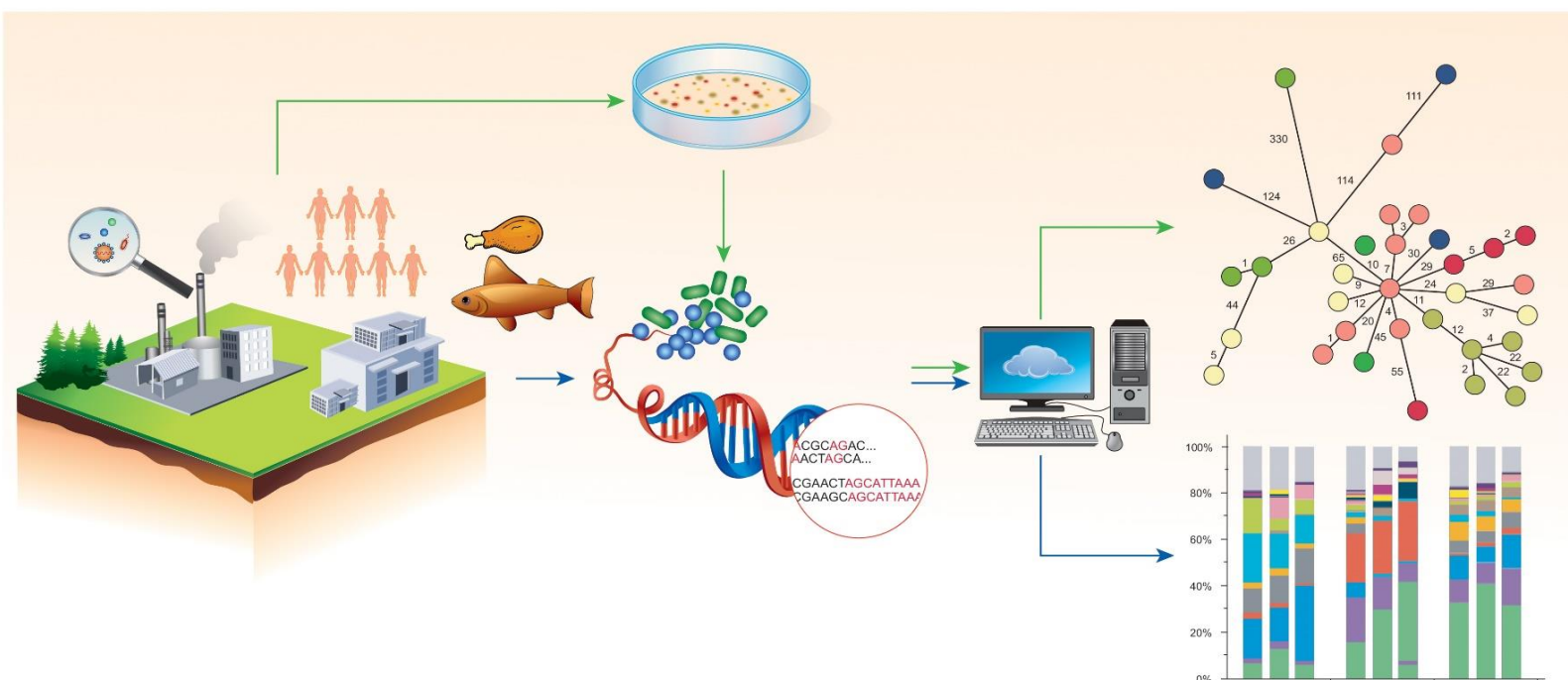


Veileder: Bruk av helgenomsekvensering for forebygging og kontroll av *Listeria monocytogenes* i matindustrien



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

«Bærekraftig mat til alle» er vår visjon.

Kontaktinformasjon

Telefon: 77 62 90 00

post@nofima.no

www.nofima.no

NO 989 278 835 MVA



Hovedkontor Tromsø

Muninbakken 9–13

Postboks 6122

NO-9291 Tromsø



Stavanger

Måltidets hus

Richard Johnsensgate 4

Postboks 8034

NO-4068 Stavanger



Sunndalsøra

Sjølsengvegen 22

NO-6600 Sunndalsøra



Ås

Osloveien 1

Postboks 210

NO-1433 ÅS



Bergen

Kjerreidviken 16

Postboks 1425 Oasen

NO-5844 Bergen

FORORD

Denne veilederen er utarbeidet av forskerne Solveig Langsrud, Annette Fagerlund, Trond Møretrø, Even Heir og Birgitte i Moen i prosjektet PathoSeq og er basert på både praktisk kunnskap og forskning. Det er matprodusenter som har ansvar for at maten er trygg, sammen med senere ledd i kjeden som dagligvare, restauranter og forbrukere. PathoSeq er et prosjekt med mål om økt mattrygghet gjennom å avklare potensialet til – og redusere barrierer for – bruk av helgenomsekvensering i matindustrien. Prosjektet er ledet av Annette Fagerlund ved matforskningsinstituttet Nofima og samler en tverrfaglig gruppe av aktører fra akademia, industri og interesseorganisasjoner. PathoSeq er finansiert av Bionærprogrammet i Forskningsrådet (prosjekt nr 294910). Veilederen bygger i tillegg på forskning i Nofimas strategiske program, Future Food Control (Fondet for forskningsavgift på landbruksprodukter, Prosjekt 314743) og tidligere forsknings- og innovasjonsprosjekter (Forskningsmidlene for jordbruk og matindustri (prosjekt 207765) og Fiskeri- og havbruksnæringens forskningsfinansiering (prosjekt 900521)

Vi vil takke våre prosjektpartnere i PathoSeq fra Universitetet i Oslo, University of Veterinary Medicine (Wien, Østerrike), Nortura, Grilstad, Norsk Kylling, Orkla Foods Norge, Kjøtt og Fjørfebransjens Landsforbund (KLF), SinkabergHansen, SalMar, Slakteriet, Sjømat Norge, Eurofins Genomics, og Aquatiq Sense for godt samarbeid.

Referanse til veilederen: Langsrud, S., Fagerlund, A., Møretrø, T., Heir, E. og Moen B. (2023) Veileder: Bruk av helgenomsekvensering for forebygging og kontroll av *Listeria monocytogenes* i matindustrien. Nofima, Ås.

ISBN: 978-82-8296-769-3. DOI: <https://doi.org/10.5281/zenodo.10468595>

For spørsmål kontakt Solveig Langsrud, seniorforsker ved Nofima: solveig.langsrud@nofima.no

INNHold

Forord	1
Oppsummering	3
Hva er sekvensering?	4
Hva forteller genomsekvensen om fare?	5
Hva forteller genomsekvensen om smittekilder og -veier?	8
Bruk av helgenomsekvensering i praksis	11
Fremtiden	14
Vedlegg: Oversikt utbrudd	15
Referanser	20

OPPSUMMERING

Listeria monocytogenes (listeria) er en matbåren sykdomsfremkallende bakterie som først og fremst er knyttet til spiseklare, kjølelagrede matprodukter. Bakterien er et vedvarende problem i matproduksjon, noe som kan forklares ved at 1) Den er utbredt i miljøet og kan komme inn i fabrikken fra råvarer, utstyr og persontrafikk. 2) Den trives godt i produksjonsmiljøet og kan etablere seg på utstyr og smitte produktene. 3) Den kan vokse selv ved kjøletemperatur og i vakuumpakkede produkter og det går ikke an for konsumenter å vite om produktet har listeria ut fra smak eller lukt.

Selv om de fleste matbedrifter av og til kan finne listeria i produksjonsmiljøet eller på produkter, er det store variasjoner. Mens noen sjelden eller aldri finner bakterien, sliter andre med daglige eller ukentlige funn, usikkerhet rundt smitekilder og smitteveier, at de ikke klarer å fjerne listeria fra miljøet eller at de jevnlig får råvarer med listeria. Når listeria blir et vedvarende problem eller man finner listeria på produkter må man finne årsaken for å kunne sette inn riktige tiltak.

Sekvensering av hele genomet til listeria kan brukes som et verktøy både for å finne ut mer om egenskapene til problembakterien og slektskap med andre listeria, noe som kan brukes for å finne smittereservoarer og smitteveier. Blant de metodene som finnes for å karakterisere bakterier, har helgenomsekvensering størst oppløsning og kan også gi standardisert informasjon på tvers av laboratorier. Fremdeles brukes helgenomsekvensering i liten grad av norske matprodusenter, men det finnes gode eksempler på bedrifter som bruker teknologien i risikoanalyse, smittesporing og i opplæringsøyemed¹. Det er imidlertid flere barrierer som må reduseres for å utnytte det fulle potensialet til metoden blant matprodusenter, både når det gjelder kunnskap om listeria, teknologi, kostnader, eierskap og tid før prøvesvar.

Hensikten med denne veilederen er å gjøre det lettere for matprodusenter å vurdere nytteverdien av helgenomsekvensering i sin bedrift. Den skal også være et verktøy for å bruke helgenomsekvensering effektivt i overvåking, problemløsning og opplæring, samt for kommunikasjon med leverandører, kunder og myndigheter.

HVA ER SEKVENSERING?

Helgenomsekvensering er å bestemme rekkefølgen av nukleotidene i arvestoffet (DNA eller genomet), og for listeria betyr dette en bokstavrekke på ca 3 millioner nukleotider. Denne sekvensen, eller deler av den, kan brukes for å finne ut om et bakterieisolat tilhører arten *Listeria monocytogenes* (listeria). Alle bakterier innenfor denne arten har felles egenskaper, som for eksempel at de kan gi sykdom hos mennesker og vokse ved lav temperatur. Arten *Listeria monocytogenes* kan videre grupperes i ulike sekvenstyper (ST) eller klonale grupper (clonal complex, CC) som har mer til felles. For eksempel gir noen sekvenstyper oftere sykdom eller er oftere husstammer i matbedrifter. Sekvenstypen bestemmes utfra sekvensen til sju av de 3000 genene til listeria. I praksis er det likevel mest kostnadseffektivt å gjennomføre sekvensering av hele genomet og deretter trekke ut informasjon om kun de sju relevante genene for å bestemme sekvenstypeⁱⁱ.

Også innenfor samme sekvenstype kan det finnes variasjon, og for å få mer informasjon kan man bruke større deler av sekvensen eller all sekvensinformasjonen. Har man en samling listeria som er sekvensert kan man lage slektstrær (fylogenetiske trær) som viser hvor like isolatene er genetisk. Her må man være oppmerksom på at treet er beregnet ut fra statistiske metoder som gir et sannsynlig slektskap, og ikke helt eksakte forskjellerⁱⁱⁱ. Slegtstrærne baserer seg ofte på en utvidet sekvenstyping der man istedenfor å se på sju gener bruker 1700 gener (kjernegenom MLST; cgMLST) eller alle de 3000 genene (helgenom MLST, wgMLST). Man kan også sammenlikne hele genomsekvensen med en referanse (SNP-analyse). Når man sammenligner nært beslektede bakterieisolater, som kun har få forskjeller som skiller dem fra hverandre, vil helgenom MLST og SNP-analyse gi omlag like gode svar om slektskap.

Hvordan kan genomet si noe om slektskap?

Bakterier formerer seg ved celledeling og i prinsippet har to datterceller helt likt genom som sin mor. Eksakt like bakterier kalles kloner og man oppfatter dem som samme «individ». Over tid vil det imidlertid oppstå mutasjoner i arvestoffet som vil nedarves til dattercellene og videre i flere generasjoner. Hvor raskt dette skjer (mutasjonsraten) vil avhenge av vekstbetingelser. En enkeltmutasjon kalles i faglitteraturen «enkeltnukleotidpolymorfisme» («single nucleotide polymorphism» eller SNP, uttalt *snipp*). Dersom man har to listeria-isolater som skiller seg fra hverandre med bare en eller noen få snipper har man grunn til å tro at de har et felles opphav ikke så langt tilbake i tid.

Myndighetene bruker helgenomsekvensering i forbindelse med utbruddsoppløring. Sekvensen til utbrudds-isolatene sammenliknes med listeria fra matvarer som er en mistenkt smittekilde (for eksempel noe alle pasientene har spist), og finner man samme eller liknende klon vil man være ganske sikker på å ha funnet smittekilden. At man finner listeria av samme undergruppe listeria (i en analyse basert på 7 eller 1700 gener) i både matvaren og en pasient er ikke nok til å konkludere om en sammenheng. Helgenomsekvensering brukes også mye i forskning, for eksempel for å kartlegge variasjon innenfor en art eller for å finne ut hvilke gener som står bak hvilke egenskaper. Metoden har blitt brukt i mange forskningsprosjekter for og med matindustrien for å samle bakgrunnsinformasjonen som er nødvendig for å tolke og bruke sekvensdata.

Helgenomsekvensering brukes av noen matprodusenter, blant annet for å avdekke smittekilder og smitteveier og få informasjon om egenskapene til problembakterien. Helgenomsekvensering kan for eksempel brukes i fareanalysen og i kommunikasjon med kunder og leverandører. Det er imidlertid fremdeles mange barrierer for at metoden benyttes bredt, som pris, analysetid og -kompleksitet, mangel på analysestandard og usikkerhet rundt eierskap til resultater, krav om deling av data og fare for mistolkninger av prøvesvar hos kunder og myndigheter^{iv}.

HVA FORTELLER GENOMSEKVENSEN OM FARE?

I prinsippet er alle *Listeria monocytogenes* sykdomsfremkallende og bør elimineres fra råvarer og produksjonsmiljø for spiseklare produkter. I et risikobasert kvalitetssystem vil det allikevel være slik at funn på produktkontaktflater eller gjentatte funn i samme prøvepunkt utløser sterkere tiltak enn eksempelvis et sporadisk funn i et sluk^v. Helgenomsekvensering muliggjør en mer avansert tilnærming, der bakteriens evne til å gi sykdom eller etablere seg i produksjonsmiljøet tas inn i risikovurderingen.

Som oftest er det mat hvor listeria kan vokse, og dermed kommer opp i høye antall, som forårsaker sykdom: 92% av listeriose-sykdom er forårsaket av mat med minst 2000 listeria-celler per gram^{vi}. For noen produktkategorier hvor listeria tidligere ikke har vært ansett som en fare kan det allikevel være relevant å inkludere høyvirulente varianter av listeria (varianter med høy sykdomsevne) i fareanalysen. Høyvirulente varianter av listeria kan gi sykdom ved lavere antall og utgjøre en risiko også i produkter som ikke tillater vekst av listeria (for eksempel frossenmat).

SYKDOMSEVNE

I fareanalysen skal man vurdere alvorligheten av en mikrobiell kontaminant, noe som innebærer både hvor alvorlig sykdom den gir, antall bakterier man må få i seg for å bli syk, mulig vekst i produktet og forventet bruk av produktet. Det er en økende erkjennelse av at det er store forskjeller i evne til å gi sykdom for ulike *Listeria monocytogenes* – det er faktisk hundre ganger så høy sannsynlighet for å bli syk av en høyvirulent variant som en lavvirulent^{vii}. Forskjellen mellom ulike varianter er like stor som forskjellen i risiko mellom den delen av befolkningen som er over 65 år og den som er under 65 og burde derfor tillegges større vekt enn det gjør i dag.

Selv om det er forskjell innenfor sekvenstyper, kan sekvenstype gi en indikasjon på om et isolat er høyvirulent eller lavvirulent. En viktig del av infeksjonsmekanismen til listeria er å trenge seg inn i vertsceller, og det har vist seg at noen sekvenstyper oftere har endringer i gener som brukes til dette. En undersøkelse av listeria fra norske matbedrifter viste at de aller fleste listeria tilhørende CC9 (ST9), CC121 (ST121) og CC5 (ST5) hadde mutasjoner i genene som koder for proteinet internalin A (også kalt *inlA*), den viktigste kjente virulensfaktoren hos listeria, slik at proteinet ikke blir funksjonelt. Disse isolatene hadde derfor liten evne til å invadere epitelceller. Verdens helseorganisasjon (WHO) har pekt på CC8, CC9 og CC121 som typisk lavvirulente listeria. I Norge er det en situasjon der noen isolater av CC121 har intakt internalin A gen samt at en større andel av personer med listeriose er smittet med CC121 enn i andre land, så det er litt usikkert på om CC121 bør regnes som lav- eller middels virulent. Alle de tretten CC8 isolatene i den norske studien hadde intakt internalin A, noe som viser at man ikke nødvendigvis kan ekstrapolere fra internasjonale funn til nasjonale. Tabell 1 viser en virulensrangering i henhold til rapporten fra WHO^{vii} og i henhold til den norske studien^{viii}.

Tabell 1. Rangering av listeria med hensyn til evne til å gi sykdom ved bruk av WHOs forslag til inndeling. Eksemplene på listeria-typer som typisk hører til i de ulike nivåene er angitt. ^{vii, viii}

	Beskrivelse	Eksempler WHO (CC)	Eksempler, Norge (CC)
Høyvirulent	Evolusjonslinje I & LIPI1/3/4 & full-lengde InlA	1, 3, 4, 5, 6, 54, 87	1, 2, 3, 4, 88, 220
Medium virulent	LIPI1 & full-lengde InlA (ekskl høyvirulent)	37, 54, 155, 204	7, 8, 11, 14, 18, 19, 20, 21, 37, 91, 101, 121, 177, 200, 403, 415
Lavvirulent	Ikke funksjonell InlA	8, 9, 121	5, 9, 121

SMITTEFARE

I fareanalysen inngår også hvor stor risiko det er for at produktet inneholder listeria, herunder en vurdering av prosess og produksjonsmiljø. Det er mye større sannsynlighet for at listeria på en kontaktflate smitter over på produktet enn listeria som er på gulvet eller i et sluk. Videre vil listeria som finnes i produksjonsmiljøet kun en enkelt dag (sporadisk) være et mye mindre problem enn listeria som har etablert seg i produksjonsmiljøet (husstamme) og som kan være en kilde til smitte hver eneste dag. Det er godt kjent at visse typer listeria lettere danner husstammer og derfor er mye mer problematiske å få inn i produksjonsmiljøet enn andre.

Tabell 2 viser sekvenstyper av listeria som har blitt isolert over minst to kalenderår i to eller flere norske kjøtt- og fiskebedrifter^x og hvor slektskapsanalyse viste at det var samme klon tilstede i samme område over tid. Et funn av en slik problem-listeria på råvarer, miljø eller produkt bør vurderes som en større risiko enn en typisk sporadisk listeria. Disse typene (pervasive listeria) har oftere gener assosiert med tilpasning til å leve i matproduksjonsmiljøet, som biofilmdannelse og resistens mot vaske- og desinfeksjonsmidler. I tillegg til disse typene, ble det funnet at listeria ST1, ST5, ST732, ST37, ST91, ST177, ST199, ST249 og ST403 dannet husstammer i enkeltbedrifter. Hvis forholdene er de rette, kan nok enhver listeria kunne etablere seg i produksjonsmiljøet.

Tabell 2. Antall bedrifter med listeria-husstammer og typiske områder hvor listeria har etablert seg.

CC	ST	Antall bedrifter (totalt 15)	Gulv	Sluk	Transportbånd	Sløyemaskin
CC7	ST7	6	3	2	1	
CC8	ST8	4	2	2	1	1
CC9	ST9	3	2	3		
CC14	ST14	2	1	1	2	1
CC19	ST1416	2	1	1		
CC121	ST121	2	2	1	1	1
CC415	ST394	2	2	1		

LISTERIA SOM GIR UTBRUDD

Dersom man ser på hvilke listeria-typer som oftest har gitt sykdom i Norge de siste årene, vil man se at det reflekterer både virulensegenskaper til listeria og hvilke listeria som oftere etablerer seg i produksjonsmiljøet (Tabell 3). Dette støtter at risikoanalysen bør ta hensyn til både forekomst og sykdomsevne.

Også når man ser på internasjonale utbrudd finner man listeria både med høy og lav sykdomsevne (Tabell 4 og Vedlegg). Det er påfallende større problem i Norge enn i utlandet med den lavvirulente, pervasive typen CC121 (ST121). Man vet ikke om dette skyldes spesielle spisevaner eller om vi i Norge har ST121-varianter som er mer virulente.

Ideelt sett burde sekvensinformasjon fra isolater knyttet til pågående utbrudd blitt publisert fortløpende for å gi aktører som matindustri og andre mulighet til å sammenlikne med listeria de finner i matproduksjonsmiljø, råvarer og produkter. Dessverre er myndighetene meget tilbakeholdne med å dele denne informasjonenⁱ.

Tabell 3. De vanligste listeria-typene som har vært knyttet til sykdom i Norge fra 2010-2022 (svart), om de er blitt påvist som pervasive (rødt) eller ikke (grønt). Tabellen indikerer også hvilke typer som er regnet som høyvirulente (rødt), en mellomting (orange) eller er lavvirulente (grønt)

	CC7	CC8	CC121	CC1	CC20	CC87	CC9	CC6	CC14
2010									
2022									
Pervasiv									
Virulens*									

* Ulik fargekode er gitt ved uoverensstemmelse mellom WHO og norske data eller variasjon innen CC.

Tabell 4. Eksempler på listeriaklustere (CC) og sekvenstyper (ST) som har gitt mer enn ett utbrudd.

CC	ST	Antall utbrudd	Kontinent (antall land)	Mat (antall utbrudd)	Syke	Døde
CC6	6	14	Europa (10), Amerika (2), Afrika (1), Australia (1)	Røykelaks (4), Grønnsaker, Ost (2), Kjøtt (7)	1568	276
CC8	8, 1247, 120, 292	10	Europa (4), Amerika (5), Amerika (1)	Kjøtt (2), Laks (5), Laks/Ørret (2), Kjøtt	195	37
CC1	1	7	Europa (2), Amerika (3)	Coleslaw, Karamell-epler, Kjøtt, Ost (4)	715	215
CC5	5	6	Amerika (1)	Ost (4), melon, iskrem	37	4
CC7	7	5	Europa (3), Amerika (2)	Fiskekake, Melon, Kjøtt (2), Ost	>67	>7
CC155	155, 372	4	Europa (3), Amerika (1)	Kjøtt/fisk, Fisk, Smør, Egg	82	11
CC2	2, 290	3	Europa (1), Amerika (1), Amerika (1)	Pate, Ost, Melk	423	15
CC19	802, 378, 398	3	Europa (4), Amerika (1)	Rakfisk, Selleri, Ost	33	8
CC11	11	2	Amerika (1)	Kjøtt, Ost	38	5
CC388	388, 558	2	Europa (1), Amerika (1)	Kjøtt, Ost	235	8
CC554	554	2	Amerika (1)	Ost, spirer	20	3
CC4	4	2	Europa (1), Amerika (1)	Ost, kjøtt	16	5
CC9	9	2	Europa (1), Amerika (1)	Pølser laks	84	17
CC403	403	2	Europa (3)	Ost, laks	33	7
CC101	101	2	Amerika (2)	Ost	43	5
CC121	121	2	Europa (2)	Laks	7	0

HVA FORTELLER GENOMSEKVENSEN OM SMITTEKILDER OG -VEIER?

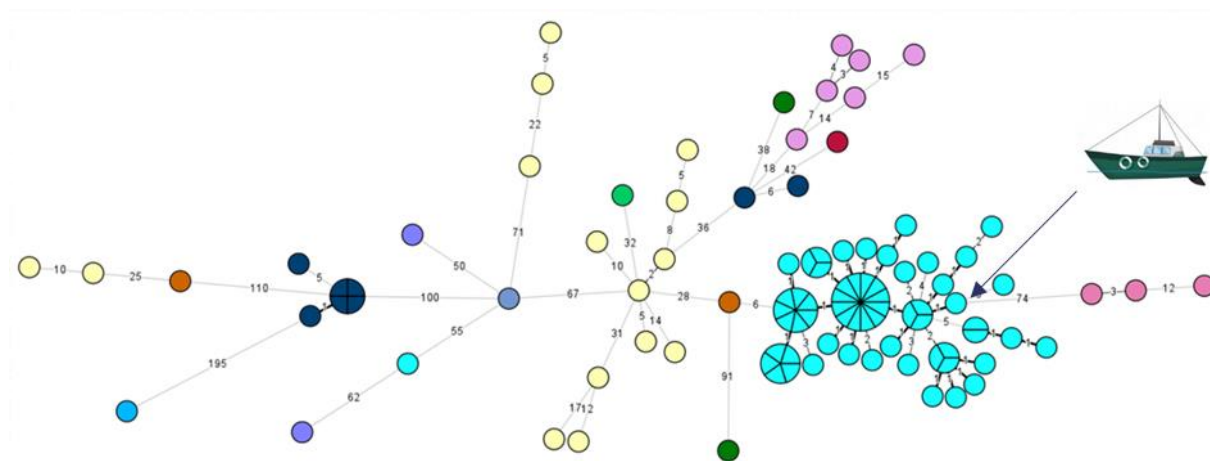
Sekvensering er verdifullt fordi det kan brukes for å si noe om egenskapene til listeria, men en annen styrke er muligheten for å sammenlikne isolater, for eksempel listeria funnet over år i samme bedrift, på tvers og langs ulike verdikjeder fra primærproduksjon til konsument, og mellom land. Helgenomsekvensering egner seg per idag ikke i daglig overvåking fordi det tar for lang tid før prøvesvar, men det er allikevel nyttig å legge opp til sekvensering av listeria som en rutinemessig del av overvåkingsprogrammet eller bruke det i perioder med problemer. Noen eksempler på dette er:

- Finne opprinnelig smittekilde eller smittevei: Undersøke om en sekvenstype på produksjonslinja eller produkt er tidligere funnet i en råvare, hos råvareleverandør eller fra en uren sone i bedriften.
- Avdekke husstammer (listeria som har festet seg, overlevd og formerer seg i dette området): Undersøke om listeria med lik sekvens er funnet flere ganger i samme punkt. Dette kan tyde på et reservoar for klonen i punktet eller i nærheten/oppstrøms på linja.
- Avdekke spredning: Undersøke om listeria-klonen har spredt seg slik at det er flere reservoarer.

Nedenfor kommer noen eksempler fra virkeligheten på hvordan slektskapsanalyser kan brukes for å avklare smittekilder og smitteveier.

RÅVARELEVERANDØR

Noen ganger har bedrifter mistanke om at listeria som har etablert seg som en husstamme eller som de finner på produktene kommer fra en spesiell leverandør. For å kunne påstå dette, kan helgenomsekvensering være til hjelp. Figur 1 viser eksempel på et slektskapstre fra en bedrift som mente at oppblomstring av listeria skjedde etter en spesiell leveranse av laks. I dette eksempelet er alle isolatene (sirklene) i slektskapstreet av samme sekvenstype, men fargene i treet representerer ulike norske fabrikker, hver fabrikk med sin farge. Listeria fra fabrikken det er snakk om er farget turkis og det var tydelig at det hadde etablert seg en husstamme, siden meget nært beslektede listeria ble funnet i samme område over lang tid. Sekvensen til en listeria funnet på brønnbåten som leverte laks ved starten av listeria-problemene var meget lik husstammen. Det er derfor meget sannsynlig at kilden for husstammen var denne brønnbåten og ikke andre leverandører av laks. Båten leverte til flere og kan derfor ha forårsaket problemer hos flere slakterier og foredlingsanlegg.

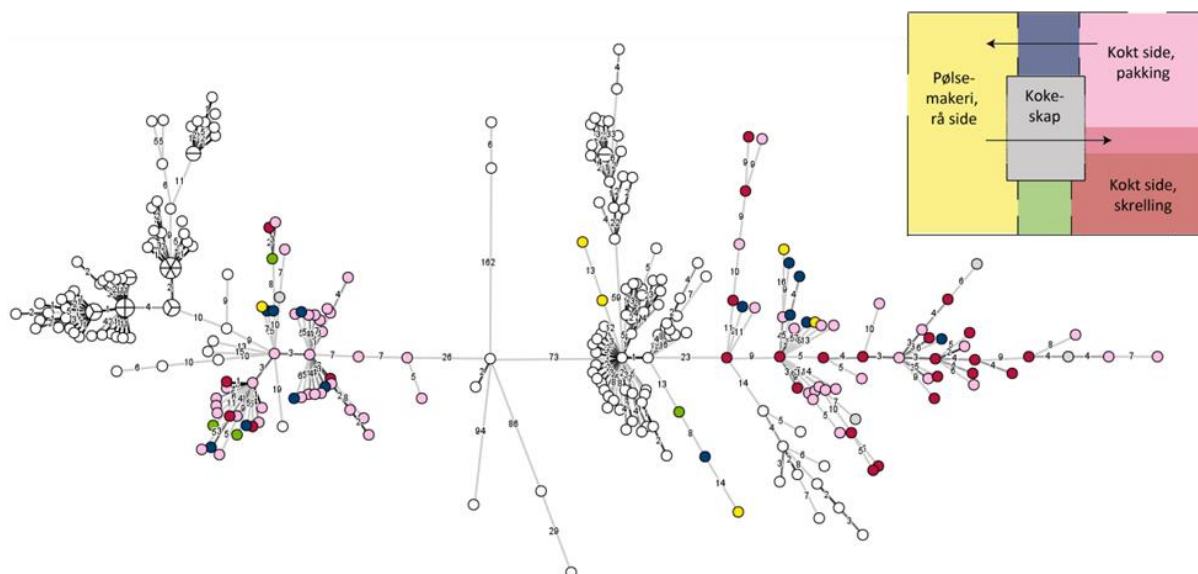


Figur 1. Slektskapstre for listeria fra en bedrift som fikk problemer med en husstamme etter en leveranse av laks for slaktning. Fargene i treet representerer ulike fabrikker, hver fabrikk med sin farge

PÅVISE HUSSTAMME

Dersom man finner listeria i samme prøvepunkt over tid, kan det enten være at man har fått en husstamme eller at listeria kommer ofte inn (for eksempel fra råvarer). Er det en husstamme så må man inn med tiltak som vedlikehold, bytte av deler og/eller renhold av nisjen hvor husstammen lever.

Figur 2 illustrerer hvordan slektskapstrær for påvisning av husstammer kan se ut. Dette eksempelet er en kjøttbedrift som hadde listeria-husstamme i en avdeling for kokt produkt. Hver farget sirkel representerer ett listeria-isolat fra bedriften (rosatoner for avdeling med kokt produkt) og tallene på strekene imellom sirkelene viser antall gener med forskjeller i sekvens mellom isolatene. De hvite sirkelene representerer isolater fra andre norske bedrifter.



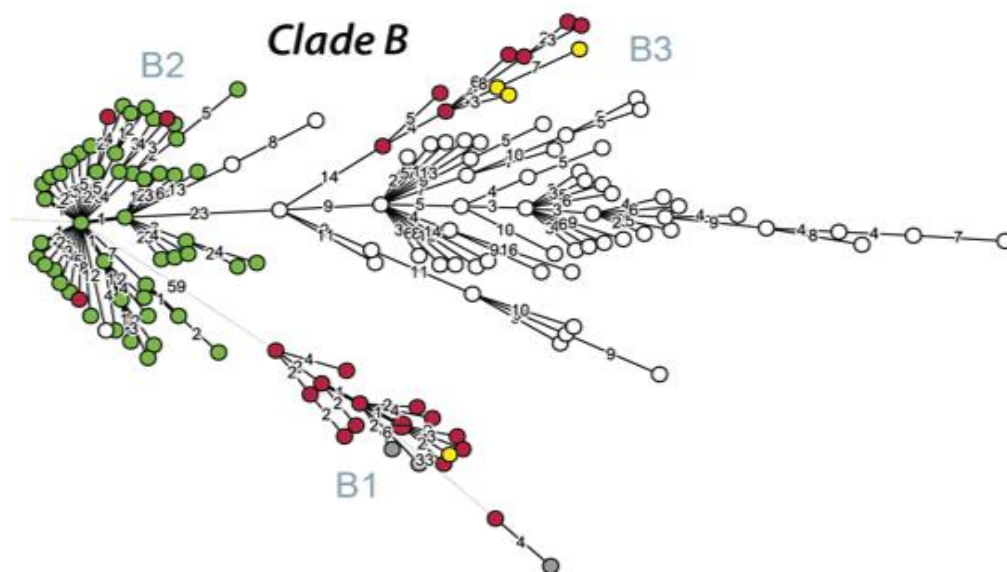
Figur 2. Slektskapstre for listeria-isolater fra kjøttbedrift. Fargekodene viser hvor listeria-isolatet ble funnet. Hvite symboler er listeria-isolater fra andre bedrifter. ^x

Av 99 listeria-isolater fordelt over seks års prøvetaking fra avdelingen med kokte varer var 97 sekvenstype 9 (ST9/CC9). I råvareavdelingen ble det derimot i samme periode funnet flere ulike typer listeria. Så å si alle isolatene fra avdelingen med kokte varer kom fra sluk og gulv, og man fant aldri listeria på kontaktflater. Dette tydet på at listeria hadde etablert seg i sluk og/eller gulv. Ved å se på slektskapet kom det frem at det var to varianter av ST9 i avdelingen, med majoriteten i hver sin del av rommet. Noen av ST9 fra råvareavdelingen (gule) skilte seg ut fra de som var i avdelingen med kokte produkter. Dette, sammen med det at det var en del forskjeller mellom isolatene tydet på at det er en stund siden barrierebrudd. Altså har de ST9-bakteriene som en gang kom inn, vært gjennom mange generasjoner (og dermed rukket å mutere flere ganger). En alternativ forklaring – at det stadig var brudd på soneskille slik at det stadig kommer listeria inn i avdelingen, virker lite sannsynlig når man ser på spredningen av ST9-varianter i kjøttbedrifter og variasjonen i listeria-typer i råvareavdelingen.

NYLIGE BRUDD PÅ HYGIENEARRIERER

Sporadiske funn av listeria i en høyrisikosone kan skyldes brudd på hygienebarrierer fra rå sone eller at det sporadisk spres en husstamme fra et område i høyrisikosonen som ikke prøvetas. Figur 3 illustrerer et eksempel på det første. Sirkler med rød farge er fra avdelingen med kokt produkt, mens de gule og grønne er fra to ulike råvareavdelinger som lå vegg i vegg med høyrisikosonen. Vi ser at det er to grupperinger listeria (B1, B3) fra høyrisikosonen som har meget nære slektninger i den ene råvareavdelingen. Her er det vanskelig å si hvilken vei smitten går, det kan være fra kokt til rå avdeling eller motsatt. Grupperingen (B2) dominerer i den andre råvareavdelingen og man har tre sporadiske funn av meget nære slektninger i høyrisikosonen, altså ser det ut som om det er nylige barrierebrudd.

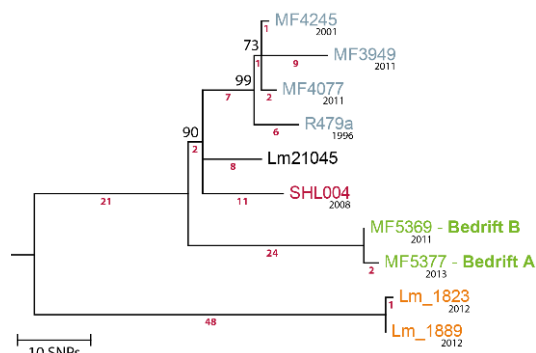
Å oppgradere skillet mellom avdelingene, med skifte av skotøy og klær samt håndvask vil være et godt tiltak i dette tilfellet.



Figur 1. Slektskapstre som viser brudd på barrierer mellom råvareavdelinger (gul, grønn) og avdeling med kokte produkter (rød).^{xi}

BRUKT UTSTYR

Det finnes mange eksempler på at bedrifter har fått listeria-problemer i forbindelse med ombygginger eller endringer i produksjonslinja. I noen tilfeller mistenker man at brukt utstyr kjøpt inn fra en annen fabrikk eller avdeling har brakt inn en ny husstamme. Figur 4 viser et eksempel på at man kunne påvise at en ny husstamme var kommet inn fra brukt utstyr. I dette tilfellet hadde fabrikk (Bedrift A) andre listeria-varianter i sluk over tid, men ikke på produksjonslinja. Ved installering av et transportbånd dukket det opp listeria fra prøver fra linja. Helgenomsekvensering viste at den nye varianten var meget lik et isolat fra samme maskin isolert da den sto i avsenderfabrikken (Bedrift B) noen år tidligere. Det var altså ikke listeria fra sluk som hadde spredt seg til linja. Maskinen ble kastet ut og problemet løst.



Figur 2 Slektskapstre som illustrerer funn av husstamme på brukt utstyr (grønt)^{xi}

BRUK AV HELGENOMSEKVENSERING I PRAKSIS

Dette kapitlet handler om hvordan man i praksis kan bruke helgenomsekvensering i kvalitetsarbeidet. For generell veiledning om overvåking og håndtering av listeria vises det til internasjonale^{xii} og nasjonale^{xiii,xiv} veiledere, samt bransjestandard for kjøttbransjen^v.

Som beskrevet i kapitlene over gir helgenomsekvensering av listeria mange muligheter. I vurdering av omfanget av sekvensering er det mye å ta hensyn til, der analysekostnader, ressurser for å tolke sekvensdata (tid og kompetanse) og risiko må balansere nytteverdi på kort og lang sikt.

Tabell 5 gir et eksempel på hvordan et enkelt prøvetakingsprogram for bevaring av isolater til sekvensering kan settes opp.

Tabell 5. Eksempel på prøvetaking for isolater til helgenomsekvensering.

	Ta vare på isolat	Sekvensere	Ta vare på etter sekvensering
Produkt	Alltid	Alle	Ett isolat per sekvensvariant per år
Råvare*	Alltid	Ett per leverandør per år og 2-3 ved gjentakende funn	Ett isolat per sekvensvariant per år
Produktkontaktflate	Månedlig og ved gjentakende funn	Årlig eller ved gjentakende funn fra samme sted eller produkt	Fem per år og to isolater fra hvert reservoar eller prøvepunkt ved gjentakende funn (første og siste)
Miljøprøve	Månedlig og ved gjentakende funn	Årlig utvalg eller ved mistanke om husstamme	Fem per år og to isolater fra hvert reservoar eller prøvepunkt ved gjentakende funn (første og siste)

* Aktuelt for spiseklare produkter uten eliminering av listeria, som rå laks til sushi

ISOLATER OG SEKVENSIINFORMASJON

BEVARING AV ISOLATER TIL SEKVENSERING

Det finnes ikke noen fasit på hvor mange listeria-prøver man skal ta i overvåkingsprogrammet og hvilke listeria man bør ta vare på. Dette vil være avhengig av produksjonsmengde, produkt (vekstpotensialet for listeria, type konsumenter), tenkt bruk (spiseklar eller ikke), prosess (trinn som dreper listeria, kontaminering etter varmebehandling), produksjonshygiene (soneskiller, varestrømmer, temperaturer, hygienisk design, renhold), kundekrav og ikke minst situasjon (påvisning i produkt eller kontaktflater, mistanke om husstamme eller spredning, tilknytning til utbrudd, kundeklager).

Det kan være hensiktsmessig å ta vare på alle (for bedrifter med få funn) eller et lite utvalg listeria-isolater (dekkende fra ulike punkter og over tid) fra rutineovervåkingen for å kunne bygge opp en stammesamling med historiske isolater og til fareanalyse. Dersom man har mistanke om at renholdet ikke fjerner listeria, eller at man har en husstamme, bør man i en periode ta vare på isolater fra samme prøvepunkt over tid. Samtidig bør man også ta vare på listeria fra andre prøvepunkter i samme periode for å kunne finne ut om listeria-varianten har spredt seg og etablert seg flere steder. Isolater fra produkter og råvarer bør også inkluderes.

HVILKE ISOLATER BØR SEKVENSERES?

Til bruk i fareanalyse bør et representativt utvalg listeria fra rutineovervåking sekvenseres årlig. Ved problemer, for eksempel ved gjentakende funn, bør man sekvensere 3-5 isolater fra samme prøvepunkt/råvare/produkt for å finne slektskap, og videre 3-5 etter innføring av tiltak for å finne ut om man har blitt kvitt problemstammen.

OPPBYGGING AV STAMMESAMLING

Uten de fysiske isolatene er det ikke mulig å undersøke egenskapene deres. Etter sekvensering, kan det derfor være hensiktsmessig å bevare ett representativt isolat for hver sekvensvariant (om flere er isolater med lik sekvens) fra hvert produkt, råvare og produktkontaktflate, samt 1-6 husstammer (antall avhengig av spredning i sekvens, antall reservoarer og hvor lang tid prøvene er tatt over).

Dersom man bruker en ekstern leverandør av analysetjenester eller forskningspartner, er det viktig å forsikre seg om at de har gode systemer for å ta vare på isolatene og at hvert isolat lett kan kobles til mer informasjon i kvalitetssystemet (for eksempel dato, tid, prøvested, produkt, råvare). Eierskap og eventuell videre bruk av isolatet (for eksempel til forskningsformål) bør avklares i en avtale. Merk at noen offentlige laboratorier som tilbyr listeria-analyser forbeholder seg rett til – med mindre annet avtales spesielt – å ta vare på isolater for egen regning og bruke disse senere til andre samfunnsnyttige formål, som kan være for eksempel forskning eller utbruddsetterforskningⁱ.

Listeria-isolater fra Mattilsynets overvåkingskampanjer, kontroller og utbruddsopklaring er i utgangspunktet Mattilsynets eiendom og bedriftene som er prøvetatt har ikke rett til å få tilgang til isolater eller sekvensinformasjonⁱ. Dersom referanselaboratoriet (Veterinærinstituttet eller Havforskningsinstituttet) tar vare på og sekvenserer et isolat på eget initiativ og for egen regning, så vil eierskapet til sekvensinformasjonen antagelig ligge hos demⁱ.

Et problem med å ikke ha tilgang til isolater eller sekvenser ved mistanke om kobling til utbrudd, er at man da ikke kan spore problem-bakterien i egen bedrift. For å kunne ha en mulighet for å følge opp funn fra Mattilsynet i videre internkontroll kan man ta parallelle prøver selv, selv om man da ikke er garantert å finne de samme listeria-klonene som Mattilsynet.

SEKVENSERING OG ANALYSE AV SEKVENSDATA

I praksis er helgenomsekvensering en to-trinns-prosess: 1) laboratorieprosedyre for å fremskaffe sekvensen til et isolat 2) en avansert bioinformatisk prosedyre for å sette sekvensen inn i en eller flere kontekster (bestemme sekvenstype, se på slektskap med andre listeria). Per i dag har de fleste matbedrifter ikke utstyr, programvare eller personer til å foreta selve helgenomsekvenseringen eller den statistiske analysen av sekvensdata selv, og dette gjøres av kommersielle laboratorier eller forskningsmiljøer.

TOLKNING AV SEKVENSDATA

Tolking av sekvensdata for problemløsning kan ikke foregå rent teoretisk, men krever praktisk kunnskap og forståelse både av listeria som bakterie, produksjonslokalenes forfatning, produksjonsrutiner, vare- og personstrømmer, renhold og prosess. Alle i HACCP-gruppen og ledelsen bør som et minimum ha kjennskap til metodens muligheter og begrensninger. I tillegg bør man ha minst en person som kan sette funnene inn i en større kontekst og ha gode dialoger internt, med analyse-leverandører, kunder, leverandører og myndigheter.

RISIKOANALYSE

Informasjon om virulens (sykdomsevne) og evne til å bli husstammer kan legges inn i overvåkings- og kontrollprogrammet for et bedre utgangspunkt for prioriteringer. For eksempel kan det legges inn 100-fold risikoøkning ved funn av listeria som sannsynligvis har, eller som faktisk har forhøyet evne til å gi sykdom, og ved påvisning av de som ofte danner husstammer. Man kan også på en systematisk måte gi ulike poeng for listeria fra kontaktflater sammenliknet med miljø (for eksempel en faktor på 10) eller gjentatte funn av samme listeria-klon (for eksempel med en faktor som sier noe om antall dager den sannsynligvis har vært tilstede i anlegget). Et eksempel på hvordan inkorporere potensielle egenskaper til isolater i en risikovurdering er gitt i Tabell 6.

Tabell 6. Eksempel på hvordan man kan kombinere informasjon om listeria-isolat med funn i renholdsprøver i en risikovurdering.

CC	Sannsynlig egenskap		Sannsynlig smitte			Risiko
	Virulens ¹	Etablering ²	Kontaktflate ³	Miljø ⁴	Gjentatt funn ⁵	
CC1	100	1	-	1	1	100
CC3	100	1	10	1	365	365 000
CC5	1	1	10	-	1	10
CC7	10	10	10	1	1	1 000
CC8	10	10	-	1	1	100
CC9	1	10	-	-	-	0
CC11	10	1	-	1	7	70
CC121	1	10	10	-	10	1000

¹ Høyvirulente har 100 poeng, medium virulente 10 poeng og lavvirulente 1 poeng; ² Typiske pervasive stammer har 10 poeng; ³ Settes som 10 poeng ved funn på kontaktflate; ⁴ settes som 1 poeng ved funn i miljø; ⁵ Angir antall dager fra første til siste gang denne varianten er funnet på samme utstyr/prøvested.

Ved slektskapsanalyser kan man i prinsippet finne ut om listeria-isolater fra egen fabrikk ligner utbruddsisolater. Dessverre publiseres disse sekvensene fra utbrudd kun unntaksvis og da etter lang tid, så per i dag er ikke dette en reell mulighet. Dersom det er mistanke om at din bedrift er knyttet til et utbrudd, kan du ikke regne med å få tilgang til sekvensdata fra utbruddet for å bruke det i egen smittesporing¹.

SMITTESPORING

For å effektivt bruke helgenomsekvensdata bør formålet være satt på forhånd siden det påvirker valg av hvilke isolater som skal sekvenseres, hvilke bioinformatiske analyser som skal gjøres og hvilke konsekvenser ulike utfall vil ha. Det mest banale eksempelet er at dersom man har mistanke om en persistent listeria på et transportbånd velger man ut isolater tatt fra dette båndet over tid og sammenlikner dem. For å koble sekvensinformasjon til egen prosess og produkter finnes det verktøy for visualisering som for eksempel PathoTracker fra Eurofins og BioMap fra Aquatic.

Dersom man vil sette funnene sine i en større kontekst blir det fort mer komplisert å tolke. En kartlegging av listeria i norske fabrikker og i utemiljø har vist at halvparten av isolatene fra de norske matbedriftene er til forveksling lik listeria fra andre norske bedrifter^{vii}. Her kan tolkningen være at det finnes en felles smitekilde, men det kan være usikkert om det er nært eller langt tilbake i tid. Dette vanskeliggjør også kobling av enkeltbedrifter til utbrudd. En likhet i sekvens betyr ikke at smitekilden er funnet dersom funnet ikke er støttet opp av gode epidemiologiske data.

KORRIGERENDE TILTAK

I kvalitetssystemet kan kriterier for når og hvilken type korrigerende tiltak skal settes inn ta hensyn til den informasjonen man får fra helgenomsekvensene. Noen eksempler:

- Tiltak etter første positive funn i miljø eller råvare for høyvirulent stamme, men etter to eller flere påvisninger dersom det er en lavvirulent
- Prioritere bekjempelse av listeria-varianter man vet har en tendens til å etablere seg permanent i produksjonsutstyr
- Endring av renholdsmetoder og midler ved problemer med listeria som er motstandsdyktig mot vaske- eller desinfeksjonsmidler)

Med bruk av sekvensinformasjon kan det være mulig å også verifisere at tiltak har hatt en effekt, ikke bare for å redusere listeria-forekomst generelt, men for å bli kvitt en spesielt problematisk type. For å verifisere at tiltak har ønsket effekt kan det legges inn prosedyrer for ekstra prøvetaking etterfulgt av sekvensering og at problem-bakterien ikke påvises igjen innen en viss tidsperiode.

FREMTIDEN

Det forventes at helgenomsekvensering av listeria vil bli vanligere blant matbedrifter, både på grunn av økte kundekrav og at ulempene blir lavere enn nytteverdien:

Kostnader og tid for prøvesvar: Når flere bruker teknologien forventes også at kostnadene går ned. Teknologisk utvikling vil redusere tiden for laboratorieanalysen og bioinformatikk-trinnet^{xv}, men man vil antageligvis ikke komme under 2-3 døgn fra prøveuttak til svar.

Kompetanse: Når helgenomsekvenseringsanalyser blir en selvfølgelig del av utdanningen innenfor mattrygghet, vil kompetanse hos matbedrifter, teknogileverandører, myndigheter og i forskningsmiljøer bli høyere. Det vil øke nytteverdien av å bruke helgenomsekvensering i overvåking og problemløsning, samt redusere risiko for mistolkninger. Høyere kompetanse kan forbedre kommunikasjon og bidra til større tillit mellom ulike aktører.

Kunnskap: Med en større oversikt over listeria-populasjonene i matkjeden og kunnskap om hvilke tiltak man bør ha mot listeria med persistensegenskaper, vil nytteverdien av helgenomsekvensering bli større. Denne kunnskapen vil også redusere sannsynligheten for at de bedriftene som tar i bruk teknologien først, feilaktig blir pekt ut som kilder for listeria i mat og utbrudd.

Deling av data: Med deling av sekvensinformasjon fra utbrudd og mat, kan helgenomsekvensering bli et viktigere verktøy i matbedriftenes fareanalyse og kvalitetsarbeid. Per i dag finnes bare begrenset og historisk informasjonⁱ, men det er erkjent at åpenhet mellom helsemyndigheter, matmyndigheter, forskere og matprodusenter nasjonalt og internasjonalt ville kunne bedre mattryggheten. Det er derfor grunn til å håpe på større transparens i fremtiden.

Norske matprodusenter ligger i tet i Europa når det gjelder å ta i bruk helgenomsekvensering, men som i andre land er kost-nytteverdi, risiko ved å ligge i front og mistillit til myndighetene viktige hinder for at teknologien skal utnyttes i sitt fulle potensiale. I Østerrike var det et stort listeria-utbrudd som initierte endringer som gjør at man i dag har en omfattende bruk av teknologien, der matprodusenter får sekvensert listeria de finner i egen produksjon gratis, de får innsyn i sekvensinformasjon og rask beskjed om de kan være koblet til et pågående utbruddⁱ. Forhåpentligvis kan vi ligge mer i forkant i Norge og ikke vente på store utbrudd før vi får de nødvendige endringer i praksis.

VEDLEGG: OVERSIKT UTBRUDD

År	Land	Produkt	Kategori	Syke	Døde	CC	ST	Referanse
1992	Frankrike	Kjøtt aspik	Kjøtt	279	85	1		Investigations related to the epidemic strain involved in the French listeriosis outbreak in 1992 Applied and Environmental Microbiology (asm.org)
1985	USA	Ost	Meieri	142	48	1		Listeriosis outbreak associated with Mexican-style cheese--California - PubMed (nih.gov)
1983	Sveits	Ost	Meieri	122	31	1		https://journals.asm.org/doi/10.1128/genomeA.00152-12
2008	Chile	Mykost	Meieri	78	14	1	1	Molecular epidemiology and genetic diversity of Listeria monocytogenes isolates from a wide variety of ready-to-eat foods and their relationship to clinical strains from listeriosis outbreaks in Chile - PMC (nih.gov)
1981	Canada			41	18	1	1	Epidemic Listeriosis — Evidence for Transmission by Food NEJM
1987	Storbritannia	Pate	Kjøtt	366		2	2	A possible outbreak of listeriosis caused by an unusual strain of Listeria monocytogenes - ScienceDirect
1983	USA	Pasteurisert melk	Meieri	49	14	2	290	https://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJM198502143120704
1994	USA	Sjokolade melk	Meieri	45	0	3		An Outbreak of Gastroenteritis and Fever Due to Listeria monocytogenes in Milk NEJM
1999	Frankrike	Rilletter	Kjøtt	10	3	4		Outbreak of Listeria Monocytogenes Serotype 3a Infections from Butter in Finland The Journal of Infectious Diseases Oxford Academic (oup.com)
2014-2015	USA	Iskrem	Meieri	6		5	5	Assessing the genome level diversity of Listeria monocytogenes from contaminated ice cream and environmental samples linked to a listeriosis outbreak in the United States PLOS ONE
2013-2015	Danmark	Røykelaks	Fisk	10	3	6	6	Two listeria outbreaks caused by smoked fish consumption—using whole-genome sequencing for outbreak investigations - ScienceDirect

År	Land	Produkt	Kategori	Syke	Døde	CC	ST	Referanse
2015-2018	Østerrike, Danmark, Sverige, Finland, Storbritannia	Frosne grønnsaker	Grønnsaker og frukt	47	9	6	6	29-11-2017-RRA-Listeria monocytogenes-Austria, Denmark, Finland, Sweden, United Kingdom (europa.eu)
2017-2018	Sør Afrika	Kjøttpålegg	Kjøtt	1060	216	6	6	Outbreak of Listeriosis in South Africa Associated with Processed Meat NEJM
1998	USA	Pølser	Kjøtt	40		6	6	Whole genome comparisons of serotype 4b and 1/2a strains of the food-borne pathogen Listeria monocytogenes reveal new insights into the core genome components of this species Nucleic Acids Research Oxford Academic (oup.com)
1998	USA, Australia, Canada, Frankrike	Pølser	Kjøtt	108	14	6		Listeria Outbreaks Listeria CDC
2002	USA	Kalkunkjøtt	Kjøtt	54	8	6		Multistate Outbreak of Listeriosis Linked to Turkey Deli Meat and Subsequent Changes in US Regulatory Policy Clinical Infectious Diseases Oxford Academic (oup.com)
2017-2019	Nederland, Belgia	Spiseklart kjøtt	Kjøtt	21	3	6	6	Multi-country outbreak of Listeria monocytogenes sequence type 6 infections linked to ready-to-eat products (europa.eu)
2018-2019	Tyskland	Blodpølse	Kjøtt	112	6	6	6	Large Nationwide Outbreak of Invasive Listeriosis Associated with Blood Sausage, Germany, 2018–2019
2016	Sveits	Kjøtt pate	Kjøtt	5		6	6	Local Outbreak of Listeria monocytogenes Serotype 4b Sequence Type 6 Due to Contaminated Meat Pâté - PubMed (nih.gov)
2018	Sveits	Ost	Meieri	34	10	6	6	Listeriosis Caused by Persistence of Listeria monocytogenes Serotype 4b Sequence Type 6 in Cheese Production Environment - PMC (nih.gov)

År	Land	Produkt	Kategori	Syke	Døde	CC	ST	Referanse
2022	Danmark	Fiskekaker	Fisk	11		7	7	Denmark – Outbreak of invasive Listeria infection sequence type 7 in Denmark caused by fish meatballs FoodWorld (kswfoodmicro.com)
2010	USA	Kjøttpålegg	Kjøtt	14		7	7	Outbreak of invasive listeriosis associated with the consumption of hog head cheese--Louisiana, 2010 - PubMed (nih.gov)
2015-2018	Italia	Spiseklart kjøtt	Kjøtt	25	4	7	7	Phylogenetic Analysis and Genome-Wide Association Study Applied to an Italian Listeria monocytogenes Outbreak - PMC (nih.gov)
2007	Norge	Camembert ost	Meieri	17	3	7	7	A large outbreak of Listeria monocytogenes infection with short incubation period in a tertiary care hospital - PubMed (nih.gov)
2014-2019	Danmark, Estland, Finland, Frankrike, Sverige	Kaldrøkt laks og ørret	Fisk	22		8	1247	Multi-country outbreak of Listeria monocytogenes clonal complex 8 infections linked to consumption of cold-smoked fish products (europa.eu)
2015-2018	Danmark, Frankrike, Tyskland	Marinert laks	Fisk	12	4	8	8	Multi-country outbreak of Listeria monocytogenes sequence type 8 infections linked to consumption of salmon products – 25 October 2018 (europa.eu)
2008	Canada	Spiseklart kjøtt	Kjøtt	57	24	8	120, 292	https://bmcgenomics.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2164-11-120
2014-2019	Tyskland	Spiseklart kjøtt	Kjøtt	39	3	8	8	Nationwide outbreak of invasive listeriosis associated with consumption of meat products in health care facilities, Germany, 2014–2019 - ScienceDirect
2012-2016	Tsjekkia	Kjøtt-kalkun	Kjøtt	26	3	8	8	An outbreak of listeriosis linked to turkey meat products in the Czech Republic, 2012–2016 Epidemiology & Infection Cambridge Core
2009	Chile	Pølser	Kjøtt	73	17	9	9	Molecular epidemiology and genetic diversity of Listeria monocytogenes isolates from a wide variety of ready-to-eat foods and their relationship to clinical strains from listeriosis outbreaks in Chile - PMC (nih.gov)

År	Land	Produkt	Kategori	Syke	Døde	CC	ST	Referanse
2000	USA	Spiseklart kjøtt	Kjøtt	30	5	11	11	Multistate Outbreak of Listeria monocytogenes Infection Linked to Delicatessen Turkey Meat Clinical Infectious Diseases Oxford Academic (oup.com)
2009	USA	Ost	Meieri	8		11	11	Multistate Outbreak of Listeria monocytogenes Associated with Mexican-Style Cheese Made from Pasteurized Milk among Pregnant, Hispanic Women Journal of Food Protection (allenpress.com)
2013	Norge	Rakfisk	Fisk	3		19	802	Utbrudd av listeriose i Norge - FHI
2010	USA	Selleri	Grønnsaker og frukt	10	5	19	378	Hospital-acquired listeriosis outbreak caused by contaminated diced celery--Texas, 2010 - PubMed (nih.gov)
2018-2019	Norge	Rakfisk	Fisk	13		20	20	Utbrudd av listeriose i Norge - FHI
2013-2015	Danmark	Røykelaks	Fisk	10	5	89	391	Two listeria outbreaks caused by smoked fish consumption—using whole-genome sequencing for outbreak investigations - ScienceDirect
2012	USA	Ost	Grønnsaker og frukt	22	4	101	101	Multistate outbreak of listeriosis caused by imported cheese and evidence of cross-contamination of other cheeses, USA, 2012 Epidemiology & Infection Cambridge Core
2022	Norge	Røykelaks	Fisk	4		121	121	Røkt laks mistenkt som kilde til utbrudd av listeriose - FHI
2019	USA	Hardkokte egg	Egg	8	1	155	372	Outbreak of Listeria Infections Linked to Hard-boiled Eggs Outbreak of Listeria Infections Linked to Hard-boiled Eggs December 2019 Listeria CDC
2016-2017	Østerrike	Kjøtt og fisk	Kjøtt og Fisk	7		155		Frontiers Whole Genome Sequencing Based Surveillance of L. monocytogenes for Early Detection and Investigations of Listeriosis Outbreaks (frontiersin.org)
1988	Finland	Smør	Meieri	25	6	155	155	Evolutionary Dynamics of the Accessory Genome of Listeria monocytogenes PLOS ONE

År	Land	Produkt	Kategori	Syke	Døde	CC	ST	Referanse
2014	USA	Steinfrukt	Grønnsaker og frukt	2		183	382	Listeria monocytogenes in Stone Fruits Linked to a Multistate Outbreak: Enumeration of Cells and Whole-Genome Sequencing Applied and Environmental Microbiology (asm.org)
2013-2014	Danmark	Rullepølse	Kjøtt	41	17	224	224	Whole-genome Sequencing Used to Investigate a Nationwide Outbreak of Listeriosis Caused by Ready-to-eat Delicatessen Meat, Denmark, 2014 Clinical Infectious Diseases Oxford Academic (oup.com)
2018	Australia	Melon	Grønnsaker og frukt	22		240	240	Listeria monocytogenes in ready-to-eat (RTE) food: attribution, characterization and monitoring: meeting report (who.int)
2019	USA	Kjøtt og Ost	Kjøtt og Meieri	10	1	321	2041	Outbreak of Listeria Infections Linked to Deli-Sliced Meats and Cheeses Outbreak of Listeria Infections Linked to Deli-Sliced Products April 2019 Listeria CDC
2019	Spania	Spiseklart kjøtt	Kjøtt	222	3	388	388	Listeriosis outbreak caused by contaminated stuffed pork, Andalusia, Spain, July to October 2019 - PMC (nih.gov)
2000	USA	Ost	Meieri	13	5	388	558	Outbreak of Listeriosis among Mexican Immigrants as a Result of Consumption of Illicitly Produced Mexican-Style Cheese Clinical Infectious Diseases Oxford Academic (oup.com)
2014	USA	Spirer	Grønnsaker og frukt	5	2	554	554	Wholesome Soy Products, Inc. Sprouts and Investigation of Human Listeriosis Cases (cdc.gov)
2008	USA	Spirer	Grønnsaker og frukt	20	5	573	573	Listeriosis outbreaks and associated food vehicles, United States, 1998-2008 - PubMed (nih.gov)
2014-2015	USA	Karamelliserte epler	Grønnsaker og frukt	35	7	1,183	1, 382	Multistate outbreak of Listeria monocytogenes infections linked to whole apples used in commercially produced, prepackaged caramel apples: United States, 2014–2015 Epidemiology & Infection Cambridge Core
2009-2010	Østerrike, Tyskland, Tsjekkia	Ost	Meieri	14	4	19,403	398,403	Genome Sequencing of Listeria monocytogenes “Quargel” Listeriosis Outbreak Strains Reveals Two Different Strains with Distinct In Vitro Virulence Potential PLOS ONE

REFERANSER

- ⁱ **Hunsbedt, C., Bygrave, L. A., Fagerlund, A. and Langsrud** (2024), Legal Regulation of Whole Genome Sequencing of *Listeria monocytogenes* in the Food Industry: Challenges, Attitudes, Possibilities (January 5, 2024). PathoSeq Project Report, WP5, University of Oslo Faculty of Law Research Paper No. 2024-01, Available at SSRN: <https://ssrn.com/abstract=4685010>
- ⁱⁱ <https://bigsdbs.pasteur.fr/listeria/> eller <https://cge.food.dtu.dk/services/MLST/>
- ⁱⁱⁱ **Baert, L., McClure, P., Winkler, A., Karn, J., Bouwknegt, M., Klijn, A.** (2021) Guidance document on the use of genome sequencing (WGS) for source tracking from a food industry perspective. *Food Control* 130: 108148 <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2021.108148>
- ^{iv} **Amezquita, A., Barretto, C., Winkler, A., Baert, L., Jagadeesan, B., Akins-Lewenthal, D., Klijn, A.** (2020) The benefits and barriers of whole genome sequencing for pathogen source tracking: A food industry perspective *Food safety Magazine* June/July: 42-47 <https://www.food-safety.com/articles/6696-the-benefits-and-barriers-of-whole-genome-sequencing-for-pathogen-source-tracking-a-food-industry-perspective>
- ^v **Anon.** Den norske kjøttbransjes retningslinje for *Listeria monocytogenes* i spiseklare produkter. (2021) <https://www.animalia.no/contentassets/00d0a722ba6945059187403a5e83c017/2021-08-09-den-norske-kjottbransjes-retningslinje-for-listeria-monocytogenes-i-spiseklare-produkter.pdf>
- ^{vi} **EFSA BIOHAZ Panel (EFSA Panel on Biological Hazards), Ricci A., Allende A., Bolton, D. Chemaly, M., et al.** (2018) Scientific Opinion on the *Listeria monocytogenes* contamination of ready-to-eat foods and the risk for human health in the EU. *EFSA Journal* 16(1): 5134, 173 pp. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2018.5134>
- ^{vii} **WHO & FAO** (2022) *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods: attribution, characterization and monitoring – meeting report. Microbiological Risk Assessment Series no 38, Rome <https://doi.org/10.4060/cc2400en>
- ^{viii} **Wagner, E., Fagerlund, A., Thalgut, S., Rusås Jensen, M., Heir, E., Møretrø, T., Moen, B., Langsrud, S., Rychli, K.** (2022) Deciphering the virulence potential of *Listeria monocytogenes* in the Norwegian meat and salmon processing industry by combining whole genome sequencing and in vitro data. *Int J Food Micro* 383: 109962 <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2022.109962>
- ^{ix} **Fagerlund, A., Wagner, E., Møretrø, T., Heir, E., Moen, B., Rychli, K., Langsrud, S.** (2022). Pervasive *Listeria monocytogenes* is common in the Norwegian food system and is associated with increased prevalence of stress survival and resistance determinants. *Appl Environ Microbiol* 88: e00861-22 <https://journals.asm.org/doi/10.1128/aem.00861-22>
- ^x **Fagerlund, A., Langsrud, S., Møretrø, T.** (2020) In-depth longitudinal study of *Listeria monocytogenes* ST9 isolates from the meat processing industry: resolving diversity and transmission patterns using whole-genome sequencing. *Appl Environ Microbiol* 86(14): e00579-20 <https://doi.org/10.1128/aem.00579-20>
- ^{xi} **Fagerlund, A., Langsrud, S., Schirmer, B.C.T., Møretrø, T., Heir, E.** (2016) Genome analysis of *Listeria monocytogenes* Sequence Type 8 strains persisting in salmon and poultry processing environments and comparison with related strains. *PloS ONE* 11(3): e0151117 <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0151117>
- ^{xii} **Anon.** Guidelines on the Application of General Principles of Food Hygiene to the Control of *Listeria monocytogenes* in Foods. CAC/GL 61 – 2007. <https://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/codex-texts/guidelines/en/>
- ^{xiii} **Langsrud, S., Møretrø, T., Heir, E.** (2016) Veileder - Problemløsning og forebygging av *Listeria* i avdelinger som håndterer uemballerte, varmebehandlede kjøttprodukter. <http://hdl.handle.net/11250/2382045>
- ^{xiv} **Heir, E., Langsrud, S., Hagtvedt, T.** (2015) Veiledning for forebygging, overvåking og fjerning av listeria i laksenæringen. FHF prosjekt # 900521 <https://www.fhf.no/prosjekter/prosjektbasen/900521>
- ^{xv} **Moen, B., Langsrud, S., Fagerlund, A.** (2023) Metoder for påvisning av *Listeria* i mat og produksjonsmiljø. Rapport nr 18/2023 <https://hdl.handle.net/11250/3087288>