

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

## Delrapport 3: Genotypingsmetoder



Foto: Jon-Arne Berg

Annette Fagerlund, Solveig Langsrud og Birgitte Moen

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> 19/2024	<i>ISBN:</i> 978-82-8296-790-7	<i>ISSN:</i>
<i>Dato:</i> 20. juni 2024	<i>Antall sider + sider vedlegg:</i> 17+0	<i>Prosjektnummer:</i> 13991
<i>Tittel:</i> <b>Metoder for påvisning av Listeria i mat og produksjonsmiljø – Delrapport 3: Genotypingsmetoder</b>		
<i>Title:</i> Methods for Listeria detection in food and food processing environment – Report 3: Genotyping methods		
<i>Forfatter(e):</i> Annette Fagerlund, Solveig Langsrud og Birgitte Moen		
<i>Avdeling:</i> Trygg og holdbar mat		
<i>Oppdragsgiver:</i> FHF		
<i>Eksternt prosjektnummer/Oppdragsgivers ref.:</i> 901822		
<i>Stikkord:</i> Hurtigmat, Listeria, sjømatindustri		
<i>Sammendrag/anbefalinger:</i> Sporing av <i>Listeria monocytogenes</i> er en viktig del av lakseprodusenters kvalitetskontroll. Det er økende interesse i laksenæringen for metoder som kan gi mer informasjon enn bare et svar på om listeria er til stede i en prøve eller ikke – altså genotypingsmetoder. Denne rapporten gir en grunnleggende oversikt over prinsippene bak eksisterende genotypingsmetoder, inkludert PCR-basert typing, MLST, MLVA og PFGE. Rapporten gir også en evaluering av metodenes oppløselighet når det gjelder å skille mellom relevante genetiske grupper av listeria, som er kjent gjennom analyser av helgenomsekvenseringdata. En viktig del av rapporten er 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. Resultatene viste at GENE-UP Typer metoden hadde noen fordeler sammenlignet med de klassiske genotypingsmetodene, inkludert et lavt nivå av feilklassifiseringer, men ikke høyere oppløselighet enn andre metoder. Genotyping kan være et nyttig verktøy i kvalitetsarbeidet, men kan ikke erstatte helgenomsekvensering for å spore smitte i næringsmiddelkjeden eller i produksjonsmiljøet i bedrifter.		
<i>English summary/recommendation:</i> Source tracking of <i>Listeria monocytogenes</i> is an important part of salmon producers' quality control. There is increasing interest in the salmon industry for methods that can provide more information than just an answer to whether listeria is present in a sample or not, i.e., genotyping methods. This report provides a basic overview of the principles behind existing genotyping methods, including PCR-based typing, MLST, MLVA, and PFGE. The report also provides an evaluation of the resolution of these methods when it comes to distinguishing between relevant genetic groups of listeria, which are known through analyses of whole-genome sequencing data. An important part of the report is an evaluation of the new GENE-UP Typer method from bioMérieux, performed as a digital analysis of a dataset consisting of over 1200 Norwegian listeria isolates. The results showed that the GENE-UP Typer method had some advantages compared to the classic genotyping methods, including a low level of misleading classifications, but not higher resolution than other methods. Genotyping can be a useful tool in quality management, but cannot replace whole-genome sequencing to trace listeria contaminations in the food chain or in food processing environments.		

## Innhold

<b>1</b>	<b>Sammendrag</b>	<b>4</b>
<b>2</b>	<b>Innledning</b>	<b>5</b>
2.1	Bakgrunn og målsetning	5
2.2	Populasjonsstruktur og genetik hos <i>L. monocytogenes</i>	5
<b>3</b>	<b>Prinsipper for genotypingsmetoder</b>	<b>6</b>
3.1	Serotyping og PCR-metoder basert på genetiske markører	6
3.2	Sekvenserings-baserte metoder inkludert MLST og WGS	7
3.3	PFGE og MLVA er basert på variasjon i fragment-lengder	9
<b>4</b>	<b>GENE-UP Typer</b>	<b>11</b>
4.1	Prinsipp	11
4.2	Fremgangsmåte	12
4.3	Analyseresultater	12
4.4	Oppsummering	14
<b>5</b>	<b>Hva nå for genotyping av listeria?</b>	<b>15</b>
<b>6</b>	<b>Referanser</b>	<b>16</b>

## 1 Sammendrag

Det er økende interesse fra laksenæringen for metoder som kan gi mer informasjon enn bare et svar på om listeria er til stede i en prøve eller ikke – altså genotypingsmetoder. Denne rapporten gir en grunnleggende oversikt over prinsippene bak eksisterende genotypingsmetoder, inkludert PCR-basert typing, MLST, MLVA og PFGE. Rapporten gir også en evaluering av metodenes oppløselighet når det gjelder å skille mellom relevante genetiske grupper av listeria, som er kjent gjennom analyser av helgenomsekvenseringdata. En viktig del av rapporten er 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. Resultatene viste at GENE-UP Typer metoden hadde noen fordeler sammenlignet med de klassiske genotypingsmetodene, inkludert et lavt nivå av feilklassifiseringer, men ikke høyere oppløselighet enn andre metoder. Genotypingsmetoder kan være nyttige i listeriakontrollprogrammer, men de kan ikke erstatte helgenomsekvensering for å finne reservoarer og spredningsveier eller i risikoanalyser.

## 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 monocytogenes* (listeria), og har i den forbindelse finansiert et mulighetsstudium for å avklare om det er faglig og teknisk mulig å utvikle en metode eller metodikk som påviser eventuell forekomst av listeria i løpet av 20-30 minutter. 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.

Genotypingsmetoder er basert på forskjellige prinsipper, noe som resulterer i at de har forskjellig sensitivitet og robusthet, og ulik egnethet for å skille mellom nært og mer fjernt beslektede grupper av listeria. Målsetningen med denne rapporten er å gi en oversikt over forskjellige genotypingsmetoder, som bakgrunn for å kunne evaluere disse opp mot hverandre. Genotyping med PCR-baserte metoder ble også beskrevet i Delrapport 2 [1]. En viktig del av denne rapporten er en evaluering av resultater fra en digital analyse av et datasett bestående av norske listeria-isolater med bioMérieux's GENE-UP Typer (kapittel 4).

### 2.2 Populasjonsstruktur og genetikk hos *L. monocytogenes*

Begrepet populasjonsstruktur innebærer en beskrivelse av relativt slektskap mellom enkeltmedlemmer i en populasjon. Kunnskap om en arts populasjonsstruktur er noe som ligger til grunn for det vi prøver å gjøre når vi for eksempel skal spore listeria-stammer i en bedrift. Vi ønsker å vite hvor likt ett listeria-isolat er et annet isolat, fordi graden av slektskap kan fortelle oss noe om hvor nært tilbake i evolusjonen de to isolatene hadde en felles stam-mor (celle), og dermed indirekte si noe om det er sannsynlig at de kan komme fra en felles kilde. For å tolke genotypingsresultater er det derfor en fordel å ha en viss kunnskap om artens populasjonsstruktur, i tillegg til kjennskap til metoden som er brukt.

Genetisk sett består arten *L. monocytogenes* av fire separate dype forgreningslinjer (slektslinjer; linje I, II, III, og IV), som sett fra et evolusjonært synspunkt egentlig er så forskjellige at de kan betraktes som forskjellige arter. Det er som regel stammer fra linje I og II vi finner blant 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 [2] (se avsnitt 3.2).

Som hos andre arter oppstår mutasjoner i arvestoffet med mer eller mindre jevne mellomrom, noe som fører til genetisk variasjon. Informasjon om antall mutasjoner som skiller to bakterieceller sier noe om hvor nært eller fjernt de er i slekt. Mutasjonene kan være små endringer i enkeltgener, for eksempel enkelt-nukleotid-substitusjoner (SNPs), eller større endringer eller omorganiseringer av genomet. Relativt til andre bakterie-arter er genomet (arvestoffet) til listeria genetisk svært stabilt, og har begrenset horisontal genoverføring og rekombinasjon.

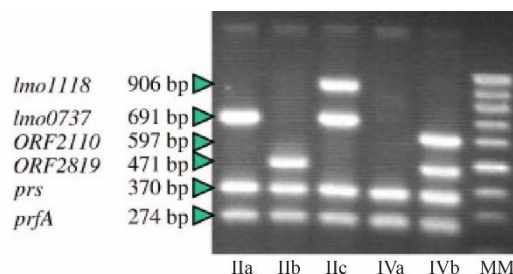
Et listeria-genom er rundt 2,9 til 3,1 millioner nukleotider langt og inneholder ca. 3000 gener. Av disse er ca. 2000 felles for de aller fleste listeria-stammer. Dette er det såkalte '**kjerner-genomet**' (core genome) for arten listeria. Gener som finnes i 'alle' isolater i en art er som regel nødvendige for bakteriens overlevelse eller konkurransevne. De resterende genene er et utvalg fra det såkalte '**tilleggs-genomet**' (accessory genome) for arten listeria. Forskjellige stammer og slektslinjer innenfor listeria har forskjellige delmengder av disse genene. Til sammen er det funnet ca. 4000 forskjellige gener i tilleggsgenomet, som opptrer med varierende hyppighet blant listeria-stammer.

### 3 Prinsipper for genotypingsmetoder

#### 3.1 Serotyping og PCR-metoder basert på genetiske markører

Klassisk immunologisk serotyping skiller bakterier innenfor en art basert på påvisning av spesifikke overflatestrukturer (såkalte O- og H-antigener) ved hjelp av antistoff, og var den første typingsmetoden tilgjengelig for listeria, utviklet på slutten av 1970-tallet [3]. Metoden er basert på forskjeller i molekyler på overflaten av listeria-celler for forskjellige slektslinjer, og at cellene vil agglutinere i synlige klumper dersom de blir blandet med blodserum som inneholder antistoff mot disse overflatemolekylene. Metoden kan skille listeria i 13 serotyper, hvorav fire er vanlig blant listeria-isolater funnet i mat og kliniske tilfeller (1/2a, 1/2b, 1/2c, og 4b). Metoden er ikke lenger i bruk, men klassifikasjonen representerte lenge et felles 'språk' for listeria-typer og beskrivelser av deres distribusjon og epidemiologi. Av historiske årsaker refereres det noen ganger til serotyping fortsatt.

Med bakgrunn i PCR metoden, som ble oppfunnet i 1983 [4], og de aller første helgenomsekvensene av listeria som ble tilgjengelig tidlig på 2000-tallet, begynte forskere å se etter om det var mulig å finne en enklere metode for å skille de forskjellige serotypene fra hverandre. Det ble utviklet, hovedsakelig på empirisk grunnlag, en DNA-basert molekylær analyse basert på PCR-amplifisering av seks gener [5-7]. Dette kunne identifisere listeria og skille isolatene inn i fem såkalte 'molekylære serogrupper' basert på et mønster av tilstedeværelse (eller ikke) for disse genene (se Tabell 1 og Figur 1). For eksempel viste det seg at genet '*lmo1118*' kun var til stede i listeria av serogruppe IIc (serotyper 1/2c og 3c). Analysene kan kjøres både med 'vanlig' PCR (som vist i Figur 1) og med real-time PCR (også kalt kvantitativ PCR, qPCR), men er basert på akkurat samme prinsipp. Forskjellen er at real-time PCR er mer robust, raskere og mer praktisk i bruk.



**Figur 1: Molekylær serotyping.** Mønster for de fem serogruppene som kan skilles etter separasjon av PCR produkter for seks markørgener på agarosegel. MM: molekylvektmarkør. Figuren er hentet fra [6].

Tabell 1: Samsvar mellom utvalgte klassifiseringsmetoder for listeria

Molekylær serogruppe ifølge [6]	Molekylær serogruppe ifølge [7]	Klassisk serotype	Clonal complex (CC) grupper som kan skilles med GenoListeria Multiplex metoden [8]**	Linje
IIa	I	1/2a (og 3a*)	CC8, CC121, CC31, CC37, CC155, CC7, CC14/ST14, CC204, CC18, CC14/ST91, CC20, CC21, CC101, CC26, CC29, CC193, CC199, CC11/ST451, CC19/ST398	II
IIb	III	1/2b, 3b*, og 7*	CC3, CC87, CC5	I
IIc	II	1/2c og 3c*	CC9	II
IVa		4c*		III
IVb	IV	4b, 4d*, og 4e*	CC1, CC2, CC6, CC4, CC54	I

\* Dette er meget sjeldne typer.

\*\* For en mer helhetlig oversikt over korrespondanse mellom serotyping og MLST, se Figur 1 i [9].

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 [10, 11], GenoListeria Multiplex utviklet av ANSES (som skiller mellom 30 CC grupper, se Tabell 1) [8, 12], og **GENE-UP Typer fra bioMérieux** [13]. Se også avsnitt 5.2 og 5.3 i Delrapport 2 [1]. En evaluering av GENE-UP Typer på et datasett av norske listeria-isolater finnes i kapittel 4 i denne rapporten.

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.



### 3.2 Sekvenserings-baserte metoder inkludert MLST og WGS

Sanger-sekvensering (førstegenerasjons-sekvensering) av enkeltgener har lenge vært brukt 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. For eksempel er det vanlig å sekvensere genet for 16S ribosomalt RNA (rRNA) for å klassifisere bakterier inn i slekter og arter. 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 [14], 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). Sekvensen til de syv MLST-genene kan også trekkes ut fra helgenomsekvenseringsdata. 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). For listeria er for eksempel MLST profilen 6-5-6-4-1-4-1 tilordnet ST9. Vanligvis vil to forskjellige sekvenstyper utgjøre to separate og avgrensede genetiske grupper av bakterier, men de kan også være del av den samme gruppen av nært beslektede isolater: Husk at én enkelt mutasjon i et av de syv genene vil per definisjon føre til at den muterte stammen blir klassifisert som en annen ST, selv om dette er den eneste endringen som har skjedd i arvestoffet (genomet).

**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 hører 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 [15]. Merk at mens en tilordning til en ST er permanent, så vil en klassifisering av en ST i en gitt CC kunne endre seg over tid: Dersom det oppdages en ny ST som bare skiller seg med ett gen fra to forskjellige sekvenstyper som tilhører to ulike CC-grupper, fører dette per definisjon til at de to opprinnelige CC-ene slås sammen. For eksempel ville ST14 med profil 8-6-13-6-5-2-1 og ST91 med profil 7-6-15-6-5-2-1 vært tilordnet to forskjellige CC grupper (siden to av syv gener er forskjellige), dersom ikke det hadde blitt oppdaget et isolat med den sjeldne mellomliggende profilen 8-6-15-6-5-2-1 (ST208). Uheldigvis viser det seg at isolater som hører til henholdsvis ST14 og ST91 ikke er nært beslektede grupper innenfor arten listeria. Systemet kan altså få noen uheldige utslag dersom man følger det slavisk. Dette tas ofte hensyn til ved å definere en gruppe både med CC og ST, som for eksempel i GenoListeria Multiplex metoden [6, 10] hvor det skilles mellom CC14/ST14 og CC14/ST91.

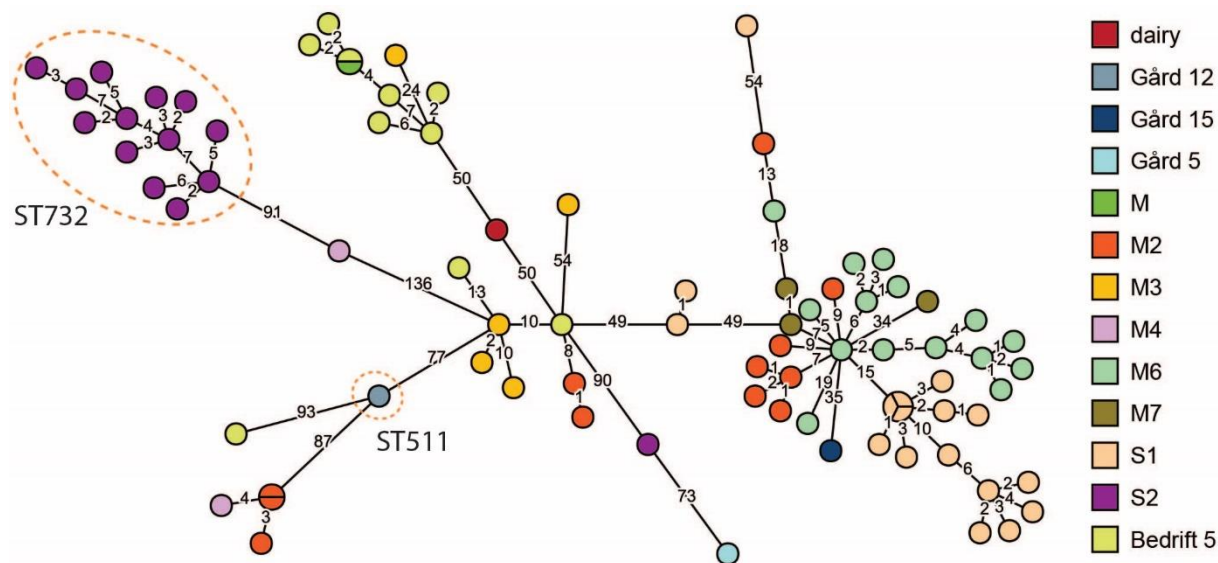
Det er mulig å utarbeide MLST-oppsett med mange ulike kombinasjoner av gener, men det oppsettet som forskersamfunnet har samlet seg om å bruke for listeria ble laget av Ragon og medarbeidere i 2008 [9]. Den felles MLST-databasen som alle bruker er administrert og forvaltet av Institut Pasteur [16]. ST- og CC-terminologien i dette oppsettet representerer det nåværende felles 'språket' som det forskere og myndigheter bruker i kommunikasjon rundt undergrupper av isolater innenfor arten listeria.

**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 sammenligne hele genomsekvensen mot en referanse (SNP-analyse). Deretter brukes mer eller mindre avanserte grupperings-metoder for å lage visualiseringer i form av fylogenetiske trær (se eksempel i Figur 2). For mer informasjon om helgenomsekvensering i matindustrien refereres det til en veileder [17].

**Hva sier ST og CC om slektskap mellom listeria-bakterier?** Dersom man har et datasett med helgenomsekvenser av beslektede listeria-isolater, og kjennskap til når disse er isolert, finnes det metoder for å estimere hvor langt tilbake i tid disse hadde samme felles opphav (mor-celle) [18]. Vi har tidligere utført denne type analyse på et datasett med 292 CC9 isolater fra norsk matindustri [19] og ett datasett med 280 CC7 isolater hovedsakelig fra Norge (40%) og andre europeiske land (37%) [20]. Resultatene viste at de norske CC9 isolatene hadde et felles opphav i en bakteriecelle som eksisterte rundt år 1935, mens den siste felles stamcellen for de analyserte CC7 isolatene fantes for omtrent 500 år siden. I en tilsvarende analyse utført av et stort team av forskere basert ved Institut Pasteur, på et datasett bestående av 1972 CC1 isolater, ble det beregnet at CC1 oppsto omkring år 200 e.Kr. i Nord-Amerika [21]. Selv om slike analyser er beheftet med betydelig usikkerhet, hovedsakelig fordi genetiske endringer avhenger av miljøbetingelser og dermed ikke skjer med konstant hastighet, antyder det noe om alderen på CC-gruppene i evolusjonshistorisk kontekst.

Dersom det eneste man vet om to isolater er at de begge er av typen CC9 (for eksempel), er det altså umulig å si om slektskapet sannsynligvis går 1 år tilbake i tid eller 100 år eller mer. Vi har også en rekke eksempler på at flere enn én genetisk undergruppe innenfor samme CC eller ST opptrer i samme fabrikk [19, 20, 22] (Figur 2). Dermed kan man ikke konkludere med at to isolater har en felles kilde innenfor den tidsskalaen som er relevant for matproduksjonsbedrifter utelukkende basert på informasjon om CC-type. Det som imidlertid er mulig å si, er at to isolater som ikke er av samme CC-type, ikke har samme kilde. Sannsynligheten for felles kilde øker dessuten dersom det dreier seg om en sjelden CC-type.

Tommelfingerregelen som ofte brukes i forbindelse med utbruddsetterforskninger er at dersom to isolater ikke har flere enn rundt 5 til 10 forskjeller i en cgMLST analyse (hvor ca. 1700 forskjellige gener blir analysert), er det sannsynlig at de har en felles kilde i den tidsrammen som er relevant for persistens i matproduksjonsmiljøer og for epidemiologisk arbeid med utbruddsopklaringer.



**Figur 2: Helgenomsekvenseringsanalyse med wgMLST for CC7-isolater fra Norge vist som et minimum spanning tre (MST). Alle isolatene er ST7 bortsett fra de som er merket som ST732 eller ST511. Hver farge representerer én fabrikk eller ett gårdsbruk. Hver node (sirkel) i grafen representerer ett eller flere listeria-isolater, hvor arealet av noden er proporsjonalt med antallet isolater. Antall wgMLST-forskjeller mellom isolatene er angitt på kantene (linjene) som forbinder nodene.**

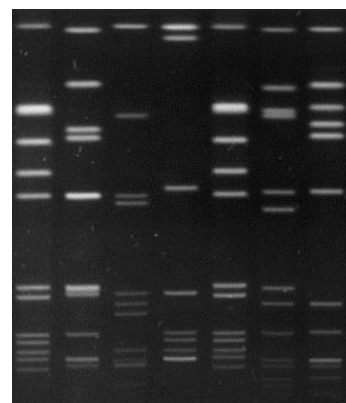
Metoder basert på sekvensering og sammenligning av gen-sekvenser for gener som er felles i et gitt datasett utnytter variasjon forårsaket av enkelt-base-mutasjoner i det konserverte kjernegenomet, og gir derfor som regel en god representasjon av populasjonsstruktur og evolusjonær historie.



### 3.3 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 restriksjonsenzymene, og visualisering av størrelsen på de resulterende DNA-fragmentene på en agarosegel (se Figur 3). PFGE ble første gang brukt på listeria i 1991 [23] og var gullstandarden for typing av listeria i epidemiologisk overvåking og utbrudds-etterforskning i to tiår, fram til helgenomsekvensering tok over omtrent rundt 2017. Metoden var den mest diskriminerende typingsmetoden man hadde, og det ble utarbeidet en standardisert protokoll, inkludert kutting med *Ascl* og *Apal* enzymene, for å kunne sammenligne resultater mellom laboratorier [24]. Mønsteret av fragmenter er det som identifiserer forskjellige PFGE 'pulsotyper'. Innskudd, fjerning, eller flytting av såkalte 'mobile genetiske elementer' er den type endringer i arvestoffet som forårsaker forskjeller i størrelse på fragmentene på gelen. Mobile genetiske elementer er genetisk materiale som kan flytte på seg innad i et genom, eller tas opp fra eksterne kilder i miljøet, for eksempel plasmider eller lysogene bakteriofager (bakterievirus som integrerer sitt genmateriale i verts-celle DNA). Slike endringer er relativt dynamiske prosesser i bakteriestammer, og sammen med det faktum at man (i prinsippet) undersøker hele genomet i PFGE, og ikke bare utvalgte biter som i for eksempel MLST, gir dette metoden høy oppløselighet.

PFGE-metoden er imidlertid relativt arbeidskrevende å utføre, og sammenligning av resultater kan være utfordrende. Dessuten, sammenlignet med helgenomsekvensering, er det vanskeligere å tolke data fra PFGE. Noen PFGE profiler (pulsotyper) 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) [25].



Figur 2: Eksempel på syv PFGE profiler fra kutting av genomisk DNA fra listeria med *Apal*. Figuren er hentet fra [24].

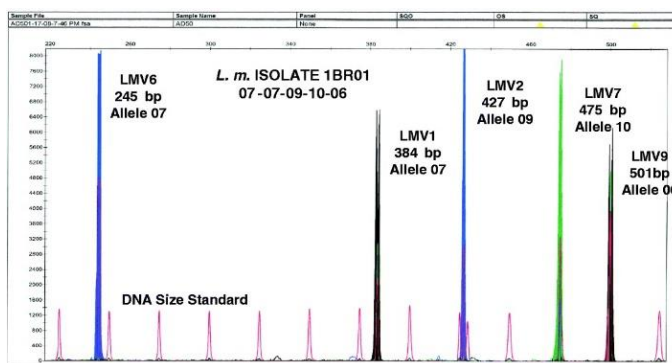
**Hvor mye mer diskriminerende enn MLST er PFGE?** Det kan variere mellom CC-gruppene om det er MLST eller PFGE som diskriminerer best. Dette er vist i flere studier, for eksempel i en undersøkelse av 255 listeria-isolater fra mange ulike kilder [26]. Der ble det identifisert 25 forskjellige CC-grupper og 123 forskjellige PFGE profiler. **Innenfor CC1** var 30 av 63 isolater ST1, og de resterende 33 fordelte seg på 25 forskjellige ST. PFGE klarte å separere de 30 ST1-isolatene i ulike 14 pulsotyper, og totalt ble det funnet 28 pulsotyper i CC1. **Innenfor CC7** var 10 av 22 isolater ST7, og de resterende 12 CC7-isolatene hadde alle ulike MLST sekvenstyper. PFGE klarte å separere de 10 ST7-isolatene inn i 9 ulike pulsotyper, og totalt ble det funnet 13 forskjellige pulsotyper i CC7. **Innenfor CC9** ble de 23 isolatene i datasettet separert i 10 forskjellige MLST sekvenstyper og 5 forskjellige pulsotyper.

**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. MLVA ble første gang brukt til å type listeria i 2007 [27]. Metoden utnytter at det finnes gener som inneholder regioner med korte gjentakende enheter (såkalte 'VNTR loci' eller 'VNTR-gener'). For eksempel finnes det et område med ca. 15 til 25 tandem repetisjoner av sekvensen 'TTGTAT' i genet for listeria endopeptidase p60. Et ulikt antall av den repeterende enheten oppstår i forskjellige stammer på grunn av en vanlig feilmekanisme ved kopiering av DNA før en celledeling ('slipped-strand mispairing'). PCR-amplifisering av slike gener fra forskjellige listeria vil derfor gi PCR-fragmenter med ulik lengde, avhengig av antallet repetererte enheter. Etter PCR separeres fragmentene på et kapillær-elektroforese instrument for å bestemme lengdene (ofte samme type instrument som brukes til Sanger-sekvensering) (se Figur 4).

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. Fragment-størrelsene ble kodet om til en rekke med fem tall, for eksempel 07-07-09-10-06 (se

Figur 4). En studie fra 2013 identifiserte totalt 18 VNTR-gener i listeria, og utarbeidet fra det et optimalisert oppsett med 11 gener [26]. Eurofins Norge har siden 2016 tilbudt en MLVA genotypingsmetode som bruker 13 VNTR-gener [29].

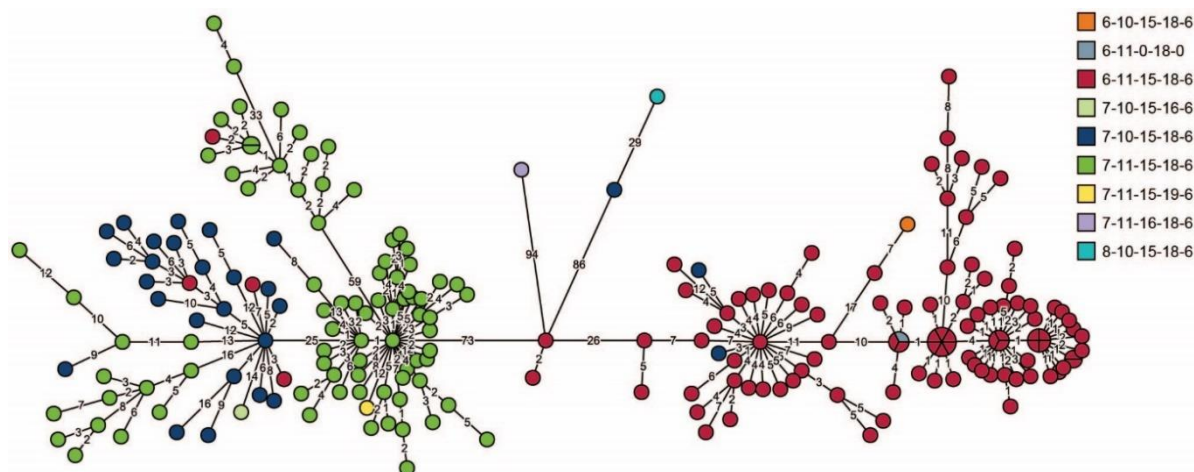
Fordelen med MLVA er at den er relativt rask, billig og enkel, sammenlignet med PFGE og MLST. Det har imidlertid vært rapportert at resultatene er instrumentavhengige, og at det dermed kan være vanskelig å sammenligne MLVA-profiler fra analyser utført på forskjellige instrumenter eller laboratorier.



Figur 3: Eksempel på MLVA for listeria analysert på kapillær-elektroforese instrument. Blå, svarte og grønne topper viser de forskjellige VNTR-genene og røde topper viser interne størrelses-markører. Figuren er hentet fra [30].

Oppløseligheten er naturlig nok avhengig av utvalget av VNTR-gener som er brukt, og som for PFGE varierer det mellom CC-gruppene hvor godt MLVA separerer. En norsk studie fra 2013 viste at 70% av 71 norske kliniske isolater hadde samme MLVA-profil når de ble typet med FHI's MLVA-oppsett med fem VNTR loci [30]. Denne MLVA-typen har senere vist seg å korrespondere med CC7. For CC9, som er en CC-type som er relativt vanlig i mat in Norge, klarte imidlertid FHI's MLVA-metode å skille mellom tre forskjellige undergrupper, og den var dermed mer sensitiv enn MLST.

En sammenligning av MLVA resultater innenfor CC9 på et datasett av norske isolater som er analysert med helgenomsekvensering er vist i Figur 5. Nært beslektede undergrupper av CC9, som vises som klynger av isolater ('klustere') i figuren, har ikke alltid samme MLVA profil, noe som kan føre til feiltolkninger av typingsresultater. Hvis for eksempel den grønne profilen i Figur 5 holder til i en nisje i én del av anlegget, og man identifiserer et isolat typet med 'rød' profil i dette området, så er den mest nærliggende tolkningen at isolatet har kommet dit på grunn av smitte utenfra. Helgenomsekvenseringsanalysen viser imidlertid at begge isolatene er av samme type, men at det første VNTR-genet i MLVA-profilen har endret lengde. Fordi antall repetisjoner i et VNTR-gen relativt enkelt kan endre seg er slike resultater ikke uventede. Det er også denne egenskapen som gjør metoden relativt sensitiv.



Figur 5: Helgenomsekvenseringsanalyse med wgMLST for CC9-isolater fra Norge. Samme farge på ringene indikerer samme MLVA profil i FHI's oppsett basert på fem VNTR-gener. Se nærmere forklaring på figuren i figurtekst for Figur 2.

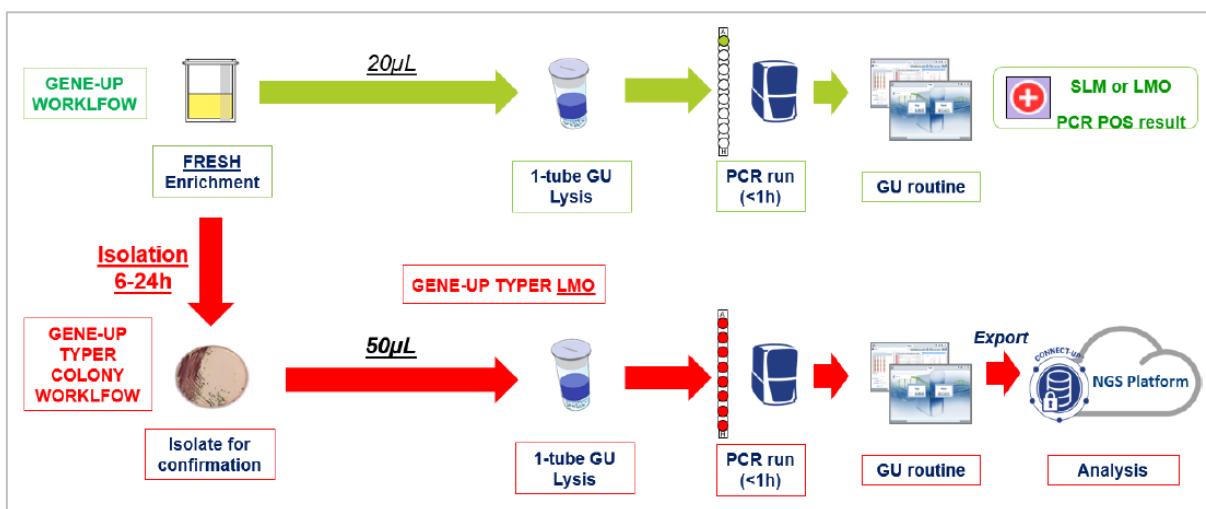
Metoder som skiller mellom bakterie-isolater basert på forskjeller i lengden på DNA-fragmenter utnytter variasjoner som oppstår på grunn av større eller mindre strukturelle endringer i arvestoffet, for eksempel forflytninger, duplikasjoner, utkuttninger ('delesjoner'), eller opptak av eksternt genetisk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

## 4 GENE-UP Typer

### 4.1 Prinsipp

GENE-UP Typer fra bioMérieux [13, 31] er en molekylær genotypingsmetode basert på real-time PCR (se avsnitt 3.1). Vi har fått informasjon om prinsippet bak metoden gjennom møter med bioMérieux-representanter og ved å studere informasjonsmateriell som bioMérieux har gitt oss tilgang til.

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 [32] (se også Delrapport 1 [33]). 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. Den praktiske arbeidsflyten er illustrert i Figur 6.



Figur 6: GENE-UP Typer arbeidsflyt-diagram for analyse av *L. monocytogenes*. Figuren er laget av bioMérieux [31].

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 genvariantene 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 slektskapstree som ble brukt til utvelgelse av markørgener. Jo lengre adresse (tallrekke) som oppgis, desto mer nøyaktig posisjon i tree kan fastsettes, og dette korresponderer med et typingsresultat med økende nøyaktighet. Terminologien ligner 'SNP adressene' i den bioinformatiske metoden som Public Health England har valgt å bruke for å sammenligne slektskap mellom bakterieisolater etter helgenomsekvensering [34].

Hvert nivå i GENE-UP Typer adressen svarer til forskjellige nivåer av genetisk likhet. For eksempel forteller tall nummer to (nivå 2) i tallrekken hvilken listeria-slektslinje isolatet tilhører: 1 svarer til linje I og 2 svarer til linje II. Nivå 11 skal svare til en teoretisk forskjell på 300 forskjeller i en kjernegenom-MLST (cgMLST) analyse (se avsnitt 3.1). Dersom det i en GENE-UP Typer analyse av et listeria-isolat er mulig å plassere isolatet i tree med nøyaktighet tilsvarende nivå 11 i GENE-UP Typer adressen, blir isolatet i tillegg tilordnet et **GENE-UP Typer klusternummer**. For eksempel vil et isolat med (eller som begynner med) adressen '1.2.2.2.61.70.75.75.77.79.85' bli tilordnet GENE-UP Typer klusternummer 85. Disse klusternumrene representerer terminologien som GENE-UP Typer metoden bruker på forskjellige populasjonsgenetiske grupper. Siden nivå 11 også er oppgitt å tilsvare en genetisk avstand

på 300 cgMLST-forskjeller følger det at to isolater med samme klusternummer har et slektskapsnivå på mellom 0 og 300 cgMLST forskjeller.

Dersom et GENE UP Typer klusternummer ikke kan tilordnes, kan den delvise adressen ofte fortsatt gi noe informasjon om slektskap mellom isolater – to isolater med forskjellig del-adresse tilhører ikke samme genetiske gruppe. I tillegg til adresse og klusternummer gir en GENE-UP Typer analyse en prediksjon av MLST sekvenstype (ST) og klonalt kompleks (CC), sammen med prosentandel sannsynlighet for at disse prediksjonene er korrekte.

## 4.2 Fremgangsmåte

Siden GENE-UP Typer metoden er basert på påvisning av spesifikke gener eller gen-varianter ved hjelp av PCR, er det lett å søke etter disse sekvensene ved hjelp av databehandling, dersom man allerede har helgenomsekvensen for et isolat. GENE-UP Typer analysen som presenteres i dette kapitlet ble utført på denne måten, og ikke i en laboratorie-analyse med real-time PCR på et GENE-UP instrument.

Et datasett på 1241 helgenomsekvenser fra norske listeria-isolater ble sendt til analyse hos bioMérieux. Disse var fra 1078 tidligere publiserte genomsekvenser [19, 22, 35-37], 111 norske kliniske isolater [35, 38], og 52 foreløpig ikke-publiserte sekvenser (Nofima). Disse utgjorde totalt 40 forskjellige CC-grupper, hvorav halvparten hadde 10 eller færre representanter. ST- og CC-klassifikasjonen var bestemt på forhånd utfra sekvensene. Datasettet er også tidligere typet med wgMLST, og denne analysen ble brukt til å se nærmere på enkelte grupper basert på resultatene fra GENE-UP Typer analysen.

Målsetningen med analysen var å undersøke i hvilken grad GENE-UP Typer klustrene som fremkommer i det analyserte datasettet korresponderer med kjente genetiske grupper basert på MLST og helgenomsekvenseringsanalyser, og deretter vurdere hvor diskriminerende metoden er, sammenlignet med andre genotypingsmetoder og helgenomsekvensering.

## 4.3 Analyseresultater

**GENE-UP Typer klarte å tilordne riktig MLST CC-gruppe i nesten alle tilfeller (98%).** Det eneste tre unntakene var: 1) En gruppe med 29 isolater av CC177 hvor ingen CC-gruppe var tilordnet. Dette skyldes antagelig at det ikke fantes noen CC177 i det datasettet som GENE-UP Typer er basert på. 2) Ett isolat av CC9. Dette var et atypisk isolat som mangler noen gener som de aller fleste andre CC9 inneholder, men som helgenomsekvensering viser at har meget nært slektskap med resten av CC9-isolatene. Antagelig er årsaken til feilklassifiseringen at genomet også mangler den eller de markørene i GENE-UP Typer PCR-mønsteret som definerer CC9. 3) Ett isolat av ST11/CC11 ble typet til CC14. Dette er ett av tilfellene der GENE-UP Typer ga bedre resultat enn CC-klassifikasjonen – helgenomsekvenseringsanalysen viser at ST11-isolatert reelt sett er nærmere beslektet med CC14 enn med de andre ST-typene som ifølge CC-klassifikasjonen er tilordnet CC11.

**GENE-UP Typer tilordnet riktig MLST sekvenstype (ST) for 87% av isolatene.** For 9% av tilfellene var ingen ST foreslått og for 4% var det tilordnet feil ST. Feil ST forekom som regel fordi den mest vanlige sekvenstypen i en CC-gruppe var foreslått, mens isolatet var av en mindre vanlig type. Analysen ser altså ut til å ikke alltid skille mellom ST innad i en CC.

**GENE-UP Typer tilordnet et GENE-UP Typer klusternummer for 86,5% av isolatene.** Tabell 2 viser en oppsummering av samsvar mellom GENE-UP Typer klusternummer og CC-grupper identifisert ved helgenomsekvensering for det analyserte datasettet. Resultatene viste at for isolatene i datasettet som fikk tilordnet et GENE-UP Typer kluster, så samsvarte hvert kluster i de fleste tilfeller med én enkelt CC-gruppe. I Tabell 2 er disse gruppene markert på grønn bakgrunn. For eksempel ble alle 53 CC1 isolatene i datasettet – og bare disse - typet til GENE-UP Typer klusternummer 13. Dette var tilfellet også for flere CC-grupper som er vanlig å finne i norsk matindustri, som for eksempel CC7, CC8, og CC121 (som





( $\leq 1100$  wgMLST forskjeller) at det her er CC-klassifikasjonen som har begrenset oppløselighet. De resterende 11 CC4-isolatene ble korrekt tilordnet ST4, men besto av både isolater som fikk tilordnet klusternummer 6 og en GENE-UP Typer adresse på 12 nivåer, og isolater med en GENE-UP Typer adresse på bare 6 nivåer. Helgenom-sekvenseringsanalysen viste ingen forskjell i gruppering for isolatene med adresse på 6 og 12 nivåer. At det finnes grupper av isolater, med adresser på forskjellige nivåer, betyr altså ikke at isolatene tilhører genetisk forskjellige grupper.

For **CC20** klassifiserte GENE-UP Typer fire ST647-isolater som kluster 32, og 20 ST20-isolater som kluster 60, og korrekt ST ble predikert av GENE-UP Typer for alle isolatene. Helgenom-sekvenseringsanalysen viste at disse to gruppene faktisk ikke er spesielt nært beslektet ( $\leq 1100$  wgMLST-forskjeller), og at det dermed også her er CC-klassifikasjonen som har begrenset oppløselighet.

I tillegg til nevnte CC11 og CC4 inneholdt tre andre CC-grupper (CC14, CC19 og CC31) **noen isolater som ble tilordnet et GENE-UP typer kluster og andre som ikke ble det.**

Som nevnt i avsnitt 3.2 utgjør **CC14** et tilfelle der CC-klassifikasjonen er direkte misvisende, og isolatene innenfor CC14 hører til genetiske populasjoner som ikke er beslektet; CC14/ST14 og CC14/ST91. I dette tilfellet ble isolatene som tilhørte CC14/ST91 predikert til å være ST91, og tilordnet GENE-UP Typer klusternummer 70. De resterende CC14-isolatene tilhørte CC14/ST14, og alle hadde samme GENE-UP Typer adresse, med 9 nivåer. Denne gruppen inneholdt imidlertid isolater av typene ST14, ST399 og ST11, som ikke er spesielt nært beslektet ( $\leq 800$  wgMLST-forskjeller), selv om de korrekt tilhører samme CC-gruppe. I dette tilfellet er det altså ikke nok oppløselighet i GENE-UP Typer metoden for å skille mellom de forskjellige genetiske gruppene innenfor CC14/ST14. Derimot viser de forskjellige adressene, som skiller lag på nivå 5, at CC14/ST14 og CC14/ST91 tilhører ulike genetiske grupper.

Innenfor **CC19** ble isolatene som tilhører ST19, pluss to isolater av ST1416, tilordnet GENE-UP Typer klusternummer 21 og predikert å være ST19. De resterende isolatene, som besto av ST398, ST802 og 26 ST1416-isolater, ble tilordnet samme GENE-UP Typer adresse, med 9 nivåer. Dette resultatet ligner på det som ble oppnådd for ST4-isolatene: Selv om alle ST1416-isolatene ifølge helgenom-sekvenseringsanalysen er meget nært beslektet, ble noen tilordnet et klusternummer mens andre forble uklassifiserte.

#### 4.4 Oppsummering

Oppløseligheten for GENE-UP Typer ligger omtrent på nivå med CC-gruppene som er basert på MLST (se avsnitt 3.2) og resultatene korresponderer bra med MLST-metoden. Noen ganger har GENE-UP Typer høyere oppløselighet enn CC-klassifikasjonen, for eksempel skiller den mellom ST219 og ST4 innenfor CC4, og mellom ST20 og ST647 innenfor CC20. Andre ganger er oppløseligheten lavere; for eksempel klarte ikke GENE-UP Typer å angi CC177 og ga feil resultat for ett isolat av typen CC9. At oppløseligheten for GENE-UP Typer ligger på nivå med CC-grupper betyr samtidig (se kapittel 3) at oppløseligheten jevnt over er lavere enn for MLST-basert ST-klassifikasjon, MLVA og PFGE.

bioMérieux oppgir at en egenskap ved GENE-UP Typer metoden er at en liten prosentandel av prøvene ikke kan tilordnes til et bestemt GENE-UP Typer kluster. I det analyserte datasettet ble over 13% av isolatene ikke klassifisert til et slikt kluster. Avhengig av hvilke forventninger man har, og selv om noe informasjon også kan leses ut av kortere GENE-UP Typer adresser, vil dette kanskje anses som et relativt høyt antall. Imidlertid kan man innvende at en av de største fordelene med GENE-UP Typer som genotypingsmetode er at informasjon om hvilke resultater som er usikre blir oppgitt, istedenfor å tilordne isolatet til en feil eller misvisende genetiske gruppering. Dette er et problem for mange av de velkjente genotypingsmetodene, og kanskje i høyest grad for MLVA (se Figur 5).

En rekke studier har allerede vist at det generelt sett ikke er tilstrekkelig med en genotypingsmetode som har oppløselighet på nivå med MLST for å spore smitte i næringsmiddelkjeden eller i produksjonsmiljøet i bedrifter [19, 20, 22, 36]. Dette gjelder også GENE-UP Typer metoden.



## 5 Hva nå for genotyping av listeria?

Etter et par tiår hvor forskere utviklet stadig mer sensitive, nøyaktige, enklere eller raskere genotypingsmetoder, fikk helgenomsekvensering sitt gjennombrudd for litt over 10 år siden. Dette skjedde etter at forskere ved amerikanske Food and Drug Administration i 2011 demonstrerte hvor nyttig denne teknikken kan være for å avsløre de små genetiske forskjellene som kan være utslagsgivende for vellykket sporing av matbårne utbrudd [39]. Helgenomsekvensering er den overlegent mest sensitive typingsmetoden, og den åpenbare gullstandarden for epidemiologiske analyser og annen smittesporing. Det var (er) antagelig forventet at helgenomsekvensering på sikt ville ta over for alle de andre metodene, slik den immunologiske serotype-metoden ble erstattet av molekylære genotypingsmetoder.

Foreløpig er den største utfordringen for bruk av helgenomsekvensering, kanskje særlig i matindustrien, at metoden tar for lang tid, selv om kostnader antagelig også er en viktig barriere. Teknologisk utvikling og økt bruk forventes å redusere prisen og analys tiden. Det vil likevel antageligvis ikke bli praktisk mulig å komme under 2 til 3 døgn fra prøveuttak til svar, siden metoden (som for alle genotypingsmetodene) er avhengig av at man først framskaffer et enkelt-isolat av bakterien [17, 33].

I mellomtiden ser det i hvert fall ut som det stadig finnes et marked for alternative genotypingsmetoder for listeria, da det fortsatt kommer nye metoder på markedet, eksempelvis GENE-UP Typer. Utfordringen nå er antagelig å utvikle en rask, praktisk og sensitiv metode som klarer å skille de genetiske gruppene vi nå er klar over at eksisterer, gitt kunnskapen som nå er tilgjengelig fra detaljerte studier av listeria-populasjoner gjennomført med helgenomsekvensering. Slike metoder vil fortsatt ha nytteverdi, selv om man i tvilstilfeller eller i tilfeller der høy oppløselighet kreves, likevel vil være avhengig av å bruke helgenomsekvensering for å få nøyaktige svar.

Dersom man er i en situasjon der man skal å velge hvilken genotypingsmetode man skal benytte (altså en enklere metode enn helgenomsekvensering), er det en ting som kan være verd å tenke på: **Er helgenomsekvensering bakoverkompatibel med genotypingsmetoden man velger?** Det vil si; går det an å lese genotypingsresultatet direkte utfra helgenomsekvensdataene? Dette er spesielt relevant dersom man benytter en kombinasjon av metoder, for eksempel utfører enklere genotyping på mange (eller de fleste) isolater og helgenomsekvensering på et utvalg, eller man vil sammenligne egne resultater med eksternt tilgjengelige helgenomsekvenseringsdata. Helgenomsekvensering er automatisk bakoverkompatibelt med metoder basert på PCR og MLST, da det er lett å se utfra genomsekvensen om et gitt gen eller en genvariant er til stede. For metoder som baserer seg på forskjeller i fragmentlengder, som PFGE og MLVA, er det imidlertid vanligvis ikke mulig å trekke ut profilen fra en helgenomsekvens. Dette henger sammen med at NGS-teknologien ofte har problemer med å bestemme nøyaktig DNA-sekvens for (eller i regioner med) repeterte områder i genomet.

### **For å konkludere:**

Helgenomsekvensering med slektskapsanalyser basert på cgMLST, wgMLST eller SNP-analyser har høy oppløselighet og kan gi mye informasjon om sannsynlige smittekilder, smittespredning og egenskaper hos listeria. Andre eksisterende typingsmetoder (f.eks. MLST, MLVA, eller GENE-UP Typer) er for grovmaskede til dette formålet, men kan gi raskere svar og enklere databearbeiding. Selv om informasjon om at to listeria-isolater tilhører samme CC-gruppe eller samme GENE-UP Typer kluster vanligvis ikke er tilstrekkelig til å konkludere at de har samme smittekilde, kan slik kunnskap brukes til å vurdere risiko [40] og som en indikasjon på etablering og eliminering av husstammer. Pålitelig informasjon om at to isolater er forskjellige kan dessuten brukes til å avkrefte en mulig smittekilde. Et av bruksområdene hvor enklere genotypingsmetoder har stort potensiale er som et utgangspunkt for valg av hvilke isolater det er relevant å sende videre til helgenomsekvensering.

## 6 Referanser

1. Moen, B., Langsrud, S. and Fagerlund, A. 2024. Metoder for påvisning av *Listeria* i mat og produksjonsmiljø – Delrapport 2: Nye metoder og teknologier. Nofima rapportnummer 6/2024; <https://www.fhf.no/prosjekter/prosjektbasen/901822/>.
2. Maury, M.M., *et al.*, 2016. Uncovering *Listeria monocytogenes* hypervirulence by harnessing its biodiversity. *Nat Genet*, **48**:308-313.
3. Seeliger, H.P.R. and Höhne, K. 1979. Chapter II Serotyping of *Listeria monocytogenes* and related species. *Method Microbiol*, **13**:31-49.
4. Mullis, K.B. 1990. The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Sci Am*, **262**:56-61, 64-65.
5. Doumith, M., *et al.*, 2004. Differentiation of the major *Listeria monocytogenes* serovars by multiplex PCR. *J Clin Microbiol*, **42**:3819-3822.
6. Kérouanton, A., *et al.*, 2010. Evaluation of a multiplex PCR assay as an alternative method for *Listeria monocytogenes* serotyping. *J Microbiol Methods*, **80**: 134-137.
7. Vitullo, M., *et al.*, 2013. Real-time PCRs assay for serogrouping *Listeria monocytogenes* and differentiation from other *Listeria* spp. *Mol Cell Probes*, **27**:68-70.
8. Félix, B., *et al.*, 2023. Identification by high-throughput real-time PCR of 30 major circulating *Listeria monocytogenes* Clonal Complexes in Europe. *Microbiol Spectr*, **11**:e0395422.
9. Ragon, M., *et al.*, 2008. A new perspective on *Listeria monocytogenes* evolution. *PLoS Pathog*, **4**:e1000146.
10. Rheonix. Listeria PatternAlert assay. <https://rheonix.com/food-beverage-testing/listeria-patternalert-assay/>.
11. Mermelstein, N.H. 2019. Automated assay maps persistent *Listeria*. *Food Technology Magazine*, **73**. <https://www.ift.org/news-and-publications/food-technology-magazine/issues/2019/october/columns/foodsafety-automated-assay-maps-persistent-listeria>.
12. Félix, B., 2023. GenoListeria Multiplex: Identification by multiplex real-time PCR of 30 major clonal complexes of *Listeria monocytogenes* strains. ANSES/LSAliments/LSA-INS-1517-Version 03; <https://doi.org/10.5281/zenodo.10037483> .
13. bioMérieux. GENE-UP Typer. <https://www.biomerieux.com/corp/en/our-offer/industry-products/gene-up-typer.html>.
14. Maiden, M.C., *et al.*, 1998. Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**:3140-3145.
15. Feil, E.J., 2004. Small change: keeping pace with microevolution. *Nat Rev Microbiol*, **2**:483-495.
16. Institut Pasteur. The Listeria Pasteur MLST sequence definition database. <https://bigsd.b.pasteur.fr/listeria/>.
17. Langsrud, S., *et al.*, 2023. Veileder: Bruk av helgenomsekvensering for forebygging og kontroll av *Listeria monocytogenes* i matindustrien. Nofima. <https://zenodo.org/records/10468595>.
18. Suchard, M.A., *et al.*, 2018. Bayesian phylogenetic and phylodynamic data integration using BEAST 1.10. *Virus Evol*, **4**:vey016.
19. Fagerlund, A., Langsrud, S., and Mørretrø 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**:e00579-20.
20. Mørretrø, T., *et al.*, 2024. Genomic analysis of *Listeria monocytogenes* CC7 associated with clinical infections and persistence in the food industry. *Int J Food Microbiol*, **410**:110482.
21. Moura, A., *et al.*, 2021. Emergence and global spread of *Listeria monocytogenes* main clinical clonal complex. *Sci Adv*, **7**(49):eabj9805.
22. Fagerlund, A., *et al.*, 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**:e0086122.

23. Carriere, C., *et al.*, 1991. DNA polymorphism in strains of *Listeria monocytogenes*. J Clin Microbiol, **29**:1351-1355.
24. Graves, L.M. and Swaminathan, B. 2001. PulseNet standardized protocol for subtyping *Listeria monocytogenes* by macrorestriction and pulsed-field gel electrophoresis. Int J Food Microbiol, **65**:55-62.
25. Barrett, T.J., Gerner-Smidt, P., and Swaminathan B. 2006. Interpretation of pulsed-field gel electrophoresis patterns in foodborne disease investigations and surveillance. Foodborne Pathog Dis, **3**:20-31.
26. Chenal-Francisque, V., *et al.*, 2013. Optimized multilocus variable-number tandem-repeat analysis assay and its complementarity with pulsed-field gel electrophoresis and multilocus sequence typing for *Listeria monocytogenes* clone identification and surveillance. J Clin Microbiol, **51**:1868-1880.
27. Murphy, M., *et al.*, 2007. Development and application of Multiple-Locus Variable number of tandem repeat Analysis (MLVA) to subtype a collection of *Listeria monocytogenes*. Int J Food Microbiol, **115**:187-194.
28. Lindstedt, B.A., *et al.*, 2008. 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, **72**:141-148.
29. Eurofins Norge. Genotyping. <https://web.archive.org/web/20161018153611/https://www.eurofins.no/food-feed-testing/vaare-tjenester/genotyping/>.
30. Lunestad, B.T., Truong, T.T., and Lindstedt, B.A. 2013. A multiple-locus variable-number tandem repeat analysis (MLVA) of *Listeria monocytogenes* isolated from Norwegian salmon-processing factories and from listeriosis patients. Epidemiol Infect, **141**:2101-2110.
31. bioMérieux, 2023. GENE-UP Typer process overview. Version June 2023.
32. AFNOR Certification, 2021. 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](https://nf-validation.afnor.org/en/wp-content/uploads/sites/2/2017/05/Synt-BIO-12-40-11-16_en.pdf).
33. Moen, B., Langsrud, S., and Fagerlund A. 2023. Metoder for påvisning av *Listeria* i mat og produksjonsmiljø – Delrapport 1: Hurtigmetoder på markedet. Nofima rapportnummer 18/2023; <https://www.fhf.no/prosjekter/prosjektbasen/901822/>.
34. Dallman, T., *et al.*, 2018. SnapperDB: a database solution for routine sequencing analysis of bacterial isolates. Bioinformatics, **34**:3028-3029.
35. Fagerlund, A., *et al.*, 2022. Whole-genome sequencing analysis of *Listeria monocytogenes* from rural, urban, and farm environments in Norway: Genetic diversity, persistence, and relation to clinical and food isolates. Appl Environ Microbiol, **88**:e02136-21.
36. Fagerlund, A., *et al.*, 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**:e0151117.
37. Ivanova, M., *et al.*, 2023. Large-scale phenotypic and genomic characterization of *Listeria monocytogenes* susceptibility to quaternary ammonium compounds. bioRxiv, <https://doi.org/10.1101/2023.09.07.556668>
38. Van Walle, I., *et al.*, 2018. Retrospective validation of whole genome sequencing-enhanced surveillance of listeriosis in Europe, 2010 to 2015. Euro Surveill, **23**:1700798.
39. Lienau, E.K., *et al.*, 2011. Identification of a salmonellosis outbreak by means of molecular sequencing. N Engl J Med, **364**:981-982.
40. FAO and WHO. 2022. *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat (RTE) foods: attribution, characterization and monitoring – Meeting report. Microbiological Risk Assessment Series No. 38. Rome. <https://doi.org/10.4060/cc2400en>.