

Metoder for påvisning av *Listeria* i mat og produksjonsmiljø

Faglig sluttrapport



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 Johnsensgate 4

Postboks 8034

NO-4068 Stavanger



Sunndalsøra

Sjølsengvegen 22

NO-6600 Sunndalsøra



Ås

Osloveien 1

Postboks 210

NO-1433 ÅS



Bergen

Kjerreidviken 16

Postboks 1425 Oasen

NO-5844 Bergen

Rapport

<i>Rapportnummer:</i> 20/2024	<i>ISBN:</i> 978-82-8296-791-4	<i>ISSN:</i>
<i>Dato:</i> 21. juli 2023	<i>Antall sider + sider vedlegg:</i> 20 + 7	<i>Prosjektnummer:</i> 13991
<i>Tittel:</i> Metoder for påvisning av Listeria i mat og produksjonsmiljø – Faglig sluttrapport		
<i>Title:</i> Methods for Listeria detection in food and food processing environment – Final report		
<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> Dagens referansemetode for påvisning av <i>Listeria monocytogenes</i> tar minimum to dager før man får et endelig svar. Dette reduserer mulighetene for å gjøre risikoreduerende tiltak. Prosjektet har kartlagt dagens kommersielle metoder og gitt en oversikt over nye teknologier og metoder for å vurdere om det er teknologisk mulig å få påvisningstiden ned til 20-30 minutter. Dagens raskeste validerte metode (real-time PCR) tar 20 timer hvorav 90% av tiden er oppformeringstrinnet og 10% er påvisningstrinnet. Dersom teknologiske barrierer overkommes og markedet etterspør det, kan det i framtiden være mulig å komme ned på en analysetid på 8-10 timer. Dette vil bety at en stor andel laks- og ørretbedrifter kan varsle renholdere før neste renhold og holde tilbake produkter før de når markedet. Det kan være mulig å utvikle metodikk med kortere tid før analysesvar, i beste fall ned mot 30 minutter, men den vil være mindre sensitiv enn regelverket krever. Denne typen tester vil likevel kunne være et nyttig tillegg til ISO-validerte metoder. Nye metoder bør i tillegg til hurtighet fokusere på å skille mellom levende og døde bakterier, samt gi mer enn bare et positivt eller negativt svar, dvs. genotyping.		
<i>English summary/recommendation:</i> The current reference method for detecting <i>Listeria monocytogenes</i> takes a minimum of two days before providing a final result. This reduces the opportunities for implementing risk-reducing measures. The project has assessed current commercial methods and provided an overview of new technologies and approaches to evaluate whether it is technologically feasible to reduce detection time to 20-30 minutes. The fastest validated method today (real-time PCR) takes 20 hours, with 90% of the time spent on amplification and 10% on detection. If technological barriers are overcome and there is market demand, it may be possible in the future to achieve an analysis time of 8-10 hours. This would allow a significant number of salmon and trout companies to notify cleaners before the next cleaning cycle and hold back products before they reach the market. It might be feasible to develop a methodology with shorter turnaround time, potentially as low as 30 minutes, although it would be less sensitive than regulatory requirements. Nevertheless, such tests could be a useful addition to ISO-validated methods. New approaches should also focus on distinguishing between live and dead bacteria and providing more than just a positive or negative result, i.e., genotyping.		

Innhold

1	Sammendrag	2
2	Innledning	4
2.1	Bakgrunn og målsetning	4
2.2	Prosjektets omfang	4
2.3	Prosjektorganisering	4
3	Problemstilling og formål	5
4	Prosjektgjennomføring	5
5	Resultater	6
5.1	Hurtigmetoder på markedet	6
5.1.1	Validerte metoder	6
5.1.2	Ikke-validerte metoder	6
5.1.3	Påvisning av alle typer <i>Listeria</i>	7
5.2	Fremtidens metoder	7
5.2.1	Regelverk og fysiske lover begrenser hastigheten på metoden	9
5.2.2	Hvor rask må en hurtigmetode være?	9
5.3	Genotyping	10
5.3.1	Populasjonsstruktur og genetikkk hos <i>L. monocytogenes</i>	10
5.3.2	Prinsipper for genotypingsmetoder	10
5.3.3	Sekvenserings-baserte metoder inkludert MLST og WGS	11
5.3.4	PFGE og MLVA er basert på variasjon i fragment-lengder	11
5.3.5	GENE-UP Typer fra bioMérieux	12
6	Diskusjon og konklusjon	13
7	Hovedfunn	14
8	Leveranser	14
9	Vedlegg	15
	Vedlegg 1: Validerte kommersielle testsett for påvisning av <i>L. monocytogenes</i>^a	16
	Vedlegg 2: Kommersielle testsett uten ISO 16140-2 validering for påvisning av <i>L. monocytogenes</i>^a	19
	Vedlegg 3: Kommersielle testsett for <i>Listeria</i> spp.^a	21
10	Referanser	23

1 Sammendrag

Norsk sammendrag:

Næringsmiddelhygieneforskriften pålegger alle produsenter av spiseklar mat hvor *Listeria monocytogenes* (listeria) er en fare å gjøre listeria-analyser av produkter, produksjonsmiljø og prosessutstyr. Det er påkrevd å bruke referansemetoden for påvisning av listeria fra den internasjonale organisasjonen for standardisering (ISO 11290-1), eller en alternativ metode som er ISO-validert som like god som referansemetoden. Ulempen med dagens referansemetode er at det tar minimum to dager til man får et endelig svar. Dette reduserer mulighetene for å gjøre risikoreduserende tiltak, som for eksempel tilbaketrekking før produkter når markedet, eller rengjøring for å fjerne listeria fra prosessutstyr. Prosjektet har hatt som mål å kartlegge dagens kommersielle metoder og få en oversikt over nye teknologier og metoder for å vurdere om det er teknologisk mulig å få påvisningstiden ned til 20-30 minutter.

Resultatene fra prosjektet er i hovedsak publisert i tre rapporter i rapportserien «Metoder for påvisning av Listeria i mat og produksjonsmiljø»; Delrapport 1: Hurtigmetoder på markedet, Delrapport 2: Nye metoder og teknologier og Delrapport 3: Genotypingsmetoder. I utarbeidelsen av rapportene har det blitt gjennomført en markedsundersøkelse, intervjuet et utvalg analyseleverandører, gjennomført en spørreundersøkelse for bransjen og gjort en omfattende litteraturundersøkelse for å kartlegge nye metoder og teknologier, samt oppsummert ulike genotypingsmetoder og gjort en digital analyse av helgenomsekvenser for å vurdere bioMérieux sin Gene-UP Typer.

Hovedleveransen i prosjektet har vært å gi en oversikt over dagens og fremtidige hurtigmetoder og prinsippene bak. Raskeste validerte metode (real-time PCR) tar 20 timer hvorav 90% av tiden er oppformeringstrinnet og 10% er påvisningstrinnet. Dersom teknologiske barrierer overkommes og markedet etterspør det, kan det i framtiden være mulig å komme ned på en analysetid på 8-10 timer. Dette vil bety at en stor andel laks- og ørretbedrifter kan varsle renholdere før neste renhold og holde tilbake produkter før de når markedet.

Det kan være mulig å utvikle metodikk med kortere tid før analysesvar, i beste fall ned mot 30 minutter, men den vil være mindre sensitiv enn regelverket krever. Denne typen tester vil likevel kunne være et nyttig tillegg til ISO-validerte metoder. Nye metoder bør i tillegg til hurtighet fokusere på å skille mellom levende og døde bakterier, samt gi mer enn bare et positivt eller negativt svar, dvs. genotyping. Dagens typingsmetoder (MLST, CC, GENE-UP Typer) er for grovmaskede til å avdekke sannsynlige smittekilder, smittespredning og egenskaper til listeria, men kan gi raskere svar og enklere databearbeiding. De egner seg derfor som et utgangspunkt for valg av isolater til helgenomsekvensering, å kunne avkrefte en smittekilde/smittevei, vurdere risiko og gir tidlige indikasjoner på etablering og eliminering av husstammer.

Det kan konkluderes med at med dagens regelverk, teknologi og fysiske lover er det ikke være mulig å utvikle en hurtigmetode som tar 20-30 minutter. Det er derimot realistisk at man gjennom forskning og utvikling kan etablere en metode som forkorter dagens raskeste analysetid på 20 timer ned til 8-10 timer. Setter man lavere krav til sensitivitet enn det regelverket krever, kan man komme ned imot 30 minutter.

English summary

All manufacturers of ready-to-eat food where *Listeria monocytogenes* (listeria) poses a risk are required to conduct listeria analyses of products, production environments, and process equipment. It is mandatory to use the reference method for detecting listeria from the International Organization for Standardization (ISO 11290-1), or an alternative method that is ISO-validated and equally effective as the reference method. The drawback of the current reference method is that it takes a minimum of two days to obtain a final result. This reduces the opportunities for risk-reducing actions, such as product recall before reaching the market or cleaning to remove listeria from process equipment.

The project aimed to assess existing commercial methods and explore new technologies and approaches to determine if it is technologically feasible to reduce detection time to 20-30 minutes. The project's results are primarily published in three reports in the series 'Methods for Detecting Listeria in Food and Production Environments': Sub-report 1: Rapid methods on the market, Sub-report 2: New methods and technologies, and Sub-report 3: Genotyping. The reports were developed through market research, interviews with selected analytical vendors, industry surveys, and extensive literature reviews to identify new methods and technologies. Additionally, various genotyping methods were summarized, and a digital analysis of whole-genome sequences was conducted to evaluate bioMérieux's Gene-UP Typer.

The main deliverable of the project was to provide an overview of current and future rapid methods and their underlying principles. The fastest validated method (real-time PCR) takes 20 hours, with 90% of the time spent on amplification and 10% on detection. Given current regulations and technology, developing a method that takes 20-30 minutes is not feasible. However, if technological barriers are overcome and the market demands it, achieving an analysis time of 8-10 hours may be possible in the future. This would allow a significant number of salmon and trout producers to notify cleaners before the next cleaning cycle and withhold products before they reach the market.

There is still room for the development of faster methods, potentially down to 30 minutes, although these would be less sensitive than required by regulations. Such tests could still complement ISO-validated methods. New methods should also focus on distinguishing between live and dead bacteria and provide more than just a positive or negative result (i.e., genotyping). Current typing methods (MLST, CC, GENE-UP Typer) are too coarse to identify likely sources of contamination, transmission routes, and listeria properties but can offer quicker responses and simpler data processing. They serve as a starting point for selecting isolates for whole-genome sequencing, confirming sources of infection, assessing risk, and providing early indications of establishment and elimination of strains.

It can be concluded that with today's regulations, technology, and physical laws, it is not possible to develop a quick method that takes 20-30 minutes. However, it is realistic that through research and development, a method can be established that shortens the current fastest analysis time from 20 hours down to 8-10 hours. If one sets lower sensitivity requirements than what the regulations demand, it's possible to achieve results in as little as 30 minutes.

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.

EUs forordning No 2073/2005 [1], gjennomført i Næringsmiddelhygieneforskriften [2] 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.

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 risikoreducerende 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.

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.

Prosjektet (FHF 901822) «**Utvikling av hurtigtest for påvisning av listeria i havbruksnæringen: Et mulighetsstudium**» har hatt som mål å kartlegge dagens kommersielle metoder og få en oversikt over nye teknologier og metoder for å vurdere om det er teknologisk mulig å få påvisningstiden ned til 20-30 minutter.

I prosjektet er det utarbeidet tre rapporter som skal hjelpe næringen med å få oversikt over kommersielle metoder på markedet (Delrapport 1 [3]), nye metoder og teknologier (Delrapport 2 [4]), samt en oversikt over ulike metoder for genotyping (Delrapport 3 [5]).

2.2 Prosjektets omfang

Prosjektet er gjennomført i perioden 2023-2024 med Nofima som ansvarlig forskningsinstitusjon. Prosjektet har blitt gjennomført med finansiering av Fiskeri- og havbruksnæringens forskningsfinansiering (FHF; totalramme på 1 999 000 NOK) og i god kontakt med næringen. Denne sluttrapporten beskriver i hovedsak resultater fra tre rapporter levert i prosjektet.

2.3 Prosjektorganisering

Prosjektgruppen har bestått av Birgitte Moen (prosjektleder), Solveig Langsrud og Annette Fagerlund ved Nofima. Styringsgruppen har bestått av Elisabeth Hassel Kjørnvik (Lerøy) og Randi Haldorsen (Mowi). Lars R. Lovund har vært observatør og fulgt opp prosjektet fra FHF.

3 Problemstilling og formål

Næringsmiddelhygieneforskriften pålegger alle produsenter av spiseklar mat hvor *Listeria monocytogenes* (listeria) er en fare å gjøre listeria-analyser av produkter, produksjonsmiljø og prosessutstyr. Det er påkrevd å bruke referansemetoden for påvisning av listeria fra den internasjonale organisasjonen for standardisering (ISO 11290-1), eller en alternativ metode som er ISO-validert som like god som referansemetoden. 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.

Ulempen med dagens referansemetode er at det tar minimum to dager til man får et endelig svar. Dette reduserer mulighetene for å gjøre risikoreduserende tiltak, som for eksempel tilbaketrekking før produkter når markedet, eller rengjøring for å fjerne listeria fra prosessutstyr.

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 fortynde prøven og ha et oppformeringstrinn for å kunne sikre at listeria er til stede i dette lille prøvevolumet. 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 kopiere opp DNA eller RNA fra det lille prøvevolumet man skal analysere før man påviser listeria.

Hurtigmetoder som enten korter ned på oppformeringstrinnet, påvisningstrinnet, eller begge deler, vil derfor kunne øke mattryggheten. I prosjektet har Nofima kartlagt hvilke metoder som finnes på markedet (Delrapport 1), kartlagt næringens behov, og vurdert mulighetene for å utvikle en raskere teknologi for å påvise listeria (Delrapport 2). I tillegg til raskere og mer presise metoder eller tester for påvisning av listeria er det økende interesse for metoder som kan gi mer informasjon i tillegg til et positivt eller negativt resultat. Noen bedrifter har begynt å bruke helgenomsekvensering, men dette er fremdeles tidkrevende og ofte også for komplisert og kostbart for mange matproduksjonsbedrifter. Vi har derfor også sett på ulike typer for genotyping og gjort en digital analyse av et datasett bestående av norske listeria-isolater med bioMérieux's GENE-UP Typer (Delrapport 3).

4 Prosjektgjennomføring

Resultatene fra prosjektet er i hovedsak publisert i tre rapporter som beskrevet over. Det er i tillegg utarbeidet en prosjektnettide på Nofima.no ([Utvikling av hurtigtest for påvisning av listeria i havbruksnæringen: Et mulighetsstudium | Nofima](#)), utarbeidet et faktaark og en populærvitenskapelig artikkel, samt holdt innlegg i ulike fagforum. Formidlingen har vært rettet mot ulike målgrupper inkludert laksenæringen og andre aktører i mat og sjømatnæringen samt academia. Resultatene fra hele prosjektet er oppsummert i denne sluttrapporten.

I utarbeidelsen av de tre rapportene så har Nofima:

- Gjennomført en markedsundersøkelse for å kartlegge dagens metoder samt intervjuet et utvalg analyseleverandører.
- Gjennomført en spørreundersøkelse for bransjen og gjort en omfattende litteraturundersøkelse for å kartlegge nye metoder og teknologier.
- Oppsummert ulike genotypingsmetoder og gjort en digital analyse av helgenomsekvenser for å vurdere bioMérieux sin Gene-UP Typer.

Prosjektgruppen har hatt jevnlig møter og kontakt med referansegruppen og observatør fra FHF og justert noen målsetninger underveis basert på resultater og for å bedre imøtekomme industriens behov for kunnskap.

5 Resultater

Resultatene i prosjektet er oppsummert i tre rapporter i serien «Metoder for påvisning av *Listeria* i mat og produksjonsmiljø»:

Delrapport 1: Hurtigmetoder på markedet

Delrapport 2: Nye metoder og teknologier

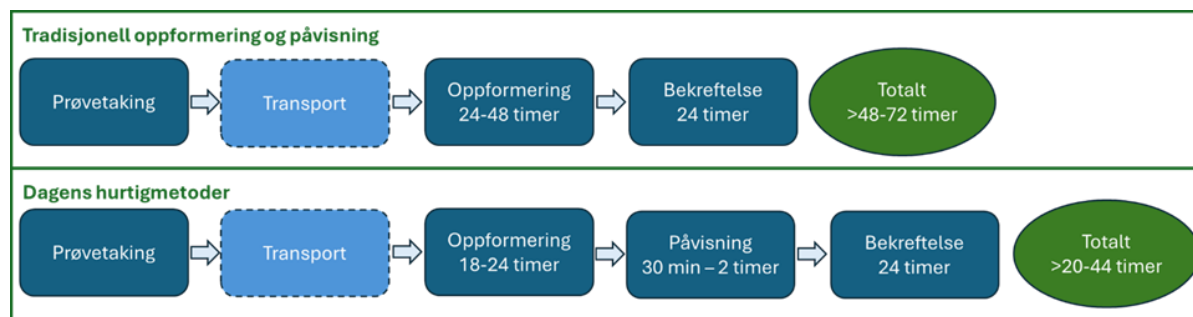
Delrapport 3: Genotypingsmetoder

Alle rapportene kan lastes ned fra FHF sin prosjektdatabase [6], eller fra prosjektets nettside [7]. Under følger en oppsummering av disse rapportene, men for flere detaljer henvises det til den enkelte rapport.

5.1 Hurtigmetoder på markedet

5.1.1 Validerte metoder

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 PCR¹. 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. Figur 1 viser en skjematisk presentasjon av tradisjonell oppformering og prøvetaking sammenlignet med dagens hurtigmetode (for eksempel real-time PCR). En oversikt over 17 validerte metoder på markedet finnes i Vedlegg 1.



Figur 1. Skjematisk presentasjon av tradisjonell oppformering og prøvetaking sammenlignet med dagens hurtigmetode (f.eks. real-time PCR). Tidligste positive svar for tradisjonell dyrkning er 48 timer, mens tidligste negative svar er 72 timer. For real-time PCR er raskeste negative- og presumptivt positivt svar 20 timer, mens endelig bekreftelse på positivt svar er tidligst 44 timer.

5.1.2 Ikke-validerte metoder

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 kan påvise listeria (presumptivt) i renholdsprøver etter 6-8 timer. Dessverre er protokollen komplisert og omfattende, så den krever mye arbeidsressurser og et trent laboratoriepersonell. En oversikt over 12 kommersielle metoder er gitt i Vedlegg 2.

¹ Real-time PCR er en syklisk kopiering av spesifikke DNA områder i målbakterien, i sanntid, slik at de kan påvises.

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).

5.1.3 Påvisning av alle typer *Listeria*

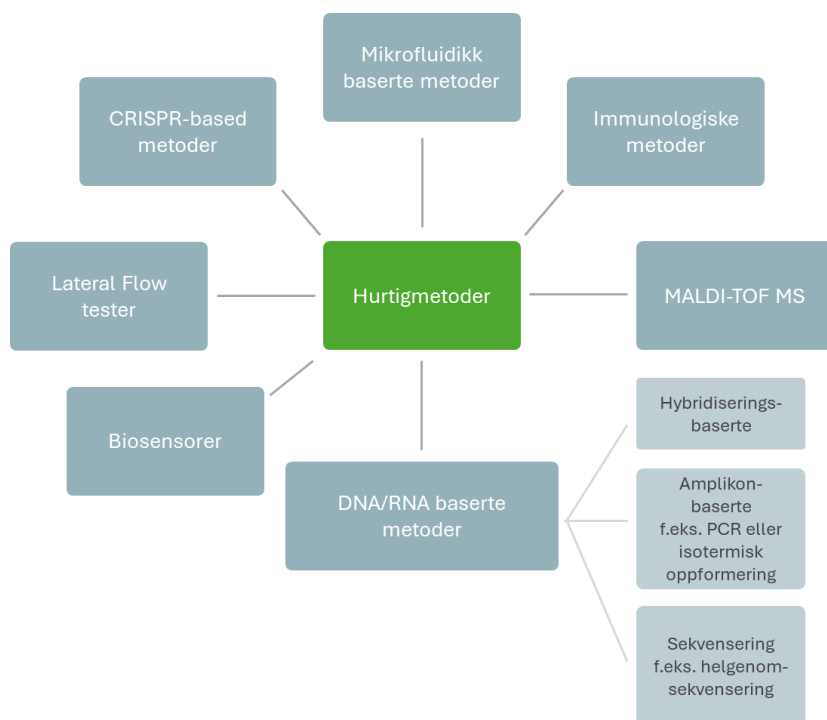
Et alternativ til å påvise *L. monocytogenes* er å velge en metode som påviser alle typer *Listeria*. Den raskeste testen på markedet, ANSR Listeria Right Now fra Neogen har en enkel prøvepreparering og man får svar etter 1 time. Metoden egner seg kun for renholdsprøver. For matprøver vil analysertiden være minimum 24 timer. Det kom fram fra bransje-spørreundersøkelsen at det er delte meninger om nytteverdien for en slik test. Under nytteverdi ble det nevnt at det kunne benyttes for å: 1) kontrollere kvaliteten på renholdet; 2) kontrollere råvarer for å kunne allokere råvaren til annen produksjon; 3) gi en pekepinn på hva som er til stede og at man antar at *L. monocytogenes* kan ligge i bakgrunnen. Det ble også nevnt at kunder i EU har begynt å se på dette (UK/Frankrike), spesielt de som kjøper røkelaks, men at det er få laboratorier i Norge som tilbyr akkreditert metode for annet enn *L. monocytogenes*. Den største ulempen vil være at en mulig positiv test vil føre til en unødvendig tilbaketrekking som vil kunne få store konsekvenser med tanke på kostnader, omdømme og ikke minst uro i markedet.

Ifølge en rapport fra FAO og WHO [8] tester ofte matbedrifter for *Listeria* spp. i stedet for *L. monocytogenes* siden det kan gi raskere svar og er mer kostnadseffektivt. Analysen kan gi svar på om bedriften har betingelser som mest sannsynlig kan støtte overlevelse og vekst av *L. monocytogenes* dersom den er kommet inn. *Listeria* spp. brukes i denne sammenhengen som en indikator på hygiene og kontroll av vask og desinfeksjon. Ifølge rapporten kan det være godt samsvar mellom tilstedeværelse av *Listeria* spp. og *L. monocytogenes* i noen typer matprosesseringsanlegg, men ikke alle. Det er blant annet vist at tilstedeværelsen mellom *Listeria* spp. ikke var en god indikator for *L. monocytogenes* i sjømat foredlingsanlegg [9]. En oversikt over 12 kommersielle *Listeria* spp. metoder er gitt i Vedlegg 3.

5.2 Fremtidens metoder

I de siste årene har det dukket opp flere nye metoder, som for eksempel biosensorer, sekvenseringsbaserte metoder (som helgenomsekvensering; WGS) og metoder basert på CRISPR/Cas². Mange av disse nye metodene er lovende, men de krever videreutvikling og kommersialisering før de kan benyttes i rutinearbeid. Figur 2 viser en oversikt over en del metoder for rask påvisning og identifikasjon av bakterier. Hver av disse metodene gir unike fordeler i sensitivitet, spesifisitet og hurtighet.

² CRISPR/Cas er et system hos bakterier som kan gjenkjenne og bryte ned fremmed genetisk materiale fra virus (dvs. bakteriofager) – altså en beskyttelsesmekanisme.



Figur 2. Oversikt over et utvalg av metoder og teknologier for hurtig påvisning og identifisering av bakterier. Flere metoder benytter kombinasjoner av ulike teknologier, f.eks. benyttes ofte oppformering av DNA for å øke sensitiviteten i biosensorer, CRISPR-baserte og mikrofluidikk systemer. MALLDI-TOF MS er primært en metode for identifikasjon av isolater og således ikke en hurtig påvisningsmetode. Helgenomsekvensering brukes også primært til karakterisering av listeria isolater.

Biosensorer er enheter som kombinerer biologisk gjenkjennelse med en transduser, som oversetter et biologisk signal til et målbart signal. Klassifiseringen av biosensorer er basert på det biologiske gjenkjennelementet, som kan være antistoffer, enzymer, celler, DNA, eller bakteriofager³, og på typen transduser, som kan være optisk, elektrokjemisk eller massebasert. Generelt sett har biosensorer høy spesifisitet og muliggjør påvisning i sanntid. De har flere fordeler som gjør dem attraktive i matindustrien, inkludert at de er bærbare, gir raske resultater og er mulig å gjenbruke. Imidlertid er det noen ulemper, som at de er relativt kostbare og påvirkes av matprøven. Det pågår forskning for å forbedre sensitiviteten, spesifisiteten og brukervennligheten til biosensorer.

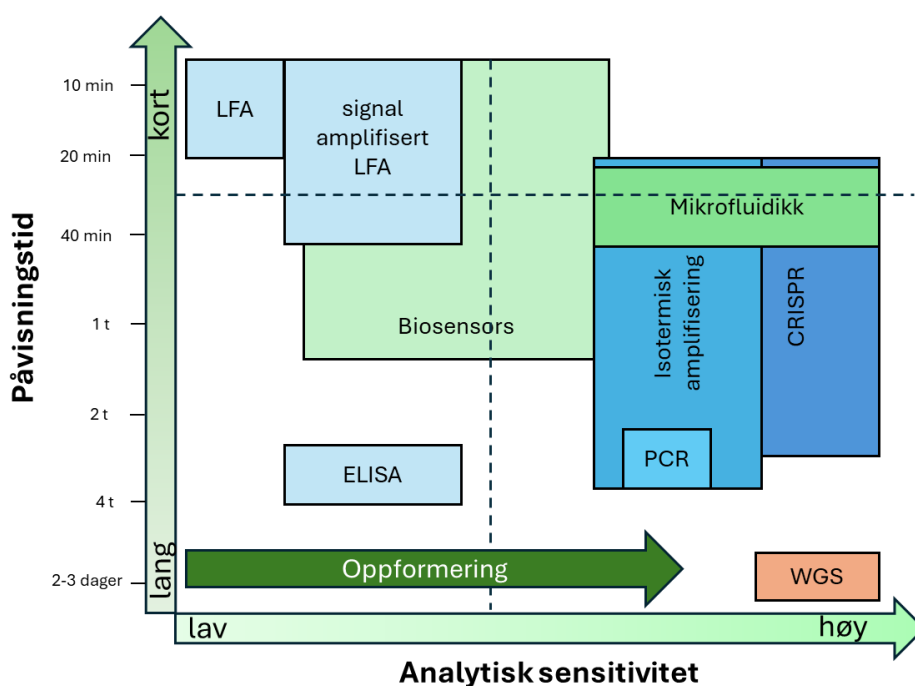
CRISPR/Cas-teknologi, kjent for sin høye spesifisitet, kan integreres i en biosensor for å påvise bakterier. For å øke sensitiviteten kombineres ofte CRISPR/Cas med PCR eller isotermisk oppformering av DNA/RNA. CRISPR/Cas for påvisning av bakterier er imidlertid fremdeles på forskningsstadiet.

Ved helgenomsekvensering bruker man en såkalt neste-generasjons-sekvenseringsmetode (NGS) for å bestemme hele koden på arvestoffet til isolatene. Helgenomsekvensering er et verdifullt verktøy for sporing og sammenligning av listeria- isolater, men det er ikke en hurtig påvisningsmetode ettersom den krever oppformering og identifisering av en enkelt bakteriekoloni. Det er forskning på kombinasjon av isotermisk oppformering av DNA etterfulgt av sekvensering som kan gi både påvisning og typingsinformasjon, men dette er fortsatt på forskningsstadiet.

Mikrofluidikk-systemer, også kjent som «lab-on-a-chip», representerer miniaturisert og automatisert molekylær diagnostikk. Det vil si at prøveopparbeidelse, DNA rensing, påvisning og analyse kan gjøres i samme instrument og med små volumer (ofte <1 ml). Fordelene med denne teknologien er at man kan ha bærbare og brukervennlige instrumenter, som raskt gir svar. Imidlertid kan de kun benytte små

³ En bakteriofag («bakteriespiser») er et virus som angriper og formerer seg i prokaryote celler som bakterier, arker og blågrønnalger. Bakteriofager kan brukes for selektiv påvisning av en bakterie.

prøvevolum, er relativt kostbare, og systemet kan bli blokkert av matprøven. Figur 3 viser en oversikt (estimat) over metoder basert på deres sensitivitet og hurtighet.



Figur 3. Sensitivitet og påvisningstid for ulike metoder. En god og rask metode bør ideelt sett ligge i øvre høyre kvadrant (relativt høy sensitivitet kort påvisningstid). Det er merket inn oppformering i figuren for å vise at sensitiviteten til metodene øker ved oppformering av bakterien, men da på bekostning av påvisningstid. En metode kan også bestå av flere ulike teknologier. For eksempel kan mikrofluidikk-systemer benytte isotermisk oppformering og CRISPR/Cas. Figuren er modifisert fra Liu et al., 2021 [10] og Younes et al. 2023 [11].

5.2.1 Regelverk og fysiske lover begrenser hastigheten på metoden

Til tross for fremskritt innen forskning på hurtigmetoder for påvisning av listeria, er det fortsatt utfordringer knyttet til sensitivitet, selektivitet og robusthet. Gjeldende regelverk krever en sensitivitet som tilsier en eller annen form for oppformering av bakterien før analyse. Prøvevolumet som brukes i påvisningsanalysen er ofte svært lavt for de fleste hurtigmetoder, ofte ned til mikroliter. Selv om metodene skulle være i stand til å påvise én listeriacele i det analyserte prøvevolumet, må denne ene cellen først konsentreres fra et større utgangsvolum, for eksempel en 25 g produktprøve, for at testen skal kunne bli godkjent som likeverdig med referansemetoden ISO 11290-1. Noen av disse metodene vil likevel kunne benyttes som et supplerende verktøy i den daglige rutinekontrollen for raskere resultater.

5.2.2 Hvor rask må en hurtigmetode være?

I spørreundersøkelsen kom det fram at over 40% svarer at de trenger en test som tar en time eller mindre for å kunne: 1) bruke listeria-positive råvarer til andre produkter; 2) iverksette tiltak for å redusere/fjerne listeria på råmateriale; 3) avvise råvare fra leverandør eller vaske på nytt før produksjonsstart. Dersom man har en test som tar maksimum 10 timer, vil 56% kunne gi renholdere tilbakemelding før neste rengjøring. Omlag 40% av fabrikkene kunne advare kunder om en positiv test, tilbakeholde produkt eller hindre at det kommer i butikk før endelig prøvesvar foreligger.

5.3 Genotyping

Det kom fram fra spørreundersøkelsen og intervju med representanter fra laksenæringen at det var økende interesse for metoder som kan gi mer informasjon enn bare et svar på om listeria er til stede i en prøve eller ikke – altså genotypingsmetoder. Under er en kort oversikt over prinsippene bak eksisterende genotypingsmetoder, inkludert PCR-basert typing, MLST⁴, MLVA⁵ og PFGE⁶, samt en evaluering av metodenes oppløselighet når det gjelder å skille mellom relevante genetiske grupper av listeria, som er kjent gjennom analyser av helgenomsekvenseringdata. I tillegg er det foretatt en evaluering av den nye GENE-UP Typer metoden fra bioMérieux, utført som en digital analyse av et datasett bestående av over 1200 norske listeria-isolater. For mer utdypende informasjon henvises det til **Delrapport 3**.

5.3.1 Populasjonsstruktur og genetikk hos *L. monocytogenes*

Populasjonsstruktur i *L. monocytogenes* beskriver slektskapet mellom medlemmer i en populasjon, noe som er viktig for å spore listeria-stammer. Vi ser på likheten mellom isolater for å bestemme deres felles opprinnelse. *L. monocytogenes* har fire genetiske linjer (I, II, III, IV), som er så forskjellige at de kan betraktes som forskjellige arter. Linje I og II er vanligst i mat, miljø og humane kliniske isolater.

Analyse av populasjonsstrukturen til listeria har vist at isolater i disse linjene for det meste sorterer i klart definerte grupper av nært beslektede isolater, som i stor grad tilsvarer de klonale gruppene (Clonal Complex; CC) definert av typingsmetoden MLST [12].

Mutasjoner skaper genetisk variasjon, og antall mutasjoner kan indikere slektskap mellom to bakterieceller. Listeria-genomet er stabilt med begrenset horisontal genoverføring og rekombinasjon. Et listeria-genom er ca. 2,9 til 3,1 millioner nukleotider langt med ca. 3000 gener, hvorav 2000 er felles for de fleste stammer. Disse utgjør 'kjernegenomet', mens resten kommer fra 'tilleggsgenomet'. Forskjellige stammer har forskjellige delmengder av disse genene. Til sammen er det funnet ca. 4000 forskjellige gener i tilleggsgenomet.

5.3.2 Prinsipper for genotypingsmetoder

Klassisk immunologiske serotyping skiller bakterier innenfor en art basert på påvisning av spesifikke overflatestrukturer (såkalte O- og H-antigener) ved hjelp av antistoff. Etter oppfinnelsen av PCR metoden, og de aller første helgenomsekvensene av listeria, ble det utviklet en DNA-basert molekylær analyse basert på PCR-amplifisering av seks gener [13-18]. Dette kunne identifisere listeria og skille isolatene inn i fem såkalte 'molekylære serogrupper' basert på et mønster av tilstedeværelse (eller ikke) for disse genene.

Det er i den senere tid utviklet flere nye analysemetoder som er basert på akkurat samme prinsipp som 'molekylær serotyping', men som har flere markør-gener for genetiske grupper (størrelsesorden 13-16). Disse er mer finmaskede forsøk på å korrelere mønster av tilstedeværelse av gener eller gen-varianter til kjente og/eller vanlige populasjonsgenetiske grupper (som man nå kjenner til) innenfor arten listeria. Eksempler er *Listeria* PatternAlert assay fra Rheonix [19, 20], GenoListeria Multiplex utviklet av ANSES [21, 22], og GENE-UP Typer fra bioMérieux [23].

PCR-baserte metoder som baserer seg på mønster av ja/nei svar for tilstedeværelse av spesifikke markør-gener (eller gen-varianter) fra listeria, utnytter (i hovedsak) at forskjellige genetiske slektsgrupper av listeria har forskjellig delmengder (subset) av det såkalte tilleggsgenomet.

⁴ MLST (Multilocus sekvenstyping) identifiserer spesifikke sekvenser av DNA i et utvalg av gener hos en organisme.

⁵ MLVA (Multilocus variable-number tandem repeat (VNTR) analyse) utnytter at det finnes gener som inneholder regioner med korte gjentakende enheter (såkalte 'VNTR loci' eller 'VNTR-gener').

⁶ PFGE (Pulsed-field gel elektroforese) baserer seg på kutting av genomisk DNA fra en bakterie med ett eller flere valgte restriksjonszymer, og visualisering av størrelsen på de resulterende DNA-fragmentene på en agarosegel.

5.3.3 Sekvenserings-baserte metoder inkludert MLST og WGS

Sanger-sekvensering (førstegenerasjons-sekvensering) av enkeltgener brukes for å studere populasjonsstrukturer hos biologiske organismer. En forutsetning for at dette skal fungere er at man velger et gen som finnes hos alle individene i populasjonen man ser på. Ved helgenomsekvensering (whole genome sequencing; WGS) bruker man en såkalt neste-generasjons-sekvenseringsmetode (NGS) for å bestemme hele koden på arvestoffet til bakterieisolater.

MLST sekvenstype (ST): Tradisjonell multilocus sekvenstyping (MLST) er en molekylær typingsmetode introdusert i 1998 [24], som brukes for å separere grupper av isolater innenfor en bakterie-art. Den er basert på PCR-amplifisering etterfulgt av Sanger-sekvensering av (vanligvis) syv 'husholdnings'-gener (essensielle gener som alle bakteriene må ha for å overleve). Alle oppdagede varianter av disse syv genene må registreres i en felles database. Her tildeles hver variant av hvert gen et vilkårlig tall (et 'allel-nummer'), og til sammen utgjør dette en kode på syv tall (en 'MLST profil'). Hver unike kombinasjon av syv tall tilordnes en sekvenstype (ST).

Klonalt kompleks (Clonal Complex; CC): To sekvenstyper som har MLST profiler som bare skiller seg fra hverandre i ett av de syv valgte husholdningsgenene anses å tilhøre det samme klonale komplekset. For eksempel tilhører alle isolater av både ST9 og ST35 (med MLST profil 6-5-6-4-1-15-1) til CC9. På denne måten knyttes isolater som ligner hverandre sammen i populasjonsbiologisk relevante grupper [25].

Helgenomsekvensering (whole genome sequencing; WGS): Etter at man har gjennomført helgenomsekvensering av et bakterieisolat kan man raskt bestemme ST og CC ved å søke opp mot databasen på Institut Pasteur. I videre analyser brukes bioinformatiske metoder for å sammenligne slektskapet mellom isolatene. Dersom hensikten er sporing av smitte, gjøres som regel slike analyser bare på isolater innenfor samme CC. Analysen kan utføres ved å utvide MLST-metoden beskrevet over til en cgMLST ('core genome MLST', 'kjernegenom MLST') som inkluderer de ca. 1700 felles genene for alle listeria (det såkalte kjernegenomet), eller en wgMLST ('whole genome MLST', 'helgenom MLST') analyse som sammenligner alle de ca. 3000 genene i bakteriene. Man kan også sammenlikne hele genomsekvensen mot en referanse (SNP-analyse). Deretter brukes mer eller mindre avanserte grupperings-metoder for å lage visualiseringer i form av fylogenetiske trær. For mer informasjon om helgenomsekvensering i matindustrien refereres det til en veileder [26].

Metoder basert på sekvensering og sammenligning av gen-sekvenser for gener som er felles i et gitt datasett utnytter variasjon forårsaket av enkelt-base-mutasjoner i det konserverte kjernegenomet, og gir derfor som regel en god representasjon av populasjonsstruktur og evolusjonær historie.

5.3.4 PFGE og MLVA er basert på variasjon i fragment-lengder

Pulsed-field gel elektroforese (PFGE) er en genotypingsmetode som er basert på kutting av genomisk DNA fra en bakterie med ett eller flere valgte restriksjonsenzymmer, og visualisering av størrelsen på de resulterende DNA-fragmentene på en agarosegel. PFGE-metoden er relativt arbeidskrevende å utføre, og sammenligning av resultater kan være utfordrende. Dessuten, sammenlignet med helgenomsekvensering (som for MLST), er det ikke enkelt å tolke data fra PFGE. Noen PFGE profiler (pulstotyper) er veldig vanlige, og dermed kan ikke to identiske profiler brukes som bevis for at to isolater er fra samme kilde. Dataene må alltid tolkes i kontekst av den diversiteten som finnes i listeria-populasjonen og epidemiologisk informasjon (for eksempel tidsrom, lokasjon) [27].

Multilocus variable-number tandem repeat (VNTR) analyse (MLVA). I Norge ble denne metoden benyttet til epidemiologisk overvåking og utbruddsetterforskning for listeria, før Folkehelseinstituttet (FHI) gikk over til helgenomsekvensering i 2018. Metoden utnytter at det finnes gener som inneholder regioner med korte gjentakende enheter (såkalte 'VNTR loci' eller 'VNTR-gener'). MLVA-metoden er ikke standardisert for listeria, og ulike studier har benyttet ulike VNTR-gener eller kombinasjoner av

disse. I oppsettet benyttet av FHI, beskrevet i 2008 [28], ble det brukt fem VNTR-gener. Fordelen med MLVA er at den er relativt rask, billig og enkel, sammenlignet med PFGE og MLST. Det har imidlertid vært rapportert at resultatene er instrumentavhengige, og at det dermed kan være vanskelig å sammenligne MLVA-profiler fra analyser utført på forskjellige instrumenter eller laboratorier.

Metoder som skiller mellom bakterie-isolater basert på forskjeller i lengden på DNA-fragmenter utnytter variasjoner som oppstår på grunn av større eller mindre strukturelle endringer i arvestoffet, for eksempel forflytninger, duplikasjoner, utkuttninger ('delesjoner'), eller opptak av eksternt genetisk materiale (og ikke på grunn av mutasjoner i enkelt-nukleotider).

5.3.5 GENE-UP Typer fra bioMérieux

GENE-UP Typer fra bioMérieux [23, 29] er en molekylær genotypingsmetode basert på real-time PCR. Metoden er utviklet for å kjøres på bioMérieux's GENE-UP real-time PCR instrument, som også kan brukes til å påvise listeria med vanlige testsett for listeria-påvisning [30].

Tanken er at man etter å ha påvist listeria går tilbake til oppformeringskulturen og plater denne ut på en agarskål som inkuberes overnatt. Deretter plukker man en enkelt-koloni som analyseres med GENE-UP Typer. Total analysetid vil være omtrent 2 døgn. GENE-UP Typer er en real-time PCR analyse av 16 markørgener, hvor to og to gener analyseres sammen i hver reaksjon – til sammen åtte reaksjoner kjøres samtidig for hvert isolat. Markørgenene er utvalgt på bakgrunn av et slektskapstre basert på helgenomsekvensering med til sammen 33 000 referansegenomer. Analysen sammenligner mønsteret for tilstedeværelse av disse 16 genene eller gen-variantene med det som finnes i kjente og/eller vanlige populasjonsgenetiske grupper i referansetreet.

En GENE-UP Typer analyse vil ved hjelp av en probabilistisk algoritme tilordne ethvert isolat en GENE-UP Typer 'adresse'. Denne adressen er en rekke med tall som indikerer posisjonen til isolatet i det underliggende slektskapstreeet som ble brukt til utvelgelse av markørgener.

I prosjektet ble metodenes oppløselighet evaluert når det gjelder å skille mellom relevante genetiske grupper av listeria, som er kjent gjennom analyser av helgenomsekvenseringdata. Evalueringen ble utført som en digital analyse av et datasett bestående av over 1200 norske listeria-isolater. Resultatene viste at GENE-UP Typer metoden hadde noen fordeler sammenlignet med de klassiske genotypingsmetodene som: veldig lav andel av misvisende resultater/feiltying; usikkerhet i analyseresultatet blir oppgitt; typingsresultatet kan leses ut fra en helgenomsekvens; samt brukervennlig og hurtighet (dersom man har GENE-UP instrumentet). Metoden hadde også noen ulemper sammenlignet med andre genotypingsmetoder: relativt stor andel av isolater som metoden ikke klarer å type og lavere oppløselighet enn alle andre vanlige genotypingsmetoder bortsett fra MLST-basert klonale kompleks (CC-grupper) og serotyping. Dette er altså ikke en metode som kan brukes istedenfor helgenomsekvensering for å spore smitte i næringsmiddelkjeden eller i produksjonsmiljøet i bedrifter. Helgenomsekvensering med slektskapsanalyser basert på wgMLST eller SNP har en høy oppløsning og kan gi mye informasjon om sannsynlige smitekilder, smittespredning og egenskaper til listeria.

Dagens typingsmetoder (MLST, CC, GENE-UP) er for grovmaskede til dette formålet, men kan gi raskere svar og enklere databearbeiding. De egner seg derfor som et utgangspunkt for valg av isolater til helgenomsekvensering, å kunne avkrefte en smittekilde/smittevei, vurdere risiko og gir tidlige indikasjoner på etablering og eliminering av husstammer.

6 Diskusjon og konklusjon

I prosjektet har vi kartlagt tilgjengelige kommersielle hurtigmatoder for påvisning av listeria, prinsippene bak og sammenlignet med dagens standardmetoder. De raskeste ISO 16140-2 validerte metodene for påvisning av *L. monocytogenes* tar ca. 20 timer (real-time PCR), hvorav om lag 90% av tiden er oppformeringstrinnet og 10% påvisningstrinnet. Siden standard PCR ikke skiller mellom levende og døde bakterier så må eventuelle positive resultat verifiseres vha. dyrkning på agarskål, noe som tar ytterligere ca. 24 timer. Dette betyr at tidligste negative resultat kan oppnå etter rundt 20 timer, mens tidligste bekreftede positive resultat kan oppnå først etter ca. 44 timer. Dagens validerte hurtigmatoder er dermed ikke spesielt raske, og det er et stort behov for raskere metoder. De metodene som kan se ut til å ha størst potensiale for raskere og sikrere påvisning av listeria er nukleinsyre (DNA/RNA)-baserte påvisningsmetoder, noe som kan redusere påvisningstrinnet fra dagens 1-2 timer ned til 30 minutter. For å oppnå samme sensitivitet som en ISO-validert metode så kommer man ikke utenom en eller annen form for oppformering før påvisning. Alternativt er at man får oppkonsentrert et større prøvevolum før påvisning ved hjelp av filtrering, sentrifugering eller «fangning» av listeria bakteriene. Dette er trinn som kan være omfattende og muligens vanskelige å utføre ute i industrien dersom de ikke automatiseres. Det største potensialet for å redusere analysetiden for listeria ligger i en kombinasjon av 1) trygge, automatiserte analysesystemer med høy kapasitet som gjør at listeria-analyser kan utføres på fabrikken og 2) oppformeringsmetoder (listeriaceller, DNA og/eller separasjon for å oppkonsentrere bakterieceller) som betydelig korter ned de 18 timene man i dag bruker på oppformering. Dersom teknologiske barrierer overkommes og markedet etterspør det, kan det kanskje i framtiden være mulig å komme ned på en analysetid på 8-10 timer. Dette vil for mange bedrifter bety at de kan varsle renholdere før neste renhold og holde tilbake produkter før de når markedet. Det er likevel en mulighet å benytte raskere metoder som ikke er validerte som et tillegg i daglig kvalitetskontroll. Disse må være sensitive og selektive nok til at man ikke får for mange falske positive eller negative resultater. For å oppnå dette må det utvikles kommersielle metoder som blant annet skiller mellom levende og døde celler, som for eksempel metoder som benytter RNA i stedet for DNA, eller metoder basert på bakteriofager eller CRISPR/Cas.

I tillegg til raskere metoder så er det også et behov for mer informasjon enn bare positivt og negativt resultat. Dagens gullstandard for sporing og typing av listeria er helgenomsekvensering. Helgenomsekvensering er derimot fortsatt relative kostbart, men ikke minst tar det lang tid (opp til 1-2 uker). Selve analysen tar ikke mer enn 2-3 dager, men kommersielt så tar det lengre tid grunnet forsendelse og oppsamling av isolater til en analyse. I prosjektet vurderte vi ulike genotyper inkludert en ny typingsmetode fra bioMérieux, Gene-UP Typer.

Ingen genotypingsmetoder på markedet kan måle seg med helgenomsekvensering, men de vil likevel kunne gi nyttig informasjon på CC- og ST-nivå, informasjon som vil være nyttig i bedriftens daglige rutinearbeid og for å eventuelt velge ut isolater til helgenomsekvensering. Det er forskning på kombinasjon av isotermisk oppformering av DNA etterfulgt av sekvensering som kan gi både påvisning og typingsinformasjon, men dette er fortsatt på forskningsstadiet.

Dagens metoder for påvisning av listeria er for tidkrevende til at bedriftene kan iverksette nødvendige tiltak som å avvise råvarer fra leverandør, vaske på nytt før produksjonsstart eller tilbakeholde produkter til analyseresultater foreligger. Dagens regelverk og teknologi setter begrensninger for hvor rask en metode kan være og det er dessverre ingen enkeltmetoder som peker seg ut som en løsning for raskere påvisning av listeria. Det er identifisert flere punkter som kan forbedres, men siden oppformeringstrinnet i dag tar 18-24 timer så er det her det er mest å hente.

7 Hovedfunn

- Dagens hurtigmetoder på markedet er ikke spesielt raske. Raskeste validerte metode (real-time PCR) tar 20 timer hvorav 90% av tiden er oppformeringstrinnet og 10% er påvisningstrinnet. Det finnes kommersielle metoder som tar 6-8 timer, men disse mangler validering og er kun beregnet på miljøprøver. I tillegg finnes det en kommersiell test for *Listeria spp.* (kun miljøprøver) som tar kun 1 time.
 - Oversikt (tabeller) over kommersielt tilgjengelige hurtigmetoder for påvisning av listeria med påvisningsprinsipp, vanskelighetsgrad og total analysetid.
- Med dagens regelverk og teknologi vil det ikke være mulig å utvikle en hurtigmetode som tar 20-30 minutter. Dersom teknologiske barrierer overkommes og markedet etterspør det, kan det kanskje i framtiden være mulig å komme ned på en analysetid på 8-10 timer. Dette vil bety at en stor andel laks- og ørretbedrifter kan varsle renholdere før neste renhold og holde tilbake produkter før de når markedet.
 - Det er likevel et mulighetsrom for utvikling av raskere metoder, ned mot 30 minutter, men disse vil være mindre sensitive enn regelverket krever. Denne typen tester vil likevel kunne være et nyttig tillegg til ISO-validerte metoder.
- Nye metoder bør i tillegg til hurtighet fokusere på å skille mellom levende og døde bakterier, samt gi mer enn bare et positivt eller negativt svar, dvs. genotyping.
 - Dagens genotypingsmetoder (MLST, CC, GENE-UP Typer) er for grovmaskede til å avdekke sannsynlige smitekilder, smittespredning og egenskaper til listeria, men kan gi raskere svar og enklere databearbeiding. De egner seg derfor som et utgangspunkt for valg av isolater til helgenomsekvensering, å kunne avkrefte en smitekilde/smittevei, vurdere risiko og gir tidlige indikasjoner på etablering og eliminering av husstammer.

8 Leveranser

Resultatene fra prosjektet er formidlet via tre rapporter, faktaark, populærvitenskapelig artikkel og presentasjoner rettet mot laksenæringen. I tillegg til rapporter og ekstern formidling så har leveransene inkludert:

- Fire møter i Referansegruppen
- Statusrapporter til FHF
- Sluttrapport

Se tabell 1 for oversikt over leveransene i prosjektet.

Tabell 1. Oversikt over publiserte leveranser i prosjektet.

Leveranse	Beskrivelse
L1	Referat fra oppstartsmøte i Referansegruppa
L2	Metoder for påvisning av Listeria i mat og produksjonsmiljø - Delrapport 1: Hurtigmetoder på markedet
L3	Referat fra møte i Referansegruppa
L4	Metoder for påvisning av Listeria i mat og produksjonsmiljø - Delrapport 2: Nye metoder og teknologier
L5	Statusrapport
L6	Faktaark «Hurtigmetoder for påvisning av Listeria i sjømatnæringen»
L7	Nyhetssak/Populærvitenskapelig art.: "Hurtigmetoder for påvisning av listeria - nye teknologier"
L8	Referat fra avslutningsmøte i RG med gjennomgang av utkast til sluttrapport
L9	utgikk
L10	Metoder for påvisning av Listeria i mat og produksjonsmiljø - Delrapport 3: Genotypingsmetoder
L11	Foredrag for næringen i relevant forum (avgjøres i samråd med referansegruppa)
L12	Faglig og administrativ sluttrapport i tråd med FHF's retningslinjer

9 Vedlegg

I delrapport 1 ble de utarbeidet en oversikt over validerte- og ikke validerte metoder for påvisning av listeria. Disse er vedlagt denne rapporten.

Vedlegg 1: Validerte kommersielle testsett for påvisning av *L. monocytogenes*

Vedlegg 2: Kommersielle testsett uten ISO 16140-2 validering for påvisning av *L. monocytogenes*

Vedlegg 3: Kommersielle testsett for *Listeria* spp.

Vedlegg 1: Validerte kommersielle testsett for påvisning av *L. monocytogenes*^a

Testsett (Produsent)	Påvisnings-prinsipp og eventuell samtidig påvisning av andre <i>Listeria</i> spp.	Oppformering: antall trinn + medium ^b	Vanskelighetsgrad og tidsbruk	Min. totaltid ^b	Nødvendig instrument ^c	Ref.
Immunologiske metoder						
VIDAS <i>L. monocytogenes</i> Xpress (LMX) (bioMérieux)	Enzym-linked fluorescent assay (ELFA) 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*	[31]
TRANSIA Plate <i>L. monocytogenes</i> (BioControl Systems / MilliporeSigma)	Sandwich ELISA 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) [§]	[32]
Solus <i>L. monocytogenes</i> ELISA (PerkinElmer)	Sandwich ELISA . 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) [§]	[33]
Hybridisering av RNA						
LUMIprobe 24 <i>L. monocytogenes</i> (Europrobe)	Hybridisering av rRNA 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 [§]	[34]
RiboFlow <i>Listeria</i> Twin Detection Kit (SY-LAB)	Lateral flow assay basert på hybridisering av to forskjellige rRNA 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	[35]

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*	[36]
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*	[37]
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	[38]
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 [§]	[39]
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	[40]
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 [§]	[41]
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.	[42]
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*	[30]

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	[43]
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*	[38]
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	[44]
Assurance GDS <i>L. monocytogenes</i> Tq (MilliporeSigma / Merck)	Oppkonsentrering av <i>L. monocytogenes</i> med immunomagnetisk separering (IMS) 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*	[45]

^a 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.

^b 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).

^c 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.

Vedlegg 2: Kommerielle testsett uten ISO 16140-2 validering for påvisning av *L. monocytogenes*^a

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.
Biokjemiske metoder (basert på påvisning av enzymaktivitet)						
N-Light <i>L. monocytogenes</i> (NEMIS Technologies)	Påvisning av enzymet fosfolipase C med kjemiluminescens. Alle listeria bortsett fra <i>L. monocytogenes</i> fjernes vha bakteriofager i oppformeringsmediet.	AOAC-validert svabertest , kun beregnet for bruk for miljøprøver /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	[46, 47]
InSite <i>L. mono</i> Glo (Hygiena)	Påvisning av enzymet fosfolipase C fra <i>L. monocytogenes</i> og <i>L. ivanovii</i> med visuell observasjon av fluorescens under UV-lys. Påvisning av enzymet β-glukosidase fra <i>Listeria</i> spp. ved visuell fargeforandring fra gul til svart (hydrolyse av esculin).	AOAC-validert svabertest , kun beregnet for bruk for miljøprøver /overflater. Oppformering i ca 5 mL vekstmedium inkludert i selve svaberenheten.	Direkte visuell avlesing av fluorescens / fargeforandring i oppdyringsmediet.	24-48 t ^b	UV lampe	[48]
SwabSURE ListeriaP (Technical Service Consultants)	Påvisning av enzymet fosfolipase C fra <i>L. monocytogenes</i> og <i>L. ivanovii</i> ved visuell fargeforandring fra gul til blå.	AOAC-validert svabertest , kun beregnet for bruk for miljøprøver /overflater. Oppformering i rør med ca 5 mL vekstmedium (inkludert i testsettet).	Direkte visuell avlesing av fargeforandring i oppdyringsmediet.	24-48 t ^b	nei	[49]
Immunologiske metoder (også i kombinasjon med PCR)						
<i>Listeria</i> Assay Kit (Real Time Analyzers)	Immunoassay med immunomagnetiske kuler og antistoff-bundet fluorescerende reporter	Ekstern validering er ikke foretatt. Svabertest kun beregnet for bruk for miljøprøver /overflater. Oppformering 8 t.	Prøvepreparering og analysetid 1 t.	9 t	Fluorimeter	[50]
Veriflow <i>Listeria monocytogenes</i> (LM) (Invisible Sentinel, del av bioMérieux)	PCR -amplifisering av spesifikke DNA-targetet(s) med bruk av merkede primere og påvisning av merket PCR-produkt i et lateral flow immunokromatografisk analyse (PCR-NALFIA). Påvisning ved visuell observasjon av rødfarget stripe (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	[51, 52]
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 (LFIA) (nitrocellulose test-strip). Påvisning ved visuell observasjon av rødfarget stripe (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	[53]

Isotermisk amplifikasjon av DNA / RNA						
Loopamp <i>Listeria monocytogenes</i> Detection Kit (Eiken Chemical)	LAMP (isotermisk amplifikasjon) av DNA (genet iap). Påvisning skjer ved måling av turbiditeten 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	[54]
Atlas <i>Listeria monocytogenes</i> LmG2 Detection Assay (Roka Bioscience)	Transkripsjon-mediert isotermisk amplifikasjon (TMA) av (ett) mRNA . 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 ^c	[55]
Hybridisering av DNA / RNA						
EnviroX-F (PathogenDx)	To-trinns PCR -amplifisering av spesifikke DNA-targets og bruk av primere merket med fluorescerende probe, etterfulgt av påvisning ved hybridisering til DNA microarray . Påviser også andre <i>Listeria</i> spp. og Salmonella.	AOAC-validert svabertest , kun beregnet for bruk for miljøprøver/overflater . Uten oppformeringstrinn . Celler fra svaberen suspenderes i en buffer, og samles derfra opp ved sentrifugering.	Komplisert og omfattende protokoll med mange manuelle trinn; krever trent laboratorie-personell .	6-8 t	PCR maskin og SensoSpot mikroarray-avleser ^c	[56]
HybriScan D <i>Listeria monocytogenes</i> (ScanBec, del av Millipore / Merck)	Påvisning av <i>L. monocytogenes</i> rRNA ved sandwich hybridisering 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)	[57]
DNA sekvensering						
Clear Safety <i>Listeria</i> (Clear Labs)	Automatisert plattform for DNA amplifisering og DNA sekvensering 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 ²) 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 ^c	[58, 59]
Biosensor						
Xpress LM (Crystal Diagnostics Corporate)	Anriking av <i>L. monocytogenes</i> med immunomagnetisk separering (IMS) etterfulgt av påvisning av komplekser av antistoff-konjugerte mikrokuler og bakterieceller med liquid crystal -basert biosensor.	AOAC-validert metode som kun er beregnet for bruk for miljøprøver/overflater . 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 ^c	[60]

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

^c Metoden kan vanskelig gjennomføres uten det spesifikke angitte instrumentet.

Vedlegg 3: Kommersielle testsett for *Listeria* spp.^a

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.
Biokjemiske metoder (basert på påvisning av enzymaktivitet)						
<i>Listeria</i> SwabCheck (GSV Filter Technology)	Påvisning av enzymet β-glukosidase 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. Svabertest kun beregnet for bruk for miljøprøver/overflater . Oppformering i ca 5 mL vekstmedium inkludert i selve svaberenheten.	Direkte visuell avlesing av fargeforandring i oppdyringsmediet.	24-48 t	nei	[61]
Bakteriofag-baserte metoder						
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 miljøprøver/overflater . Uten oppformeringstrinn , men har isteden et 4 timers 'recovery' trinn 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	[62]
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	[31, 63]
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 miljøprøver/overflater . 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	[62, 64]
Immunologiske metoder						
Solus One <i>Listeria</i> (PerkinElmer)	Enzymlinked immunosorbent assay (ELISA) utført i mikrotiterplater. Enzymatisk påvisning som måles som fargeforandring.	AOAC-validert metode som kun er beregnet for bruk for miljøprøver/overflater . 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)	[65]
BACSpec <i>Listeria</i> (Eurofins GeneScan)	Enzymlinked immunosorbent assay (ELISA) 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)	[66, 67]

RapidChek <i>Listeria</i> NextDay Food and Environmental Test System (Romer Labs/DSM)	Lateralt flow immunkromatografisk analyse (LFIA) (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	[68]
Reveal 2.0 <i>Listeria</i> Test System (Neogen)	Lateralt flow immunkromatografisk analyse (LFIA) (nitrocellulose test-strip). Påvisning ved visuell observasjon av rødfarget stripe (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	[69]
Oxoid <i>Listeria</i> Rapid Test (Thermo Fisher)	Lateralt flow immunkromatografisk analyse (LFIA) (inkorporert i testkassett). Påvisning ved visuell observasjon av blåfarget stripe (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	[70]
VIP Gold for <i>Listeria</i> (BioControl Systems / MilliporeSigma)	Lateralt flow immunkromatografisk analyse (LFIA) (inkorporert i testkassett). Påvisning ved visuell observasjon av rødfarget stripe (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	[71]
Isotermisk amplifikasjon av DNA / RNA						
ANSR <i>Listeria</i> Right Now (Neogen)	Amplifisering av 23S rRNA ved hjelp av isotermisk nicking enzym amplifiseringsreaksjon (NEAR) teknologi, og påvisning av amplifisert DNA ved hjelp av fluorescerende molecular beacon prober.	AOAC-validert svabertest , kun beregnet for bruk for miljøprøver (rene overflater). Uten oppformeringstrinn . 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	[72, 73]
Biosensor						
<i>Listeria</i> CANARY Zephyr (Smiths Detection)	Biosensor bestående av genredigerte B-celler (immunceller) som uttrykker spesifikke antistoff 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 miljøprøver/overflater . 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)	[74, 75]
^a 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.						

10 Referanser

1. 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>.
2. Næringsmiddelhygieneforskriften. Forskrift om næringsmiddelhygiene (FOR-2008-12-22-1623). <https://lovdata.no/forskrift/2008-12-22-1623>.
3. Moen, B., S. Langsrud, and A. Fagerlund, Metoder for påvisning av Listeria i mat og produksjonsmiljø. Delrapport 1: Hurtigmetoder på markedet. <https://www.fhf.no/prosjekter/prosjektbasen/901822/>. 2023, Nofima.
4. Moen, B., S. Langsrud, and A. Fagerlund, Metoder for påvisning av Listeria i mat og produksjonsmiljø. Delrapport 2: Nye metoder og teknologier. <https://www.fhf.no/prosjekter/prosjektbasen/901822/>. 2023, Nofima.
5. Fagerlund, A., L. S., and B. Moen, Metoder for påvisning av Listeria i mat og produksjonsmiljø. Delrapport 3: Genotypingsmetoder. <https://www.fhf.no/prosjekter/prosjektbasen/901822/>. 2024, Nofima.
6. FHF prosjektdatabase, <https://www.fhf.no/prosjekter/prosjektbasen/901822>.
7. Utvikling av hurtigtest for påvisning av listeria i havbruksnæringen: Et mulighetsstudium. <https://nofima.no/prosjekt/utvikling-av-hurtigtest-for-pavisning-av-listeria-i-havbruksnaeringen-et-mulighetsstudium/>.
8. FAO and WHO, Listeria monocytogenes in ready-to-eat (RTE) food: attribution, characterization and monitoring: Meeting report, in Microbiological risk assessment series 38, W.H.O.F.a.A.O.o.t.U. Nations, Editor. 2022, <https://doi.org/10.4060/cc2400en>: Rome.
9. Alali, W.Q. and D.W. Schaffner, Relationship between Listeria monocytogenes and Listeria spp. in seafood processing plants. J Food Prot, 2013. **76**(7): p. 1279-82.
10. Liu, Y.L., et al., Ultrasensitive and Highly Specific Lateral Flow Assays for Point-of-Care Diagnosis. Acs Nano, 2021. **15**(3): p. 3593-3611.
11. Younes, N., et al., A review of rapid food safety testing: using lateral flow assay platform to detect foodborne pathogens. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2023.
12. Maury, M.M., et al., Uncovering hypervirulence by harnessing its biodiversity. Nature Genetics, 2016. **48**(3): p. 308-313.
13. Doumith, M., et al., Differentiation of the major Listeria monocytogenes serovars by multiplex PCR. Journal of Clinical Microbiology, 2004. **42**(8): p. 3819-22.
14. Kérouanton, A., et al., Evaluation of a multiplex PCR assay as an alternative method for Listeria monocytogenes serotyping. Journal of Microbiological Methods, 2010. **80**(2): p. 134-137.
15. Vitullo, M., et al., Real-time PCRs assay for serogrouping Listeria monocytogenes and differentiation from other Listeria spp. Molecular and Cellular Probes, 2013. **27**(1): p. 68-70.
16. Doumith, M., et al., Differentiation of the major Listeria monocytogenes serovars by multiplex PCR. J Clin Microbiol, 2004. **42**(8): p. 3819-22.
17. Kerouanton, A., et al., Evaluation of a multiplex PCR assay as an alternative method for Listeria monocytogenes serotyping. J Microbiol Methods, 2010. **80**(2): p. 134-7.
18. Vitullo, M., et al., Real-time PCRs assay for serogrouping Listeria monocytogenes and differentiation from other Listeria spp. Mol Cell Probes, 2013. **27**(1): p. 68-70.

19. Mermelstein, N.H. Automated Assay Maps Persistent Listeria. <https://www.ift.org/news-and-publications/food-technology-magazine/issues/2019/october/columns/foodsafety-automated-assay-maps-persistent-listeria>. 2019.
20. Rheonix Listeria PatternAlert™ assay. <https://rheonix.com/food-beverage-testing/listeria-patternalert-assay/>.
21. Felix, B., et al., Identification by High-Throughput Real-Time PCR of 30 Major Circulating Listeria monocytogenes Clonal Complexes in Europe. *Microbiol Spectr*, 2023. **11**(3): p. e0395422.
22. Félix, B. GenoListeria Multiplex: Identification by multiplex real-time PCR of 30 major clonal complexes of Listeria monocytogenes strains. <https://doi.org/10.5281/zenodo.10037483>. 2023; Available from: <https://doi.org/10.5281/zenodo.10037483>.
23. bioMérieux. GENE-UP Typer. Available from: <https://www.biomerieux.com/corp/en/our-offer/industry-products/gene-up-typer.html>.
24. Maiden, M.C.J., et al., Multilocus sequence typing: A portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1998. **95**(6): p. 3140-3145.
25. Feil, E.J., Small change: keeping pace with microevolution. *Nat Rev Microbiol*, 2004. **2**(6): p. 483-95.
26. Langsrud, S., et al., Veileder: Bruk av helgenomsekvensering for forebygging og kontroll av Listeria monocytogenes i matindustrien. <https://zenodo.org/records/10468595>. 2024, Nofima.
27. Barrett, T.J., P. Gerner-Smidt, and B. Swaminathan, Interpretation of pulsed-field gel electrophoresis patterns in foodborne disease investigations and surveillance. *Foodborne Pathogens and Disease*, 2006. **3**(1): p. 20-31.
28. Lindstedt, B.A., et al., Multiple-locus variable-number tandem-repeats analysis of Listeria monocytogenes using multicolour capillary electrophoresis and comparison with pulsed-field gel electrophoresis typing. *J Microbiol Methods*, 2008. **72**(2): p. 141-148.
29. bioMérieux, GENE-UP Typer process overview. Version June 2023. 2023.
30. AFNOR Certification, Validation of Gene-Up® Listeria monocytogenes 2. Certificate no. BIO 12/40-11/16. https://nf-validation.afnor.org/en/wp-content/uploads/sites/2/2017/05/Synt-BIO-12-40-11-16_en.pdf, in Certificate no. BIO 12/40-11/16. 2021.
31. AFNOR Certification, Validation of VIDAS LMX. https://nf-validation.afnor.org/en/wp-content/uploads/sites/2/2014/03/Synt-BIO-12-27-02-10_en.pdf, in Certificate # BIO 12/27-02/10. 2022.
32. AFNOR Certification, Validation of TRANSIA Plate L. monocytogenes. https://nf-validation.afnor.org/en/wp-content/uploads/sites/2/2014/03/Synt-TRA-02-11-03-08_en.pdf, in Certificate no. TRA 02/11-03/08. 2020.
33. AFNOR Certification, Validation of Solus L. monocytogenes ELISA. <https://nf-validation.afnor.org/en/wp-content/uploads/sites/2/2022/12/Synt-SOL-37-05-10-22.pdf>, in Certificate no. SOL 37/05-10/22. 2022.
34. AFNOR Certification, Validation of LUMIprobe 24 L. monocytogenes. https://nf-validation.afnor.org/en/wp-content/uploads/sites/2/2014/03/Synt-EUR-15-03-12-05_fr.pdf, in Certificate no. EUR 15/03 – 12/05. 2021.
35. MicroVal, Validation of RiboFlow® L. mono. https://assets.bettyblocks.com/2e826c3765f4401c84671a06de961fc7_e1e4b8ec2b22479080d36

- [038777c5403/22038/2015LR53 - RiboFlow Listeria Twin -Summary Report.pdf](#), in 2015LR53. 2022.
36. AFNOR Certification, Validation of ANSR for Listeria monocytogenes. https://nf-validation.afnor.org/en/wp-content/uploads/sites/2/2016/06/Synt-NEO-35-04-03-16_en.pdf, in certificate # NEO 35/04-03/16. 2020.
 37. AFNOR Certification, Validation of 3M Molecular Detection Assay 2 – L. monocytogenes. https://nf-validation.afnor.org/en/wp-content/uploads/sites/2/2016/12/Synt-3M-01-15-09-16_en.pdf, in Certificate no. 3M 01/15-09/16. 2020.
 38. AFNOR Certification, Validation of BAX System Real-Time PCR Assay L. monocytogenes. <https://nf-validation.afnor.org/en/wp-content/uploads/sites/2/2022/12/Synt-QUA-18-10-01-19.pdf>, in Certificate no. QUA 18/10-01/19. 2021.
 39. NordVal International, Validation of Listeria Velox. <https://www.nmkl.org/wp-content/uploads/2023/02/NordVal-certificate-058-Listeria-Velox-DNA-Diagnostic-Feb2023.pdf>, in NordVal No: 058. 2023.
 40. AFNOR Certification, Validation of BACGene L. monocytogenes. https://nf-validation.afnor.org/en/wp-content/uploads/sites/2/2017/10/Synt-EGS-38-05-01-17_en1.pdf, in Certificate no. 38/03-01/17 2019.
 41. NordVal International, Validation of foodproof® Listeria monocytogenes Detection LyoKit - 5'Nuclease. https://www.nmkl.org/wp-content/uploads/2022/03/NordVal-certificate-025-Foodproof-Listeria-mono_Biotecon_02Nov2021.pdf, in NordVal No: 025. 2021.
 42. AFNOR Certification, Validation of SureTect L. monocytogenes PCR Assay. https://nf-validation.afnor.org/en/wp-content/uploads/sites/2/2014/03/Synt-UNI-03-08-11-13_en.pdf, in Certificate no. 03/08-11/13. 2023.
 43. AFNOR Certification, Validation of iQ-Check L. monocytogenes II. https://nf-validation.afnor.org/en/wp-content/uploads/sites/2/2014/03/Synt-BRD-07-10-04-05_fr.pdf, in Certificate no. BRD 07/10-04/05. 2023.
 44. AFNOR Certification, Validation of MicroSEQ L. monocytogenes. https://nf-validation.afnor.org/en/wp-content/uploads/sites/2/2014/03/Synt-ABI-29-05-12-11_en.pdf, in Certificate no. ABI 29/05-12/11. 2020.
 45. MicroVal Certification, Validation of Assurance GDS L. monocytogenes Tq. https://nen.bettywebblocks.com/view-microval-details?cert_nr=2014LR32&r_name=MicroVal. 2022.
 46. NEMIS Technologies, N-Light rapid tests. <https://www.nemistech.com/technology/>.
 47. Larose, D., et al., Validation of N-Light (TM) L. monocytogenes for Detection of Listeria monocytogenes on Environmental Surfaces: AOAC Performance Tested Method(SM) 122002. Journal of Aoac International, 2022. **105**(3): p. 835-843.
 48. AOAC Research Institute, Validation of InSite L.mono GLO, in Certificate No. PTM 061802. 2022: https://members.aoc.org/AOAC_Docs/RI/23PTM/23C_061802_HygienalMglo.pdf.
 49. Technical Service Consultants, SwabSURE ListeriaP. Online Certification. Available from: <https://www.tscswabs.co.uk/Products/184/SS-L01-SwabSURE-Listeria-mono>.
 50. Real-time Analyzers. Listeria Assay kit. <http://www.rta.biz/products/sers-products/listeria-assay-kit/>.

51. 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): p. 1325-34.
52. Siciliano, N., et al. (oppfinnere), Methods for detecting multiple analytes with a single signal. United States Patent No. US9347938B2. 9. Mars 2013. <https://patents.google.com/patent/US9347938B2/en>.
53. Juck, G., et al., Romer Labs RapidChek((R))Listeria monocytogenes Test System for the Detection of L. monocytogenes on Selected Foods and Environmental Surfaces. J AOAC Int, 2018. **101**(5): p. 1490-1507.
54. 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): p. 150-4.
55. Bres, V., et al., Atlas((R)) 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): p. 1343-58.
56. Katchman, B.A., et al., Validation Study for PathogenDx EnviroX-F Assay for the Detection of Listeria, L. monocytogenes, and Salmonella in Environmental Surface Samples: AOAC Performance Tested MethodSM 092001. J AOAC Int, 2022. **105**(5): p. 1390-1407.
57. Merck. HybriScan® Rapid Microbial Test System. Available from: <https://www.sigmaaldrich.com/NO/en/technical-documents/technical-article/microbiological-testing/pathogen-and-spoilage-testing/hybriscan-rapid-test>.
58. Clear Labs Announces Partnership with Oxford Nanopore. 2019; Available from: <https://www.food-safety.com/articles/6150-clear-labs-announces-partnership-with-oxford-nanopore>.
59. 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 MethodSM 091901. J AOAC Int, 2022. **105**(1): p. 211-229.
60. 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): p. 165-175.
61. GSV Filter Technology, Listeria SwabCheck. <http://www.gvs.com.br/wp-content/uploads/2022/02/microbiologia.pdf>.
62. 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): p. 1895-1904.
63. 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): p. 431-41.
64. 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 MethodSM 102005. J AOAC Int, 2021. **104**(6): p. 1609-1619.
65. 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): p. 570-579.
66. AOAC Research Institute, Certification of BACSpec Listeria. https://members.aoc.org/AOAC_Docs/RI/22PTM/22C_051703_EuroLis.pdf, in Certificate No. 051703. 2021.

67. AFNOR Certification, Validation of BACSpec Listeria. https://nf-validation.afnor.org/en/wp-content/uploads/sites/2/2017/10/Synt-EGS-38-04-01-17_en.pdf, in Certificate No. EGS 38/04-01/17. 2021.
68. 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): p. 850-9.
69. 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): p. 424-34.
70. Thermo Fisher Scientific. Oxoid Listeria Rapid Test. http://www.oxoid.com/UK/blue/prod_detail/prod_detail.asp?pr=FT0401&c=UK&lang=EN, in AFNOR Certificate No. UNI-03/02-04/95; AOAC-RI Certificate No. 960701.
71. Feldsine, P.T., et al., Comparative Validation Study to Demonstrate the Equivalence of a Minor Modification to AOAC Method 997.03 Visual Immunoprecipitate (VIP (R)) for Listeria to the Reference Culture Method. Journal of Aoac International, 2009. **92**(5): p. 1421-1425.
72. 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 MethodSM 081802. J AOAC Int, 2019. **102**(5): p. 1589-1594.
73. Neogen, Validation for Listeria Right Now™. https://www.neogen.com/globalassets/pim/assets/original/10001/official_9873-listeria-right-now_validation-report.pdf. 2019.
74. AOAC Research Institute, Validation of Listeria CANARY® Zephyr. https://www.smithsdetection.com/media/oprk5pi3/smiths_detection_listeria.pdf, in Certificate No. 122005. 2020.
75. Petrovick, M.S., et al., Rapid Sensors for Biological-Agent Identification. https://www.ll.mit.edu/sites/default/files/page/doc/2019-02/17_1_3Petrovick.pdf. Lincoln Laboratory Journal, 2007. **17**(1): p. 63-84.