

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

## Delrapport 1: Hurtigmetoder på markedet



Foto: Jon-Are Berg

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 Johnsenegate 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> 18/2023	<i>ISBN:</i> 978-82-8296-752-5	<i>ISSN:</i> 1890-579X
<i>Dato:</i> 3. juli 2023	<i>Antall sider + sider vedlegg:</i> 27 + 0	<i>Prosjektnummer:</i> 13991
<i>Tittel:</i> <b>Metoder for påvisning av Listeria i mat og produksjonsmiljø – Delrapport 1: Hurtigmetoder på markedet</b>		
<i>Title:</i> Methods for Listeria detection in food and food processing environment – Report 1: Commercially available rapid assays		
<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> Næringsmiddelhygieneforskriften pålegger alle produsenter av spiseklar mat hvor <i>Listeria monocytogenes</i> (listeria) er en fare å gjøre listeria-analyser av produkter, produksjonsmiljø og prosessutstyr. Det er påkrevd å bruke referansemetoder for prøvetaking og analyser fra den internasjonale organisasjonen for standardisering (ISO), eller alternative metoder som er validert opp mot referansemetodene. Ulempen med dagens referansemetoder for listeria-påvisning er at det tar minimum to dager til man får svar, noe som reduserer mulighetene for å gjøre risikoreduerende tiltak, som tilbaketrekking før produkter når markedet eller rengjøring for å fjerne listeria fra prosessutstyr. Bruk av hurtigmetoder som enten korter ned på oppformeringstrinnet, påvisningstrinnet eller begge deler vil derfor kunne øke mattryggheten. Denne rapporten gir en oversikt over regelverk og referansemetoder, trinnene i en mikrobiologisk påvisningsmetode, samt prinsippene bak eksisterende teknologier for listeria påvisning. Rapporten inneholder også en oversikt over validerte og ikke-validerte kommersielt tilgjengelige tester for listeria-påvisning.		
<i>English summary/recommendation:</i> All manufacturers of ready-to-eat foods where <i>Listeria monocytogenes</i> (listeria) is a hazard are required to perform listeria analyses of products, production environments and process equipment. The regulations require the use of reference methods from the International Organization of Standards (ISO) for sampling and analysis, or alternative methods validated against the reference methods. The disadvantage of current reference methods for listeria detection is that they are time consuming, taking a minimum of two days. This reduces the possibility for implementing risk-reducing measures, such as withdrawal of products before they reach the market, or cleaning to remove listeria from process equipment. The use of rapid methods that either shorten the enrichment step, the detection step, or both, may therefore increase food safety. This report provides an overview of regulations and reference methods, the steps of a microbiological detection method, and the principles behind existing listeria detection technologies. The report also includes an overview of validated and non-validated testkits for listeria detection.		

## Innhold

<b>1</b>	<b>Sammendrag</b>	<b>2</b>
<b>2</b>	<b>Innledning</b>	<b>3</b>
2.1	Bakgrunn og målsetning	3
2.2	Listeria i mat og matprosesseringsanlegg	3
2.3	Regelverk og referansemetoder for listeria-overvåking	3
2.3.1	Prøvetaking	4
2.3.2	Påvisning	4
2.3.3	Alternativer til ISO-metodene og validering	4
<b>3</b>	<b>Tester for påvisning av listeria</b>	<b>5</b>
3.1	Trinnene i en mikrobiologisk påvisningsmetode og validering	5
3.2	Validerte påvisningsmetoder for <i>L. monocytogenes</i>	5
3.3	Ikke-validerte påvisningsmetoder for <i>L. monocytogenes</i>	6
3.4	Påvisning av bakterier fra slekten <i>Listeria</i>	7
<b>4</b>	<b>Prinsipper bak eksisterende teknologier for selektiv påvisning</b>	<b>8</b>
4.1	Dyrknings-baserte metoder	8
4.2	Biokjemiske metoder	10
4.3	Nukleinsyre (DNA/RNA) baserte metoder	11
4.3.1	Konvensjonell PCR (end-point PCR)	11
4.3.2	Real-time PCR	11
4.3.3	Isotermisk amplifisering	11
4.3.4	Hybridisering	12
4.3.5	Nukleinsyre-basert lateral flow immunkromatografisk analyse (NALFIA)	12
4.3.6	Sekvensering	13
4.4	Immunologiske metoder	14
4.4.1	Enzymlinket immunosorbent assay (ELISA)	14
4.4.2	Lateral flow immunkromatografisk analyse (LFIA)	14
4.4.3	Enzym-linket fluorescent assay (ELFA)	15
4.5	Biosensorer (signal-baserte metoder)	15
<b>5</b>	<b>Diskusjon</b>	<b>16</b>
5.1	Faktorer relatert til prøver og prøvetaking	16
5.2	Hvor raskt er det mulig å oppformere <i>L. monocytogenes</i> ?	16
5.3	Valg av teknologi	17
5.4	Konklusjon	17
	<b>Tabell 1: Validerte kommersielle testsett for påvisning av <i>L. monocytogenes</i><sup>a</sup></b>	<b>18</b>
	<b>Tabell 2: Kommersielle testsett uten ISO 16140-2 validering for påvisning av <i>L. monocytogenes</i><sup>a</sup></b>	<b>21</b>
	<b>Tabell 3: Kommersielle testsett for <i>Listeria</i> spp.<sup>a</sup></b>	<b>23</b>
<b>6</b>	<b>Referanser</b>	<b>25</b>

# 1 Sammendrag

Næringsmiddelhygieneforskriften pålegger alle produsenter av spiseklar mat hvor *Listeria monocytogenes* (listeria) er en fare å gjøre listeria-analyser av produkter, produksjonsmiljø og prosessutstyr. Hensikten med dette er å sikre at mat ikke inneholder mer enn 100 listeria per gram ved konsum. Det er pålagt å bruke referansemeterer fra den internasjonale organisasjonen for standarder (ISO), eventuelt metoder som er validert opp disse, for prøvetaking og analyse.

En stor ulempe med ISO-metodene for listeria-analyser er at det tar minimum to dager til man får svar. Dersom bedrifter ikke kan gjøre analysen selv vil forsendelsestid komme i tillegg. Lang tid fra prøvetaking til prøvesvar reduserer mulighetene for å gjøre risikoreduserende tiltak, som tilbaketrekking før produkter når markedet eller rengjøring for å fjerne listeria fra prosessutstyr. Bruk av hurtigmetoder som enten korter ned på oppformeringstrinnet (som skal gi nok listeria til at den er mulig å påvise), påvisningstrinnet eller begge deler vil derfor kunne øke mattryggheten.

En viktig grunn til at analysene tar tid er et krav om at man skal dokumentere at det er mindre enn 1 *L. monocytogenes* i 25 gram matprøve. Siden påvisningsmetodene opererer med prøvevolumer i mikroliterskala og vandig løsning, må man fortynne prøven og ha et oppformeringstrinn for å kunne sikre at listeria er til stede i dette lille prøvevolumet (alternativet ville være å fortynne prøven og dele den opp i ca 5000 analyser). Til dette finnes det spesielle dyrkingsmedier (for eksempel Fraser buljong) som hemmer andre bakterier i prøven og samtidig inneholder det listeria behøver for å vokse. Neste utfordring er at det ikke finnes metoder som klarer å påvise en enkelt listeria-celle direkte. Man må derfor for eksempel oppkopiere DNA eller RNA fra det lille prøvevolumet man skal analysere før man påviser listeria.

I dag finnes det validerte, kommersielle metoder hvor man kan få svar på om en prøve **ikke** eller **presumptivt** inneholder *L. monocytogenes* i løpet av 20-28 timer. Disse metodene kombinerer ofte et forkortet oppformeringstrinn med påvisning av molekyler som er spesifikke for listeria, som DNA-sekvens eller spesielle proteiner. De raskeste og mest brukte metodene er basert på real-time PCR. Grunnen til at man ikke får et endelig svar etter 20-28 timer er at påvisningsmetoden både slår positivt ut for døde og levende listeria. For å få endelig svar må man gå et trinn videre med utplating på selektive skåler, oppdyrking og påvisning, så total analysetid før endelig positivt svar er 2-3 døgn. Mange av metodene krever en man kjøper inn spesialinstrumenter i tillegg til testsett. En oversikt med 17 validerte metoder på markedet finnes i rapporten.

Det finnes også en rekke ikke-validerte metoder på marked de fleste med en analysetid på minst 24 timer for å vite om prøve **ikke** eller **presumptivt** inneholder *L. monocytogenes*. Den raskeste metoden på markedet er EnviroX-F fra PathogenDx som kan påvise listeria (presumptivt) i renholdsprøver etter 6-8 timer. Metoden er basert på massekopiering av DNA, hybridisering til DNA og måling av fluorescens. Dessverre er protokollen er komplisert og omfattende, så den krever mye arbeidsressurser og et trent laboratoriepersonell. Listeria assay kit fra Real Time analyzers, også for renholdsprøver, kan gi svar (presumptivt) etter 9 timer, hvorav prøvepreparering og analysetiden tar 1 time. Metoden er basert på å separere listeria fra andre bakterier med immunomagnetiske kuler og måling av fluorescens. Utover disse to testene finnes en rekke kommersielle testsett med og uten oppformeringstrinn og påvisning av spesifikke DNA-sekvenser, RNA-sekvenser, enzymer eller overflateproteiner, men hvor analysetiden er minst 24 timer. En oversikt over 12 kommersielle metoder er gitt i rapporten.

Et alternativ til å påvise *Listeria monocytogenes* er å velge en metode som påviser alle typer *Listeria*. Den raskeste testen på markedet, ANSR Listeria Right Now fra Neogen har en enkel prøvepreparering og man får svar etter 1 time. Metoden egner seg kun for renholdsprøver. For matprøver vil analysetiden være minimum 24 timer.

## 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. Denne rapporten er første delrapport prosjektet og inneholder en oversikt over eksisterende metoder og tilgjengelige kommersielle testsett<sup>1</sup> for påvisning av *L. monocytogenes*. Rapporten inkluderer metoder som er validert i henhold til ISO 14160-2 [1] som godkjent alternativ til ISO 11290-1 [2] – og som dermed er godkjent for bruk i europeisk matindustri, ikke-validerte metoder for påvisning av *L. monocytogenes*, og en oversikt over tilgjengelige metoder og testsett for påvisning av *Listeria* spp. (dvs. 'arter i slekten *Listeria*'). Videre arbeid i prosjektet vil ta for seg nye lovende teknologier for raskere påvisning av listeria, samt kostnadsoverslag for utvikling av en raskere metode.

### 2.2 Listeria i mat og matprosesseringsanlegg

Bakterieslekten *Listeria* består av flere arter der *Listeria monocytogenes* er den som forårsaker sykdom hos mennesker. *L. monocytogenes* er en av de matpatogene bakteriene man bekymrer seg mest over i norsk matindustri da den er vanlig forekommende i naturen og produksjonsmiljø. Når noen blir syke av listeria, er årsaken oftest at de har spist spiseklare matprodukter listeria har vokst opp til et høyt antall. Selv om listeria vanligvis gir asymptomatiske eller influensalignende symptomer, så kan smitte også gi den alvorlige sykdommen listeriose, vanligvis hos høyrisikogrupper. Symptomer hos ikke-gravide er meningitt og sepsis, og i sjeldne tilfeller diaré. Gravide kan smitte sitt barn uten selv å bli syk og forårsake infeksjon som kan føre til spontanabort, dødfødsel og sykdom hos det nyfødte barnet.

Kontaminering av matprodukter med *L. monocytogenes* skjer oftest gjennom krysskontaminering fra matproduksjonsmiljøet [3, 4]. Det er velkjent at overvåkning av *L. monocytogenes* i mat primært ikke håndteres med kontroll av sluttproduktene, men ved overvåkning av råvarer og prosesseringsmiljø for å finne kilder, reservoarer og krysskontamineringsveier [5, 6]. For å forebygge smitte til mat er det viktig med gode verktøy og rutiner for prøvetaking, påvisning av bakterien og smittesporing. Nofima har tidligere utarbeidet en veileder for forebygging, overvåking og fjerning av listeria i laksenæringen [7]. Denne er ment som et praktisk hjelpemiddel for å utøve målrettet arbeid for økt kontroll med listeria i anlegg som produserer laks. Det er stadig strengere krav til kontroll med *L. monocytogenes* og flere land og innkjøpere har også nulltoleranse for *L. monocytogenes* på konsumferdige produkter.

### 2.3 Regelverk og referansemetoder for listeria-overvåking

EUs forordning No 2073/2005 [8], gjennomført i Næringsmiddelhygieneforskriften [9] krever at bedrifter som produserer spiseferdige produkter hvor *L. monocytogenes* kan vokse har en prøvetakingsplan for produksjonsmiljø, prosessutstyr og produkter. Forordningen krever videre at godkjente analysemetoder brukes. For produktprøver er det krav om at næringsmidlene oppfyller ett av to mikrobiologiske kriterier: Enten fravær av *L. monocytogenes* i 25 g når produktet forlater produsenten, eller mindre enn 100 *L. monocytogenes* per gram i produktet ved holdbarhetstidens utløp.

---

<sup>1</sup> Et sett av reagenser og annet utstyr til en bestemt test kalles et 'kit' eller et 'testsett' [Vogt. 2004. Tidsskr Nor Lægeforen. 124:973](http://Vogt.2004.Tidsskr.Nor.Laegeforen.124:973).

### 2.3.1 Prøvetaking

For prøvetaking av produkt er det krav til å følge referansemetoden ISO 6887 [10, 11]. For prøvetaking av produksjonsmiljø og prosessutstyr er det krav om at standardmetoden ISO 18593 [12] brukes som referansemetode. Andre framgangsmåter kan brukes dersom det kan dokumenteres overfor vedkommende myndighet at de gir likeverdige resultat.

### 2.3.2 Påvisning

Påvisningsmetoden ISO 11290-1 [2] må benyttes som referansemetode for å bevise fravær av *L. monocytogenes* i 25 g produktprøve eller i prøver fra produksjonsmiljø og prosessutstyr. Metoden innebærer en to-trinns selektiv oppformering av listeria som tar til sammen 48 timer, etterfulgt av en dyrkningsbasert påvisning og eventuelt en endelig bekreftelse. Den dyrkningsbaserte påvisningen er en oppdyrking på selektive agarskåler i opptil 48 timer etterfulgt morfologiske eller biokjemiske tester for en bekreftelse på at det er påvist listeria. Med denne metoden tar bekreftelse av fravær av listeria fire døgn. Påvisning av tilstedeværelse av listeria tar mellom to og fire døgn (påvisning etter to døgn kan oppnås dersom man sår ut på agar også etter 24 timer oppformering). Metoden kan påvise (eller bekrefte mindre enn) 1 *Listeria*-celle per prøvemengde (deteksjonsgrense 'level of detection' 50% [LOD<sub>50%</sub>] er 0.5-1 cfu per 25 g).

Kvantifiseringsmetoden ISO 11290-2 [13] må benyttes som referansemetode om man skal vise at nivået i produkt er lavt nok til å ikke overstige 100 *L. monocytogenes* per gram i løpet av holdbarhetstiden. I ISO 11290-2 fortynnes prøven direkte og dyrkes på selektive agarskåler i 48 timer før avlesning uten forutgående oppformering. Presumptivt positivt resultat kan leses av tidligst etter 24 timer og deteksjonsgrensen er på 10-100 cfu per gram matvare.

### 2.3.3 Alternativer til ISO-metodene og validering

Artikkel 5 i forordningen (EU 2073/2005) anfører at alternative analysemetoder kan brukes dersom de gir likeverdige resultater med referansemetoden. Dette må valideres med protokollen i standarden ISO 16140-2 [1]. Videre anføres det at 'Opphavsrettslig beskyttede metoder' – i praksis kommersielle testsett hvor noen av ingrediensene er hemmelige – kan benyttes som alternative analysemetoder dersom de er validert i samsvar med ISO 16140-2 og dette er sertifisert av et uavhengig sertifiseringsorgan. Andre analysemetoder enn de som er validert og sertifisert kan brukes etter validering i samsvar med internasjonalt anerkjente protokoller og at vedkommende myndighet har godkjent bruken av dem (artikkel 5 i EU 2073/2005). Videre i denne rapporten vil det med «validerte metoder» menes kommersielt tilgjengelige metoder eller testsett som er validert iht. kravene fra myndighetene.

Den norsk-produserte testen Sensilist [14] er ikke en erstatning for påvisningsmetoden ISO 11290-1, men for kvantifiseringsmetoden ISO 11290-2. Sensilist markedsføres som en hurtigmetode, men tar like lang tid som referansemetoden. Fordelen er at den er mer sensitiv, og kan påvise ned til <1 cfu/g i næringsmidler og miljøprøver. Sensilist er under uttesting hos Campden BRI for validering i henhold til ISO 16140-2.

Mange av de ikke-validerte påvisningsmetodene som er beskrevet i denne rapporten er validert av AOAC International [15, 16] opp mot de amerikanske referansemetodene brukt av FDA [17] og USDA [18]. AOAC bruker normalt ikke ISO 16140-2 og denne valideringen er dermed ikke gyldig i EU eller Norge.

### 3 Tester for påvisning av listeria

En stor ulempe med referansemethodene fra ISO (og også de fra FDA og USDA) er at det tar lang tid til prøvesvar, noe som begrenser mulighetene for å unngå at kontaminerte produkter sendes ut på markedet eller å kunne sette inn tiltak for å unngå at nye partier blir kontaminert med listeria.

*En hurtigmetode for kvalitativ mikrobiologisk kontroll kan defineres som en alternativ metode som reduserer tiden fram til resultat [19].*

I tillegg til selve analysetiden må man i mange tilfeller også beregne tid til frakt av prøver til analyselaboratorium siden mange bedrifter ikke ønsker eller har mulighet til å oppformere listeria i egen fabrikk. En analysemetode kan derfor i prinsippet benevnes som 'hurtig' dersom bedriften kan utføre testen selv og dermed spare tid på transport og eventuell annen administrasjon, for eksempel om den er enklere og mer brukervennlig enn referansemethoden. Det kan bemerkes at det er store variasjoner i kostnader mellom forskjellige metoder, for eksempel når det gjelder instrumenter, investeringskostnader, forbruksmateriell og personalkostnader. Dette må selvfølgelig også tas i betraktning når man sammenlikner nytteverdien av metodene.

#### 3.1 Trinnene i en mikrobiologisk påvisningsmetode og validering

Påvisning av *L. monocytogenes* i produksjonsmiljø, råvarer eller produkt foregår i flere steg: **1) prøvetaking**, for eksempel svabring av overflate eller uttak av kjøttprøve, **2) oppformering** av listeria i selektivt dyrkningsmedium for å få et høyt nok antall til å kunne påvise bakterien, og **3) selektiv påvisning** ved bruk av en metode basert på oppdyrking på selektive skåler, en immunologisk test eller genetisk test.

Redusert analysetid kan oppnås ved å bruke en alternativ metode som har et raskere selektivt oppformeringstrinn, en raskere analysemetode for selektiv påvisning eller begge deler. Imidlertid vil i mange tilfeller mulighetene for bruk av en alternativ raskere metode i ett av trinnene påvirke kravet til metoden som brukes i det andre trinnet, og man må derfor ofte se begge i sammenheng. ISO 16140-2 kan brukes til å validere et alternativt oppformeringstrinn, et alternativt selektivt påvisningstrinn, eller en alternativ metode for begge trinnene kombinert. Det er mulig å validere metoder enten for alle matvare- og prøvetyper, eller kun for et utvalg.

#### 3.2 Validerte påvisningsmetoder for *L. monocytogenes*

En oversikt over kommersielt tilgjengelige hurtigmetoder for påvisning av *L. monocytogenes* validert i henhold til ISO 14160-2 opp mot ISO 11290-1 er sammenfattet i **Tabell 1**. Metodene baserer seg på immunologiske eller molekylærbiologiske prinsipper (se kapittel 4) og er raskere enn de dyrkningsbaserte teknikkene i referansemethoden. Som det fremgår av tabellen, er det en overvekt av metoder basert på real-time PCR. Ofte inkluderer metodene i tillegg et raskere oppformeringstrinn. De raskeste metodene kan bekrefte fravær av *L. monocytogenes* eller gi en presumptiv<sup>2</sup> påvisning av *L. monocytogenes* i løpet av 20-24 timer. Metoder basert på real-time PCR er såpass vanlig i bruk, også av kommersielle analyse-laboratorier, at de kan betraktes som dagens standardmetode for påvisning av *L. monocytogenes*.

Alle kommersielle tilgjengelige validerte hurtigmetoder krever at en presumptiv påvisning må bekreftes med identifikasjon ved oppdyrking av enkeltkolonier på selektive agarskåler (dette oppfyller kravet om identifisering med morfologiske eller biokjemiske tester). Dette tar minimum 24 timer i tillegg til oppgitt analysetid. Årsaken til dette er antagelig at ingen av hurtigmetodene kan bekrefte om bakterien som påvises er levende eller død, noe som er nødvendig for å få et svar som er likeverdig med det som

<sup>2</sup> Presumptiv betyr 'trolig, sannsynlig eller det som man må forutsette'.



referansemetoden ISO 11290-1 gir. I denne sammenheng kan det nevnes at det finnes én metode, 'Bruker MALDI Biotyper' metoden [20], basert på MALDI-TOF massespektrometri identifisering av kolonier, som er et validert alternativ for identifikasjon ved morfologiske eller biokjemiske tester. bioMérieux har et system (VITEX 2) med tilsvarende bruksområde, men denne er kun AOAC-validert.

Man vil altså med dagens standardmetoder kunne bekrefte fravær eller få en presumptiv påvisning av *L. monocytogenes* etter ca. 24 timer, mens den endelige bekreftelsen først kommer etter to eller tre døgn. I praksis vil man antageligvis uansett agere som om en prøve er positiv etter et innledende positivt svar, for raskest mulig å kunne sette inn nødvendige forebyggende tiltak og unngå å sende produkter med listeria ut på markedet.

### 3.3 Ikke-validerte påvisningsmetoder for *L. monocytogenes*

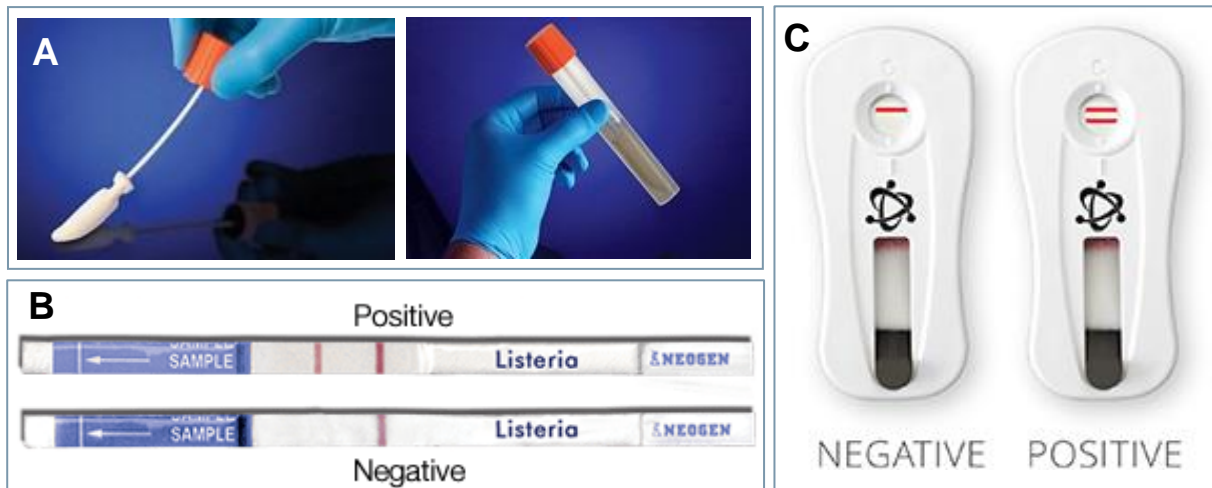
Årsaken til at en test ikke er validert (eller ikke er under validering) i henhold til ISO 14160-2 vil i de fleste tilfeller være at den ikke er like nøyaktig som referansemetoden ISO 11290-1, som kan påvise 1 *Listeria*-celle i 25 g eller 25 mL prøve uten å gi utslag på andre bakterier enn *L. monocytogenes*. Metoder med lav sensitivitet retter seg ofte mot analyse av overflateprøver og ikke matprøver. Noen tester er validert etter andre standarder enn ISO fordi de ikke retter seg primært mot det europeiske markedet.

I visse tilfeller og til visse formål kan en metode som ikke er 100% treffsikker være et **nyttig supplement til validerte metoder** for å kunne sette inn nødvendige forebyggende tiltak i tide og redusere risikoen for å sende produkter med listeria ut på markedet. Dette gjelder kanskje spesielt hvis metoden er vesentlig raskere eller billigere enn de validerte metodene. Det er imidlertid viktig å være klar over eventuelle begrensninger i metodene som blir benyttet og i tillegg gjennomføre en prøvetakings- og analyseplan hvor godkjente metoder brukes, slik at kravene i Næringsmiddelhygieneforskriften oppfylles. Dette gjelder også for bruk av en av de validerte metodene til andre matvarer eller formål enn det de er validert for, eller bruk av en av de validerte metodene med et kortere selektivt dyrkningstrinn enn det den validerte metoden angir.

Vanlige begrensninger for ikke-validerte metoder er lav **sensitivitet** (falske negative prøver fordi metoden ikke kan påvise lave nivåer av listeria), **selektivitet** (falske positive prøver fordi metoden rapporterer andre bakterier som *L. monocytogenes* eller falske negative prøver fordi ikke alle undergrupper av *L. monocytogenes* blir fanget opp), og/eller **robusthet** (falske negative prøver fordi metoden ikke virker hvis noe i prøven hemmer påvisning, for eksempel smuss, laksekjøtt eller salt).

En oversikt over kommersielle metoder for påvisning av *L. monocytogenes* på markedet som ikke er validerte i henhold til ISO 14160-2 er sammenfattet i **Tabell 2**. Kommerielle testsett basert på real-time PCR er ikke tatt med i denne oversikten. De fleste av metodene i oversikten (9 av 12) er validert av AOAC. Minimum total analysetid varierer fra 6-8 timer til 50 timer, og bare to tester gir resultater på under 24 timer. Dersom et presumptivt positivt resultat skal bekreftes ved oppdyrking av enkeltkolonier på selektive agarskåler må man legge på minst ytterligere 24 timer. Flere av de ikke-validerte metodene er antagelig utviklet for å være mer brukervennlige alternativ til referanse- og standardmetodene, og ikke nødvendigvis for å gi hurtigere svar. Av de 12 metodene inkludert i Tabell 2 er seks beregnet kun for prøver fra overflater i produksjonsmiljøet, og av disse er fem såkalte svabertester («q-tips»-lignende pinner svaber; Figur 1A), hvorav to hvor påvisning skjer ved visuell avlesning av resultatet som fargeforandring i oppdyrkningsmediet. To av metodene er såkalte lateral flow immunkromatografisk analyse hvor resultatet leses av som en strek på en test-strip eller testkassett (Figur 1B og 1C).

To metoder er raskere enn real-time PCR: svabertesten *EnviroX-F* fra PathogenDx og *Listeria Assay Kit* fra Real Time Analyzers, som er basert på immunologisk analyse. *EnviroX-F* er AOAC-validert, men beregnet kun for miljøprøver. Metoden er uten oppformeringstrinn, og baserer seg på oppsamling av bakterier fra svaberen ved sentrifugering og påvisning ved PCR-amplifisering av spesifikke gener fra DNA etterfulgt av hybridisering til microarrays [21]. *Listeria Assay Kit* er et uten AOAC-validering, og inkluderer et 8-timers oppformeringstrinn [22].



**Figur 1: Eksempler på test-typer med brukervennlig avlesning. A) Svabertest. B) Lateral flow immunkromatografisk analyse med test-strip (Reveal 2.0 for *Listeria* fra Neogen). C) Lateral flow immunkromatografisk analyse med testkassett (Veriflow *Listeria monocytogenes* fra Invisible Sentinel / bioMérieux).**

I tillegg til listeria testsett og instrumenter beregnet for bruk i matproduksjon og myndighetenes overvåking finnes det metoder som kan påvise listeria i en prøve som primært brukes i forskning. Dette gjelder for blant annet forskjellige DNA sekvenseringsmetoder som for eksempel metagenom-sekvensering med Oxford Nanopore teknologi [23]. *Clear Safety Listeria* fra Clear Labs er en automatisert plattform for denne typen analyser markedsført mot matindustri [24, 25].

### 3.4 Påvisning av bakterier fra slekten *Listeria*

Slekten *Listeria*, hvor arten *L. monocytogenes* inngår, har økt fra seks arter i 2009 til i dag å inneholde totalt 28 arter [26], hvorav de to siste ble identifisert i 2022 [27, 28]. *L. monocytogenes* tilhører undergruppen ***Listeria sensu stricto*** ("in a strict sense") sammen med følgende ni andre arter: *Listeria innocua*, *L. ivanovii*, *L. seeligeri*, *L. welshimeri*, *L. marthii*, *L. cossartiae*, *L. immobilis*, *L. farberi*, og *L. swaminathanii*. De resterende 18 *Listeria*-artene (***Listeria sensu lato***; "in a broad sense") er såpass forskjellige fra de artene som tilhører *Listeria sensu stricto* at de i prinsippet burde vært taksonomisk reklassifisert som noe annet enn '*Listeria*' [29]. Dette inkluderer *L. grayi*, som var en av de opprinnelige seks kjente *Listeria*-artene.

Det er kun *L. monocytogenes* som vanligvis er assosiert med human listeriose. *Listeria ivanovii* kan gi sykdom hos dyr, spesielt drøvtyggere, men det er ekstremt sjeldent at den er sykdomsfremkallende hos mennesker. Regelverket for næringsmidler spesifiserer mikrobiologiske kriterier kun for *L. monocytogenes*. Likevel kan det i visse tilfeller være interessant å vite om det finnes andre arter til stede i en prøve som ikke inneholder *L. monocytogenes*, siden en nisje som tillater vekst av andre *Listeria*-arter også har potensial for å være en nisje for vekst av *L. monocytogenes* [30]. Det har derfor iblant vært anbefalt at overvåkings- og kontrollprogram for listeria i næringsmiddelindustrien også analyserer for andre *Listeria*-arter [31]. Noen testsett kan selektivt påvise *Listeria sensu stricto* parallelt med påvisning av *L. monocytogenes*, for eksempel *foodproof Listeria plus Listeria monocytogenes Detection LyoKit* fra Hygienea. En test som ikke skiller mellom *L. monocytogenes* og andre *Listeria*-arter kan også potensielt være et **nyttig supplement til *L. monocytogenes*-spesifikke metoder**, kanskje spesielt dersom testen er vesentlig raskere eller enklere enn metoder som kun påviser *L. monocytogenes*.

En oversikt over tilgjengelige kommersielle metoder for påvisning av *Listeria* spp. (dvs. 'arter i slekten *Listeria*') er sammenfattet i **Tabell 3**. De forskjellige testsettene skiller mellom de forskjellige *Listeria* -

typene i varierende grad, og en test brukt til dette formålet bør ideelt sett påvise bare *Listeria*-arter som inngår i gruppen *Listeria sensu stricto* [26, 29]. Metoder som gir positivt svar for *L. grayi* påviser antagelig både *Listeria sensu stricto* og *sensu latu*. De fleste av metodene (10 av 12) er validert av AOAC, hvorav to også er validert i henhold til ISO 14160-2 som et alternativ til ISO 11290-1 (for påvisning av *Listeria* spp., ikke *L. monocytogenes*). Seks er beregnet kun for prøvetaking av overflater i produksjonsmiljøet. Fire tester er lateral flow immunkromatografiske analyser, to er ELISA-metoder hvor resultatet måles som fargeforandring i en mikrotiterplateleser, og en test (*Listeria SwabCheck* fra GSV Filter Technology) har påvisning ved visuell avlesning av resultatet som fargeforandring i oppdyrkningsmediet. Til forskjell fra metoder for påvisning av *L. monocytogenes* er tre av testene for påvisning av *Listeria* spp. basert på bakteriofager<sup>3</sup> – to på infeksjon med spesifikke bakteriofager og en test basert på binding av rekombinante bakteriofag-proteiner. Testene basert på bakteriofag-infeksjon har den fordel at de kun vil kunne påvise levende celler.

Minimum total analysetid for metodene i Tabell 3 varierer fra 1 time til 48 timer, og bare to tester gir resultater på under 24 timer: svabertesten *ANSR Listeria Right Now* fra Neogen [32, 33] og *Sample6 DETECT/L Test* fra IEH [34]. Begge disse er AOAC-validert kun for bruk på miljøprøver fra overflater i matindustrien. *ANSR Listeria Right Now* skal gi prøvesvar på under 1 time. Metoden er uten oppformeringstrinn, og svaberen settes direkte ned i lyseringsbuffer før påvisning basert på isotermisk amplifisering av ribosomalt RNA. *Sample6 DETECT/L Test* gir prøvesvar på 6 timer og er en av testene basert på infeksjon med spesifikke bakteriofager.

## 4 Prinsipper bak eksisterende teknologier for selektiv påvisning

### 4.1 Dyrknings-baserte metoder

*Listeria*-bakterier er vanligvis til stede i lavt antall i prøver fra mat og miljø, som inneholder (til forskjell fra kliniske prøver) vanligvis et betydelig større antall andre mikroorganismer, noe som kompliserer isolering og påvisning av *Listeria*. Hensikten med bruk av selektive dyrkningsmedier eller oppformeringsmedier, er å øke både mengden og den relative andelen av *Listeria* i en prøve slik at påvisning er mulig. Oppformering i selektive dyrkningsmedier kan også regnes som en del av selve påvisningsmetoden.

*Listeria* fra produksjonsmiljø kan være stresset eller svekket, for eksempel på grunn av uttørking, høyt osmotisk trykk eller tilstedeværelse av rester av desinfeksjonsmidler, og dermed trenge noe restitusjonstid før de igjen kan begynne å dele seg [35]. Slike skadede celler kan likevel utgjøre en risiko for mattrygghet, siden de kan overleve og begynne å vokse på et senere tidspunkt. Derfor er det viktig at en påvisningsmetode for *L. monocytogenes* tar hensyn til dette og sørger for at ikke slike skadede celler dør før påvisning, for å unngå falske negative test-resultater. Svabertester eller andre prøveenheter beregnet for prøvetaking i miljø inneholder derfor ofte transportmedium eller nøytraliseringsmedium som for eksempel Dey/Engley (D/E) broth, Lethen broth eller HiCap broth.

Av eksisterende kommersielt tilgjengelige testsett for påvisning av *Listeria* (Tabell 1-3) er det kun tre metoder, *Sample6 DETECT/L Test*, *EnviroX-F* og *ANSR Listeria Right Now* som er uten oppformeringstrinn. *Sample6 DETECT/L Test* inneholder imidlertid et 4 timers 'recovery' eller restitusjonstrinn, hvor bakteriene inkuberes i 'Detection buffer'. Alle tre testsettene er beregnet kun for analyse av miljøprøver. Mange validerte testsett har kortere oppformeringstrinn for miljøprøver enn for prøver fra mat (ned i 18 timer).

Selektiv oppformering av *Listeria* er vanligvis ikke basert på å hemme konkurrerende mikroflora ved ugunstig næringstilgang eller veksttemperatur. I stedet tilsettes antimikrobielle forbindelser som påvirker

<sup>3</sup> Bakteriofag (bakteriespisere) er virus som angriper og formerer seg i prokaryote celler som bakterier, arker og blågrønnalger.

listeria-vekst i minst mulig grad samtidig som de i størst mulig grad hemmer konkurrerende mikroflora. En kompliserende faktor med denne fremgangsmåten er at slike antimikrobielle forbindelser ofte har vist seg å ha negativ påvirkning på overlevelse av listeria-celler som er stresset eller skadet. Derfor brukes ofte en to-trinns oppformeringsprotokoll, som i referansemetoden ISO 11290-1, hvor konsentrasjonen av antimikrobielle tilsetningsstoffer er halvert i mediet som brukes i det første trinnet (Half Fraser broth) sammenlignet med i trinn to ([Full] Fraser broth), eller i referansemetoden fra FDA, hvor antimikrobielle forbindelser tilsettes først etter 10 min.

**Nalidixinsyre** er det mest vanlig brukte selektive middelet for listeria-isolering, og finnes blant annet i Fraser broth. Det er et antibiotikum i klassen quinoloner og har tydelig effekt mot gram-negative bakterier som *Enterobacter* spp. og *E. coli*. *Pseudomonas* spp. er derimot vanligvis resistente. Det andre selektive middelet i Fraser Broth er **acriflavin**. Dette hemmer effektivt gram-positiv bakgrunnsflora, men kan også påvirke vekst av *L. monocytogenes* [36]. Det er kjent at tilstedeværelse av andre *Listeria* sensu stricto kan komplisere deteksjon av *L. monocytogenes* i prøver, da disse kan utkonkurrere *L. monocytogenes* under selektiv oppformering [37]. Acriflavin forlenger lag-fasen og øker generasjonstiden for *L. monocytogenes*, mens vekst ikke påvirkes for *Listeria innocua*, og vil dermed til en viss grad selektere for *L. innocua* på bekostning av *L. monocytogenes* [38]. Fraser broth tilsettes også 3 g/L **litiumklorid** for å gi høy saltkonsentrasjon, noe som tolereres av listeria men ikke av enterokokker og visse gram-negative bakterier [39]. Buffered *Listeria* enrichment broth (BLEB), som er det selektive oppformeringsmediet som brukes i FDA's referansemetode [17] inneholder i tillegg det selektive middelet cycloheximide. Cycloheximide hemmer proteinsyntesen hos eukaryote celler, og dermed vekst av mugg. Seleksjonsmediet L-PALCAM Broth inneholder de selektive antimikrobielle forbindelsene ceftazidime og polymyxin B.

Det finnes flere **dyrkningsbaserte metoder** for påvisning av *L. monocytogenes* som er validert henhold til ISO 14160-2 som et alternativ til ISO 11290-1, og som benytter alternative dyrkningsmedier med opphavsrettslig beskyttet sammensetning. Det er mulig at disse kan gi bedre restitusjon, raskere oppformering og/eller bedre seleksjon enn dyrkningsmedier med publiserte (offentlig tilgjengelige) oppskrifter. To eksempler er *One Broth One Plate for Listeria monocytogenes (OBOP-LMO)* metoden fra Neogen [40] med seleksjonsmediet *LESS Plus medium*, og *Listeria PreciS* metoden fra OXOID / Thermo Fisher Scientific [41] med seleksjonsmediet *Oxoid ONE broth Listeria*. Begge disse metodene er ca 24 timer raskere enn referansemetoden ISO 11290-1, da de har kun ett oppformeringstrinn på 22-28 timer før påvisning med plating på selektive agarskåler. Et annet kommersielt tilgjengelig seleksjonsmedium er det AOAC-validerte mediet *PDX-LIB* fra Paradigm Diagnostics [42]. På lignende måte inkluderer flere **kommersielle testsett** bruk av seleksjonsmedier med patenterte eller hemmelige tilsetninger, for eksempel *RapidChek Listeria NextDayMedia* fra Romer Labs / DSM [43], *Atlas Listeria Detection Assay* fra Roka Bioscience [44] En metode, *N-Light L. monocytogenes* fra NEMIS Technologies, øker spesifisiteten ved å tilsette en blanding av **bakteriofager** som infiserer og dreper konkurrerende bakterier i oppformeringsmediet [45].

**Immunomagnetisk separering (IMS)** er en annen anrikingsmetode for *Listeria* eller *L. monocytogenes*. Ved IMS benyttes magnetiske kuler dekket med spesifikke antistoffer som fester seg til listeria slik at bakterien kan skilles ut med en magnet. Eksempler på metoder som benytter dette prinsippet er real-time PCR metoden *Assurance GDS Listeria monocytogenes Tq* fra Merck. Thermo Fisher har også et automatisk system, Pathatrix Auto Instrument [46], som oppkonsentrerer bakterier ved hjelp av IMS før nedstrøms analyser (for eksempel PCR, immunoassay eller dyrkning). IMS har også blitt brukt før metagenom-sekvensering for å redusere antall sekvenser fra bakgrunnsflora [47].

## 4.2 Biokjemiske metoder

Det finnes flere metoder for påvisning av *L. monocytogenes* som baserer seg på biokjemiske prinsipper, og da særlig påvisning av spesifikk enzymaktivitet. Disse metodene er ofte optiske, det vil si at de baserer seg på dyrkningsmedium (enten på agarskåler eller i flytende kultur) som inneholder kromogene substrater som gir fargeomslag når bakteriene vokser. Dette gjelder også for referansemetoden ISO 11290-1, hvor påvisning av listeria er basert på utplating av prøven på selektive kromogene agarskåler tilsatt substrater som gir *Listeria* spp. eller *L. monocytogenes* karakteristisk morfologi og farge. For eksempel vokser *L. monocytogenes* og *L. ivanovii* typisk opp som blå-grønne kolonier med en lys halo/opklaring rundt hver koloni ved plating på **ALOA** ('Agar *Listeria* according to Ottaviani and Agosti') eller **AL-agar** [48]. Blåfargen kommer av at enzymet  **$\beta$ -D-glucosidase** bryter ned det kromogene substratet X-glucosid, og oppklaringssonen rundt hver koloni er et resultat av at enzymet **fosfolipase C** (PI-PLC; phosphatidylinositol-specific phospholipase C) bryter ned fosfatidylinositol tilsatt agaren. Av bakteriene som kan vokse i oppformeringsmediet er det bare *L. monocytogenes* og *L. ivanovii* som produserer fosfolipase C, mens alle *Listeria*-arter i tillegg til andre bakterier som for eksempel *Enterococcus* og noen *Bacillus*-arter produserer  $\beta$ -glucosidase.

Et annet substrat for  $\beta$ -glucosidase er **esculin**. Hydrolyse av esculin gir esculetin og glukose, og binding av esculetin til jern(III) ioner gir et mørkebrunt eller svart kompleks, noe som utnyttes som diagnostisk prinsipp i PALCAM Agar [49]. Også oppformeringsmedier som for eksempel Fraser broth og *PDX-LIB* fra Paradigm Diagnostics [42] inneholder esculin og jern(III) ioner, og man kan dermed bruke fargeforandring direkte i bakteriekulturen som indikasjon på tilstedeværelse av *Listeria* spp.

*RAPID'L.mono* er en annen type selektive kromogene agarskåler, som i tillegg til påvise fosfolipase C-aktivitet etter samme prinsipp som for ALOA, også kan skille mellom *L. monocytogenes* og *L. ivanovii* [50]. Denne differensieringen baserer seg på at *L. ivanovii* kan **fermentere xylose**, og dermed gir en gul halo/opklaring rundt hver koloni, mens *L. monocytogenes* ikke har denne egenskapen.

Metoder basert på ett oppformeringsstrinn i Half Fraser medium etterfulgt av påvisning ved plating på selektive kromogene agarer som for eksempel *AL-agar* og *RAPID'L.mono* er validert henhold til ISO 14160-2 som et alternativ til ISO 11290-1 [48, 50]. Begge disse metodene er ca 24 timer raskere enn referansemetoden ISO 11290-1, da de har kun ett oppformeringsstrinn før påvisning med utplating på selektive agarskåler. I tillegg kan man ved bruk av disse metodene avlese agarskålene etter 24 timer (mot 48 timer for ISO 11290-1) for å avkrefte at det er listeria i prøvene. Presumptive positive svar må imidlertid, som for ISO 11290-1, bekreftes ved bruk av en sekundær metode med et annet påvisningsprinsipp; andre morfologiske eller biokjemiske tester eller for eksempel real-time PCR.

Påvisning av enzymaktivitet fra  $\beta$ -glucosidase og fosfolipase C brukes også som påvisningsmetode i flere kommersielt tilgjengelig testsett, hvor substratene tilsettes direkte i dyrkningsmediene som brukes til oppformering (Tabell 2 og 3). Tre svabertester med AOAC-validering for prøvetaking i miljø er basert på påvisning av **fosfolipase C**: *N-Light L. monocytogenes* fra NEMIS Technologies [45], *InSite L. mono Glo* fra Hygiene [51] og *SwabSURE ListeriaP* fra Technical Service Consultants [52]. De to sistnevnte kan ikke skille mellom *L. monocytogenes* og *L. ivanovii*, mens oppformeringsmediet i *N-Light L. monocytogenes* inneholder bakteriofager som infiserer og dreper bakgrunnsflora [45], noe som antagelig er årsaken til at denne testen er oppgitt å være spesifikk for *L. monocytogenes*. To svabertester for *Listeria* spp. beregnet for prøvetaking i miljø er basert på tilsetning av esculin i oppdyrkningsmediet og påvisning av *L. monocytogenes* ved synlig fargeforandring: *InSite L. mono Glo* (som samtidig påviser *L. monocytogenes* ved påvisning av fosfolipase C aktivitet) og *Listeria SwabCheck* fra GSV Filter Technology [53]. Produsenten av *SwabCheck* påstår at tilsetninger og antibiotika i dyrkningsmediet hemmer alle andre arter enn *Listeria*, slik at metoden totalt sett er spesifikk for denne slekten selv om det ikke gjelder for hydrolyse av esculin, men i og med at metoden ikke er validert er denne påstanden vanskelig å ettergå.

## 4.3 Nukleinsyre (DNA/RNA) baserte metoder

### 4.3.1 Konvensjonell PCR (end-point PCR)

Polymerase chain reaction (PCR) er en laboratorieteknikk for rask oppformering eller kopiering av spesifikke DNA områder (for eksempel gener<sup>4</sup>) til millioner og milliarder av kopier som kan studeres videre. Kopieringen skjer ved bruk av spesifikke primere (syntetiske oligonukleotider som binder til mål-DNA) og enzymet DNA polymerase. Kopieringen av DNA er syklisk i tre steg og foregår i en termosyklus (en PCR-maskin); 1) dobbelt-trådet DNA utsettes for høy temperatur (95°C) for å få enkelt-trådet DNA, 2) to primere binder til DNA, typisk ved ca 50-60°C, og 3) DNA syntetiseres ved hjelp av DNA polymerase ved 72°C. I konvensjonell PCR måles mengden kopiert DNA (dette kalles 'PCR produktet') etter endt antall sykluser (derav 'end-point'). Tradisjonelt blir ofte PCR produktet visualisert på en agarosegel og man kan derfra måle mengden (kvantifisere) PCR produkt på ulike måter. Dette er derimot manuelt og tidkrevende og ikke mye brukt for påvisning av listeria. Det finnes derimot automatiserte metoder for påvisning av *L. monocytogenes* som baserer seg på konvensjonell PCR, for eksempel *BAX System PCR Assay for Listeria monocytogenes 24E* fra Hygiene [54], hvor deteksjonen foregår i PCR maskinen i form av en smeltepunktsskurve-analyse etter at PCR syklusene er gjennomført.

### 4.3.2 Real-time PCR

Som nevnt i Kapittel 3.2 er metoder basert på real-time PCR såpass vanlig i bruk at de kan betraktes som dagens standardmetode for påvisning av *L. monocytogenes*. I motsetning til for konvensjonell PCR, hvor mengden produkt måles til slutt etter at oppformering av DNA/RNA er gjennomført med et gitt antall oppformeringsrunder, så måler real-time PCR mengden oppformert produkt underveis (real-time). Det finnes ni validerte real-time PCR testsett på markedet (Tabell 1), der alle baserer seg på en oppformering av listeria og et lyseringstrinn som løser opp cellveggen og gjør DNA tilgjengelig i forkant av selve PCR-analysen. Alle testsettene baserer seg på bruk av spesifikke fluorescerende prober for å måle hvor mye PCR produkt som blir generert (for eksempel TaqMan, MGB, scorpions, eller FRET prober). Mengden PCR produkt som dannes er proporsjonal med mengden listeria-celler i prøvene.

Real-time PCR har i tillegg til høy spesifisitet også høy sensitivitet. Selv om selve metoden er veldig sensitiv, og i teorien kan påvise en enkelt kopi av mål-DNA, så må man huske på at analysen foregår i et lite volum, ofte 50 µL. Det vil si at den ene kopien av mål-DNA må finnes i de 50 µL som analyseres for å kunne bli påvist. I tillegg så vil kan prøvematriksen (maten som testes, oppformeringsmediet, osv) inneholde komponenter som kan hemme aktiviteten til DNA polymerasen [55]. Det er også vist at den høye saltkonsentrasjonen i Fraser broth kan hemme lyseringstrinnet [56]. Alle de validerte real-time PCR testsettene har derfor en internkontroll, som må gi utslag for at en analyse skal være godkjent. Dersom et negativt resultat skyldes hemming av reaksjonen på grunn av hemmekomponenter i prøvematriksen så vil oppformeringen av den interne kontrollen også hemmes.

Real-time PCR er en rask prosess som tar ca. 90 minutter etter oppformering og lysering av celler, og det finnes brukervennlige kommersielle testsett, selv om prøveoppbeholdelsen krever trent laboratoriepersonell. PCR skiller i prinsippet ikke mellom levende og døde bakterier, noe som også er grunnen til at det er viktig med en oppformering i forkant av analysen, samt årsaken til at man må verifisere levende listeria ved utplating på agarskåler dersom listeria påvises ved real-time PCR. For testsettene *BACGene Listeria monocytogenes* fra Eurofins GeneScan [57] og *iQ-Check L. monocytogenes II* fra Bio-Rad [58] finnes det imidlertid et valgfritt tilleggstrinn som fjerner ekstracellulært DNA fra prøvene før cellelysning, og som anbefales for analyse av prøver hvor det er forventet en høy andel døde celler i prøven.

### 4.3.3 Isotermisk amplifisering

Isotermisk amplifisering er oppkopiering av DNA under konstant temperatur. Fordelen sammenliknet med real-time PCR er at man ikke trenger et kostbart instrument for å kjøre temperatursykluser. Et

<sup>4</sup> Gener er oppskrifter for egenskaper hos levende organismer, og er kodet for på et avgrenset område av DNA-tråden i hver celle.

eksempel på isotermisk amplifisering av DNA er loop-mediert isotermisk amplifikasjon (**LAMP**) [59]. LAMP er et rimelig alternativ for å påvise patogene bakterier [60], som kan amplifisere et lite antall DNA kopier til en million kopier innen en time. DNA kopieres opp med høy spesifisitet, effektivitet og hurtighet ved hjelp av enzymet Bst DNA polymerase og spesifikke primere, hvor et sett med fire (eller seks) ulike primere binder til seks (eller åtte) ulike områder på målgenet [59]. Et eksempel på mål-DNA i en LAMP reaksjon for påvisning av *L. monocytogenes* er invasjonsgenet *iap*, som oppkopieres i *Loopamp Listeria monocytogenes Detection Kit* fra Eiken Chemical [61]. DNA-produktet kan visualiseres for eksempel ved måling av turbiditet, agarosegelelektroforese, eller fluorescerende eller kjemiluminescerende prober. Av kommersielle metoder på markedet som bruker isotermisk amplifikasjon for påvisning av *L. monocytogenes* finnes det to validerte testsett: *ANSR for L. monocytogenes* fra Neogen [62] og *3M Molecular Detection Assay 2 – L. monocytogenes* fra 3M Health Care [63].

Fordelene med LAMP er høy sensitivitet, brukervennlighet og raskt resultat. Systemet kan påvise  $10^2$  til  $10^4$  bakterier per mL i oppformeringskulturen innen 75 minutter. LAMP kan også benyttes for påvisning av RNA (ribonukleinsyre), såkalt revers-transkripsjon (rt) LAMP. Dette prinsippet benyttes i metoden *ANSR Listeria Right Now* fra Neogen [32, 33], som påviser ribosomalt RNA (rRNA). rRNA finnes i et langt høyere antall i en bakterie-celle enn et tradisjonelt mål-DNA; ca. 1000 til 10 000 kopier per celle i motsetning til 1 kopi per celle for hvert gen på DNA. Fordelen med å bruke rRNA som mål for en molekylær test er høyere sensitivitet, som resultat av at man har mye mer av det man skal måle (1000 til 10000 ganger mer sammenlignet med DNA). Ulempen er at rRNA ikke kan brukes til å skille de ulike listeria-artene fra hverandre, og dermed er ikke testen spesifikk for *L. monocytogenes*, men påviser isteden alle *Listeria* spp.

#### 4.3.4 Hybridisering

DNA-hybridisering er basert på paring mellom enkelttrådede nukleinsyrer med komplementær sekvens. Det finnes to validerte testsett basert på dette prinsippet for påvisning av *L. monocytogenes*: *LUMIprobe 24 Listeria monocytogenes* fra Europrobe [64] og *RiboFlow Listeria Twin Detection Kit* fra SY-LAB [65]. *LUMIprobe* er basert på DNA/RNA hybridisering ved hjelp av en solid-fase DNA-probe og påviser rRNA fra lyserte celler etter oppformering i 22 timer. Deteksjonen skjer via måling av luminescens i et eget instrument. *RiboFlow* påviser også rRNA men påvisning skjer ved hjelp av et lateral flow assay og visuell deteksjon av en rødfarget stripe i en testkassett (se Figur 1C).

#### 4.3.5 Nukleinsyre-basert lateral flow immunkromatografisk analyse (NALFIA)

Tradisjonelle lateral flow assays (LFA) er ofte basert på immunologisk påvisning, såkalt lateral flow immunkromatografisk analyse (LFIA) (se kapittel 4.4.2 og Figur 1B og C). Disse metodene krever ofte en oppformering på minimum 24 timer for å kunne påvise en gitt bakterie. For å øke sensitiviteten og spesifisiteten, og dermed også analysetiden, så kan LFIA kombineres med andre teknologier eller metoder, for eksempel påvisning av nukleinsyrer i en såkalt NALFIA ('nucleic acid' LFIA).

Prinsippet bak NALFIA er deteksjon av amplifisert DNA ved hjelp av primere merket med små molekyler, som igjen kan binde til et spesifikt antistoff eller andre molekyler (for eksempel biotin eller digoxigenin; såkalte 'tags'). Disse er igjen konjugert til nanopartikler av kolloidalt gull, som gir signal i testen i form av en rødfarget linje. Dersom andre molekyler (for eksempel biotin eller digoxigenin) benyttes i testen istedenfor antistoff, blir riktig betegnelse NALFA og ikke NALFIA.

NALFIA kombinerer altså lateral flow teknologi og immunoassay-prinsippet for påvisning av nukleinsyrer i form av PCR-produkt (PCR-NALFIA) eller genetiske amplikoner fremkalt for eksempel ved loop-mediert isotermisk amplifikasjon (såkalt LAMP-NALFIA) [66]. Et eksempel på et testsett for påvisning av *L. monocytogenes* som bruker PCR-NALFIA er *Veriflow Listeria monocytogenes (LM)* fra Invisible Sentinel / bioMérieux [67].

#### 4.3.6 Sekvensering

DNA-sekvensering er ulike metoder som brukes for å kunne lese av rekkefølgen på bokstavene (nukleotidene) i arvestoffet DNA. Når man snakker om sekvensering så snakker man ofte om ulike generasjoner av sekvenseringsteknologi, der andre- og tredje generasjons sekvenseringsteknologi (NGS – next generation sequencing) har gjort at man relativt enkelt kan kartlegge hele arvestoffet til en bakterie ved hjelp av såkalt helgenomsekvensering. Helgenomsekvensering brukes ofte til å studere slektskap hos en bakterieart og til sporing og utbruddsavklaring, og for å gjøre det trenger man en renkultur, dvs. at man først må ha identifisert en enkelt koloni av bakterien på agarskål. Helgenomsekvensering er altså ikke en metode for å analysere innholdet i sammensatte prøver, men kan brukes til identifisering og typing av isolater under artsnivå, for eksempel for *L. monocytogenes*.

Det finnes ulike sekvenseringsplattformer på markedet for NGS, med ulike fordeler og ulemper. De to største aktørene er Illumina og Oxford Nanopore Technologies (ONT). Illumina krever en høy investeringskostnad og selve sekvensering tar typisk rundt et døgn, men kan ta kortere eller lengre tid avhengig av testsett/program og sekvenseringslengde. Fordelen med Illumina-sekvensering er høy sekvenskvalitet og et høyt sekvensutbytte. En ulempe er at de individuelle sekvensene har begrenset lengde, noe som gjør at nedstrømsanalysene krever relativt stor datakraft. ONT derimot har løsninger som krever lav investering, er portabel (man kan sekvensere «overalt») og gir sekvenser i sanntid (real-time). Ulempen er at den har noe lavere sekvenskvalitet og et lavere sekvensutbytte, dog med mulighet for å lese lange DNA områder.

Alle teknologiske plattformer for NGS kan benyttes til såkalt metagenomsekvensering, der man sekvenserer alt DNA i en prøve. Metagenomsekvensering kan brukes til å påvise listeria i en prøve. Som med de fleste teknikkene nevnt i denne rapporten vil også sekvensering kreve en viss andel listeria i en prøve for å fungere optimalt. Dette kan løses med en oppformering i forkant, eventuelt en delvis (kortere) oppformering. Dersom man benytter en hel eller delvis oppformering så snakker man ikke lengre om metagenomikk, men om quasimetagenomikk [47]. Selv om sekvensering i seg selv ikke er en kommersiell hurtigmetode for påvisning av listeria så finnes det flere aktører på markedet (for eksempel Eurofins Genomics) som tilbyr sekvenseringstjenester og dataanalyse. Slike analyser tar imidlertid av forskjellige årsaker i praksis noen uker å gjennomføre. Det finnes imidlertid en automatisert sekvenseringsplattform på markedet, markedsført mot matindustri: *Clear Safety* fra Clear Labs [24]. Metoden innebærer automatisk prøveoppbeidelse etter oppformering, sekvensering med GridION systemet fra Oxford Nanopore og skybasert dataanalyse. Med *Clear Safety Listeria* metoden, som er AOAC-validert [25], vil man kunne påvise *L. monocytogenes* med >99.9% nøyaktighet innen 36 timer, og i tillegg kunne bruke resultatene til overvåkning og kartlegging av funn i bedriftens lokaler.

Det finnes i tillegg et norsk selskap, Salico AS [68], som markedsfører et «Laboratory-on-a-Chip» (LoC) microfluidic system (FORDETECT technology) for onsite DNA-sekvenseringsanalyser, men så vidt vi kjenner til så er ikke denne teknologien brukt til å påvise listeria.



## 4.4 Immunologiske metoder

Et immunoassay er definert som en bioanalytisk metode som baserer seg på interaksjon mellom antistoff (Ab) og antigen (Ag) (analytt) [69]. Antistoffer er spesifikke, som betyr at de gjenkjenner ett bestemt antigen. For metoder for påvisning av listeria i form av hele celler, må antigenet være et protein som finnes på overflaten av cellene for at antistoffene skal kunne få tilgang til og binde til antigenet. Hvis derimot proteinet eller antigenet er intracellulært, må cellene først lyses for at et immunoassay skal kunne fungere. Spesifisiteten og sensitiviteten til immunologiske metoder avhenger av bruken av monoklonale og polyklonale antistoffer, og deteksjonsgrensen (limit of detection; LOD) påvirkes av flere faktorer som prøvetype, bakgrunnsbakterier, viskositet, veksthemmere, stressbetingelser og oppformeringsmedium [70].

### 4.4.1 Enzymlinket immunosorbent assay (ELISA)

Enzymlinket immunosorbent assay (ELISA) er en klassisk immunologisk metode, som baserer seg på spesifikk binding mellom antigen og antistoff. ELISA utføres som regel i 96-brønners mikrotiterplater. Det finnes fire ulike ELISA teknikker: sandwich-ELISA, direkte-ELISA, indirekte-ELISA og inhibisjons-ELISA, der den første er mest vanlig [71]. Sandwich-ELISA benytter seg av to forskjellige antistoffer: «capture antistoff» og deteksjons-antistoff. Capture-antistoffet er bundet til den faste overflaten i testen, for eksempel til brønnene i en mikrotiterplate, og når prøven med antigenet tilsettes brønnen så bindes antigenet til dette antistoffet. Etter vasking for å fjerne ubundet antigen så tilsettes deteksjons-antistoffet, som reagerer med et antigen slik at det dannes en sandwich. Deteksjons-antistoffet er som regel konjugert til et enzym som muliggjør påvisning og avlesning av test-resultatet. Dette gjøres ved tilsetning av et kromogent substrat som forandrer farge som resultat av enzymaktivitet. Fargeintensiteten er proporsjonal med konsentrasjonen av enzym og dermed antigen til stede i prøven.

Med ELISA kan man kjøre et stort antall prøver samtidig, men metoden har ofte et komplisert oppsett og involverer mange trinn. ELISA er derfor ofte automatisert for å unngå brukerfeil og for å redusere tidsbruken, med den ulempen at analysen må kjøres på et laboratorium og ikke er bærbar. Den største ulempen med ELISA er imidlertid at den er lite sensitiv sammenlignet med for eksempel mange nukleinsyre-baserte metoder. Det kreves et minimum av  $10^5$ - $10^6$  bakterier/ml for å gi et positivt svar og dermed kunne skille mellom positive og negative prøver [72]. Siden mengden listeria ofte er svært lav i matprøver og i miljøprøver er det nødvendig med en oppformering av listeria i forkant av analysen.

### 4.4.2 Lateral flow immunkromatografisk analyse (LFIA)

Lateral flow immunkromatografisk analyse (LFIA) har vært nevnt tidligere i denne rapporten i forbindelse med metoder der teknologien brukes i kombinasjon med nukleinsyre-baserte metoder (kapittel 4.3.5). I 'klassisk' LFIA brukes imidlertid metoden til å påvise proteiner og ikke DNA eller RNA. Til forskjell fra ELISA er LFIA en ett-trinns metode som er enklere å bruke, tar kortere tid og er bærbar. Resultatet fra en LFIA test kan leses av med det blotte øye som fargestreker på en nitrocellulose-membran, enten i form av en test-strimmel eller en testkassett (se Figur 1B og 1C). Som for ELISA er den største ulempen med LFIA at metoden krever et minimum av  $10^5$ - $10^6$  bakterier for påvisning.

Kommersielt tilgjengelige LFIA tester for påvisning av listeria benytter seg som regel av antistoff konjugert til nanopartikler av kolloidalt gull, og da vises resultatet som en rødfarget rød linje i testen. Dette gjelder for eksempel metoden *RapidChek Listeria monocytogenes* fra Romer Labs / DSM [43]. Det går også an å bruke antistoff konjugert til latex-kuler istedenfor gull, og da kan fargen på streken variere avhengig av fargen på latex-kulene som er brukt. Denne teknikken er brukt i *Oxoid Listeria Rapid Test* fra Thermo Fisher [73], hvor resultatet vises som en blå stripe.

*Veriflow Listeria monocytogenes (LM)* fra Invisible Sentinel / bioMérieux [67], som er en LFIA test av typen PCR-NALFIA (se kapittel 4.3.5), bruker egentlig vertikal flow istedenfor lateral flow i testkassetten, men for alle praktiske hensyn så dreier det seg om samme teknologi og samme prinsipp.

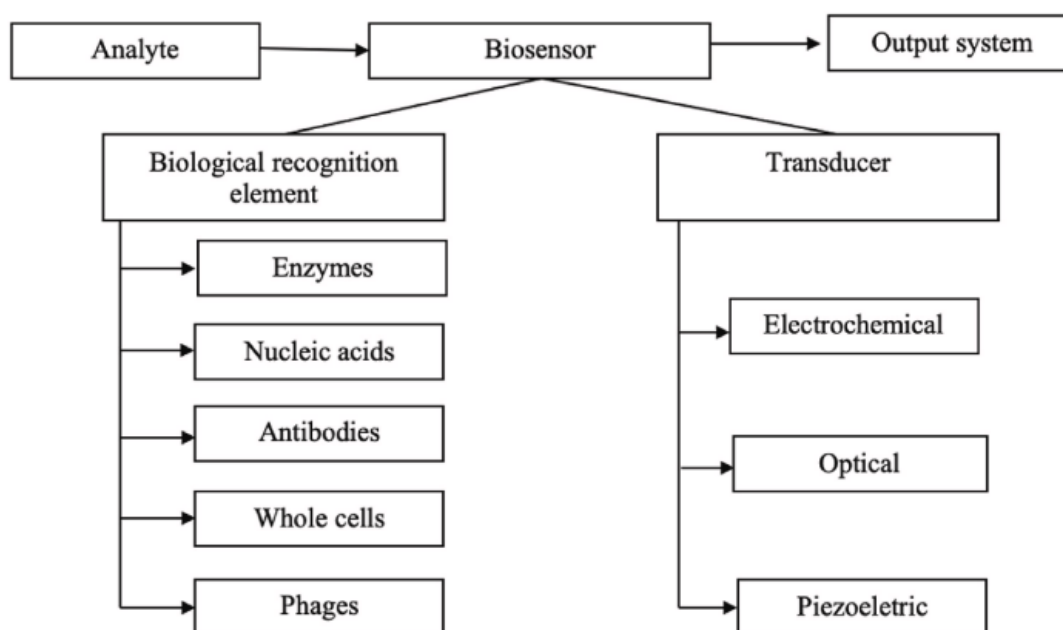
#### 4.4.3 Enzym-linket fluorescent assay (ELFA)

Enzym-linket fluorescent assay (ELFA) er en mer moderne teknologi som er ca 100 ganger mer sensitiv enn ELISA, men krever fortsatt en del bakterier og kombineres derfor med oppformering i forkant av analysen. Et eksempel på en kommersiell metodeplattform for ELFA testsett er bioMérieux sitt VIDAS system [74]. Påvisningsreaksjonen skjer der i et lukket system i to faser: en immunologisk reaksjon og en enzymatisk reaksjon. Metoden er fullautomatisk etter oppformering til avlesning. Oppformeringstiden varierer fra 26-48 timer avhengig om man benytter bioMérieux sitt *Listeria monocytogenes* Xpress (LMX) medium eller ikke. Selve analysen krever egne instrumenter og tar ca 80 minutter. VIDAS-instrumentet kan også benyttes til metoder som er basert på binding til rekombinante bakteriofag-proteiner istedenfor antistoff, for eksempel VIDAS UP *Listeria* (LPT) [75, 76].

#### 4.5 Biosensorer (signal-baserte metoder)

En biosensor defineres ofte som et analytisk instrument eller en enhet som konverterer en biologisk respons til et elektrisk signal. En biosensor består av to hovedkomponenter: en bioreseptor som gjenkjenner det man vil påvise, og en transduser som omformer påvisningen til et målbart signal. En biosensor er med andre ord en **integreert reseptor-transduser enhet**. Bioreseptoren kan være mange ulike ting, for eksempel antistoff, celle, enzym, nukleinsyre, aminosyrer, antimikrobielle peptider, bakteriofag, vev eller en organelle. Transduseren kan være enten elektrokjemisk (amperometri, potensiometri og voltametri), optisk (luminiscence, fluorescense eller synlig farge) eller piezoelektrisk (elektrisk spenning som oppstår når visse typer krystaller deformeres). Biosensorer kan klassifiseres ut fra transduser-type (Figur 2).

Det finnes to kommersielt tilgjengelige metoder for påvisning av listeria, som begge er AOAC-validerede for bruk for miljøprøver i etterkant av selektiv oppformering: *Xpress LM* fra Crystal Diagnostics Corporate [77], som er basert på liquid crystal teknologi, og *Listeria CANARY Zephyr* fra Smiths Detection [78, 79], hvor genredigerte immunceller med spesifikke antistoffer mot *Listeria* spp. på overflaten aktiverer bioluminescerende proteiner ved binding til bakteriecellene. Sistnevnte har en deteksjonsgrense på 50 bakterier og påvisningstrinnet gjennomføres på 5 minutter, etter oppformering.



**Figur 2. Skjematisert oppsett av en biosensor med oversikt over de mest vanlige biomolekylene brukt som gjenkjenningselement (bioreseptor) og de ulike transduser elementene. Figuren er fra Cossettino et al., 2022 [80].**

## 5 Diskusjon

### 5.1 Faktorer relatert til prøver og prøvetaking

Prinsippet bak ISO 11290-1 metoden for påvisning av *L. monocytogenes* er selektiv oppformering i flytende kultur etterfulgt av dyrking på selektive agarskåler. Alle alternative metoder for påvisning av listeria i næringsmidler benytter også et trinn for selektiv oppformering. Dette er fordi prøvevolumet som skal testes, kombinert med sensitiviteten som er nødvendig for validering i henhold til ISO 14160-2 som godkjent alternativ til referansemetoden ISO 11290-1, dvs. påvisning av 1 celle *L. monocytogenes* i 25 g produktprøve, ikke er kompatibelt med direkte deteksjon i de prøvevolumer som brukes i molekylære eller immunologiske testsett, hvor reaksjonsvolumet typisk er på rundt 50 µL. Ved prøvepreparering er det dessuten vanlig å tilsette et visst volum væske og deretter homogenisere prøven slik at hele prøven blir tilgjengelig for testing. I ISO 11290-1 fortynnes prøven 10 ganger ved å tilsette 225 mL flytende oppformeringsmedium til 25 g prøve. Tilstrekkelig oppskalering av analysevolumene for å omfatte hele dette volumet vil ikke være realistisk hverken praktisk sett eller ut fra et kostnadsperspektiv. Fortynning av prøven har også den funksjonen at det kan fortynne ned komponenter av prøven som hemmer påvisningsmetodikken. For eksempel kan fett, proteiner, salt eller andre komponenter i mat hemme PCR-reaksjoner eller forstyrre deteksjon basert på antistoff. Oppdyrking i forkant av selektiv påvisning vil også øke andelen prøvemateriale fra levende celler relativt til døde celler, og dermed redusere falske positive test-resultater forårsaket døde listeria.

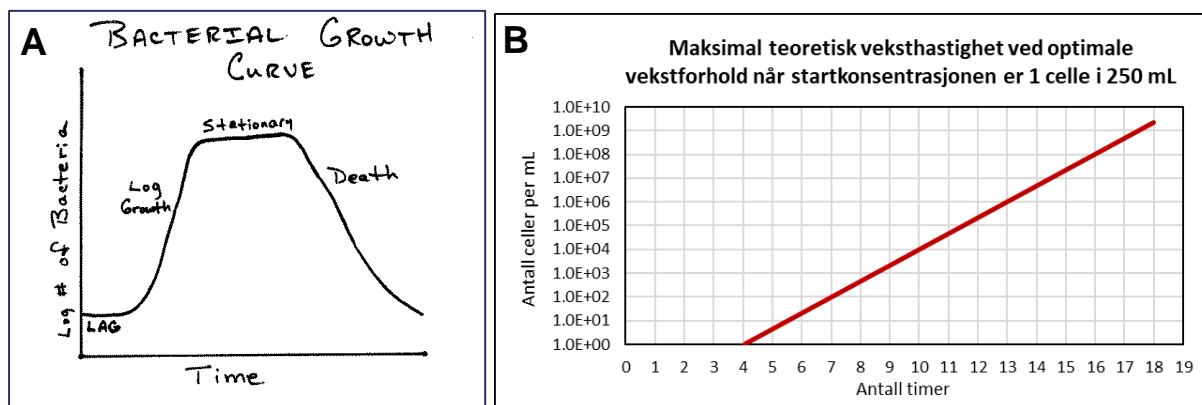
Det finnes en rekke hurtigmatoder som kun markedsføres for miljøprøver (prøver av overflater i produksjonsmiljø), og av disse var det tre som ikke inkluderte et oppformeringstrinn. Når det gjelder miljøprøver vil selve prøvetakingsmetoden og prøvetakingsarealet ha stor betydning for om man klarer å få med seg *L. monocytogenes* fra miljø eller utstyr til prøven. Det er stor forskjell på å skrubbe et areal på 30×30 cm med en klut og å bruke 'q-tips'-lignende prøvetakingsutstyr. I noen tilfeller der man forventer lave tall vil det derfor være fornuftig å ta en sampleprøve framfor en enkeltprøve, eventuelt vurdere å bruke en lavere fortynning av prøven. Prøveoppkonsentrering ved sentrifugering ved høy hastighet er mulig til en viss grad for miljøprøver, spesielt hvis det er lite smuss/materiale i prøvene, men man risikerer å miste bakterieceller i prosessen, og det øker igjen risikoen for hemming av påvisningsmetodikken forårsaket av tilstedeværelse av hemmende komponenter i prøven.

### 5.2 Hvor raskt er det mulig å oppformere *L. monocytogenes*?

Bakterier deler seg ved celledeling, og i vekst under optimale betingelser, for eksempel ved dyrking i næringsbuljongen Brain Heart Infusion ved 37°C uten tilstedeværelse av konkurrerende bakterier, kan *L. monocytogenes* klare å dele seg en gang hvert 45-60 minutt [81]. Andre bakteriearter har kortere generasjonstid, for eksempel *Escherichia coli*, som kan dele seg en gang hvert 20. minutt.

Bakterieceller bruker litt tid på å tilpasse seg nye vekstbetingelser, og det tar dermed litt tid før de kommer inn i eksponentiell (eller 'log') vekstfase. Denne tilpasningsfasen kalles 'lag-fasen' og varer vanligvis et par timer, men kan ta lenger tid hvis cellene er stresset eller skadet, noe som ofte vil være tilfellet for bakterieceller fra for eksempel miljøprøver. Etter at cellene har vokst en tid vil næringsstoffene bli brukt opp. Bakteriene deler seg da saktere og kommer over i stasjonær vekstfase, hvor det er en tilnærmet likevekt mellom celledød og celledeling (Figur 3A). Maksimal bakterietetthet mot slutten av eksponentiell fase er vanligvis omkring  $10^9$  bakterieceller per mL ved dyrkning i næringsrikt vekstmedium. Hvis kulturen er en blanding av flere bakterie-arter gjelder dette totalt for alle bakterier i prøven. Konkurransen om næringsstoffer og andre konkurranseforhold mellom bakteriene vil påvirke veksten til de forskjellige bakterieartene i ulik grad.

I teorien (men altså ikke i praksis) kan man gå fra 1 *Listeria*-celle i et volum på 250 ml (dvs. 25 g eller 25 mL prøve + 225 mL vekstmedium, som brukt i ISO 11290-1) til 1 *Listeria*-celle per mL på 4 timer, og til 1 *Listeria*-celle per µL på 8.5 timer (Figur 3B). Ved dyrkning på agarskåler med rikt medium får man vanligvis synlige listeria kolonier (som utgår fra en enkelt celle) etter 18-24 timer ved 37°C.



**Figur 3: Bakterievekst. A)** En bakteriell vekstkurve (figur fra [82]). **B)** Listeriavekst ved 45 minutters generasjonstid.

### 5.3 Valg av teknologi

Som beskrevet i dette arbeidet finnes det mange ulike teknologiske prinsipper bak kommersielle hurtigmetoder for listeria. Mange metoder benytter også ulike kombinasjoner av de teknologiske prinsippene beskrevet over. Valg av metode må tas på bakgrunn av behov og hvilke analysefasiliteter man har til rådighet. Det kan være flere grunner til man ikke kan eller ønsker å kjøre listeria-analyser i egen bedrift. Kostnader, intern kompetanse og personale til rådighet kan være noen grunner, men også mangel på egnede lokaler for analyse da det ikke er ønskelig å oppformere listeria i lokaler som ikke er avgrenset fra produksjonslokaler. Det finnes dog systemer som er helt eller delvis lukkede slik at risikoen for kontaminering er begrenset. Fordelene av å kjøre analyser i egen bedrift er nok først og fremst tidsbesparing, men også at man har full kontroll på hele analysen. Dersom man sender prøver til et eksternt analyselaboratorium så er real-time PCR ofte den metoden som benyttes.

Det er et krav at bedrifter som produserer spiseferdige produkter hvor *L. monocytogenes* kan vokse, har prøvetakingsplan for produksjonsmiljø, prosessutstyr og produkter, samt at godkjente analysemetoder brukes. Ulempen med disse metodene er at de tar minimum 20 timer for et negativt svar (og et presumtivt positivt svar). Sensitive, selektive og robuste ikke-validerte hurtigmetoder vil derimot kunne være et nyttig supplement i den daglige driften og med på å styrke internkontrollen. Dagens hurtigmetoder tar likevel relativt lang tid da de fleste baserer seg på en oppformering i forkant av analysen. Det er et behov og ønske fra næringen at man utvikler raskere og sikre metoder. Det publiseres stadig nye artikler på metoder som virker lovende, men tiden vil vise om de fungerer under reelle betingelser og om de kommersialiseres slik at de kan benyttes av industrien.

### 5.4 Konklusjon

Denne rapporten er første rapport i prosjektet «Utvikling av hurtigtest for påvisning av Listeria – Et mulighetsstudium» der målet er å kartlegge om det er teknologisk mulig å få påvisningstiden ned til 20-30 minutter, samt anslå hva det vil koste å utvikle en slik hurtigmetode. Rapporten omtaler kun dagens standardmetoder og kommersielle påvisningsmetoder. De raskeste ISO 16140-2 validerte metodene for påvisning av *L. monocytogenes* tar ca. 20 timer (to real-time PCR kit), og som beskrevet tidligere så må eventuelle positive resultat verifiseres vha. dyrkning på agarskål, noe som tar ytterligere ca. 24 timer. Det finnes likevel kommersielle testkits som er betydelig raskere, ned mot 6-8 timer, men disse mangler ekstern validering og er også kun beregnet på miljøprøver. I tillegg finnes det en kommersiell test for *Listeria* spp. som kun tar 1 time (kun validert på miljøprøver). Disse testene kan likevel være et nyttig supplement til godkjente analysemetoder. **Dagens kommersielle ISO-validerte metoder er ikke i nærheten av å være så hurtige som FHF og sjømatnæringen ønsker**, og videre arbeid i prosjektet vil avdekke om man med nye lovende teknologier vil kunne oppnå en raskere påvisning av listeria, og eventuelle kostnader knyttet til dette. Denne rapporten vil danne grunnlag for evaluering av disse nye teknologiene.

**Tabell 1: Validerte kommersielle testsett for påvisning av *L. monocytogenes*<sup>a</sup>**

Testsett (Produsent)	Påvisnings-prinsipp og eventuell samtidig påvisning av andre <i>Listeria</i> spp.	Oppformering: antall trinn + medium <sup>b</sup>	Vanskelighetsgrad og tidsbruk	Min. totaltid <sup>b</sup>	Nødvendig instrument <sup>c</sup>	Ref.
<b>Immunologiske metoder</b>						
VIDAS <i>L. monocytogenes</i> Xpress (LMX) (bioMérieux)	Enzym-linked fluorescent assay ( <b>ELFA</b> ) som bruker spesifikke antistoff. Enzymatisk påvisning ved måling av fluorescens. Finnes også i en versjon hvor både <i>L. monocytogenes</i> og <i>Listeria</i> spp. påvises i samme assay.	Oppformering i <i>Listeria monocytogenes</i> Xpress (LMX) broth med supplement i 26 t.	Enkel påvisningsprotokoll: Kulturen varmebehandles før automatisert analyse i instrument (80 min)	28 t	VIDAS instrument*	[83]
TRANSIA Plate <i>L. monocytogenes</i> (BioControl Systems / MilliporeSigma)	Sandwich <b>ELISA</b> med antistoffer spesifikke for proteinet P60. Enzymatisk påvisning som måles som fargeforandring.	To-trinns oppformering i 20 t i Half Fraser og 24 t i Fraser broth.	Manuell analyseprotokoll som tar ca 3-4 timer og inkluderer varmebehandling, binding, vask og avlesning	47 t	Mikrotiter-plateleser (450 nm) <sup>§</sup>	[84]
Solus <i>L. monocytogenes</i> ELISA (PerkinElmer)	Sandwich <b>ELISA</b> . Enzymatisk påvisning som måles som fargeforandring.	To-trinns oppformering med 20 t i Half Fraser og 24 t i PAC supplemented Solus Palcam broth.	Kan brukes både med en manuell protokoll og en automatisert analyseplattform (Dynex DS2). Tar ca 3-4 t.	51 t	Mikrotiter-plateleser (450 nm) <sup>§</sup>	[85]
<b>Hybridisering av RNA</b>						
LUMIprobe 24 <i>L. monocytogenes</i> (Europrobe)	Hybridisering av <b>rRNA</b> til DNA prober festet på fast overflate, i mikrorør eller mikrotiterplater. Påvisning ved en sekundær DNA-probe konjugert til et enzym og kjemiluminescens.	Oppformering i Rich medium (RM) i 22 timer.	Relativt enkel manuell protokoll (4 trinn). Kan også automatiseres.	24 t	Lumino-meter <sup>§</sup>	[64]
RiboFlow <i>Listeria</i> Twin Detection Kit (SY-LAB)	Lateral flow assay basert på hybridisering av to forskjellige <b>rRNA</b> molekyler til en nitrocellulose-membran i en testkassett – ett fra <i>L. monocytogenes</i> og ett som er likt for alle <i>Listeria</i> spp. Påvisning ved visuell observasjon av en eller to rødfargede striper.	To-trinns oppformering, begge med ONE Broth- <i>Listeria</i> + selective supplement, begge trinn i 22 t.	Relativt enkel prøve-preparering (lyseringstrinn) før applisering på LFA testkassett. Avlesning etter 15 min.	45 t	nei	[65]

Isotermisk amplifikasjon av DNA						
ANSR for <i>L. monocytogenes</i> (Neogen)	Isotermisk nicking enzym amplifiseringsreaksjon (NEAR) med påvisning av amplifisert DNA ved hjelp av fluorescerende molecular beacon prober.	Oppformering i 24 t i LESS Plus broth.	Enkel prøve-preparering (lyseringstrinn) før analyse i ANSR-instrument, som tar 10 min.	25 t	ANSR reader*	[62]
3M Molecular Detection Assay 2 – <i>L. monocytogenes</i> (3M Health Care)	Loop-mediated isothermal amplification (LAMP), påvisning med bioluminescens	To-trinns oppformering med 20 t i Half Fraser og 20 t i Fraser broth.	Enkel prøve-preparering (varmebehandling) før analyse i deteksjons-instrument. Analysen tar 75 min.	42 t	3M Molecular Detection Instrument*	[63]
End-point PCR						
BAX System PCR Assay for <i>L. monocytogenes</i> 24E (Hygiena)	PCR og påvisning med end-point smeltekurveanalyse og påvisning med et fargestoff som fluorescerer ved binding til dobbelt-trådet DNA.	Oppformering i 24 t i 24 LEB Complete broth + supplement.	Relativt enkel prøve-preparering (lyseringstrinn) før reaksjonen kjøres i PCR instrument. Software gir enkle ja/nei svar.	29 t	BAX System Q7 eller X5	[54]
Real-time PCR – Deteksjon av fluorescens i real-time PCR instrument						
Listeria Velox (DNA Diagnostic)	Real-time PCR med prober av ukjent type. Testen påviser både <i>L. monocytogenes</i> og <i>Listeria</i> spp. i samme assay.	Oppformering i 18 t i Listeria Velox Broth.	Relativt enkel prøve-preparering (lyseringstrinn) før reaksjonen kjøres i PCR-instrument.	20 t	Real-time PCR instrument <sup>§</sup>	[86]
BACGene <i>L. monocytogenes</i> (Eurofins)	Real-time PCR med prober av ukjent type. Det finnes også en versjon av testen som kan påvise både <i>L. monocytogenes</i> og <i>Listeria</i> spp. i samme assay.	Oppformering i 18 t i Actero Listeria Enrichment Media (ALEM).	Relativt enkel prøve-preparering (lyseringstrinn) før reaksjonen kjøres i PCR-instrument. Valgfritt trinn for å fjerne fritt DNA fra prøvene (inkl. døde celler) før lysering ( <i>PREEraser BACGene Kit</i> ).	20 t	Agilent AriaMx og Bio-Rad CFX96 Touch	[57]
foodproof <i>L. monocytogenes</i> Detection LyoKit (Hygiena)	Real-time PCR med TaqMan prober. Det finnes også en versjon av testen som kan påvise både <i>L. monocytogenes</i> og <i>Listeria</i> spp. i samme assay.	Oppformering i 20 t i Actero Listeria Enrichment Media (ALEM).	Relativt enkel prøve-preparering (lyseringstrinn med <i>foodproof StarPrep Two Kit</i> ) før reaksjonen kjøres i PCR-instrument.	22 t	Real-time PCR instrument <sup>§</sup>	[87]
SureTect <i>L. monocytogenes</i> PCR Assay (Thermo Fisher Scientific)	Real-time PCR basert på Solaris qPCR teknologi med Minor Groove Binder (MGB) prober.	Oppformering i 20 t i 24 LEB <i>Listeria</i> + supplement.	Relativt enkel prøve-preparering (lyseringstrinn) før reaksjonen kjøres i PCR-instrument.	22 t	Thermo Scientific PikoReal m.fl.	[88]
GENE-UP <i>L. monocytogenes</i> 2 (LMO 2) (bioMérieux)	Real-time PCR med Dual FRET hybridization prober (to forskjellige oligonukleotid-prober som hybridiserer til samme PCR-produkt)	Oppformering i 20 t i LPT broth.	Relativt enkel prøve-preparering (lyseringstrinn med <i>GENE-UP Lysis Kit</i> ) før reaksjonen kjøres i PCR-instrument.	24 t	GENE-UP Thermocycler*	[89]

iQ-Check <i>L. monocytogenes</i> II (Bio-Rad)	Real-time PCR med prober av ukjent type. Protokollene	Oppformering i 22 t i Listeria Special Broth (LSB).	Relativt enkel prøve-preparering (lyseringstrinn) før reaksjonen kjøres i PCR-instrument. Valgfritt trinn for å fjerne fritt DNA fra prøvene (inkl. døde celler) før lysering ( <i>iQ-Check Free DNA Removal Solution</i> ).	24 t	Bio-Rad CFX96 Touch, CFX96 Touch Deep well og CFX OPUS Deepwell	[58]
BAX System Real- Time PCR Assay <i>L. monocytogenes</i> (Hygiena)	Real-time PCR med Scorpions prober.	Oppformering i 24 t i 24 LEB Complete broth + supplement.	Relativt enkel prøve-preparering (lyseringstrinn) før reaksjonen kjøres i PCR-instrument.	26 t	BAX System Q7*	[90]
MicroSEQ <i>L. monocytogenes</i> (Thermo Fisher Scientific)	Real-time PCR med TaqMan prober.	Oppformering i 24 t i Half Fraser.	Relativt enkel prøve-preparering (lyseringstrinn med et <i>PrepSEQ Kit</i> ) før reaksjonen kjøres i PCR-instrument	26 t	Applied Biosystems 7500 Fast System	[91]
Assurance GDS <i>L. monocytogenes</i> Tq (MilliporeSigma / Merck)	Oppkonsentrering av <i>L. monocytogenes</i> med immunomagnetisk separering ( <b>IMS</b> ) etter hvert oppformeringstrinn, etterfulgt av påvisning ved real-time PCR med MGB Eclipse probe.	To-trinns oppformering, begge med Half Fraser etterfulgt av IMS; første trinn 22 t og siste trinn 4 t.	IMS utføres med et Assurance GDS PickPen verktøy. Deretter enkel preøvepreparering (varmebehandling) før reaksjonen kjøres i PCR-instrument.	28 t	Assurance GDS Rotor- Gene*	[92]

<sup>a</sup> Validert mot ISO 11290-1 ved bruk av ISO 16140-2 med gyldig validering (AFNOR, MicroVal eller NorVal) per 30.06.2023. Metoder hvor påvisnings-trinnet innebærer oppdyrking av enkeltkolonier på selektive agarskåler er ikke inkludert i tabellen.

<sup>b</sup> Der metoden er validert med alternative oppformeringsprotokoller/vekstmedier er det angitt tid og medium for den protokollen som er validert for rå fisk, og deretter den som tar kortest tid. Minimum totaltid er ikke medregnet tiden det tar å bekrefte positive prøver (må gjøres for alle metodene og tar ca 24 timer i tillegg).

<sup>c</sup> De fleste metoder, bortsett fra der instrument er merket med §, er validert for bruk sammen med et eller flere spesifikt angitte instrument (oftest fra samme produsent som for assayet). Der instrumenter er merket med \* kan metoden vanskelig gjennomføres uten det spesifikke angitte instrumentet.

**Tabell 2: Kommerisielle testsett uten ISO 16140-2 validering for påvisning av *L. monocytogenes*<sup>a</sup>**

Testsett (Produsent)	Påvisnings-prinsipp og eventuell samtidig påvisning av andre <i>Listeria</i> spp.	Bruksområder, AOAC-validering, og oppformering	Vanskelighetsgrad og tidsbruk	Min. totaltid	Nødvendig instrument	Ref.
<b>Biokjemiske metoder (basert på påvisning av enzymaktivitet)</b>						
N-Light <i>L. monocytogenes</i> (NEMIS Technologies)	Påvisning av enzymet <b>fosfolipase C</b> med kjemiluminescens. Alle listeria bortsett fra <i>L. monocytogenes</i> fjernes vha <b>bakteriofager</b> i oppformeringsmediet.	AOAC-validert <b>svabertest</b> , kun beregnet for bruk for <b>miljøprøver</b> /overflater. Oppformering i rør med 2 mL 'NEMIS Enrichment Broth L. mono' i 24 t.	Tilsett tablett med substrat til oppformeringskulturen og les av svar etter 10 min.	24 t	NEMIS lumino-meter	[45, 93]
InSite <i>L. mono</i> Glo (Hygiena)	Påvisning av enzymet <b>fosfolipase C</b> fra <i>L. monocytogenes</i> og <i>L. ivanovii</i> med visuell observasjon av fluorescens under UV-lys. Påvisning av enzymet <b>β-glukosidase</b> fra <i>Listeria</i> spp. ved visuell fargeforandring fra gul til svart (hydrolyse av esculin).	AOAC-validert <b>svabertest</b> , kun beregnet for bruk for <b>miljøprøver</b> /overflater. Oppformering i ca 5 mL vekstmedium inkludert i selve svaberenheten.	Direkte visuell avlesing av fluorescens / fargeforandring i oppdyringsmediet.	24-48 t <sup>b</sup>	UV lampe	[51]
SwabSURE ListeriaP (Technical Service Consultants)	Påvisning av enzymet <b>fosfolipase C</b> fra <i>L. monocytogenes</i> og <i>L. ivanovii</i> ved visuell fargeforandring fra gul til blå.	AOAC-validert <b>svabertest</b> , kun beregnet for bruk for <b>miljøprøver</b> /overflater. Oppformering i rør med ca 5 mL vekstmedium (inkludert i testsettet).	Direkte visuell avlesing av fargeforandring i oppdyringsmediet.	24-48 t <sup>b</sup>	nei	[52]
<b>Immunologiske metoder (også i kombinasjon med PCR)</b>						
<i>Listeria</i> Assay Kit (Real Time Analyzers)	Immunoassay med <b>immunomagnetiske kuler</b> og antistoff-bundet fluorescerende reporter	Ekstern validering er ikke foretatt. <b>Svabertest</b> kun beregnet for bruk for <b>miljøprøver</b> /overflater. Oppformering 8 t.	Prøvepreparering og analysetid 1 t.	9 t	Fluorimeter	[22]
Veriflow <i>Listeria monocytogenes</i> (LM) (Invisible Sentinel, del av bioMérieux)	<b>PCR</b> -amplifisering av spesifikke DNA-targetet(s) med bruk av merkede primere og påvisning av merket PCR-produkt i et lateral flow <b>immunokromatografisk analyse</b> (PCR-NALFIA). Påvisning ved visuell observasjon av <b>rødfarget stripe</b> (aggregert kolloidalt gull/protein-konjugat).	AOAC-validert for 25 g av ulike meieri, kjøtt- og grønnsaks-produkter og miljøprøver, etter min. 24 t oppformering i 'Invisible Sentinel Listeria Enrichment Broth' (ISLB).	Ganske enkel prøvepreparering: varmebehandling etterfulgt av en 1,5 t PCR reaksjon og deretter påvisning (3 min).	26 t	PCR maskin	[67, 94]
RapidChek <i>Listeria monocytogenes</i> (Romer Labs; del av DSM)	Påvisning ved hjelp av antistoff mot <i>L. monocytogenes</i> -celler og bruk av lateral flow immunkromatografisk analyse ( <b>LFIA</b> ) (nitrocellulose test-strip). Påvisning ved visuell observasjon av <b>rødfarget stripe</b> (aggregert kolloidalt gull/antistoff-konjugat).	AOAC-validert for 25 g av ulike meieri- og kjøttprodukter og kokte reker, og for miljøprøver (rustfritt stål og plast), etter minimum 44 t oppformering i RapidChek Listeria NextDayMedia (med Supplement).	Enkel påvisningsprotokoll: Test-strip'en settes direkte ned i oppformeringskulturen uten forutgående prøvepreparering. Avlesning etter 10 min.	45 t	nei	[43]



Isotermisk amplifikasjon av DNA / RNA						
Loopamp <i>Listeria monocytogenes</i> Detection Kit (Eiken Chemical)	LAMP (isotermisk amplifikasjon) av DNA ( <b>genet iap</b> ). Påvisning skjer ved måling av <b>turbiditeten</b> som følger av at et biprodukt av amplifiseringen (pyrofosfat-ioner) presipiterer som magnesium pyrofosfat.	Ekstern validering foreligger ikke. Oppformering i 24 t i Half Fraser, UVM eller EB medium.	Enkel prøve-preparering (rensingstrinn) etterfulgt av et 1 t kombinert reaksjons- og påvisnings-trinn.	26 t	Loopamp Realtime Turbidi-meter	[61]
Atlas <i>Listeria monocytogenes</i> LmG2 Detection Assay (Roka Bioscience)	Transkripsjon-mediert <b>isotermisk amplifikasjon</b> (TMA) av (ett) <b>mRNA</b> . Mål-mRNA trekkes først ut fra cellelysatsat med en probe bundet til magnetiske kuler, og til slutt påvises amplifisert RNA med en kjemiluminescerende probe.	AOAC-validert for ulike kjøtt- og meieriprodukter og cantaloupe-melon (enten 25 eller 125 g) og for miljøprøver (rustfritt stål). Oppformering i PALCAM broth med 0.02 g/L nalidixinsyre i min. 24 t eller 44 t avhengig av prøvetype.	Automatisert plattform for analyse etter oppformeringstrinn og lysing av celler.	27 t	Atlas System <sup>c</sup>	[95]
Hybridisering av DNA / RNA						
EnviroX-F (PathogenDx)	To-trinns <b>PCR</b> -amplifisering av spesifikke DNA-targets og bruk av primere merket med fluorescerende probe, etterfulgt av påvisning ved hybridisering til DNA <b>microarray</b> . Påviser også andre <i>Listeria</i> spp. og Salmonella.	AOAC-validert <b>svabertest</b> , kun beregnet for bruk for <b>miljøprøver/overflater</b> . <b>Uten oppformeringstrinn</b> . Celler fra svaberen suspenderes i en buffer, og samles derfra opp ved sentrifugering.	Komplisert og omfattende protokoll med mange manuelle trinn; <b>krever trent laboratorie-personell</b> .	6-8 t	PCR maskin og SensoSpot mikroarray-avleser <sup>c</sup>	[21]
HybriScan D <i>Listeria monocytogenes</i> (ScanBec, del av Millipore / Merck)	Påvisning av <i>L. monocytogenes</i> <b>rRNA</b> ved sandwich <b>hybridisering</b> i mikrotiterplater. Enzymatisk påvisning hvor amplifisert DNA måles som fargeforandring. Kan muligens kryss-reagere med andre listeria-arter.	Ekstern validering foreligger ikke. To-trinns oppformering med 24 t i Half Fraser og 24 t i Fraser broth.	Manuell analyseprotokoll som tar ca 2-3 timer og inkluderer binding, vask og avlesning i mikrotiterplater.	50 t	Mikrotiter-plateleser (450 nm filter)	[96]
DNA sekvensering						
Clear Safety <i>Listeria</i> (Clear Labs)	Automatisert plattform for DNA amplifisering og <b>DNA sekvensering</b> med Oxford Nanopore MinION teknologi. Kan identifisere alle listeria-arter og dessuten gi subtype-informasjon for <i>L. monocytogenes</i> .	AOAC-validert for miljøprøver (svaberprøver for 100 cm <sup>2</sup> ) og 125 g prøver av «hot dogs» (pølser), etter henholdsvis 22 og 26 timers oppformering i 'Clear Listeria Medium' (CLM).	Automatisert analyseplattform med 10-12 timer analysetid, inkludert ca 1 time manuell prøvehåndtering.	36 t	Clear Safety System <sup>c</sup>	[24, 25]
Biosensor						
Xpress LM (Crystal Diagnostics Corporate)	Anriking av <i>L. monocytogenes</i> med immunomagnetisk separering ( <b>IMS</b> ) etterfulgt av påvisning av komplekser av antistoff-konjugerte mikrokuler og bakterieceller med <b>liquid crystal</b> -basert biosensor.	AOAC-validert metode som kun er beregnet for bruk for <b>miljøprøver/overflater</b> . Oppformering i min. 28 t i 'FoodChek Actero Listeria Enrichment Media'.	Skal nå finnes en automatisert analyseplattform (AutoXpress). Alternativt kan IMS utføres med manuell protokoll.	29 t	Xpress System Reader <sup>c</sup>	[77]

<sup>a</sup> Metoder basert på real-time PCR er ikke inkludert i tabellen. <sup>b</sup> Presumptivt positiv påvisning kan avleses tidligst etter 24 timer og negativt svar kan først tolkes etter 48 timer.

<sup>c</sup> Metoden kan vanskelig gjennomføres uten det spesifikke angitte instrumentet.

**Tabell 3: Kommersielle testsett for *Listeria* spp.<sup>a</sup>**

Testsett (Produsent)	Påvisnings-prinsipp og samtidig påvisning av andre <i>Listeria</i> spp.	Bruksområder, validering, og oppformering	Vanskelighetsgrad og tidsbruk	Min. totaltid	Nødvendig instrument	Ref.
<b>Biokjemiske metoder (basert på påvisning av enzymaktivitet)</b>						
<i>Listeria</i> SwabCheck (GSV Filter Technology)	Påvisning av enzymet <b><math>\beta</math>-glukosidase</b> fra <i>Listeria</i> spp. ved visuell fargeforandring fra gul til svart (hydrolyse av esculin). Reaksjonen kan kryss-reagere også med andre bakterier som for eksempel <i>Enterococcus</i> og noen <i>Bacillus</i> arter.	Ekstern validering foreligger ikke. <b>Svabertest</b> kun beregnet for bruk for <b>miljøprøver/overflater</b> . Oppformering i ca 5 mL vekstmedium inkludert i selve svaberenheten.	Direkte visuell avlesing av fargeforandring i oppdyringsmediet.	24-48 t	nei	[53]
<b>Bakteriofag-baserte metoder</b>						
Sample6 DETECT/L Test (IEH)	Påvisning av ved infeksjon med rekombinante bakteriofager spesifikke mot <i>Listeria</i> spp. Enzymatisk deteksjon av reporter-proteinet luciferase som produseres når bakteriofagene replikerer i <i>Listeria</i> -cellene ved kjemiluminescens.	AOAC-validert metode som kun er beregnet for bruk for <b>miljøprøver/overflater</b> . <b>Uten oppformeringstrinn</b> , men har isteden et 4 timers <b>'recovery' trinn</b> hvor svaberprøve inkuberes i 'Detection Buffer'.	Inkubasjon med bakteriofag-løsning (Detection Solution) i 2 t etterfulgt av enkel prøvepreparering (sentrifugering) og et 1 min påvisnings-trinn.	6 t	Lumino-meter	[34]
VIDAS UP <i>Listeria</i> (LPT) (bioMérieux)	Enzym-linked fluorescent assay (ELFA) som bruker rekombinante bakteriofag-proteiner til å binde <i>Listeria</i> spp. celler. Enzymatisk påvisning ved måling av fluorescens.	AFNOR- og AOAC-validert metode for ulike matvarer, inkludert sjømat. Oppformering i LPT broth i 22 t for miljøprøver og 26 t for produktprøver.	Automatisert plattform for analyse (program tar 1 t) etter oppformering og varmebehandling av prøve.	23 t	VIDAS instrument	[75, 76]
PhageDX <i>Listeria</i> Assay (LabCorp) <i>Mulig utgått produkt.</i>	Påvisning av ved infeksjon med rekombinante bakteriofager spesifikke mot <i>Listeria</i> spp. Enzymatisk deteksjon av reporter-proteinet luciferase som produseres når bakteriofagene replikerer i <i>Listeria</i> -cellene ved kjemiluminescens.	AOAC-validert metode som kun er beregnet for bruk for <b>miljøprøver/overflater</b> . Oppformering i 20 mL buffered <i>Listeria</i> enrichment broth (BLEB) i 20 t.	Inkubasjon med PhageDx <i>Listeria</i> Recombinant Phage i 4 t etterfulgt av enkel prøvepreparering (lysering) og et 1 min påvisnings-trinn.	25 t	Lumino-meter	[34, 97]
<b>Immunologiske metoder</b>						
Solus One <i>Listeria</i> (PerkinElmer)	Enzymlinked immunosorbent assay ( <b>ELISA</b> ) utført i mikrotiterplater. Enzymatisk påvisning som måles som fargeforandring.	AOAC-validert metode som kun er beregnet for bruk for <b>miljøprøver/overflater</b> . Oppformering i SOLO+ medium i 22 t.	Manuell analyseprotokoll som tar ca 2-3 timer og inkluderer binding, vask og avlesning i mikrotiterplater.	25 t	Mikrotiter-plateleser (450 nm filter)	[98]
BACSpec <i>Listeria</i> (Eurofins GeneScan)	Enzymlinked immunosorbent assay ( <b>ELISA</b> ) utført i mikrotiterplater. Enzymatisk påvisning som måles som fargeforandring. Antistoffene binder flagelle-proteiner.	AFNOR- og AOAC-validert metode for ulike matvarer, inkludert sjømat. To-trinns oppformering med 22 t i Half Fraser og 22 t i Eurofins <i>Listeria</i> Enrichment Broth (ELEB).	Manuell analyseprotokoll som tar ca 2-3 timer og inkluderer binding, vask og avlesning i mikrotiterplater.	46 t	Mikrotiter-plateleser (450 nm filter)	[99, 100]

RapidChek <i>Listeria</i> NextDay Food and Environmental Test System (Romer Labs/DSM)	Lateralt flow immunkromatografisk analyse ( <b>LFIA</b> ) (nitrocellulose test-strip), som for RapidChek <i>Listeria monocytogenes</i> i Tabell 2 men med andre antistoffer.	AOAC-validert for ulike meieri- og kjøttprodukter, og for miljøprøver (ulike overflater). Oppformering i RapidChek <i>Listeria</i> NextDayMedia i 24 t for miljøprøver.	Enkel påvisningsprotokoll: Kulturen varmebehandles før test-strip settes direkte ned i prøven. Avlesning etter 10 min.	24 t	nei	[101]
Reveal 2.0 <i>Listeria</i> Test System (Neogen)	Lateralt flow immunkromatografisk analyse ( <b>LFIA</b> ) (nitrocellulose test-strip). Påvisning ved visuell observasjon av <b>rødfarget stripe</b> (aggregert kolloidalt gull/antistoff-konjugat).	AOAC-validert for ulike matvarer inkludert røkelaks og for miljøprøver. Oppformering i LESS broth i 27 t.	Enkel påvisningsprotokoll: Kulturen varmebehandles før test-strip settes direkte ned i prøven. Avlesn. Etter 10 min.	27 t	nei	[102]
Oxoid <i>Listeria</i> Rapid Test (Thermo Fisher)	Lateralt flow immunkromatografisk analyse ( <b>LFIA</b> ) (inkorporert i testkassett). Påvisning ved visuell observasjon av <b>blåfarget stripe</b> (blå latex konjugert med antistoff). Antistoffene binder flagelle-proteiner.	Gyldig ekstern validering foreligger ikke. To-trinns oppformering med 21 t i Half Fraser etterfulgt av 21 t i Fraser broth.	Enkel påvisningsprotokoll: Kulturen varmebehandles før den appliseres i testkassett. Avlesning etter 20 min.	42 t	nei	[73]
VIP Gold for <i>Listeria</i> (BioControl Systems / MilliporeSigma)	Lateralt flow immunkromatografisk analyse ( <b>LFIA</b> ) (inkorporert i testkassett). Påvisning ved visuell observasjon av <b>rødfarget stripe</b> (aggregert kolloidalt gull/antistoff-konjugat).	AOAC-validert for ulike matvarer, inkludert sjømat. To-trinns oppformering i 26 t i Modified Fraser Broth with lithiumklorid etterfulgt at 22 t i BLEB.	Enkel påvisningsprotokoll: Kulturen varmebehandles før den appliseres i testkassett. Avlesning etter 10 min.	48 t	nei	[103]
<b>Isotermisk amplifikasjon av DNA / RNA</b>						
ANSR <i>Listeria</i> Right Now (Neogen)	Amplifisering av <b>23S rRNA</b> ved hjelp av isotermisk nicking enzym amplifiseringsreaksjon (NEAR) teknologi, og påvisning av amplifisert DNA ved hjelp av fluorescerende molecular beacon prober.	AOAC-validert <b>svabertest</b> , kun beregnet for bruk for <b>miljøprøver</b> (rene overflater). <b>Uten oppformeringstrinn</b> . Svaberen settes direkte ned i lyseringsbuffer. Deteksjonsgrense på 2-3 CFU per svaber.	Enkel prøvepreparering (lyseringstrinn) etterfulgt av et 18 min kombinert reaksjons- og påvisnings-trinn.	1 t	ANSR reader	[32, 33]
<b>Biosensor</b>						
<i>Listeria</i> CANARY Zephyr (Smiths Detection)	Biosensor bestående av genredigerte <b>B-celler (immunceller)</b> som uttrykker spesifikke <b>antistoff</b> mot <i>Listeria</i> på overflaten. Ved binding til bakterieceller overføres et signal i cellene i form av økt kalsium-konsentrasjon, som igjen aktiverer et kalsium-sensitivt luminescerende protein. Signalet måles som luminescens.	AOAC-validert metode som kun er beregnet for bruk for <b>miljøprøver/overflater</b> . Oppformering (antagelig) i 24 timer. Deteksjonsgrense på 1 CFU per prøve. Sensitivitet på ca 50 CFU i analysevolumet <u>etter</u> oppformering.	Enkel prøvepreparering (sentrifugering) etterfulgt av et 1 min påvisnings-trinn.	24 t	Zephyr Biological Identifier (lumino-meter)	[78, 79]
<sup>a</sup> Metoder basert på real-time PCR er ikke inkludert i tabellen. Det samme gjelder testsett der det finnes en tilsvarende metode (fra samme produsent) spesifikk for <i>L. monocytogenes</i> (i Tabell 1 eller 2), bortsett fra der <i>Listeria</i> spp. assayet tar (vesentlig) kortere tid.						

## 6 Referanser

- International Organization of Standardization, ISO 16140-2:2016. *Microbiology of the food chain — Method validation — Part 2: Protocol for the validation of alternative (proprietary) methods against a reference method.* <https://www.iso.org/standard/54870.html>.
- International Organization of Standardization, ISO 11290-1:2017. *Microbiology of the food chain — Horizontal method for the detection and enumeration of Listeria monocytogenes and of Listeria spp. — Part 1: Detection method.* <https://www.iso.org/standard/60313.html>.
- Jordan, K., et al., *Listeria monocytogenes in the Food Processing Environment.* *Curr Clin Microbiol Rep*, 2018. **5**(2):106-119.
- Vazquez-Boland, J.A., et al., *Listeria pathogenesis and molecular virulence determinants.* *Clin Microbiol Rev*, 2001. **14**(3):584-640.
- USDA Food Safety and Inspection Service, *FSIS compliance guideline: controlling Listeria monocytogenes in post-lethality exposed ready-to-eat meat and poultry products.* 2014. <https://www.fsis.usda.gov/sites/default/files/import/Controllin-g-Lm-RTE-Guideline.pdf>.
- EFSA BIOHAZ Palen (EFSA Panel on Biological Hazards), Koutsoumanis, K. et al., *The public health risk posed by Listeria monocytogenes in frozen fruit and vegetables including herbs, blanched during processing.* *EFSA J*, 2020. **18**(4):e06092.
- Heir, E. & Langsrud, S., *Tiltak for økt kontroll med Listeria i laksenæringen. Sluttrapport.* Nofima Rapport 47/2014, 2014. <https://www.fhf.no/prosjekter/prosjektbasen/900521/>.
- Commission Regulation (EC) No 2073/2005 of 15 November 2005 on microbiological criteria for foodstuffs (Text with EEA relevance). 2005. Official Journal L338. <http://data.europa.eu/eli/reg/2005/2073/2020-03-08>.
- Næringsmiddelhygieneforskriften. Forskrift om næringsmiddelhygiene (FOR-2008-12-22-1623).* <https://lovdata.no/forskrift/2008-12-22-1623>.
- International Organization of Standardization, ISO 6887-1:2017. *Microbiology of the food chain — Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination — Part 1: General rules for the preparation of the initial suspension and decimal dilutions.* <https://www.iso.org/standard/63335.html>.
- International Organization of Standardization, ISO 6887-3:2017. *Microbiology of the food chain — Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination — Part 3: Specific rules for the preparation of fish and fishery products.* <https://www.iso.org/standard/63337.html>.
- International Organization of Standardization, ISO 18593:2018. *Microbiology of the food chain — Horizontal methods for surface sampling.* <https://www.iso.org/standard/64950.html>.
- International Organization of Standardization, ISO 11290-2:2017. *Microbiology of the food chain — Horizontal method for the detection and enumeration of Listeria monocytogenes and of Listeria spp. — Part 2: Enumeration method.* <https://www.iso.org/standard/60314.html>.
- Sensilist. <https://www.sensilist.com/>.
- Andrews, W.H. og Hammack T.S. (Red.), *Subchapter 10 Listeria*, i Latimer G.W.Jr. (Red.) *Official Methods of Analysis of AOAC INTERNATIONAL*. 22. utgave. AOAC Publications, 4. Jan. 2023. <https://doi.org/10.1093/9780197610145.003.120>.
- AOAC Research Institute, *AOAC Research Institute's Performance Tested Methods (PTM) Program.* <https://www.aoc.org/scientific-solutions/research-institute-ptm/>.
- Hitchins, A.D., Jinneman K., og Chen Y. *BAM Chapter 10: Detection of Listeria monocytogenes in Foods and Environmental Samples, and Enumeration of Listeria monocytogenes in Foods.* FDA's Bacteriological Analytical Manual (BAM), 2022. <https://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/bam-chapter-10-detection-listeria-monocytogenes-foods-and-environmental-samples-and-enumeration>.
- USDA Food Safety and Inspection Service. *Isolation and Identification of Listeria monocytogenes from Red Meat, Poultry, Ready-To-Eat, Siluriformes (Fish) and Egg Products, and Environmental Samples.* 2021. Microbiology Laboratory Guidebook (MLG) Method no. 8.13 [https://www.fsis.usda.gov/sites/default/files/media\\_file/2021-09/MLG-8.13.pdf](https://www.fsis.usda.gov/sites/default/files/media_file/2021-09/MLG-8.13.pdf).
- Feng, P., *Emergence of rapid methods for identifying microbial pathogens in foods.* *J AOAC Int*, 1996. **79**(3):809-812.
- Bastin, B., et al., *Confirmation and Identification of Listeria monocytogenes, Listeria spp. and Other Gram-Positive Organisms by the Bruker MALDI Biotyper Method: Collaborative Study, First Action 2017.10.* *J AOAC Int*, 2018. **101**(5):1610-1622.
- Katchman, B.A., et al., *Validation Study for PathogenDx Enviro<sup>x-F</sup> Assay for the Detection of Listeria, L. monocytogenes, and Salmonella in Environmental Surface Samples: AOAC Performance Tested Method 092001.* *J AOAC Int*, 2022. **105**(5):1390-1407.
- Real-Time Analyzers. *Listeria Assay kit.* <http://www.rta.biz/products/sers-products/listeria-assay-kit/>.
- Oxford Nanopore Technologies, *Metagenomics and microbiome analysis with nanopore technology.* <https://nanoporetech.com/applications/techniques/metagenomics-and-microbiome-analysis-with-nanopore-technology>.
- Food Safety Magazine, *Clear Labs Announces Partnership with Oxford Nanopore.* 2019. <https://www.food-safety.com/articles/6150-clear-labs-announces-partnership-with-oxford-nanopore>.
- Pollard, S., et al., *Validation of the Clear Safety Listeria Method for Detection of Listeria Species in Hot Dogs and on Environmental Surface Matrixes: AOAC Performance Tested Method 091901.* *J AOAC Int*, 2022. **105**(1):211-229.
- IAFP, *Webinar: Is it a Listeria sensu stricto or sensu lato species? Why understanding the difference is important.* 2023. [https://www.foodprotection.org/members/files/5\\_8\\_23\\_Webinar.pdf](https://www.foodprotection.org/members/files/5_8_23_Webinar.pdf).
- Carlin, C.R., et al., *Soil Collected in the Great Smoky Mountains National Park Yielded a Novel Listeria sensu stricto Species, L. swaminathanii.* *Microbiol Spectr*, 2022. **10**(3):e0044222.
- Raufu, I.A., et al., *Listeria ilorinensis sp. nov., isolated from cow milk cheese in Nigeria.* *Int J Syst Evol Microbiol*, 2022. **72**(6):005437.
- Orsi, R.H. & Wiedmann M., *Characteristics and distribution of Listeria spp., including Listeria species newly described since 2009.* *Appl Microbiol Biotechnol*, 2016. **100**(12):5273-5287.
- United Fresh Food Safety & Technology Council, *Guidance on environmental monitoring and control of listeria for the fresh produce industry.* 2. utgave. United Fresh Produce Association, 2018. <https://www.freshproduce.com/siteassets/files/reports/food-safety/guidance-on-environmental-monitoring-and-control-of-listeria.pdf>.
- Malley, T.J., Butts J., & Wiedmann M., *Seek and destroy process: Listeria monocytogenes process controls in the ready-to-eat meat and poultry industry.* *J Food Prot*, 2015. **78**(2):436-45.
- Roman, B., et al., *Matrix Extension Study: Listeria Right Now Test for Detection of Listeria spp. from Selected Environmental Surfaces Without Enrichment: AOAC*

- Performance Tested Method 081802. J AOAC Int, 2019. **102**(5):1589-1594.
33. Neogen, *Validation for Listeria Right Now*. 2019. [https://www.neogen.com/globalassets/pim/assets/original/10001/official\\_9873-listeria-right-now\\_validation-report.pdf](https://www.neogen.com/globalassets/pim/assets/original/10001/official_9873-listeria-right-now_validation-report.pdf).
  34. Banerjee, K., et al., *Validation of Workflow Changes, Phage Concentration and Reformatted Detection Threshold for the Sample6 DETECT/L Test: Level 3 Modification*. J AOAC Int, 2018. **101**(6):1895-1904.
  35. Gandhi, M. & Chikindas M.L., *Listeria: A foodborne pathogen that knows how to survive*. Int J Food Microbiol, 2007. **113**(1):1-15.
  36. Jacobsen, C.N., *The influence of commonly used selective agents on the growth of Listeria monocytogenes*. Int J Food Microbiol, 1999. **50**(3):221-226.
  37. Gnanou Besse, N., et al., *Evaluation of reduction of Fraser incubation by 24h in the EN ISO 11290-1 standard on detection and diversity of Listeria species*. Int J Food Microbiol, 2016. **224**:16-21.
  38. Beumer, R.R., et al., *The effect of acriflavine and nalidixic acid on the growth of Listeria spp in enrichment media*. Food Microbiol, 1996. **13**(2):137-148.
  39. Cox, L.J., Dooley D., & Beumer R., *Effect of lithium chloride and other inhibitors on the growth of Listeria spp*. Food Microbiol, 1990. **7**(4):311-325.
  40. AFNOR Certification, *Validation of One Broth One Plate for Listeria monocytogenes (OBOP-LMO)*. Certificate No. NEO 35/06-07/16. 2020. [https://nf-validation.afnor.org/en/wp-content/uploads/sites/2/2016/07/NEO-35-06-07-15\\_en.pdf](https://nf-validation.afnor.org/en/wp-content/uploads/sites/2/2016/07/NEO-35-06-07-15_en.pdf).
  41. AFNOR Certification, *Validation of Listeria Precis (Detection method)*. Certificate No. UNI 03/04-04/05. 2023. [https://nf-validation.afnor.org/en/wp-content/uploads/sites/2/2014/03/Synt-UNI-03-04-04-05\\_en.pdf](https://nf-validation.afnor.org/en/wp-content/uploads/sites/2/2014/03/Synt-UNI-03-04-04-05_en.pdf).
  42. AOAC Research Institute, *Validation of PDX-LIB*. Certificate No. PTM 040501. 2022. [https://members.aoac.org/AOAC\\_Docs/RI/23PTM/23C\\_040501\\_PDXLIB\\_ver2.pdf](https://members.aoac.org/AOAC_Docs/RI/23PTM/23C_040501_PDXLIB_ver2.pdf).
  43. Juck, G., et al., *Romer Labs RapidChek Listeria monocytogenes Test System for the Detection of L. monocytogenes on Selected Foods and Environmental Surfaces*. J AOAC Int, 2018. **101**(5):1490-1507.
  44. Arias-Rios, E.V., et al., *Rapid Detection of Listeria in Ice Cream in 13 Hours Using the Roka Listeria Detection Assay*. J AOAC Int, 2018. **101**(6):1806-1812.
  45. NEMIS Technologies, *N-Light rapid tests*. <https://www.nemistech.com/technology/>.
  46. AOAC Research Institute, *Validation of PATHATRIX Pooling System for Listeria spp*. Certificate No. PTM 090201B. 2020. [https://members.aoac.org/AOAC\\_Docs/RI/21PTM/21C\\_090201B\\_TFSL.pdf](https://members.aoac.org/AOAC_Docs/RI/21PTM/21C_090201B_TFSL.pdf)
  47. Wagner, E., et al., *Surveillance of Listeria monocytogenes: Early detection, population dynamics and quasimetagenomic sequencing during selective enrichment*. Appl Environ Microbiol, 2021: **87**:e01774-21.
  48. AFNOR Certification, *Validation of Agar Listeria (AL)*. Certificate No. BRD 07/16-01/09. 2022. [https://nf-validation.afnor.org/en/wp-content/uploads/sites/2/2022/02/Synt-BRD-07-16-01-09\\_L.mono\\_en.pdf](https://nf-validation.afnor.org/en/wp-content/uploads/sites/2/2022/02/Synt-BRD-07-16-01-09_L.mono_en.pdf).
  49. van Netten, P., et al., *Liquid and solid selective differential media for the detection and enumeration of L. monocytogenes and other Listeria spp*. Int J Food Microbiol, 1989. **8**(4):299-316.
  50. AFNOR Certification, *Validation of RAPID'L.mono*. Certificate No. BRD 07/04-09/98. 2019. [https://nf-validation.afnor.org/en/wp-content/uploads/sites/2/2014/03/Synt-BRD-07-04-09-98\\_en.pdf](https://nf-validation.afnor.org/en/wp-content/uploads/sites/2/2014/03/Synt-BRD-07-04-09-98_en.pdf).
  51. AOAC Research Institute, *Validation of InSite L. mono Glo*. Certificate No. PTM 061802. 2022. [https://members.aoac.org/AOAC\\_Docs/RI/23PTM/23C\\_061802\\_HygienalMglo.pdf](https://members.aoac.org/AOAC_Docs/RI/23PTM/23C_061802_HygienalMglo.pdf).
  52. Technical Service Consultants, *SwabSURE ListeriaP*. <https://www.tscswabs.co.uk/Products/184/SS-L01-SwabSURE-Listeria-mono>.
  53. GSV Filter Technology, *Listeria SwabCheck*. <http://www.gvs.com.br/wp-content/uploads/2022/02/microbiologia.pdf>.
  54. AFNOR Certification, *Validation of BAX System PCR Assay for L. monocytogenes 24E*. Certificate no. QUA 18/05-07/08. 2021. [https://nf-validation.afnor.org/en/wp-content/uploads/sites/2/2014/03/Synt-QUA-18-05-07-08\\_en.pdf](https://nf-validation.afnor.org/en/wp-content/uploads/sites/2/2014/03/Synt-QUA-18-05-07-08_en.pdf).
  55. Buckwalter, S.P., et al., *Inhibition controls for qualitative real-time PCR assays: are they necessary for all specimen matrices?* J Clin Microbiol, 2014. **52**(6):2139-43.
  56. Partis, L., et al., *Inhibitory effects of enrichment media on the Accuprobe test for Listeria monocytogenes*. Appl Environ Microbiol, 1994. **60**(5):1693-4.
  57. AFNOR Certification, *Validation of BACGene L. monocytogenes*. Certificate no. EGS 38/03-01/17. 2019. [https://nf-validation.afnor.org/en/wp-content/uploads/sites/2/2017/10/Synt-EGS-38-05-01-17\\_en1.pdf](https://nf-validation.afnor.org/en/wp-content/uploads/sites/2/2017/10/Synt-EGS-38-05-01-17_en1.pdf).
  58. AFNOR Certification, *Validation of iQ-Check L. monocytogenes II*. Certificate no. BRD 07/10-04/05. 2023. <https://nf-validation.afnor.org/en/wp-content/uploads/sites/2/2014/03/Synt-BRD-07-10-04-05-fr.pdf>,
  59. Notomi, T., et al., *Loop-mediated isothermal amplification of DNA*. Nucleic Acids Res, 2000. **28**(12):e63.
  60. Wong, Y.P., et al., *Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): a versatile technique for detection of microorganisms*. J Appl Microbiol, 2018. **124**(3):626-643.
  61. Mori, Y., et al., *Detection of loop-mediated isothermal amplification reaction by turbidity derived from magnesium pyrophosphate formation*. Biochem Biophys Res Commun, 2001. **289**(1):150-4.
  62. AFNOR Certification, *Validation of ANSR for Listeria monocytogenes*. Certificate no. NEO 35/04-03/16. 2020. [https://nf-validation.afnor.org/en/wp-content/uploads/sites/2/2016/06/Synt-NEO-35-04-03-16\\_en.pdf](https://nf-validation.afnor.org/en/wp-content/uploads/sites/2/2016/06/Synt-NEO-35-04-03-16_en.pdf).
  63. AFNOR Certification, *Validation of 3M Molecular Detection Assay 2 – L. monocytogenes*. Certificate no. 3M 01/15-09/16. 2020. [https://nf-validation.afnor.org/en/wp-content/uploads/sites/2/2016/12/Synt-3M-01-15-09-16\\_en.pdf](https://nf-validation.afnor.org/en/wp-content/uploads/sites/2/2016/12/Synt-3M-01-15-09-16_en.pdf).
  64. AFNOR Certification, *Validation of LUMIprobe 24 L. monocytogenes*. Certificate no. EUR 15/03-12/05. 2021. [https://nf-validation.afnor.org/en/wp-content/uploads/sites/2/2014/03/Synt-EUR-15-03-12-05\\_fr.pdf](https://nf-validation.afnor.org/en/wp-content/uploads/sites/2/2014/03/Synt-EUR-15-03-12-05_fr.pdf).
  65. MicroVal Certification, *Validation of RiboFlow L. mono*. Certificate no. 2015LR53. 2022. [https://nen.bettywebblocks.com/view-microval-details?cert\\_nr=2015LR53&r\\_name=MicroVal](https://nen.bettywebblocks.com/view-microval-details?cert_nr=2015LR53&r_name=MicroVal).
  66. Fogaca, M.B.T., et al., *Antibody- and nucleic acid-based lateral flow immunoassay for Listeria monocytogenes detection*. Anal Bioanal Chem, 2021. **413**(16):4161-4180.
  67. Joelsson, A.C., et al., *Comparative Evaluation of Veriflow(R) Listeria monocytogenes to USDA and AOAC Culture Based Methods for the Detection of Listeria monocytogenes in Food*. J AOAC Int, 2015. **98**(5):1325-1334.
  68. Salico AS. <https://salico.no/>.
  69. Innova Biosciences. *Guide to Lateral Flow Immunoassays*. [https://fnkprdata.blob.core.windows.net/domestic/download/pdf/IBS\\_A\\_guide\\_to\\_lateral\\_flow\\_immunoassays.pdf](https://fnkprdata.blob.core.windows.net/domestic/download/pdf/IBS_A_guide_to_lateral_flow_immunoassays.pdf).
  70. Fogaca, M.B.T., et al., *Antibody- and nucleic acid-based lateral flow immunoassay for Listeria monocytogenes detection*. Anal Bioanal Chem, 2021. **413**(16):4161-4180.

71. Cell Signaling Technology. *Types of ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay) Tests*. <https://www.cellsignal.com/applications/elisa/types-of-elisa-tests>.
72. Jadhav, S., Bhavne, M. & Palombo, E.A. *Methods used for the detection and subtyping of Listeria monocytogenes*. J Microbiol Methods, 2012. **88**(3):327-341.
73. Thermo Fisher Scientific. *Oxoid Listeria Rapid Test*. [http://www.oxoid.com/UK/blue/prod\\_detail/prod\\_detail.asp?pr=FT0401&c=UK&lang=EN](http://www.oxoid.com/UK/blue/prod_detail/prod_detail.asp?pr=FT0401&c=UK&lang=EN).
74. bioMérieux. *VIDAS. Multiparametric immunoassay system for medium throughput*. <https://www.biomerieux-diagnostics.com/vidas-solution>.
75. Crowley, E., et al., *Evaluation of VIDAS UP Listeria assay (LPT) for the detection of Listeria in a variety of foods and environmental surfaces: First Action 2013.10*. J AOAC Int, 2014. **97**(2):431-41.
76. AFNOR Certification, *Validation of VIDAS UP Listeria (LPT)*. Certificate no. BIO 12/33-05/12. 2020. [https://nf-validation.afnor.org/en/wp-content/uploads/sites/2/2014/03/Synt-BIO-12-33-05-12\\_en.pdf](https://nf-validation.afnor.org/en/wp-content/uploads/sites/2/2014/03/Synt-BIO-12-33-05-12_en.pdf).
77. Stumpf, C.H., et al., *Crystal Diagnostics Xpress LM Kit for the Rapid Detection of Listeria monocytogenes from Environmental Surfaces*. J AOAC Int, 2017. **100**(1):165-175.
78. AOAC Research Institute, *Validation of Listeria CANARY Zephyr*. Certificate No. PTM 122005. 2020. [https://www.smithsdetection.com/media/oprk5pi3/smiths\\_detection\\_listeria.pdf](https://www.smithsdetection.com/media/oprk5pi3/smiths_detection_listeria.pdf).
79. Petrovick, M.S., et al., *Rapid Sensors for Biological-Agent Identification*, Lincoln Laboratory Journal, 2007. **17**(1):63-84. [https://archive.ll.mit.edu/publications/journal/pdf/vol17\\_no1/17\\_1\\_3Petrovick.pdf](https://archive.ll.mit.edu/publications/journal/pdf/vol17_no1/17_1_3Petrovick.pdf).
80. Cossetini, A., et al., *Rapid detection of Listeria monocytogenes, Salmonella, Campylobacter spp., and Escherichia coli in food using biosensors*. Food Control, 2022. **137**:108962.
81. Jones, G.S. & D'Orazio, S.E.F., *Listeria monocytogenes: cultivation and laboratory maintenance*. Curr Protoc Microbiol, 2013. **31**:9B.2.1-9B.2.7.
82. Berestecky, J.M., *Microbial Growth*. <http://www2.hawaii.edu/~johnb/micro/medmicro/medmicro.5.html>.
83. AFNOR Certification, *Validation of VIDAS LMX*. Certificate no. BIO 12/27-02/10. 2022. [https://nf-validation.afnor.org/en/wp-content/uploads/sites/2/2014/03/Synt-BIO-12-27-02-10\\_en.pdf](https://nf-validation.afnor.org/en/wp-content/uploads/sites/2/2014/03/Synt-BIO-12-27-02-10_en.pdf).
84. AFNOR Certification, *Validation of TRANSIA Plate Listeria monocytogenes*. Certificate no. TRA 02/11-03/08. 2020. [https://nf-validation.afnor.org/en/wp-content/uploads/sites/2/2014/03/Synt-TRA-02-11-03-08\\_en.pdf](https://nf-validation.afnor.org/en/wp-content/uploads/sites/2/2014/03/Synt-TRA-02-11-03-08_en.pdf).
85. AFNOR Certification, *Validation of Solus Listeria monocytogenes ELISA*. Certificate no. SOL 37/05-10/22. 2022. <https://nf-validation.afnor.org/en/wp-content/uploads/sites/2/2022/12/Synt-SOL-37-05-10-22.pdf>.
86. NordVal International, *Validation of Listeria Velox*. Certificate no. 058. 2023. <https://www.nmkl.org/wp-content/uploads/2023/02/NordVal-certificate-058-Listeria-Velox-DNA-Diagnostic-Feb2023.pdf>.
87. NordVal International, *Validation of foodproof Listeria monocytogenes Detection LyoKit - 5'Nuclease*. Certificate no. 025. 2021. [https://www.nmkl.org/wp-content/uploads/2022/03/NordVal-certificate-025-Foodproof-Listeria-mono-Biotecon\\_02Nov2021.pdf](https://www.nmkl.org/wp-content/uploads/2022/03/NordVal-certificate-025-Foodproof-Listeria-mono-Biotecon_02Nov2021.pdf).
88. AFNOR Certification, *Validation of SureTect L. monocytogenes PCR Assay*. Certificate no. UNI 03/08-11/13. 2023. [https://nf-validation.afnor.org/en/wp-content/uploads/sites/2/2014/03/Synt-UNI-03-08-11-13\\_en.pdf](https://nf-validation.afnor.org/en/wp-content/uploads/sites/2/2014/03/Synt-UNI-03-08-11-13_en.pdf).
89. AFNOR Certification, *Validation of Gene-Up Listeria monocytogenes 2*. Certificate no. BIO 12/40-11/16. 2021. [https://nf-validation.afnor.org/en/wp-content/uploads/sites/2/2017/05/Synt-BIO-12-40-11-16\\_en.pdf](https://nf-validation.afnor.org/en/wp-content/uploads/sites/2/2017/05/Synt-BIO-12-40-11-16_en.pdf).
90. AFNOR Certification, *Validation of BAX System Real-Time PCR Assay L. monocytogenes*. Certificate no. QUA 18/10-01/19. 2022. <https://nf-validation.afnor.org/en/wp-content/uploads/sites/2/2022/12/Synt-QUA-18-10-01-19.pdf>.
91. AFNOR Certification, *Validation of MicroSEQ L. monocytogenes*. Certificate no. ABI 29/05-12/11. 2020. [https://nf-validation.afnor.org/en/wp-content/uploads/sites/2/2014/03/Synt-ABI-29-05-12-11\\_en.pdf](https://nf-validation.afnor.org/en/wp-content/uploads/sites/2/2014/03/Synt-ABI-29-05-12-11_en.pdf).
92. MicroVal Certification, *Validation of Assurance GDS L. monocytogenes Tq*. Certificate no. 2014LR32. 2022. [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).
93. Larose, D., et al., *Validation of N-Light L. monocytogenes for Detection of Listeria monocytogenes on Environmental Surfaces: AOAC Performance Tested Method 122002*. J AOAC Int, 2022. **105**(3):835-843.
94. Siciliano, N., et al. (opffinnere), *Methods for detecting multiple analytes with a single signal*. United States Patent No. US9347938B2. 9. Mars 2013. <https://patents.google.com/patent/US9347938B2/en>.
95. Bres, V., et al., *Atlas Listeria monocytogenes LmG2 Detection Assay Using Transcription Mediated Amplification to Detect Listeria monocytogenes in Selected Foods and Stainless Steel Surface*. J AOAC Int, 2014. **97**(5):1343-1358.
96. Merck. *HybriScan Rapid Microbial Test System*. <https://www.sigmaaldrich.com/NO/en/technical-documents/technical-article/microbiological-testing/pathogen-and-spoilage-testing/hybriscan-rapid-test>.
97. Nguyen, M.M., et al., *Validation of the PhageDx Listeria Assay for Detection of Listeria Spp. on Stainless Steel and Ceramic Environmental Surfaces* AOAC Performance Tested Method 102005. J AOAC Int, 2021. **104**(6):1609-1619.
98. Tonner, E., et al., *Evaluation of the Solus One Listeria Method for the Detection of Listeria Species on Environmental Surfaces*. J AOAC Int, 2019. **102**(2):570-579.
99. AOAC Research Institute, *Validation of BACSpec Listeria*. Certificate No. PTM 051703. 2021. [https://members.aoc.org/AOAC\\_Docs/RI/22PTM/22C\\_051703\\_EuroLis.pdf](https://members.aoc.org/AOAC_Docs/RI/22PTM/22C_051703_EuroLis.pdf).
100. AFNOR Certification, *Validation of BACSpec Listeria*. Certificate No. EGS 38/04-01/17. 2021. [https://nf-validation.afnor.org/en/wp-content/uploads/sites/2/2017/10/Synt-EGS-38-04-01-17\\_en.pdf](https://nf-validation.afnor.org/en/wp-content/uploads/sites/2/2017/10/Synt-EGS-38-04-01-17_en.pdf).
101. Muldoon, M.T., et al., *SDIX RapidChek Listeria F.A.S.T. environmental test system for the detection of Listeria species on environmental surfaces*. J AOAC Int, 2012. **95**(3):850-859.
102. Alles, S., et al., *Reveal Listeria 2.0 test for detection of Listeria spp. in foods and environmental samples*. J AOAC Int, 2012. **95**(2):424-434.
103. Feldsine, P.T., et al., *Comparative Validation Study to Demonstrate the Equivalence of a Minor Modification to AOAC Method 997.03 Visual Immunoprecipitate (VIP) for Listeria to the Reference Culture Method*. J AOAC Int, 2009. **92**(5):1421-1425.