ikke en raskere metode for påvisning av listeria løst problemene bransjen har med listeria. Selv en rask og god test kan gi falsk trygghet siden den uansett kun representerer en liten del av prosessen/produktene. Ja, man kan med en rask metode eventuelt vaske på nytt, avvise råvarer eller omrokere produkt til varer som skal varmebehandles, men det ble poengtert at beste løsning for å minimere/eliminere listeria er å **jobbe systematisk og ha mulighet til å spore** hvor de ulike listeriatypene kommer inn eventuelt etablerer seg (**finne kilden**).

Bedriftene som ble intervjuet har allerede tatt i bruk helgenomsekvensering og/eller andre typingsteknikker i sitt interne kvalitetsarbeid. Utfordringen er at sekvenseringen er kostbar, tar for lang tid til svar og at svarene kan være kompliserte å tolke for kvalitetsleder. Det er et stort ønske om en raskere og mer brukervennlig metode for å få typingsinformasjon. Som nevnt i kapittel 5 (Genotyping) så finnes det alternative typingsteknikker på markedet. Resultatene fra slike analyser vil ikke gi like mye informasjon som helgenomsekvensering, og nytteverdien av denne type informasjon i internt kvalitetsarbeid sammenlignet med sekvens type (ST) og punktmutasjoner som man får fra helgenomsekvensering er uklart.

## 4 Nye metoder for hurtigere påvisning av *L. monocytogenes*

### 4.1 Fremgangsmåte for litteraturstudium

Som beskrevet i delrapport 1 [1], foregår påvisning av *L. monocytogenes* i produksjonsmiljø, råvarer eller produkt i flere steg: 1) prøvetaking, for eksempel svabring av overflate eller uttak av kjøttprøve, 2) oppformering av listeria ved dyrkning for å få et høyt nok antall til å kunne påvise bakterien, og 3) selektiv påvisning av bakterieceller ved bruk av en test basert på en eller annen type teknologi. Ny teknologi eller forbedring av eksisterende teknologi på ett eller flere av disse trinnene vil kunne gi en hurtigere testmetode.

En kartlegging av vitenskapelig litteratur ble gjennomført for å identifisere nye eller forbedrede metoder for hurtigere deteksjon av *L. monocytogenes*, som har potensiale i utvikling av en hurtigere test enn det som finnes på markedet i dag. **Litteratursøket** ble utført 21.09.2023 i to ulike databaser: Web of Science (<https://www.webofscience.com/>) og Scopus (<https://www.scopus.com/>). Følgende søkestreng ble benyttet: '[(Listeria) AND (rapid OR fast) AND (assay OR detect\* OR analys\*) AND (food OR salmon OR fish OR environment OR surface)]', eller samme søkestreng, men hvor 'Listeria' ble erstattet med 'Salmonella'. Seleksjonen inkluderte artikler (på engelsk) fra 2019 fram til søketidspunktet. Totalt ble 353 artikler vurdert (etter fjerning av duplikater, screening for relevans og uten oversiktsartikler).

Oversikten over litteraturen sammenfattet i dette kapitlet er ikke utfyllende, da det er et hav av ulike metoder og teknologier beskrevet i litteraturen, i tillegg til utallige kombinasjoner av de ulike teknologiene. Fokus er på beskrivelse og evaluering av metoder som var beskrevet i mange publikasjoner, og metoder som ble ansett som mest lovende.

Ingen publikasjoner som beskrev nye eller forbedrede metoder for selve prøvetakingstrinnet ble identifisert i litteraturgjennomgangen. Da forbedret prosedyre på dette trinnet heller ikke er evaluert til å være viktig for å få en hurtigere test, er metoder som sikter seg inn på dette trinnet ikke videre behandlet i denne rapporten.

Som nevnt i delrapport 1 [1], må en test som er like nøyaktig som referansemetoden ISO 11290-1 kunne påvise 1 *L. monocytogenes*-celle i 25 g eller 25 mL prøve (krav til **sensitivitet**), samt påvise alle *L. monocytogenes*-stammer uten å gi utslag på andre bakteriearter enn nettopp *L. monocytogenes* (krav til **spesifisitet**). Testen må også være **robust** nok til å kunne oppnå krav til sensitivitet og spesifisitet i den type prøver som testen er beregnet på – dvs. i prøver som inneholder komponenter som ofte hemmer påvisning, for eksempel smuss, laksekjøtt, salt eller annen forstyrrende bakterieflora.

Evaluering av forskjellige metoder fra litteraturen opp mot hverandre kan være vanskelig. Når det gjelder evaluering av **sensitivitet**, er parameteren av interesse oftest en metodes **deteksjonsgrense**. Deteksjonsgrensen for en påvisningsmetode er per definisjon antall bakterier per mL eller per gram som kan påvises i en prøve – etter eventuell oppformering ved dyrkning. Ofte er deteksjonsgrensen angitt som antall bakterier i prøven før et obligatorisk oppformeringstrinn, noe som åpenbart vil gjøre påvisningsmetodens deteksjonsgrense sterkt avhengig av lengden på oppformeringstrinnet.

Når det gjelder **spesifisitet**, er det et krav for validering av en test for påvisning av *L. monocytogenes* at den kan påvise et bredt utvalg av *L. monocytogenes*-stammer. Validerings-prosedyren innebærer å teste 50 forskjellige stammer med bred variasjon i serotyper og genotyper. Videre er kravet for alle tester som skal påvise en spesifikk bakterieart at metoden ikke reagerer på andre arter i samme bakterieslekt. En godkjent påvisningsmetode for *L. monocytogenes* skal dermed ikke gi utslag på nært beslektede arter som for eksempel *Listeria innocua*. Det holder altså ikke at den ikke slår ut på *E. coli*. Det kan være vanskelig å vurdere hvor spesifikk en test er uten å gjennomføre disse forsøkene.

En ytterligere utfordring for sammenligning av ulike tester er det faktum at både sensitivitet og spesifisitet vil variere under ulike betingelser, avhengig av metodens **robusthet**. Det vil for eksempel være mye vanskeligere å påvise 1 *Listeria*-celle i 1 mL laksesmuss enn 1 *Listeria*-celle i 1 mL rent vann. I tillegg er det et krav til en validerte metode at den er robust i den forstand at testen skal kunne utføres på forskjellige laboratorier og da gi samme resultat. Dette gjør at en metode bør være brukervennlig og reproducerbar.

Det ble raskt klart under litteraturgjennomgangen at et gjennomgående problem med metodene som er beskrevet var at de fleste **ikke var testet under reelle betingelser**. Studiene viser ofte bare at konseptet virker under optimale betingelser, uten smuss og uten forstyrrende bakgrunnsflora. Ting som er viktig å tenke på når man skal evaluere en metode er:

- Vil oppformeringstrinnet tillate vekst av mål-bakterien til påvisningsbare nivåer i reell matmatriks?
- Vil metoden kunne påvise skadde bakterier?
- Vil reell matmatriks forstyrre kjemi eller teknologi benyttet i påvisningstrinnet, for eksempel ved at prøven inneholder hemmestoffer som vil kunne hindre oppkopiering av DNA?
- Vil reelle prøver inneholde andre bakterier eller annet DNA som vil kunne forstyrre oppformering eller påvisning av mål-bakterien?
- Er metoden spesifikk nok til at den vil kunne påvise alle *L. monocytogenes* stammer og dessuten skille mellom *L. monocytogenes* og andre *Listeria*-arter?

## 4.2 Oppformering i selektivt medium

Oppformering i et selektivt medium har som hensikt fortynne vekk stoffer som kan ødelegge for nedstrøms analyse (som fett i et matprodukt) samtidig som antallet listeria blir høyt nok til at man kan finne ut om det var minimum én listeriabakterie i det opprinnelige prøvevolumet, selv om man analyserer kun en liten fraksjon av prøven. Et selektivt oppformeringsmedium må både være skånsomt, for å sikre

at skadede listeriaceller kan vokse opp, samt selektivt nok til at andre bakterier ikke utkonkurrerer vekst av listeria. Det finnes allerede kommersielt tilgjengelige patenterte oppformeringsmedium som skal gi et raskere eller mer selektivt oppformingstrinn, for eksempel *Listeria monocytogenes Xpress (LMX) broth* fra bioMérieux eller oppformeringsmediet som brukes i *N-Light Listeria monocytogenes* fra NEMIS Technologies [7]. Sistnevnte er et patentbeskyttet oppformeringsmedium som inneholder bakteriofager (se faktaboks) som dreper visse konkurrerende bakterier (blant annet *Listeria ivanovii*), noe som skal redusere falske påvisninger av listeria (se delrapport 1 [1]).

Ingen nye eller forbedrede teknologier for oppformingstrinnet ble funnet i litteraturstudien. I noen studier ble det forsøkt å forkorte oppformingstrinnet i eksisterende metoder og dyrkingsmedier, men da som oftest kombinert med metoder for å oppkonsentrere enten listeriacellene eller mål-DNA [8-10].

Det er kjent at det er forskjellig bakteriaflora i ulike typer mat og matproduksjonsmiljøer. Det er dermed mulig å tenke seg at det kan gå an å utvikle oppformeringsmedium som er spesifikke for ulike bransjer eller prøvetyper. Det ble imidlertid ikke funnet noen artikler som beskrev slike prøve-spesifikke oppformeringsmedier i litteraturstudien.

#### Faktaboks: Bakteriofager

En bakteriofag ('bakteriespiser') er et virus som angriper og formerer seg i prokaryote celler som bakterier, arker og blågrønnalger. Bakteriofager kan brukes på flere måter i prosessen med å påvise listeria:

- i oppformeringsmediet for å fjerne konkurrerende bakterier
- for å 'fiske ut' listeria fra en løsning
- for selektiv påvisning av listeria

Bakteriofager har god selektivitet og vertsspesifisitet og kan derfor benyttes til påvisning av listeria.

Interaksjon mellom fag og bakterier kan være basert på 1) en gjenkjenning og absorpsjons-prosess, eller 2) en infeksjons-prosess.

### 4.3 Oppkonsentrering av listeriaceller fra prøve eller selektivt medium

Da det gjennomgående er oppformingstrinnet som tar lengst tid, er 'den hellige gral' for listeria hurtigtester en rask metode som kan utføres direkte på en prøve, uten forutgående oppforming ved dyrkning.

Siden prøvevolumene etter prøvetaking opererer i milliliter- til deciliter-skala, mens prøvevolumet i påvisningstrinnet (volumet for analysen som skal påvise listeria) opererer i mikroliter-skala, er et mulig alternativ til et oppformingstrinn å forsøke å oppkonsentrere eller 'fiske ut' listeriaceller fra prøvetakingsvolumet. For at en prøve skal kunne bli like god som ISO 11290-1 (og dermed kunne bli 'godkjent', dvs. validert i henhold til ISO 16140-2) må metoden kunne fiske ut 1 listeriacelle fra 25 g produktprøve – eller fra kluten eller svaberen som blir benyttet til prøvetaking av miljø – og hensette denne ene cellen i et volum som er lite nok til å kunne analyseres. Alternativt kan en prosedyre for å oppkonsentrere listeria fra en prøve kombineres med et kortere oppformingstrinn, eller brukes for å øke sensitiviteten til en test [10, 11].

For bruk som del av en metode for påvisning av *L. monocytogenes*, vil det være viktigere at et slikt oppkonsentreringstrinn ikke mister noen listeria-celler, enn at den er god til å skille *L. monocytogenes* fra andre bakterieceller.

Metoder som kan brukes for å oppkonsentrere listeriaceller fra et større volum inkluderer for eksempel magnetisk separasjon, sentrifugering eller ulike filtreringer. Disse trinnene vil gjøre analysen mer komplisert og arbeidsintensiv, noe som kan gjøre metodene mindre aktuelle for bruk av bedrifter i matindustrien, tross mulighetene for kortere total analysestid.

#### 4.3.1 Magnetisk separasjon

Magnetiske kuler koblet til et molekyl som binder listeria kan benyttes til å oppkonsentrere listeria fra et større prøvevolum. Det vanligste er å ha antistoffer mot mål-bakterien koblet til kulene (immuno-magnetisk separasjon; IMS), men man kan også benytte aptamerer (korte sekvenser av syntetisk DNA, RNA, XNA eller peptider), antibiotika (f.eks. ampicillin [9]) eller bakteriofager.

Det finnes kommersielt tilgjengelige **immunomagnetiske kuler** som binder listeria (*Dynabeads anti-Listeria* fra Thermo Fisher Scientific [12]), men siden disse kulene er koblet til polyklonale antistoff binder de andre *Listeria*-arter i tillegg til *L. monocytogenes*. En studie hvor disse kulene ble testet på en oppformeringskultur med listeria og andre bakgrunnsbakterier til stede viste at bruk av kulene klarte å øke den relative andelen av *L. monocytogenes* i prøven, men at man samtidig mistet en del listeriaceller – dvs. kulene var ikke 100% effektive [10]. En kommersielt tilgjengelig metode som bruker magnetiske kuler bundet til listeria-spesifikt antistoff for å oppkonsentrere listeria fra oppformeringskulturen er real-time PCR metoden *Assurance GDS L. monocytogenes Tq* fra MilliporeSigma / Merck [13]. Selv om man skulle anta at bruk av immunomagnetisk separasjon ville gjøre testen mer sensitiv enn andre real-time PCR metoder, er imidlertid ikke lengden på det angitte oppformeringstrinnet for metoden kortere enn for andre real-time PCR testsett på markedet.

Det går også an å koble **bakteriofager** (f.eks. P100) til magnetiske kuler for til å 'fiske ut' listeriaceller fra en prøve før nedstrøms analyser [14, 15]). Bakteriofag P100 finnes i *Listex* som er et FDA-godkjent produkt til bekjempelse av listeria i mat og på overflater [16]. Selv om dette kan virke lovende er problemet at **noen *L. monocytogenes* er resistente** mot bakteriofag P100 [16], noe som vil føre til falske negative resultater siden ikke alle *L. monocytogenes* stammer vil fanges opp. Man kan tenke seg at det går an å **utvikle genetisk modifiserte bakteriofager**, men det kan være utfordrende å lage modifiserte bakteriofag.

Dynabeads (såkalte Ugelstad-kuler) er typisk et par mikrometer i diameter. Bruk av magnetiske kuler som er mye mindre – såkalte **nanopartikler** – er beskrevet i mange studier i forbindelse med metoder som kombinerer magnetisk separasjon av mål-bakterien med spesifikke påvisningsmetoder, for eksempel SERS (se kapittel 4.7) eller LFA analyser (se kapittel 4.9).

#### 4.3.2 Filtrering og sentrifugering

Filtrering kan benyttes for å fjerne uønsket materiale (f.eks. fra mat eller smuss) samt til å gå fra et stort til et mindre prøvolum. Det finnes mange ulike filtreringsmetoder på markedet. Det er viktig at filtreringen fører til minimalt tap av bakterien man ønsker å påvise, f.eks. kan bakterier sitte fast i biofilm eller på prøvemateriale og ikke slippe gjennom filteret. Dersom man bruker filtrering for å oppkonsentrere listeria så er det viktig at man senere får løst bakterien fra filteret før videre analyse [8]. I tillegg til filtrering kan man oppkonsentrere listeria fra et stort volum ved hjelp av sentrifugering. Alle disse stegene krever ekstra utstyr og tid og er ikke alltid gjennomførbare i en industriell setting.

### 4.4 Nukleinsyre (DNA/RNA) baserte metoder

Et alternativ til å øke sensitiviteten til en test ved å oppformere selve bakterien, er å kopiere opp DNA eller RNA fra mål-bakteriene, og deretter påvise det oppkopierte produktet. Man kan også kombinere oppkonsentrering av bakterier og DNA [17].

Som nevnt i delrapport 1 [1] er mange påvisningsmetoder basert på påvisning av nukleinsyrer (DNA/RNA). For å øke sensitiviteten kombineres disse teknikkene med PCR (f.eks. real-time PCR, også kalt qPCR) eller isotermisk nukleinsyre amplifiseringsteknikker (f.eks. LAMP). Det finnes kommersielle metoder som benytter LAMP (se delrapport 1), mens i litteraturen så blir også RPA, RCA, SRCA, NASBA, MDA og SPIA nevnt. For en oversikt over PCR og de mest vanlige isotermiske metodene se tabell 2.

De ulike metodene har ulike mekanismer som ikke beskrives nærmere her, men det kan nevnes at LAMP er det som blir oftest nevnt i litteraturen samt også den teknikken som oftest benyttes kommersielt. I tillegg er NSBA interessant i den betydning at metoden primært benytter RNA (16s rRNA gener eller mRNA transkripter). Det kan være mer utfordrende å jobbe med RNA, men fordelene er at påvisning ikke bare betyr tilstedeværelse av en bakterie, men også indikerer levedyktighet, dvs. at man unngår levende/død-problematikken man har ved bruk av DNA.



All oppformering av nukleinsyrer kan påvirkes av eventuelle hemmestoffer som kan komme fra blant annet matmatriks og smuss. Hemmestoffer vil kunne redusere effektiviteten av oppformeringen samt kunne føre til falske negative resultater. Ifølge litteraturen [18, 19] har LAMP og MDA høyere toleranse for hemmestoffer enn f.eks., RPA, RCA og NASBA. Det finnes DNA rensemetoder som skal fjerne hemmestoffer (f.eks., [20]), men disse er ikke alltid tilstrekkelig effektive. Oppformering av nukleinsyrer er også utsatt for aerosol-kontaminering som kan føre til falske positive resultater. Metoder basert på amplifisering av DNA vil ikke kunne skille mellom levende og døde bakterier (uten tilleggstrinn i analysen), selv om dette vil være et margintalt problem etter oppdyrking. Metoder basert på oppformering av DNA kan derfor kun gi presumtvt positive resultater som må verifiseres med dyrkning.

Tabell 2. Oversikt over egenskaper for PCR og de mest vanlige isotermske oppformeringsmetodene. Tabellen er modifisert fra tabell fra Oliveira et al. [21].

Egenskap	PCR	NASBA	LAMP	SDA	RCA	RPA
<b>Primer design</b>	Enkel	Enkel	Kompleks	Kompleks	Enkel	Enkel
<b>Temperatur</b>	Termiske sykluser (90, 50-60, 72) <sup>o</sup> C	ca 41 <sup>o</sup> C	60-65 <sup>o</sup> C	37 <sup>o</sup> C	30 <sup>o</sup> C	37-42 <sup>o</sup> C
<b>Reaksjonstid</b>	2-3 timer	1.5-5 timer	<1 time	2 timer	1.5 time	20-40 min
<b>Mål</b>	DNA (RNA)	ssRNA (DNA)	dsDNA (RNA)	ssDNA (RNA)	sirkulært DNA (RNA)	dsDNA
<b>Sensitivitet</b>	1-10 kopier	enkel kopi	enkel kopi	10 kopier	10 kopier	enkel kopi
<b>Toleranse for hemmestoffer</b>	lav	medium	høy	lav	lav	høy
<b>Fordeler</b>	Korrekt og robust kvantifisering	Rettet mot RNA	10 <sup>9</sup> -ganger oppformering på under 1 time	Egnet for miRNA profilering	Lav temperatur	Lav temperatur
	Enkel prosedyre	10 <sup>7</sup> -ganger oppformering på 2 timer	toleranse mot hemmestoffer	10 <sup>5</sup> -ganger oppformering på 2 timer	Spesifikk for sirkulære mål	Selektiv
	Veletablert metode	Kommersielle tester tilgjengelig	Kan påvise visuelt (naked-eye)	Kommersielt tilgjengelig plattform		Raskeste oppformering (20-40 min)
	Mange kommersielle tester	Lav temperatur	Stort utvalg av kommersielle tester	Lav temperatur		Toleranse for hemmestoffer
<b>Ulemper</b>	Høy kostnad for utstyr	Ikke ideell for DNA	Ikke egnet for små DNA-fragmenter	Initial denaturering kreves	Virker kun på sirkulære templatler	Streng reaksjonsbetingelse
	Polymerase utsatt for feil	Utsatt for falske positive	Falske positive	Krever prøveoppbeholdelse	RNA oppformering kan være kompleks og problematisk	Kommersielle tester er kostbare
	Mindre effektiv enn flere isotermske metoder		Kompleks primerdesign	Utsatt for uspesifikk oppformering		
	Lang oppformeringstid					

PCR - Polymerase chain reaction (syklisk oppformering av DNA); NASBA - Nucleic Acid Sequences Based Amplification; LAMP - Loop-mediated isothermal amplification; SDA - Strand Displacement Amplification; RCA - Rolling Circle Amplification; RPA - Recombinase Polymerase Amplification.

## 4.5 CRISPR-Cas baserte biosensorer

En biosensor er en analytisk enhet som selektivt gjenkjenner et spesifikt biologisk materiale og samtidig omgjør gjenkjenningshendelsen til et fysisk målbart signal [22] (se også delrapport 1 [1]). En økende andel studier har vist at CRISPR-Cas teknologien (se faktaboks) kan integreres i en biosensor for å påvise patogener.

De mest brukte verktøyene for påvisning av nukleinsyrer tilhører klasse 2 Cas enzymer: Cas9 (DNA), Cas12 (DNA), Cas13 (RNA) og Cas14 (ssDNA). Cas12 og Cas13 bruker såkalt 'vilkårlig kutting'. Ved tilstedeværelse av mål- eller reporter DNA/RNA kan disse Cas-enzymene aktiveres og (uspesifikt) kløyve ssDNA/ssRNA som er til stede. Dette kan påvises med fluorescensreportere innmerket i ssDNA/RNA. Signalene kan deretter måles på ulike måter, f.eks. kjemiske indikatorer, LFA, optisk, fluorescens eller elektrokjemisk. Denne teknikken brukes i 'spesific high-sensitivity enzymatic reporter unlocking' (SHERLOCK) [23] og 'DNA endonuclease-targeted CRISPR trans reporter' (DETECTR) [24]. En oversiktsartikkel fra 2023 oppsummerer nylige framskritt og framtidige muligheter for CRISPR-Cas-baserte teknikker for påvisning av patogener [25].

Det er foreløpig få CRISPR baserte påvisningsmetoder for bakterier. CRISPR-Cas er mer utbredt innen påvisning av virus enn bakterier. Grunnen til dette kan være at det allerede eksisterer veletablerte gullstandarder for påvisning av bakterier samt at mutasjonshastigheten er mye større i virus enn bakterier. Dette har ført til en høyere prioritet på deteksjon av virus enn bakterier.

Fordeler med CRISPR-Cas er uansett høy spesifisitet og sensitivitet. Dette resulterer i en mer robust metode med høyere troverdighet pga. færre falske positive.

For å øke sensitiviteten kombineres ofte CRISPR-Cas systemer med PCR og isotermisk nukleinsyre amplifiseringsteknikker som NASBA, RCA, SDA, LAMP, RPA og EXPAR (se tabell 2 for en oversikt over de mest vanlige metodene). I en oversiktsartikkel fra 2022 [26] ble det identifisert 46 studier som omhandlet CRISPR-Cas system-baserte tester for påvisning av bakterier, hvorav fem artikler handlet om listeria. De fleste studiene brukte nukleinsyre som biomarkør (39/46) og de fleste systemene hadde en for form oppformering av nukleinsyre i forkant av analysen. Artikkelen oppsummerte at totaltiden for de ulike metodene var fra 30 min til 4 timer og at laveste deteksjonsnivå (ulike artikler oppgir ulik benevning) var 1 kopi per  $\mu\text{L}$  og 1 bakteriecelle per mL.

En artikkel fra 2023 testet påvisning av *L. monocytogenes* basert på CRISPR-Cas12a systemet [27]. Metoden benyttet RPA for isotermisk oppformering av DNA og genet som ble påvist var *hly* genet. De konkluderte med at dette var en 'ett-stegs', lavkostnads plattform som kan påvise mål-DNA fra 4.4 bakterieceller/g på 25 min. Material og metode delen i artikkelen var uklar og det var vanskelig å finne

### Faktaboks: CRISPR-Cas

CRISPR-Cas er et system hos bakterier som kan gjenkjenne og bryte ned fremmed genetisk materiale fra virus (dvs. bakteriofager) – altså en beskyttelsesmekanisme.

CRISPR er en forkortelse for 'Clustered Regularly Interspaced Palindromic Repeats', og er et område på bakteriekromosomet som inneholder biter av virus-sekvenser separert av korte repetitive DNA sekvenser (spacers). Disse virus-sekvensene kjenner igjen virus som bakterien (eller en opphav-celle) tidligere har blitt utsatt for. Nye virus-biter kan legges til CRISPR-arrayet dersom en bakteriecelle overlever et virus-angrep, og systemet kalles derfor for bakterienes adaptive immunsystem.

Cas står for 'CRISPR-associated' og er enzymet som klipper opp virus-DNA. Cas-enzymet binder til et såkalt guide-RNA, som er en kopi av en virus-sekvens fra CRISPR-arrayet. Når et guide-RNA kjenner igjen (binder til) DNA fra et invaderende virus, klipper Cas opp virus-DNA'et og beskytter dermed cellen. Det finnes mange typer Cas enzym som fungerer på litt forskjellige måter.

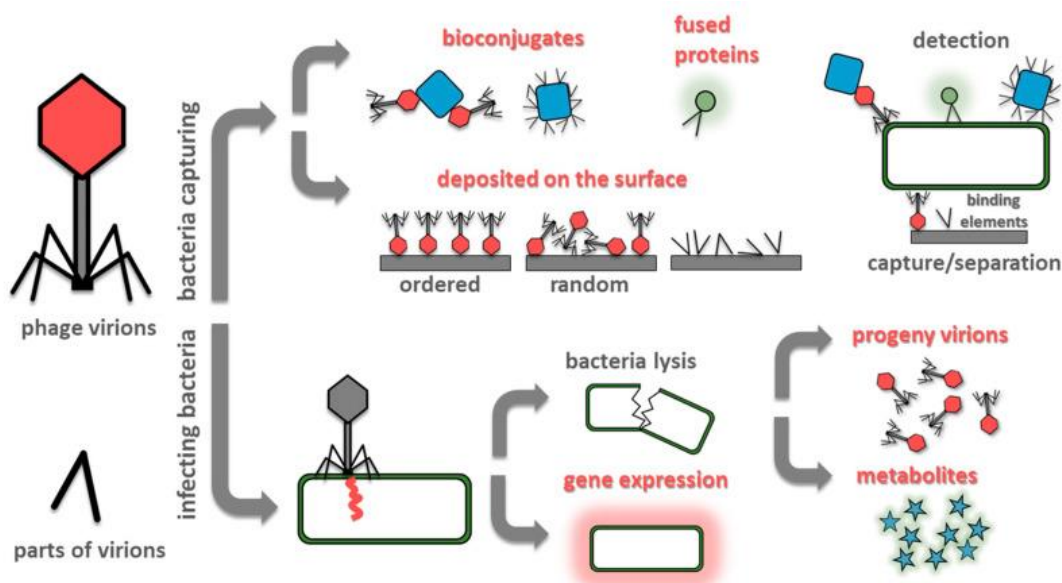
Systemet utnyttes i moderne genteknologi for å lage genetiske modifikasjoner i levende celler. Det brukes da spesielle Cas enzym (ofte Cas9, eller modifiserte varianter) som brukes sammen med kunstige guide-RNA molekyler. Disse styrer Cas til å kutte i DNA på et spesifikt sted. Når en celle opplever brudd i DNA-tråden, er den nødt til å sette inn tiltak for å reparere bruddet, ellers vil den dø. Et triks for å lage en ønsket genmodifisering i en celle er dermed å samtidig tilføre cellen en DNA-bit med den genetiske endringen man ønsker å innføre. Cellen vil da bruke denne DNA-biten som 'oppskrift' for å reparere den avkuttete DNA-tråden og samtidig inkorporere endringen som forskerne ønsker.

ut nøyaktig hva de hadde gjort. Ut fra det de skriver så virker oppgitt deteksjonsgrense overoptimistisk og deteksjonsgrensen ble ikke testet på reelle matprøver.

En annen artikkel testet påvisning av *Salmonella typhimurium* vha. overflate-forsterket Raman spektroskopi (SERS)-basert CRISPR-Cas assay på mikrofluid papir [28]. Metoden beskrives som en rask og behovspunkt (point-of-need) metode. Metoden gikk ut på å først rense DNA (ca. 30 min) for deretter enten å oppformere DNA vha. RPA eller gå videre uten oppformering før tilstedeværelse av mål-genet, *invA*, ble målt vha. SERS nanoprobe (se kapittel 4.7). Deteksjonsgrensen ble oppgitt til å være 3–4 bakterieceller/mL i kontaminert melk og kjøtt og testen ga resultat etter 45 minutter. Selv om metoden benyttet kunstig kontaminert mat, så fortynnes matmatriksen såpass mye at det ikke kan sammenlignes med en reell matprøve.

#### 4.6 Bakteriofag-baserte biosensorer

De mest vanlige bioreseptorene for biosensorer (se faktaboks) er antistoffer, enzymer og nukleinsyrer [29], men bakteriofager kan være et godt alternativ for deteksjon av patogener. Fordeler med bakteriofag versus antistoffer er at bakteriofager kan produseres raskt og rimelig i store volum. Takket være mangfoldet av ulike bakteriofager er det i teorien mulig å designe en biosensor som påviser enhver bakterie. Siden bakteriofager trenger levende celler for oppformering så vil de **skille mellom levende og døde bakterier**. Det er ulike måter bakteriofager kan brukes for påvisning av bakterier (se figur 7).



**Figur 7. Oppsummering av de mest vanlige oppsettene for bakteriofag-baserte biosensorer.** Figuren er kopiert fra "Recent Progress in the Detection of Bacteria Using Bacteriophages: A Review" [30].

Ved 'fanging av bakterier' så benyttes bakteriofag som f.eks. bakteriofagbaserte prober. Metoden er rask, men påvisning kan være utfordrende pga. lite signal fra systemet. Dersom man derimot benytter infeksjon av virus så oppformeres det man ønsker å påvise (virusavkom, reporter-gen, eller metabolitter) siden bakteriofag har 'innebygd' oppformeringssystem. Metoden er mer sensitiv, men mer tidkrevende. Ulempen er at man må ha virulente fag (i motsetning til temperente), samt at virusavkom ikke vil bli

produsert dersom verten allerede har inkorporert virus-arvestoff i sitt DNA (CRISPR-Cas system vil avverge bakteriofag infeksjon.

Det mest vanlige er å benytte en kombinasjon av bakteriofag oppformering og påvisning av virusavkom vha. PCR, men siden det ikke kun virusavkom som frigjøres etter lytisk syklus, men også celleinnhold, kan man også påvise ulike biomarkører.

Genetisk modifisert bakteriofag har blitt testet for påvisning av listeria [31]. Bredspektret bakteriofag kunne påvise en *L. monocytogenes* celle i 25 g kunstig kontaminert melk, kokt kjøtt og salat på under 24 timer (dvs. oppformering) uten falske positive eller falske negative resultater. Metoden ble også testet på matmatriks med høyt fettinnhold som røkt laks. Metoden fungerte tilfredsstillende, men man måtte ha en oppformering på 48 timer i forkant av analysen. Det vil si at denne metoden ikke nødvendigvis er raskere, men **mer presis** og at den kan **påvise levende celler**.

**Levende/død problematikken** er et gjennomgående tema ved bruk av DNA teknikker siden DNA-baserte teknikker ikke vil kunne skille mellom levende og døde bakterier. Dette er årsaken til at f.eks. real-time PCR kun oppgir **presumtivist positivt resultat** som må verifiseres ved dyrkning. Noen artikler beskriver bruk av **propidium monazide (PMA)** for å kunne skille mellom levende og døde bakterier før real-time PCR eller isotermisk amplifisering (f.eks. LAMP). PMA kan penetrere membranen til ødelagte celler og binder kovalent til DNA, dermed forhindres oppformering av DNA fra døde celler. Det er eksempler på bruk av PMA før LAMP (PMA-LAMP) for påvisning av levende *L. monocytogenes* der de skriver at de oppnår en deteksjonsgrense på 10 bakterieceller per mL [32]. Måten dette er testet på har likevel sine svakheter og det er rimelig å anta at dette ikke vil fungere tilsvarende bra under reelle betingelser. PMA er også benyttet i kombinasjon med multiplex real-time PCR for påvisning av levende *Salmonella Typhimurium*, *Staphylococcus aureus*, og *L. monocytogenes* i melk [33]. For å oppkonsentrere mengden listeria før analyse ble det benyttet IMS, deretter behandling med natriumdodecylsulfat (SDS) og PMA før real-time PCR for å redusere falske positive svar. Forfatterne oppgir en deteksjonsgrense på 10 bakterieceller/ml i kunstig kontaminert melk. Også her kan man sette spørsmåltegn om dette ville fungert like godt under reelle prøvebetingelser der matmatriks og smuss ikke er like fortynnet.

Det finnes en ny og forbedret versjon av PMA kalt **PMAxx** (Biotium). PMAxx er, ifølge produsent, et overlegent alternativ til PMA og er kompatibelt med alle eksisterende PMA-protokoller. Det eliminerer ikke alle falske positive, men reduserer antallet kraftig. PMAxx kan blant annet brukes i bioMérieux sitt GENE-UP system (GENE-UP BACTVIAP PMAxx).

#### 4.7 Overflate-forsterket Raman spektroskopi (SERS)-baserte biosensorer

En betydelig andel av artiklene fra litteraturoversikten omhandler overflate-forsterket ('surface-enhanced') Raman spektroskopi (SERS), f.eks. [34]. Raman er en spektroskopisk metode som kan identifisere kjemiske strukturer ('kjemiske fingeravtrykk') basert på måling av Raman-spredningen som lyset får, når et molekyl utsettes for en laserstråle. Biosensorer basert på SERS hører dermed til under kategorien optiske biosensorer. Ulike molekyler har forskjellige Raman-spektre fordi de har forskjellige vibrasjons- og rotasjons-energinivåer.

SERS er en metode for å forsterke svake Raman-signaler. Teknikken utnytter at Raman-signalet blir mye sterkere (opptil  $10^{15}$  ganger sterkere) dersom molekylene som skal analyseres bindes til overflaten av nanopartikler av edle metaller som gull eller sølv, og disse nanopartiklene deretter bringes sammen som aggregater [35, 36].

SERS-metoden kan bruke nanopartikler av gull koblet til et molekyl som binder listeria, for eksempel antistoff eller aptamerer. Raman-signalet fra listeria kan da måles direkte, men er svakt fordi bakterier i seg selv avgir veldig svake Raman-signaler [36]. En studie som brukte denne fremgangsmåten rapporterte en deteksjonsgrense på  $10^3$  celler per mL under optimale betingelser [37]. For å oppnå økt

sensitivitet kobles ofte Raman reporter-molekyler (organiske molekyler) som avgir karakteristiske Raman-signal på edelmetall-nanopartiklene, for eksempel 4-merkaptobenzosyre (4-MBA). Bakterier vil da kunne påvises indirekte ved å måle Raman-signalet til reporter-molekylet.

Flere studier beskriver bruk av magnetiske nanopartikler (av jernoksid;  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) som er belagt med gull, noe som muliggjør oppkonsentrering av listeria-bakterier fra en prøve ved immunomagnetisk separasjon (IMS) integrert med etterfølgende påvisning via SERS (f.eks., [38]). Et annet alternativ for påvisning av lave konsentrasjoner av bakterier er bruk av filter hvor nanopartiklene som brukes til SERS er immobilisert [39]. Ved å koble DNA som hybridiserer med et spesifikt gen på gull-nanopartiklene, kan SERS-teknologi også brukes til å påvise spesifikke gener istedenfor hele bakterier [28].

For økt spesifisitet utformes ofte en påvisningstest som en 'sandwich'; dvs. med to forskjellige prober som binder til analytten man vil påvise (for eksempel listeria-bakterier). SERS kan for eksempel brukes i lateral flow kromatografiske analyser (se kapittel 4.9). Alternativt kan for eksempel en 'sandwich' type SERS-test utformes med magnetiske kuler med antistoff mot listeria (eller bakterier generelt; for separasjon etter IMS-prinsippet), og nanopartikler av gull funksjonalisert med et Raman reporter-molekyl og en aptamer som binder listeria, som kan påvises via SERS. Én studie [38] beskriver en lignende fremgangsmåte for påvisning av både *Staphylococcus aureus* og *L. monocytogenes*, hvor en deteksjonsgrense for *L. monocytogenes* på 5 celler per mL ble oppnådd under optimale betingelser. Forfatterne testet videre fangst av bakteriene når de ble tilsatt ekte prøver av appelsinjuice, salat-ekstrakt og urin. Påfallende nok ble imidlertid da bare resultater for trinnet hvor bakteriene ble 'fisket ut' med magnetisk separasjon beskrevet i studien, og ikke påvisning ved hjelp av gull-partiklene og SERS. En lignende studie [40] klarte imidlertid å påvise 10 *L. monocytogenes*-celler per mL i melk og appelsinjuice, og 100 *E. coli*-celler per mL i salat- og kjøtt-ekstrakt.

Selv om det er teoretisk mulig å påvise enkeltmolekyler med SERS, ser det ut til at teknologien har vanskeligheter med å påvise analytter direkte fra komplekse mat-matrikser [35, 36]. Det er heller ikke vist at metoden kan skille mellom ulike *Listeria* spp. arter, men antakelig mulig dersom den kombineres med f.eks., nukleinsyre (DNA/RNA) teknikker.

#### 4.8 Gass-sensorer og elektroniske neser

De senere årene har det vært en del oppmerksomhet rundt muligheter for bruk av gass-sensorer for påvisning av metabolitter produsert av patogene bakterier, uten at det har kommet noen kommersielle instrumenter på markedet som benytter denne teknologien. I litteraturen ser det ut som om det fleste metodene baserer seg på påvisning av **3-hydroxy-2-butanone** (også kjent som acetoin), som nevnes som en metabolsk biomarkør for *L. monocytogenes* [41]. Noen sensorer påviser også triethylamin eller dimetyl trisulfid. 3-hydroxy-2-butanone er en typisk og vanlig bakterie- og gjærmetabolitt som kommer opp under analyse av flyktige komponenter fra diverse mat- og drikke produkter [42]. Det er derfor tvilsomt at dette er en aktuell vei å gå for hurtig påvisning av listeria, spesielt med tanke på at man ønsker å påvise små mengder av bakterien i en matmatriks eller miljøprøve.

I forbindelse med gass-sensorer så blir også **elektronisk nese** nevnt som en mulig metode for påvisning av bakteriemetabolitter. En elektronisk nese bruker en samling av gass-sensorer for å påvise og kjenne igjen ulike flyktige komponenter i lufta [43]. Den største forskjellen fra en gass-sensor og er at en gass-sensor er laget for å påvise én spesifikk gass mens en elektronisk nese er laget for å påvise et mønster av gasser. Selv om konseptet med elektronisk nese har vært diskutert i noen år så har det ikke kommet noen gode produkter på markedet. Grunnen er at denne teknologien er mindre sensitiv enn gass-sensorer [43] og den derfor krever en høy konsentrasjon bakterier, samt at den påvirkes av bakgrunn (mat, smuss eller andre bakterier). Det hjelper lite med en elektronisk nese som kan skille mellom dyrkingsmedium og *L. monocytogenes* etter 48 timers oppformering [44].

## 4.9 Forbedringer av lateral flow kromatografisk analyse (LFA)

Kromatografiske metoder ble beskrevet i delrapport 1 [1] og prinsippet er enkelt forklart at en væske som kan inneholde det målmolekylet eller analytten man vil påvise trekkes gjennom en porøs membran eller et papir (ofte nitrocellulose) ved hjelp av kapillærkrefter. Dette er enkle tester som vi alle kjenner gjennom hjemmetestene som ble brukt for å påvise COVID-19 viruset. Testene er raske (20-30 minutter) men samtidig kjennetegnet ved at de har veldig lav sensitivitet og spesifisitet, og krever et minimum av  $10^5$ - $10^6$  bakterier for påvisning.

I det tradisjonelle oppsettet – sandwich LFA basert på immunologisk påvisning (LFIA) – har membranen en spesifikk sone eller stripe med immobilisert antistoff som binder analytten, som kan være hele listeriaceller eller oppkopierte DNA fra listeria. I tillegg inneholder testen et annet antistoff som også binder til samme analytt, og dette antistoffet er bundet til et reporter-molekyl. Når begge antistoffene binder til analytten vil reporter-molekylet samle seg i test-stripen på membranen. Tradisjonelle LFA-tester bruker nanopartikler av kolloidalt gull som reporter-molekyl, og testen leses da av med det blotte øye som en rød stripe (den sterke fargen skyldes fenomenet overflate-plasmonresonans). Siden påvisning med LFA-tester er basert på at reporter-molekyler aggregerer sammen på en stripe, vil en slik test aldri kunne påvise en enkelt listeria-celle direkte, og man må oppformere bakteriene og/eller kopiere opp DNA i forkant.

Litteratgjennomgangen avslørte at mange jobber aktivt med å forbedre LFA-teknologien. En mulig måte å øke sensitiviteten på er å bruke reporter-molekyl som binder direkte til bakterieceller istedenfor via et sekundært antistoff eller aptamer [45]. Flere artikler beskriver også at sensitiviteten kan forbedres ved å bruke andre typer reportere. Eksempler inkluderer magnetiske nanopartikler (MNPs, med mulighet for å kombinere LFA med konsentrasjon av listeria ved IMS), fluorescerende nanopartikler (for eksempel quantum dots; QD), eller nanopartikler som kan påvises ved SERS [46-48]. Ulempen er at man da trenger et kostbart instrument for å lese av signalet fra testen, og da blir en del av poenget med det enkle test-formatet borte.

Testene krever et oppkonsentreringstrinn før påvisning, siden det kun er mulig å tilsette noen mikroliter på testen. Som for flere andre metoder vil sensitiviteten og ikke minst spesifisiteten til testen avhenge av antistoffene eller aptamerene som skal binde til listeria.

## 4.10 Automatiserte system

Som et alternativ til (eller i tillegg til) en test som er raskere å utføre, så kan man tenke seg at man kan oppnå hurtigere prøvesvar ved å bruke en test som kan utføres av bedriften selv, i stedet for å sende prøver til analyse ved eksterne laboratorium. Slike systemer bør ideelt sett være enkle å håndtere, og uten manuelle trinn for oppformering og prøveopparbeidelse før påvisning. Oppformering av listeria i ikke-lukkede systemer medfører i tillegg en kontaminasjonsfare.

Det finnes ulike automatiserte system i helsesektoren f.eks. for påvisning av SARS-CoV-2. Disse systemene er derimot mindre relevante for som hurtigmetode for listeria pga. regelverkets krav til både robusthet og sensitivitet. I klinisk mikrobiologi er prøvene (spytt, blod) 'renere', prøvolumet er mindre enn for matprøver, og man har relativt store mengder av viruset eller bakterien som gjør påvisningen enklere. Det er heller ikke vedtatt i forskrift et krav om at for eksempel en test for SARS-CoV-2 må være like god som en standardmetode som kan påvise ett virus i prøvetakingsvolumet.

Et eksempel på et automatisert system for listeria-påvisning under utvikling kommer fra det norske firmaet Salico. Deres system er basert på mikrofluidbasert teknologi, også kalt lab-on-a-chip-teknologi, og baserer seg på påvisning av nukleinsyrer (DNA/RNA). Når prøven er i væskeform gjøres analysen automatisk på en brikke (chip). Det er viktig å nevne at dette systemet imidlertid krever manuelle trinn i forbindelse med prøveopparbeidelse. Som nevnt i delrapport 1 [1] er en av utfordringene med å konstruere en validert test for listeria som ikke inkluderer dyrking av bakterien er at godkjenning av en

metode som likeverdig med ISO 11290-1 krever at en presumtiv påvisning må bekreftes med identifikasjon ved oppdyrking av enkeltkolonier på selektive agarskåler. Dette kravet er vanskelig å unngå med gjeldende regelverk, i alle fall ved bruk av metoder som i prinsippet ikke skiller mellom levende og døde celler.

## 5 Genotyping

I tillegg til raskere og mer presise metoder eller tester er det økende interesse for metoder som kan gi tilleggsinformasjon og ikke kun positive eller negative svar. Noen bedrifter har startet med helgenomsekvensering (whole genome sequencing; WGS), men dette er fortsatt tidkrevende og også for komplisert og kostbart for de fleste bedrifter. For mer informasjon om helgenomsekvensering i matindustrien så refereres det til en veileder [49].

### 5.1 Quasimetagenomikk

Quasimetagenomikk, dvs. en delvis oppformering før man renser DNA og sekvenserer, er en teknikk som ble beskrevet i delrapport 1 [1]. Teknikken vil gi store mengder informasjon om hele prøven, dvs., også informasjon om andre bakterier i prøven og kan på nåværende tidspunkt innebære relativt kompliserte analyser som ikke er standardiserte eller automatiserte. Siden man også sekvenserer alt DNA i prøven, vil man 'bruke opp' sekvenseringskapasitet til informasjon om bakterier man muligens ikke er interessert i.

### 5.2 LamPORE

For å unngå å 'bruke opp' sekvenseringskapasitet ved å sekvensere også bakterier man ikke er interessert i, kan man som alternativ til quasimetagenomikk benytte LamPORE. LamPORE benytter isotermisk målrettet oppformering av nukleinsyrer (LAMP) kombinert med nedstrøms real-time sekvensering ved bruk av Nanopore sekvensering (Oxford Nanopore Technologies, se delrapport 1 [1]. LamPORE har blitt benyttet til påvisning og karakterisering av SARS-CoV-2 [50].

Det er ikke publisert noen vitenskapelige artikler på bruk av LamPORE for listeria, men teknikken er likevel interessant. Denne teknikken vil potensielt kunne påvise listeria og gi sekvensinformasjon (f.eks. genotyping) på samme tid. Deteksjonsgrensen må evalueres, men det er rimelig å anta at det vil trenge en delvis oppformering, eventuelt en oppkonsentrering før LAMP og sekvensering.

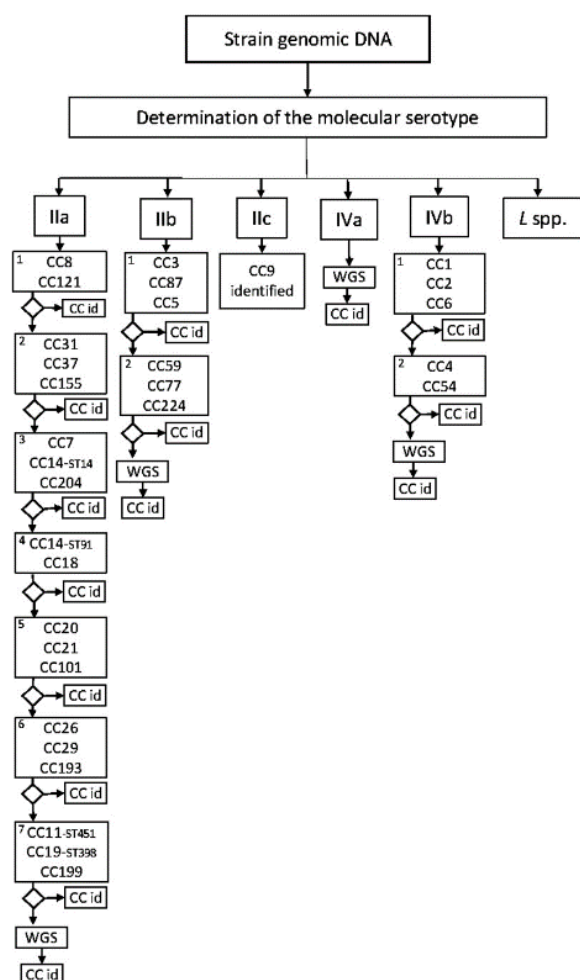
### 5.3 PCR-basert typing

Listeria PatternAlert assay fra Rheonix [51, 52] er en PCR-basert typingsteknikk som kan benyttes rett på oppformeringsmediet, dvs. man trenger ikke gå vi en enkeltkoloni. Metoden amplifiserer 15 ulike markører som danner et individuelt mønster pluss en markør for å bekrefte *Listeria* spp. I motsetning til andre typingsmetoder så typer man ikke en stamme, men man får et mønster som representerer en hel populasjon av *Listeria* spp. i prøven. Selv om en oppformeringsbuljong blir positiv for *L. monocytogenes* i real-time PCR så kan det ofte være andre listeriaarter til stede i oppformeringsbuljongen. Mønsteret representerer derfor en gruppe *Listeria* spp. stammer i prøven. Instrumentet kan kjøre 24 prøver samtidig og er tenkt benyttet på prøver som er antatt positive for *L. monocytogenes* (f.eks., fra real-time PCR) for videre karakterisering. Selve analysen tar ca. 7 timer (etter oppformering). Rheonix har et samarbeid med Eurofins US for denne type analyser, og så vidt vi har forstått på Eurofins Norge så tilbys dette foreløpig kun for kunder i USA. Det er usikkert om Eurofins Norge vil tilby dette som en tjeneste i Norge da det her ser ut til å være større interesse for helgenomsekvensering.

## 5.4 Typing med real-time PCR

Real-time PCR benyttes allerede rutinemessig for listeria-påvisning. Svaret man får er enten negativt eller presumtivt positivt. Presumtivt positive prøver må bekreftes med dyrkning. Kolonier fra oppdyrkingen kan types ved hjelp av helgenomsekvensering, men dette er som nevnt fortsatt for komplisert og kostbart for mange bedrifter. Det finnes imidlertid metoder som kan gi typingsinformasjon ved hjelp av real-time PCR, dog gir ikke disse like mye informasjon som helgenomsekvensering. For mer informasjon om PCR og real-time PCR se delrapport 1 [1].

Det er utviklet et system kalt **GenoListeria Multiplex** der man kan identifisere de 30 mest vanlige klonale kompleksene (CC) av *L. monocytogenes* ved hjelp av real-time PCR [53]. Metoden er tenkt som en kartleggingsmetode og et alternativ til multilokus sekvens typing (MLST) som er mer kostbar og tidkrevende og er allerede benyttes i utbruddsstudier (i tillegg til helgenomsekvensering). Man må likevel kjøre en del real-time PCR reaksjoner avhengig av hvilken type man har (se figur 8).



For å omgå behovet med mange real-time PCR reaksjoner og for å gjøre dataanalysen brukervennlig så har bioMérieux har utviklet et typingssystem på deres GENE-UP system kalt **GENE-UP Typer**. Dette er en real-time PCR med 16 ulike markører koblet til programvare for å bestemme listeria type på tilsvarende nivå som MLST. Dersom man får et positivt resultat på GENE-UP så er tanken at man går tilbake til oppformeringen og plater ut denne på agar skål. Deretter plukker man en koloni og kjører GENE-UP Typer. Metoden er raskere og rimeligere enn helgenomsekvensering, og kan også brukes til å bestemme eventuelle isolater som bør studeres videre med helgenomsekvensering. Metoden er tenkt som et verktøy for internkontroll i bedriften og kan ikke sammenlignes direkte med det myndighetene gjør (dvs. helgenomsekvensering).

Figur 8. Oversiktskart for tolkning av real-time PCR multiplex PCR metoden. Figuren er kopiert fra Félix et al., 2023 [53].

## 6 Hva tenker analyseleverandørene?

Vi har intervjuet tre leverandører av listeria-analyser for å få deres perspektiv på fremtidige hurtigmetoder. Analyseleverandørene ble valgt ut for å representere både store internasjonale selskap, små og mellomstore selskap og oppstartsbedrifter. Personene som ble intervjuet hadde roller innenfor teknisk utvikling og salg.

Fra leverandørenes side så jobbes det kontinuerlig med å forbedre eksisterende metoder og alle er opptatt av enkelhet for brukeren. Alle mente at det er behov for metoder som ikke krever trent personale, og at analyse og databehandling bør være automatisk. De var alle også bevisst på mulig kontamineringsrisiko om man dyrker opp og håndterer listeria i lokalt laboratorium på matbedrifter. For



å redusere risiko så hadde en av leverandørene utviklet et helt lukket system fra oppformering til analyse.

Leverandørene ble spurt om muligheten for å utvikle påvisningsmetoder som ikke krever oppformering. To av leverandørene mente at med dagens teknologi (og myndighets krav) vil være vanskelig å komme utenom oppformering. Det var deres oppfatning at selv å korte ned på tiden for oppformering vil være vanskelig siden listeria-cellene kan være skadde (f.eks., av renholdmidler eller inntørking) og vil bruke tid på reparasjon før de begynner vokse. Så selv om man i laboratoriestudier kan korte ned på oppformeringstiden, er det ikke sikkert det er mulig i praksis. De presiserte at selv om vi har sett mange hurtigtester på markedet under COVID-pandemien, så er det noe helt annet å designe tester for matindustrien enn helse. Mennesker er en egen inkubator så minimumskravet for antall mikroorganismer en klinisk test må kunne påvise er mangfoldig høyere enn det som kreves for prøver fra mat eller produksjonsmiljø. En av leverandørene mente at med deres metode så må man ha en oppformering på minimum 16 timer for å påvise en enkelt skadet listeriacelle. For å kunne oppnå svar samme dag må oppformeringen være kortere enn 8 timer, noe de mente ikke var mulig.

En av leverandørene hadde en metode basert på påvisning av DNA/RNA og mente at deres teknologi ikke krever oppformering før påvisning. Systemet er automatisk etter tilsetning av prøvevæske og påvisning gjøres ved hjelp av isothermisk oppformering av DNA/RNA i et mikrofluidikksystem. Selv om selve påvisningen er testet ut så må det videre uttesting til for å oppnå ønsket deteksjonsgrense. For å få nok listeriaceller til analysen var deres forslag å ta prøver av et større volum enn det som kreves i henhold til ISO 11290-1, for eksempel 250 g fisk eller et større område med klut-prøver for å øke sannsynligheten for å samle bakterier på prøver med lave forurensningsnivåer. Deretter skulle prøven homogeniseres og filtreres for å oppkonsentrere bakterier før analyse.

De to andre leverandørene mente at man ikke kunne kutte ned oppformeringstrinnet dersom man skulle følge myndighetenes krav til påvisning. På spørsmål om muligheten for å korte ned på oppformeringstiden ved hjelp av filtrering eller sentrifugering så sa en leverandør at deres erfaring var at selv en filtrering eller sentrifugering er for komplisert for enkelte kunder. De var opptatt av enkelhet for kundene sine.

Det er utviklet en metode med raskere oppformeringstrinn for *Salmonella*, men denne kan ikke benyttes på alle typer matvarer grunnet ulik bakteriesammensetning i ulike typer mat. På spørsmålet om det kunne vært mulig å designe et oppformeringsmedium spesifikt for laks så svarte en av leverandørene at laks er vanskelig blant annet pga. en vanskelig prøvemasse. De antok at det også vil være en stor variasjon i mikrobiomet i ulike deler av lakseindustrien som vil gjøre dette arbeidet veldig vanskelig. Som for alle oppformeringsmedium poengterte de at det er en balanse mellom spesifisitet og det å få oppformert selv skadede celler.

Alle leverandørene var opptatt av å utvikle bedre metoder for å minimere falske positive resultat. For å oppnå dette nevnte de ulike leverandørene henholdsvis bruk av levende/død fargestoff, bruk av bakteriofager (både i oppformering og til påvisning) eller benytte RNA fra aktive celler (mRNA). Det er viktig å nevne at dagens regelverk for validering at påvisning av *L. monocytogenes* med metoder basert på påvisning av DNA eller RNA må bekreftes med identifikasjon ved oppdyrking av enkeltkolonier på selektive agarskåler (se delrapport 1 [1]). En av leverandørene mente at dagens regelverk for validering er basert på en svært gammel og ineffektiv teknologi og håper at denne vil bli erstattet på sikt når DNA/RNA-baserte metoder blir sikrere med hensyn til eliminering av falske positive.

I tillegg til å jobbe med metoder for påvisning (positiv/negativ) så hadde en av leverandørene et produkt som også kunne tilby typingsinformasjon (real-time PCR). Dette vil ikke være en raskere metode, men et svar på industriens behov for å jobbe systematisk og ha mulighet til å spore hvor de ulike listeriatypene kommer inn eventuelt etablerer seg (finne kilden)

## 7 Oppsummering og konklusjon

I denne rapporten har vi gått gjennom industriens behov og erfaringer med hurtigmetoder, samt presentert påvisningsmetoder og teknikker som er beskrevet i vitenskapelig litteratur eller som brukes i andre bransjer, men som ennå ikke er kommersialisert for matbransjen. Flere aktører fra matindustrien påpekte at de har dårlige erfaringer med dagens hurtigmetoder, med unntak av real-time PCR (dersom det kan regnes som en hurtigmetode i denne sammenhengen). Samtidig har de et stort ønske og behov for en raskere metode. Men er det mulig å oppnå en metode som tar 20-30 minutter? Eksisterende hurtigttester i klinisk bruk kan ta ned imot 20 minutter (for eksempel hjemmetestene for COVID-19), men sensitiviteten og robustheten til disse metodene ligger meget langt fra kravet man har til analysemetoder for mat eller matmiljø.

For å tilfredsstille kravet fra myndighetene og behovet til matbransjen må en test både være **sensitiv** (dvs. fange opp et lavt antall bakterier), **selektiv** (dvs. kun fange opp det man ønsker påvise og ikke andre lignende bakterier) og være **robust** (dvs. fungere under reelle betingelser med andre bakterier, matrester og smuss). Som nevnt i forrige delrapport er prøvevolumet som brukes i påvisningsanalysen i de aller fleste hurtigmetoder veldig lavt – ofte ned i mikroliter. Selv om metodene skulle klare å påvise én listeriacele i det prøvevolumet som blir analysert så må denne ene cella først konsentreres fra et stort utgangsvolum, for eksempel 25 g produktprøve, dersom testen skal kunne bli godkjent som likeverdig med referansemetoden ISO 11290-1. Mange av metodene som er beskrevet i litteraturen mangler dokumentasjon på enten sensitivitet, selektivitet eller robusthet under betingelser man vil finne i mat og matmiljøprøver. I de publikasjonene hvor det er brukt matprøver er forsøkene ofte gjort på en måte som fortynner bort matmassen og smuss slik at den analytiske følsomheten blir høyere (deteksjonsgrensen blir lavere) enn hva man kan tenke seg ville vært tilfelle under reelle betingelser.

Med dagens regelverk og teknologi er det **ikke mulig å utvikle en test som tar 20-30 minutter**. Når det er sagt, er det mye som kan gjøres for å forbedre dagens tester. For å komme i mål med hurtigere påvisning av listeria så er det behov for mer arbeid på 1) **Prøveopparbeidelsen**, inkludert hurtigere og mer selektiv oppformering og teknikker for å oppkonsentrere (fiske ut) listeriacele fra et større prøvevolum. Det kom fram fra spørreundersøkelsen og intervju med matbedrifter at dersom man i framtiden kunne komme ned til en analyse tid på 8-10 timer ville dette for om lag halvparten av laks- og ørretbedriftene bety at de vil kunne varsle renholdere før neste renhold og holde tilbake produkter før de når markedet. Dette er nok også tiden man må komme ned på dersom det skal være kommersielt interessant å utvikle en ny metode. Kan man tenke seg å utvikle oppformeringsmedium som er spesifikke for ulike matprodukter? Dette ble diskutert med utstyrsløseleverandører og mulige grunner til at det ikke er utviklet oppformeringsmedier for spesifikke produkttyper som laks, kan være 1) økonomi – det er mer lønnsomt å utvikle en test som kan brukes i flere bransjer, og 2) laks har en vanskelig prøvematriks – mye fett, smuss, og hemmestoffer som inhiberer. Selv med disse begrensningene så er det et behov å jobbe videre med å optimalisere oppformeringsmediet for å komme nærmere målet om et raskere oppformeringstrinn. 2) **Sikrere metoder**, dvs. metoder der et positivt svar ikke trenger verifisering ved hjelp av dyrkning. Her kan bakteriofager (som biosensor), levende/døde fargestoffer eller metoder som oppformerer og påviser RNA fra aktive celler (f.eks., NASBA) muligens være en framtidig løsning. Det er viktig å huske at etter dagens regelverk for validering at påvisning av *L. monocytogenes* med metoder basert på påvisning av nukleinsyrer må bekreftes med identifikasjon ved oppdyrking av enkeltkolonier på selektive agarskåler. Dersom man i framtiden kan vise at metoder som baseres seg på påvisning nukleinsyrer er sikre og kan skille mellom levende og døde bakterier, så bør man muligens også se på om dagens regelverk for validering bør endres.

I tillegg til raskere og sikrere metoder kom det også fram at det er stor interesse for typingsinformasjon. Gullstandarder her er helgenomsekvensering. Helgenomsekvensering vil kunne hjelpe matbedrifter å se om de finner den samme listeria-stammen gjentatte ganger (persistent stamme eller husstamme)

eller om det jevnlig kommer nye typer listeria inn. Denne type informasjon er viktig for å kunne gjøre korrekte tiltak, enten det er vask- og desinfeksjon tiltak, bytting av utstyr eller bedre kontroll med enkelte råvareleverandører. For mer informasjon om bruk av helgenomsekvensering i matindustrien så henvises det til en veileder [49]. Det finnes også raskere metoder for typing basert på real-time PCR (på MLST nivå) som kan være aktuelle, men nytteverdien for sjømatindustrien må studeres nærmere.

For å oppsummere så er det dessverre ingen nye enkeltmetoder som peker seg ut som en løsning for raskere metoder for påvisning av listeria. Det er identifisert flere ulike punkter som kan forbedres, men siden oppformeringstrinnet i dag tar ca. 18-24 timer er det her det er mest tid å hente. Det kan også være en farbar vei å optimalisere oppformeringsmedium, gjerne spesifikt for ulike industrier og/eller matvarer ved f.eks. å inkludere bakteriofager eller andre komponenter som hemmer konkurrerende bakterier og/eller andre listeria arter som reagerer positivt på testen. Selv om det finnes en del lovende metoder i vitenskapelig litteratur så innebærer flere av de en del manuelle og til dels kompliserte trinn. En ny metode må være enkel, robust, og ha mulighet for å kjøre mange prøver samtidig. Fram til analyseleverandørene kommer opp med en bedre hurtigmetode for listeria så kan mye tyde på at mer informasjon i form av typing er viktig i arbeidet med å forebygge listeriasmitte i matindustrien.

## 8 Referanser

1. Moen, B., S. Langsrud, and A. Fagerlund, *Metoder for påvisning av Listeria i mat og produksjonsmiljø. Delrapport 1: Hurtigmatoder på markedet*. <https://www.fhf.no/prosjekter/prosjektbasen/901822/>. 2023, Nofima.
2. RESIST Food *Listeria monocytogenes* deteksjon kit. <https://www.kurabiotech.com/resist-food-listeria-monocytogenes>.
3. Innovation center for U.S. Dairy, *Control of Listeria monocytogenes - guidance for the U.S. dairy industry*. <https://www.usdairy.com/getmedia/9023c332-2ae0-4883-986b-0fdac5058881/Pathogen-Guidance-FINAL-10-22-2020.pdf>. 2017.
4. United Fresh Food Safety & Technology Council, *Guidance on environmental monitoring and control of Listeria for the fresh produce industry*, U.F.P. Association, Editor. 2018.
5. FAO and WHO, *Listeria monocytogenes in ready-to-eat (RTE) food: attribution, characterization and monitoring: Meeting report*, in *Microbiological risk assessment series 38*, W.H.O.F.a.A.O.o.t.U. Nations, Editor. 2022, <https://doi.org/10.4060/cc2400en>: Rome.
6. Alali, W.Q. and D.W. Schaffner, *Relationship between Listeria monocytogenes and Listeria spp. in seafood processing plants*. *J Food Prot*, 2013. **76**(7): p. 1279-82.
7. Ganz, G.M., et al., *AquaSpark(TM) - Rapid Environmental Monitoring of Listeria monocytogenes*. *Chimia (Aarau)*, 2020. **74**(10): p. 791-797.
8. Armstrong, C.M., et al., *Impacts of Clarification Techniques on Sample Constituents and Pathogen Retention*. *Foods*, 2019. **8**(12).
9. Bai, X.K., et al., *Rapid and accurate detection for Listeria monocytogenes in milk using ampicillin-mediated magnetic separation coupled with quantitative real-time PCR*. *Microchemical Journal*, 2022. **183**.
10. Wagner, E., et al., *Surveillance of Listeria monocytogenes: Early detection, population dynamics and quasimetagenomic sequencing during selective enrichment*. *Appl Environ Microbiol*, 2021: p. AEM0177421.
11. Xiao, F.B., et al., *Rapid-Response Magnetic Enrichment Strategy for Significantly Improving Sensitivity of Multiplex PCR Analysis of Pathogenic Species*. *Applied Sciences-Basel*, 2022. **12**(13).
12. Dynabeads® anti-Listeria. [https://www.thermofisher.com/document-connect/document-connect.html?url=https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets%2FSLG%2Fmanuals%2Fdynabeads\\_anti\\_listeria\\_man.pdf](https://www.thermofisher.com/document-connect/document-connect.html?url=https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets%2FSLG%2Fmanuals%2Fdynabeads_anti_listeria_man.pdf).
13. MicroVal Certification, *Validation of Assurance GDS L. monocytogenes Tq*. [https://nen.bettywebblocks.com/view-microval-details?cert\\_nr=2014LR32&r\\_name=MicroVal](https://nen.bettywebblocks.com/view-microval-details?cert_nr=2014LR32&r_name=MicroVal).
14. Zhou, Y. and R.P. Ramasamy, *Isolation and separation of Listeria monocytogenes using bacteriophage P100-modified magnetic particles*. *COLLOIDS AND SURFACES B-BIOINTERFACES*, 2019. **175**: p. 421-427.
15. Maciel, C., et al., *Development of a Novel Phagomagnetic-Assisted Isothermal DNA Amplification System for Endpoint Electrochemical Detection of Listeria monocytogenes*. *BIOSENSORS-BASEL*, 2023. **13**(4).
16. EFSA Panel on Biological Hazards, *Evaluation of the safety and efficacy of Listex™ P100 for reduction of pathogens on different ready-to-eat (RTE) food products*, in *Efsa journal*. 2016.
17. Kim, J.H., S. Jung, and S.W. Oh, *Combination of bacteria concentration and DNA concentration for rapid detection of E. coli O157:H7, L. monocytogenes, and S. Typhimurium without microbial enrichment*. *LWT-FOOD SCIENCE AND TECHNOLOGY*, 2020. **117**.
18. Chikhi, L., et al., *Comparison of Listeria monocytogenes alternative detection methods for food microbiology official controls in Europe*. *Int J Food Microbiol*, 2024. **408**: p. 110448.
19. Moon, Y.J., S.Y. Lee, and S.W. Oh, *A Review of Isothermal Amplification Methods and Food-Origin Inhibitors against Detecting Food-Borne Pathogens*. *Foods*, 2022. **11**(3).
20. Li, X.R., et al., *Use of β-cyclodextrin and milk protein-coated activated charcoal for rapid detection of Listeria monocytogenes in leafy greens by PCR without pre-enrichment*. *Food Control*, 2022. **140**.
21. Oliveira, B.B., B. Veigas, and P.V. Baptista, *Isothermal Amplification of Nucleic Acids: The Race for the Next "Gold Standard"*. *Frontiers in Sensors*, 2021. **2**.
22. Thevenot, D.R., et al., *Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification*. *Biosens Bioelectron*, 2001. **16**(1-2): p. 121-31.
23. Kellner, M.J., et al., *SHERLOCK: nucleic acid detection with CRISPR nucleases*. *Nature Protocols*, 2019. **14**(10): p. 2986-3012.
24. Mustafa, M.I. and A.M. Makhawi, *SHERLOCK and DETECTR: CRISPR-Cas Systems as Potential Rapid Diagnostic Tools for Emerging Infectious Diseases (Retraction of Vol 59, art no E00745-20, 2021)*. *Journal of Clinical Microbiology*, 2023.
25. Huang, T., R. Zhang, and J. Li, *CRISPR-Cas-based techniques for pathogen detection: Retrospect, recent advances, and future perspectives*. *J Adv Res*, 2023. **50**: p. 69-82.
26. Selvam, K., et al., *CRISPR-Cas Systems-Based Bacterial Detection: A Scoping Review*. *Diagnostics (Basel)*, 2022. **12**(6).
27. Xiao, Y.R., et al., *A rapid and inexpensive nucleic acid detection platform for Listeria monocytogenes based on the CRISPR/Cas12a system*. *TALANTA*, 2023. **259**.
28. Zhuang, J., et al., *SERS-based CRISPR/Cas assay on microfluidic paper analytical devices for supersensitive detection of pathogenic bacteria in foods*. *Biosensors and Bioelectronics*, 2022. **207**.
29. Cossettini, A., et al., *Rapid detection of Listeria monocytogenes, Salmonella, Campylobacter spp., and Escherichia coli in food using biosensors*. *Food Control*, 2022. **137**.
30. Paczesny, J., L. Richter, and R. Holyst, *Recent Progress in the Detection of Bacteria Using Bacteriophages: A Review*. *Viruses-Basel*, 2020. **12**(8).
31. Meile, S., et al., *Engineered Reporter Phages for Rapid Bioluminescence-Based Detection and Differentiation of Viable Cells*. *Applied and Environmental Microbiology*, 2020. **86**(11).
32. Shi, D.L. and H. Shi, *Combining loop-mediated isothermal amplification and nanozyme-strip for ultrasensitive and rapid detection of viable Listeria monocytogenes cells and biofilms*. *LWT-FOOD SCIENCE AND TECHNOLOGY*, 2022. **154**.
33. Shi, X.Q., et al., *Biotin exposure-based immunomagnetic separation coupled with sodium dodecyl sulfate, propidium monoazide, and multiplex real-time PCR for rapid detection of viable Salmonella Typhimurium, Staphylococcus aureus, and Listeria monocytogenes in milk*. *JOURNAL OF DAIRY SCIENCE*, 2021. **104**(6): p. 6588-6597.

34. Gonchar, K.A., et al., *Optical Express Monitoring of Internalin B Protein of Listeria Monocytogenes Pathogenic Bacteria Using SERS-Active Silver-Decorated Silicon Nanowires*. OPTICS AND SPECTROSCOPY, 2022. **130**(9): p. 521-526.
35. Xiao, L., S. Feng, and X. Lu, *Raman spectroscopy: Principles and recent applications in food safety*. Adv Food Nutr Res, 2023. **106**: p. 1-29.
36. Zhou, X., et al., *Bacteria Detection: From Powerful SERS to Its Advanced Compatible Techniques*. Advanced Science, 2020. **7**(23).
37. Busch, R.T., et al., *Detection and Aggregation of Listeria Monocytogenes Using Polyclonal Antibody Gold-Coated Magnetic Nanoshells Surface-Enhanced Raman Spectroscopy Substrates*. FRONTIERS IN NANOTECHNOLOGY, 2021. **3**.
38. Cheng, S.Y., et al., *An efficient SERS platform for the ultrasensitive detection of Staphylococcus aureus and Listeria monocytogenes via wheat germ agglutinin-modified magnetic SERS substrate and streptavidin/aptamer co-functionalized SERS tags*. ANALYTICA CHIMICA ACTA, 2021. **1187**.
39. Zhu, A.F., et al., *SERS-based Au@Ag NPs Solid-phase substrate combined with chemometrics for rapid discrimination of multiple foodborne pathogens*. SPECTROCHIMICA ACTA PART A-MOLECULAR AND BIOMOLECULAR SPECTROSCOPY, 2022. **270**.
40. Zhou, Z.H., et al., *A universal SERS-label immunoassay for pathogen bacteria detection based on Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@Au-aptamer separation and antibody-protein A orientation recognition*. ANALYTICA CHIMICA ACTA, 2021. **1160**.
41. Li, Z.W., et al., *Research progress of semiconductor metal oxides-based gas sensors towards metabolic gas of Listeria monocytogenes: A mini review*. Materials Science in Semiconductor Processing, 2023. **163**.
42. Xiao, Z.J. and J.R. Lu, *Generation of Acetoin and Its Derivatives in Foods*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2014. **62**(28): p. 6487-6497.
43. Chen, H., D.X. Huo, and J.L. Zhang, *Gas Recognition in E-Nose System: A Review*. IEEE Transactions on Biomedical Circuits and Systems, 2022. **16**(2): p. 169-184.
44. Astantri, P.F., et al., *Lab-Made Electronic Nose for Fast Detection of Listeria monocytogenes and Bacillus cereus*. VETERINARY SCIENCES, 2020. **7**(1).
45. Wu, P.C., et al., *Recent advances of lateral flow immunoassay for bacterial detection: Capture-antibody-independent strategies and high-sensitivity detection technologies*. Trac-Trends in Analytical Chemistry, 2023. **166**.
46. Wu, Z.Z., *Simultaneous Detection of Listeria monocytogenes and Salmonella typhimurium by a SERS-Based Lateral Flow Immunochromatographic Assay*. FOOD ANALYTICAL METHODS, 2019. **12**(5): p. 1086-1091.
47. Yan, S.S., et al., *SERS-based lateral flow assay combined with machine learning for highly sensitive quantitative analysis of Escherichia coli O157:H7*. ANALYTICAL AND BIOANALYTICAL CHEMISTRY, 2020. **412**(28): p. 7881-7890.
48. Sohrabi, H., et al., *State of the art: Lateral flow assays toward the point-of-care foodborne pathogenic bacteria detection in food samples*. Compr Rev Food Sci Food Saf, 2022. **21**(2): p. 1868-1912.
49. Langsrud, S., et al., *Veileder: Bruk av helgenomsekvensering for forebygging og kontroll av Listeria monocytogenes i matindustrien*. <https://zenodo.org/records/10468595>, 2024, Nofima.
50. Ptasinska, A., et al., *Diagnostic accuracy of loop-mediated isothermal amplification coupled to nanopore sequencing (LamPORE) for the detection of SARS-CoV-2 infection at scale in symptomatic and asymptomatic populations*. Clin Microbiol Infect, 2021. **27**(9): p. 1348 e1-1348 e7.
51. *Rheonix Listeria PatternAlert™ assay*. <https://rheonix.com/food-beverage-testing/listeria-patternalert-assay/>.
52. Mermelstein, N.H. *Automated Assay Maps Persistent Listeria*. <https://www.ift.org/news-and-publications/food-technology-magazine/issues/2019/october/columns/foodsafety-automated-assay-maps-persistent-listeria>. 2019.
53. Felix, B., et al., *Identification by High-Throughput Real-Time PCR of 30 Major Circulating Listeria monocytogenes Clonal Complexes in Europe*. Microbiol Spectr, 2023. **11**(3): p. e0395422.