

Sunniva Hoel, Anita Nordeng Jakobsen, Lisbeth Mehli og
Jørgen Lerfall

Kartlegging av *Listeria monocytogenes* i fôr og sjøfase ved produksjon av atlantisk laks (*Salmo salar*)

Trondheim 30.11 2021

NTNU
Norges teknisk-naturvitenskapelige universitet
Fakultet for naturvitenskap
Institutt for bioteknologi og matvitenskap



Rapport

Kartlegging av *Listeria monocytogenes* i fôr og sjøfase ved produksjon av atlantisk laks (*Salmo salar*)

VERSJON

1

DATO

30.11.2021

FORFATTER(E)

Sunniva Hoel
Anita Nordeng Jakobsen
Lisbeth Mehli
Jørgen Lerfall

PROSJEKTNUMMER

FHF 901591

ANTALL SIDER OG VEDLEGG

17

OPPDRAGSGIVER

Fiskeri og havbruksnæringens
forskningsfinansiering (FHF)

OPPDRAGSGIVER REF.

FHF 901591

Sammendrag

Forekomst av *Listeria monocytogenes* er en kjent utfordring i lakseindustrien. Bakterien kan etablere seg i produksjonsmiljøet, kontaminere produkter ved prosessering og utgjøre en potensiell risiko for forbrukere, spesielt de som tilhører risikogrupper. I prosjektet «Kartlegging av *Listeria monocytogenes* i sjøfasen ved produksjon av atlantisk laks (TraceListeria)» (FHF 901591) har vi gjennom en systematisk fareanalyse, dialog med involverte aktører og befarings ved ulike anlegg i verdikjeden for produksjon av atlantisk laks, kartlagt forekomst av *L. monocytogenes* og andre *Listeria*-arter i hele verdikjeden. Denne rapporten presenterer resultater fra verdikjede fôr og fra sjøfasen. Det ble tatt 339 miljø- og fôrprøver fra produksjons- og distribusjonskjeden til tre norske fôrprodusenter. Det ble påvist *L. monocytogenes* i 8 % av prøvene, og resultatene indikerer en høyere forekomst av *L. monocytogenes* i miljøprøver enn i fôrprøver. Fra sjøfasen ble det tatt 875 prøver av levende og død fisk i merder hos tre oppdrettsanlegg i Midt-Norge, samt 147 prøver i forbindelse med brønnbåttransport av levende, slakteklar fisk fra anleggene (totalt 1022 prøver fra sjøfasen). Forekomsten av *L. monocytogenes* i levende og død fisk i sjøfasen var svært lav (1 %), og bakterien ble påvist i kun ett av tre oppdrettsanlegg. Det ble ikke påvist *L. monocytogenes* i miljø- og vannprøver fra brønnbåt der kun sporadisk påvisning av andre *Listeria*-arter ble observert. Prøvetaking fra fôr- og sjøfase viser at *L. monocytogenes* og andre *Listeria*-arter kan påvises i fôr og produksjons- og lagringsmiljøet til fôr (inkludert fôrflåter), i sjøfasen på overflaten av død og levende fisk i merdene samt i brønnbåter. Forekomsten er relativt lav og oppfølging med genetiske analyser av de bevarte bakterieisolatene vil potensielt gi kunnskap om smitteveier for *Listeria* i verdikjeden til atlantisk laks.

Abstract

The presence of *Listeria monocytogenes* is a recognized challenge in the salmon industry. The bacterium can establish and prevail in the production environment, contaminate products during processing and pose a potential risk to consumers, especially those belonging to risk groups. In the project «Tracing *Listeria monocytogenes* along the value chain in production of Atlantic salmon (TraceListeria)» financed by FHF – Norwegian Seafood Research Fund, we have through a systematic hazard analysis, dialogue with stakeholders and inspections at different facilities in the value chain for production of Atlantic salmon, mapped the occurrence of *L. monocytogenes* and other *Listeria* species along the entire production chain. This report presents results from the feed and sea phase value chains. A total of 339 environmental and feed samples were taken from the production and distribution chain of three Norwegian feed producers. *L. monocytogenes* were detected in 8% of the samples, and the results indicate a higher prevalence of *L. monocytogenes* in environmental samples than in feed samples. From the sea phase, 875 samples from live and dead fish were collected from sea cages at three fish farms in Central Norway, in addition to 147 samples in connection with well boat transport of live, ready-to-slaughter fish from the facilities (a total of 1022 samples from the sea phase). The prevalence of *L. monocytogenes* in samples from live and dead fish was low (1%), and the bacterium was detected in only one of three fish farms. *L. monocytogenes* was not detected in environmental and water samples from well boats where only sporadic detection of other *Listeria* species was observed. Sampling from the feed and sea phase demonstrates that *L. monocytogenes* and other *Listeria* species can be detected in feed and in the production or storage environment for feed (including feed fleets), on the surface of live and dead fish in the sea cages, and in well boats. The prevalence at these stages is relatively low, and future genetic characterization of the preserved bacterial isolates will potentially provide knowledge about transmission routes for *Listeria* in the value chain of Atlantic salmon.

Forord

Denne rapporten er en leveranse i prosjektet «Kartlegging av *Listeria monocytogenes* i sjøfasen ved produksjon av atlantisk laks (TraceListeria)» (FHF 901591) finansiert av Fiskeri og havbruksnæringens forskningsfond (FHF). Rapporten er en delrapport knyttet til prosjektets arbeidspakke 3 (kartlegging av *L. monocytogenes* i verdikjede fôr) og 4 (kartlegging av *L. monocytogenes* i sjøfasen). Prosjektets hovedmål er å øke kunnskapen om fôr og oppdrett og dets betydning for kontaminering av *L. monocytogenes* i verdikjede laks. Prosjektet er et samarbeid mellom NTNU – Norges teknisk naturvitenskapelige universitet og Københavns Universitet (KU) og har et totalt budsjett på NOK 4.465.000, -. Prosjektets varighet er fra 01.01.2020 – 31.03.2022.

Vi ønsker å takke Gunn Merethe Bjørge Thomassen, Tore Brembu og John-Kristian Jameson for utmerket teknisk støtte i prosjektet. Videre retter vi en stor takk til alle samarbeidspartnere ved fôrfabrikkene, fôrbåtene og oppdrettsanleggene for omfattende hjelp til prøveinnsamling.

Innholdsfortegnelse

Introduksjon	1
Kontamineringsveier for <i>Listeria monocytogenes</i> i verdikjeden for produksjon av atlantisk laks	1
<i>Listeria</i> i spiseklare sjømatprodukter	2
Materialer og metoder	3
<i>Forsøksdesign og prøvetakingspunkter</i>	3
<i>Prøvetaking og prøveoppbevaring</i>	5
<i>Kvalitativ påvisning av <i>Listeria</i> spp. og <i>L. monocytogenes</i></i>	6
<i>Mikrobiologisk verifisering av PCR-positive prøver</i>	6
<i>Bakterieisolater for genetisk karakterisering</i>	6
Resultater og diskusjon	6
<i>Forekomst av <i>Listeria</i> i verdikjede fôr</i>	6
<i>Forekomst av <i>Listeria</i> i verdikjede sjø</i>	7
Konklusjon	9
<i>Videre arbeid</i>	9
Referanser	10

Introduksjon

Den norske oppdrettsnæringen er verdensledende, og i 2019 utgjorde den norske produksjonen av atlantisk laks (*Salmo salar*) omtrent 53 % av den globale produksjonen på ca. 2,6 millioner tonn (FAO, 2020). Til tross for et krevende år preget av den globale pandemien eksporterte Norge i fjor 1,1 millioner tonn laks med en samlet verdi på 70,1 milliarder, noe som er den nest høyeste eksportverdien som er registrert, og volummessig er 2020 et rekordår (Norges Sjømatråd, 2021).

Forekomst av *Listeria monocytogenes* er en kjent utfordring i lakseindustrien og denne bakterien kan utgjøre en risiko for forbrukeren, spesielt ved konsum av spiseklare produkter. Rå laks er en populær ingrediens i sushi, sashimi og sjømatosalater, og fersk laks kan anses som et spiseklart produkt (Skjerdal et al., 2014). Kaldrøkte lakseprodukter er også mattrygghetsmessig utfordrende med tanke på forekomst av *Listeria*, noe som synliggjøres med flere bekreftede tilfeller av listeriose med dødelig utfall i Europa de siste årene (EFSA BIOHAZ Panel, 2018).

Listeriose er en matbåren zoonose som forårsakes av *L. monocytogenes*, og rammer primært personer med nedsatt immunforsvar, eldre, fostre og nyfødte, og kan gi hjernehinnebetennelse og blodforgiftning (Lyngstad et al., 2019). Bakterien kan overføres fra mor til foster under graviditet og føre til abort og dødfødsel. Underliggende sykdom som kreft og diabetes predisponerer også for listeriose (FHI, 2010). Personer som tilhører en risikogruppe, kan utvikle alvorlig sykdom og dødeligheten ligger vanligvis mellom 20-30 % hos pasienter i disse gruppene (Wang & Orsi, 2013). Et økende antall meldte tilfeller av listeriose (både sporadiske tilfeller og utbrudd) i Europa er registrert, spesielt hos personer over 75 år og blant kvinner i aldersgruppen 25-44 år (EFSA, 2018). Smitte skjer hovedsakelig ved inntak av kontaminert mat hvor bakterien kan oppformeres til et høyt antall under lagring. I 2017 ble det i EU/EØS-området rapportert 2500 tilfeller av listeriose. Flest tilfeller per 100 000 innbyggere ble rapportert fra Island, Finland og Danmark (ECDC, 2020).

Kontamineringsveier for *Listeria monocytogenes* i verdikjeden for produksjon av atlantisk laks

Kunnskap om forekomst, kontamineringspunkter og smitteveier for *L. monocytogenes* ved produksjon av atlantisk laks er viktig for å kunne oppnå økt kontroll med *Listeria*, og krever en systematisk kartlegging av hele verdikjeden. Bransjens utfordringer med *Listeria* har i all hovedsak hatt fokus på lokaler og utstyr i slakteri- og prosesseringsanlegg (Heir et al., 2015; Heir & Langsrud, 2013; Heir et al., 2018). Risikoen for kontaminering med *L. monocytogenes* er i vesentlig mindre grad kartlagt i sjøfasen hos lokalitetene for oppdrett. Produsentene melder selv om såkalte «problemlokaliteter» der forekomsten av *Listeria* er høyere i slakterier eller ferdig prosesserte produkter når det slaktes fra disse lokalitetene, men denne sammenhengen er i liten grad dokumentert.

Denne rapporten presenterer funn i prosjektet «Kartlegging av *Listeria monocytogenes* i sjøfasen ved produksjon av atlantisk laks» (FHF 901591), og er av og for av grenset til arbeidspakkene for produksjon og distribusjonsveier for fôr (AP 3) og produksjon av laks i sjøanlegg inkludert brønnbåttransport av levende fisk frem til primærprosesseringsanlegg (slakteri) (AP 4). Bakgrunnen for dette prosjektet er det tidligere finansierte FHF-prosjektet «Kartlegging av forekomst av *Listeria monocytogenes* i sjø» (FHF 901492, Mowi ASA) som genererte behov for en mer omfattende kartlegging av betydningen av laksefôr, fisk i sjøfasen og brønnbåter som mulige kontamineringsveier for *L. monocytogenes* inn i primærprosesseringsanlegg. Når stammer av *Listeria* først har etablert seg i produksjonsmiljøet er det vanskelig å bli kvitt og derfor er det viktig å ha kontroll på smitekilder og forsøke å redusere innførsel av *Listeria* i produksjonen.

Kontaminering med *L. monocytogenes* kan komme fra flere kilder, da både friske mennesker, dyr og miljø kan være et reservoar for bakterien (Linke et al., 2014). Det er vist at *L. monocytogenes* kan introduseres til slakteri- og prosessanlegg fra sjøvann, brønnbåttransport og via råmaterialet eller gjennom prosessering ved krysskontaminasjon fra miljø, utstyr eller personell (Haldorsen, 2019; Møretrø et al., 2016). På grunn av naturlig forekomst av *Listeria* i sjøvann vil introduksjon av bakterien i produksjonsmiljøet være nærmest uunngåelig, og for å unngå kontaminering av sluttproduktet kreves hygienisk produksjon (Jordan et al., 2018). Det er likevel antatt at levende fisk i merder og sjøvann utgjør en mindre kontamineringsfare for *L. monocytogenes* inn i prosesseringsanlegg og at *L. monocytogenes* i betydelig større grad forekommer på død fisk og på utstyr som er i kontakt med død fisk i merden (Haldorsen, 2019; Zaremba, 2018). En mulig forklaring kan være at død fisk som blir liggende i dødfisk-håven kan fungere som et reservoar for smitte til levende fisk, men denne sammenhengen er ikke dokumentert. Hyppig fjerning av dødfisk er foreslått som et mulig tiltak for å redusere risikoen for overføring av *L. monocytogenes* fra død fisk i sjøfasen. Værforhold, slik som perioder med intensivt regn, er pekt på som en mulig medvirkende faktor for økt påvisning av *L. monocytogenes* i produksjonsanlegg for fisk (Miettinen & Wirtanen, 2006). Bekker, elver og avrenning fra omkringliggende områder (f.eks. beiteområder) er potensielle kilder til kontaminering av miljøet i sjøfasen.

Betydningen av laksefôr som en mulig smittekilde til *L. monocytogenes* har i liten grad blitt kartlagt, men funn i det tidligere omtalte kartleggingsstudiet indikerer at også laksefôr kan være en mulig kilde til *Listeria* i matfiskproduksjon (Haldorsen, 2019). Da fôret gjennomgår en kraftig varmebehandling er det lite trolig at fôret er kontaminert med *Listeria* etter ekstrudering. Det er behov for mer kunnskap om hvilke(n) del(er) av fôrproduksjon, distribusjon og lagring på forflåte som kan utgjøre en kilde til *L. monocytogenes* i slakterier og prosesseringsanlegg for laks.

Listeria i spiseklare sjømatprodukter

Spiseklar mat, inkludert rå laks, er spesielt utfordrende med hensyn til *L. monocytogenes* da slike produkter skal spises uten videre bakteriereduserende behandling. Krysskontaminering fra produksjonsmiljø er ansett som den vanligste kilden til *Listeria* i spiseklare produkter (Jordan et al., 2018). Bakterien har evne til å overleve og vokse ved lave temperaturer, i ferske og prosesserte lakseprodukter og i produksjonsmiljøet. Påvisning av *L. monocytogenes* i fersk laks utgjør ikke bare en risiko for forbrukeren, men er også knyttet til omfattende tilbaketrekninger og potensielt store økonomiske tap for produsenter (Heir et al., 2021). Rå fisk og spiseklare måltider er rangert på toppen av listen over rapporterte matrelaterte utbrudd eller tilbaketrekninger i Europa (Soon et al., 2020), og påvisning av *L. monocytogenes* er den viktigste årsaken til tilbaketrekninger av produkter på markedet (Lüth et al., 2019).

Studier av norske spiseklare sjømatprodukter viser at kontaminasjonsnivået av *L. monocytogenes* generelt er svært lavt, men det er sannsynligvis store variasjoner. I undersøkelser av kjølelagret, butikkkjøpt sushi med tre dagers holdbarhet ble det ikke påvist *L. monocytogenes* (Hoel et al., 2017; Hoel et al., 2015; Lunestad & Skjerdal, 2008). En større studie av kaldrøkt laks på det europeiske markedet viste en forekomst av *L. monocytogenes* i 10 % av produktene i butikk (EFSA, 2013). Forekomst i rå laks er i mindre grad kartlagt, men det er likevel antatt at rå laks er en potensiell kilde til *L. monocytogenes* (Heir et al., 2021). Mattilsynet gjennomfører i 2021 en tilsynskampanje i norske lakseslakteri for å undersøke tiltak og rutiner for å hindre at fisk blir kontaminert med *Listeria*. Mattilsynet peker på at det er svært viktig at produsentene har effektive tiltak mot *Listeria* da laks i stor grad blir spist uten videre varmebehandling og blir brukt i andre spiseklare produkter som sushi, sashimi, røkt- og gravet fisk (Mattilsynet, 2021).

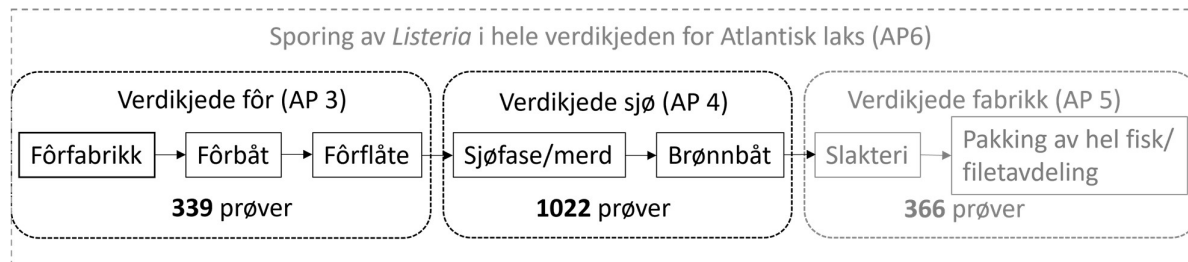
Selv om både prevalens og nivået av *L. monocytogenes* i nyprosessert laks generelt er lavt, er fersk laks et utmerket vekstmedium for denne bakterien (Skjerdal et al., 2014). For å unngå å overskride gjeldende grenseverdier for spiseklare produkter på < 100 CFU/g *L. monocytogenes*

ved produktets utløpsdato (EU forordning 2073/2005) er det helt nødvendig å holde kontamineringen i råstoffet på et lavt nivå. Tilgjengelige vekstmodeller for *L. monocytogenes* i laks viser at det ikke bør være mer enn 0,5-10 CFU/g *L. monocytogenes* ved prosesseringstidspunkt, men dette estimatet forutsetter at den ferdigpakkede lasken ikke utsettes for svingninger i lagringstemperatur, det vil si at kjølekjeden må holdes konstant på $\leq 4^{\circ}\text{C}$ helt frem til konsum (Skjerdal et al., 2014). I 2018 og 2019 var det flere alvorlige listerioseutbrudd i Europa som kan knyttes til røkte, gravede eller marinerte fiskeprodukter tilvirket med norsk råstoff. Produktene ble sporet tilbake til foredlingsanlegg i Polen og Estland, men kontaminering av råstoffet i Norge kunne ikke utelukkes (ECDC og EFSA, 2019; EFSA og ECDC, 2018).

Materialer og metoder

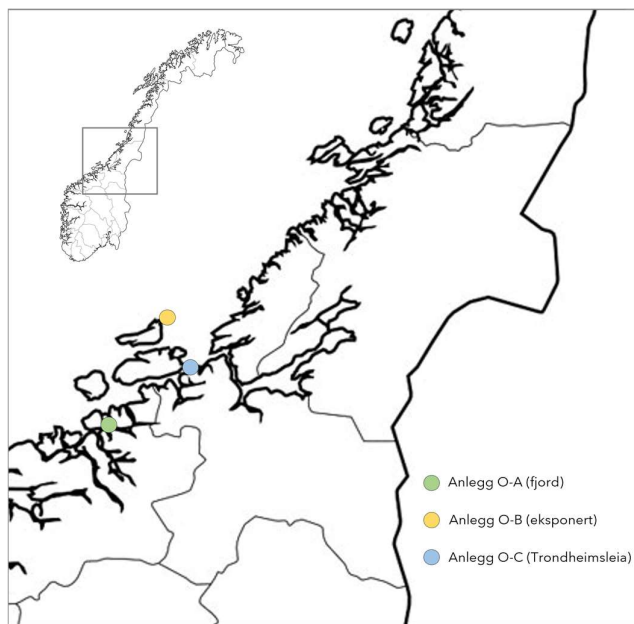
Forsøksdesign og prøvetakingspunkter

Ved prosjektets oppstart ble det utført en innledende fareanalyse for å peke på kritiske punkt i verdikjeden der smitte av *L. monocytogenes* fra miljø til fisk og videre til ferdig prosessert produkt kan oppstå (Hannisdal et al., 2020). Grunnlaget for fareanalysen var et felles arbeidsmøte med inviterte aktører som representerte hele verdikjeden (fôrprodusenter, brønnbåtrederi og lakseprodusent), litteraturstudier, samt befaringer i flere ledd i verdikjeden: oppdrettsanlegg, brønnbåt og slakteri. Prosjektets omfang ble avgrenset til verdikjeden for produksjon av laks gjennom distribusjonsveier for fôr, produksjon av laks i sjøanlegg, brønnbåttransport av slakteklar fisk, og i primærprosesseringsanlegg til ferdig sløyd fisk pakket i emballasje for transport og eksport eller til ferdig emballert *pre-rigor* prosessert filet (Figur 1). Denne rapporten omhandler kartlegging av *Listeria* i verdikjeden for fôr (AP 3) og i sjøfasen (AP 4) og beskrivelse av prøvetaking i primærprosesseringsanlegg og fra ferdige produkter er ikke omtalt her.



Figur 1: Hovedprosesser i verdikjeden for produksjon av atlantisk laks som ligger til grunn for valg av prøvetakingspunkter. Prosesser og aktiviteter markert i grått omtales ikke i denne rapporten.

Tre produksjonsanlegg for laks i Midt-Norge ble valgt ut på bakgrunn av ulike beliggenhet langs kysten. De tre anleggene representerer antatt ulike eksponering for menneskelig aktivitet i og rundt sjøen, samt vær- og strømforhold (uten at dette ble undersøkt nærmere). De tre anleggenes plassering er om vist i Figur 2 inne i en fjord (antatt minst eksponert), i Trondheimsleia (middels eksponert) og ved ytre del av kysten (mest eksponert). En detaljert prøvetakingsplan ble i prosjektets startfase (AP 2) utarbeidet på bakgrunn av kunnskap fra fareanalysen, dialog med aktørene i verdikjeden og befaringer ved anleggene (Hannisdal et al., 2020; Lerfall et al., 2020). I perioden august 2020 til juni 2021 ble det tatt ut prøver fra tre ulike produksjonsanlegg for fôr, fem ulike fôrbåter, tre ulike produksjonsanlegg for laks (tre merder fra hvert anlegg) og fire brønnbåter.



Figur 2: Beliggenhet for de tre produksjonsanleggene for laks i prosjektet. Fra hver av disse lokalitetene ble det prøvetatt laks fra 3 merder.

Det ble i prosjektperioden analysert 339 prøver fra verdikjede fôr (Tabell 1). Fôrprøvene i fabrikk ble tatt rett etter produksjon (F-A og F-B) og ved lastning til fôrboat (F-A, F-B og F-C), i fôrboat og på topp og bunn av fôrflåtens silo. I tillegg ble det gjennomført prøvetaking av fôringsslanger ved alle sjøanleggene.

Det ble i prosjektet analysert 1022 prøver fra sjøfase (Tabell 2). De fleste prøvene som ble tatt i sjøfasen var fra overflaten av levende fisk (459 prøver) og ved rutinemessig oppsamling av død fisk (416 prøver) der én prøve representerer ett individ. Det ble tatt totalt 147 prøver i

forbindelse med transport av levende, slakteklar fisk til primærprosesseringsanlegg.

Tabell 1: Oversikt over prøvepunkt og prøveomfang fra produksjon, distribusjon og lagring av fôr, samt prøver fra fôr tatt i perioden august 2020 til juni 2021.

Produsent	Prøve	Prøvepunkt	Antall prøveuttak	Antall prøver	Lokasjon		
F-A	Miljø	Blidetrakt	6	18	Fôrfabrikk		
		Transportbånd	6	18	Fôrfabrikk		
		Transportbånd	6	18	Fôrboat		
		Svamp gjennom fôringsslange	1	3	Fôrflåte O-C		
	Fôr	Ferdigvaresikt	6	24	Fôrfabrikk		
		Shuten	6	24	Fôrfabrikk		
		Topp av silo	2	10	Fôrflåte O-C		
		Bunn av silo	2	10	Fôrflåte O-C		
F-B	Miljø	Transportbånd	6	18	Fôrfabrikk		
		Transportbånd	6	18	Fôrboat		
		Svamp gjennom fôringsslange	1	3	Fôrflåte O-C		
		Svamp gjennom fôringsslange	1	7	Fôrflåte O-B		
		Svamp gjennom fôringsslange	1	3	Fôrflåte O-A		
	Fôr	Fôrstrøm lastetut	6*	30	Fôrfabrikk		
		Fôrflåte silo -topp	4	19	Fôrflåte O-B		
		Fôrflåte silo -bunn	2	10	Fôrflåte O-B		
		Fôrflåte silo -topp	1	5	Fôrflåte O-A		
		Fôrflåte silo -bunn	1	5	Fôrflåte O-A		
		Fôrflåte silo -topp	5	5	Fôrflåte O-C		
		Fôrflåte silo -bunn	5	5	Fôrflåte O-C		
		F-C	Miljø	Landsilo	4	11	Fôrfabrikk
				Lastetut	4	9	Fôrfabrikk
Fôrsekk	3			5	Fôrfabrikk		
Båtsilo	1			3	Fôrboat		
Lossetut	4			8	Fôrboat		
Fôr	Forstrøm lastetut		3	15	Fôrfabrikk		
	Fôrflåte silo -topp		4	20	Fôrflåte O-A		
	Fôrflåte silo -bunn		4	15	Fôrflåte O-A		
Totalt antall prøver fra fôr, fôrfabrikker og fôrflåter				339			

Tabell 2: Oversikt over prøvepunkt og prøveomfang fra sjøanlegg i perioden august 2020 til juni 2021.

Anlegg	Prøve	Prøvepunkt	Antall			
			prøveuttak	Antall prøver		
O-A	Miljø	Kulerekke merd	2	10		
		Fisk	6	180		
	Brønnbåt 1	Fisk	Død fisk	6	180	
			Slange, lasting av fisk	2	4	
		Organisk materiale i tank	Organisk materiale i tank	2	13	
			Vann i tank	2	4	
			Lusefilter	2	2	
			Slangekobling til fabrikk	2	4	
	Brønnbåt 2	Fisk	Slange, lasting av fisk	1	3	
			Organisk materiale i tank	1	5	
		Vann i tank	1	2		
	Brønnbåt 3	Fisk	Lusefilter	1	1	
			Slange, lasting av fisk	1	3	
		Organisk materiale i tank	Organisk materiale i tank	1	5	
			Vann i tank	1	2	
Lusefilter	1	1				
O-B	Fisk	Levende fisk	6	159		
		Død fisk	5	116		
	Brønnbåt 1	Fisk	Slange, lasting av fisk	2	2	
			Organisk materiale i tank	2	20	
		Organisk materiale i tank	Vann i tank	2	4	
			Lusefilter	2	2	
			Slangekobling til fabrikk	2	6	
			Slange, lasting av fisk	1	3	
	Brønnbåt 4	Fisk	Organisk materiale i tank	1	5	
			Vann i tank	1	2	
		Lusefilter	1	1		
	O-C	Fisk	Levende fisk	4	120	
			Død fisk	4	120	
		Brønnbåt 1	Fisk	Slange, lasting av fisk	2	2
				Organisk materiale i tank	2	10
Vann i tank			2	12		
Brønnbåt 3		Fisk	Slange, lasting av fisk	1	1	
			Organisk materiale i tank	1	5	
		Vann i tank	1	10		
Slangekobling til fabrikk		1	3			
Totalt antall prøver fra sjøfasen og brønnbåt				1022		

Prøvetaking og prøveoppbevaring

Alle prøvene i prosjektet ble tatt ut av personell ved de ulike fôrfabrikkene, fôråtene, sjøanleggene og brønnbåtene etter opplæring via Teams-møter og distribusjon av skriftlige prosedyrer med beskrivende bilder. Prøver fra fisk og miljø (fôrmiljø og merder) ble tatt ut ved bruk av hansker og steril prøvetakingsklut fuktet med 10 mL bufret peptonvann (Labolytic) for kvalitativ påvisning av *Listeria*. Fôrprøver ble samlet i aseptiske poser for kvalitativ påvisning av *Listeria* i 25 gram. Svamper ble samlet opp med hæv etter utløp fra fôringslanger ble lagt i aseptiske plastposer. Vannprøver fra brønnbåt ble oppsamlet i aseptiske plastkanner (5 L) og senere filtrert gjennom 0,2

µL cellulosefilter. Prøvematerialet ble sendt fra de respektive anleggene med over-natt eksprespakker og håndtert ved laboratoriet umiddelbart etter ankomst. Oppformering av prøvemateriale ble utført ved å homogenisere prøvematerialet i en Stomacher-mikser (IUL Masticator) i 1:10 forhold med 24 Listeria Enrichment Broth (LEB) (Oxoid) tilsatt 10 ml/L 24 LEB Selective Supplement (Oxoid) i 60 sekunder. Homogeniserte prøver ble tilsatt 24 LEB Buffer Supplement (Oxoid) (henholdsvis 4,4 eller 10 mL for klut/vann/svamp- og fôrprøver) og inkubert ved 37°C i 24 ± 2 timer.

Kvalitativ påvisning av *Listeria* spp. og *L. monocytogenes*

Fra den preanrikede prøven ble det utført en kvalitativ real-time PCR analyse for *Listeria* arter. Ekstraksjon av DNA og PCR påvisning av *Listeria* spp. ble utført med SureTect *Listeria* species PCR Assay (Thermo Fisher Scientific) i et QuantStudio 5 Real-Time PCR instrument (Applied Biosystems) med RapidFinder Analysis Software v. 1.3, i henhold til produsentens prosedyrer. DNA fra prøver som ble tolket som *Listeria* spp. positiv ble re-analysert for å spesifikt påvise *L. monocytogenes* med SureTect *Listeria monocytogenes* PCR Assay (Thermo Fisher Scientific).

Mikrobiologisk verifisering av PCR-positive prøver

Ved positiv PCR for *Listeria* spp. og/eller *L. monocytogenes* ble 10 µL fra den primære oppfomeringsvæsken strøket ut på Brilliance Listeria Agar (BLA) (Oxoid) og inkubert ved 37°C i 24 ± 2 timer. 3-5 presumptive *Listeria* spp. eller *L. monocytogenes* kolonier ble plukket fra hver positiv prøve, renyrket og kryopreservert ved -80°C for videre analyser.

Bakterieisolater for genetisk karakterisering

Fra prøvepunktene i verdikjede fôr (AP 3) er det renyrket og bevart 165 bakterieisolater, henholdsvis 100 isolater presumtivt identifisert som *L. monocytogenes* og 65 som andre *Listeria*-arter. Fra død og levende fisk i sjøfasen er det renyrket og bevart 61 bakterieisolater, henholdsvis 50 presumptive *L. monocytogenes* og 11 andre *Listeria*-arter. Prøvetakning i forbindelse med brønnbåttransport resulterte i 12 *Listeria*-isolater. Arbeidspakke 3 og 4 bidrar dermed med totalt 238 bakterieisolater til videre genetisk karakterisering i arbeidspakke 6.

Resultater og diskusjon

Forekomst av *Listeria* i verdikjede fôr

Det ble tatt prøver av fôr (n=197) og produksjonsmiljø (n=142) igjennom verdikjede fôr fra tre norske fôrprodusenter (**F-A**, **F-B** og **F-C**), via fôr båter til fôrflåtene hos de involverte produksjonsanleggene av laks (**O-A**, **O-B** og **O-C**). Det ble påvist *Listeria*-arter i 18 % av prøvene, og totalt var 8 % av prøvene fra denne verdikjeden positiv for *L. monocytogenes* (Tabell 3).

Forekomst av *L. monocytogenes* varierte mellom de tre fôrfabrikkene. Hos produsent **F-A** ble ikke *L. monocytogenes* påvist i fôr, kun i miljøprøver. Også hos produsent **F-B** var påvisningsfrekvensen for *L. monocytogenes* lavere i fôr (3 %) enn i miljøprøver (8 %). Fôr og miljøprøver fra produsent **F-C** hadde vesentlig høyere forekomst av *L. monocytogenes*, henholdsvis 13 % og 25 %. Spesielt var det prøver fra lastetut som viste høy frekvens av *L. monocytogenes*. I fôrprøver fra de ulike fôrflåtene varierte forekomsten av *L. monocytogenes* fra ikke påvist til 10 %, mens prøvetakingen fra fôringsslange viste en variasjon fra ikke påvist til 33 %.

Resultatene fra verdikjede fôr indikerer høyere forekomst av *L. monocytogenes* i miljøprøver enn i fôrprøver, mens det ikke ble funnet noen sammenheng mellom påvisningsfrekvens i fôrfabrikk og på fôrflåte. Tallmaterialet er begrenset og bør tolkes med varsomhet. Det ble gjennomført en

begrenset prøvetaking av føringsslangene, og funnene kan tyde på at dette er et punkt som burde vært undersøkt ytterligere. For å få kunnskap om stammene fra produksjonsmiljøet kan gjenfinnes ute på fôrflåtene, og om disse stammene introduseres til og følger gjennom verdikjede sjø og kan utgjøre en potensiell fare for sluttforbrukeren må analysene utført i dette prosjektet kompletteres av genetiske analyser av stammene. Dersom det er sannsynlig at det finnes en link mellom stammer påvist i slaktemiljø/sluttprodukt er det meget relevant å undersøke kontamineringskilder til fôrproduksjonsmiljøet og hvordan disse stammene eventuelt overføres til fôret og videre i verdikjeden for atlantisk laks. I en tilsvarende studie fra 2018/19 ble det påvist *L. monocytogenes* i prøver som ble tatt i silo på fôrflåte (15 %) og i prøver tatt i fordelingsystem for fôr (fôrspreder) (18 %) (Haldorsen, 2019). Våre funn støtter at det skjer en betydelig kontaminering av fôret i distribusjonskjeden etter produksjon. Laksefôret gjennomgår en kraftig varmebehandling og har lav grad av kontaminering i punktene rett etter produksjon.

Tabell 3: Forekomst (antall positive prøver og % andel positive prøver) av *Listeria* spp. (*L. spp.*) og *Listeria monocytogenes* (*L. m.*) i miljø- og fôrprøver.

Produsent	Prøvetype	Antall prøvetakinger	Antall prøver	Antall positive <i>L. spp.</i>	Positive <i>L. spp.</i> (%)	Antall positive <i>L. m.</i>	Positive <i>L. m.</i> (%)
F-A	Miljøprøver	6	54	0	0	2	4
	Fôrprøver fabrikk		48	0	0	0	0
	Fôrprøver fra fôrflåte O-C	2	20	4	20	2	10
	Svamp fôrslange forflåte O-C	1	3	1	33	1	33
F-B	Miljøprøver	6	36	9	25	3	8
	Fôrprøver fabrikk		30	5	17	1	3
	Fôrprøver fra fôrflåte O-B	4	29	2	7	2	7
	Fôrprøver fra fôrflåte O-C	1	10	1	10	0	0
	Fôrprøver fôrflåte O-A	1	10	0	0	0	0
	Svamp fôrslange fôrflåte O-C	1	3	0	0	0	0
	Svamp fôrslange fôrflåte O-B	1	7	1	14	1	14
	Svamp fôrslange fôrflåte O-A	1	3	1	33	0	0
F-C	Miljøprøver		36	15	42	9	25
	Fôrprøver fabrikk	4	15	5	33	2	13
	Fôrprøver fôrflåte O-A		35	17	49	3	9
Totalt			339	61	18	26	8

Forekomst av *Listeria* i verdikjede sjø

Det ble tatt prøver av levende (n= 459) og død (n= 416) fisk i sjøfasen hos tre ulike oppdrettsanlegg i Midt-Norge (**O-A**, **O-B**, **O-C**) samt prøver fra fire ulike brønnbåter i forbindelse med tømning av merder fra anleggene (n=147). Av de totalt 875 prøvene som ble tatt av levende og død fisk ble det påvist *Listeria*-arter i 7 % av prøvene, mens andelen påviste *L. monocytogenes* utgjorde kun 1 % av prøvene (Tabell 4).

Forekomsten av *Listeria* spp. i død og levende fisk var høyere i anlegg **O-C** (14 %) sammenlignet med anlegg **O-A** (4 %) og anlegg **O-B** (ikke påvist). *L. monocytogenes* ble kun påvist i ett av anleggene (**O-C**), i 5 % av prøvetatt fisk. Det var ingen signifikant forskjell i påvisningsrate for *Listeria* spp. i død og levende fisk, alle anleggene sett under ett ($X^2 (2, N = 49) = 2,62, p = 0,269$). Prøvene ble tatt over en periode på nesten ett år, men det er ikke mulig å fastslå om det foreligger sesongvariasjoner i forekomst av *L. monocytogenes* eller andre *Listeria*-arter. I anlegg **O-C** ble *L. monocytogenes* påvist ved 3 av 4 prøveuttak fra dette anlegget (høst, sen høst, og tidlig vinter).

Tabell 4: Forekomst (antall positive prøver og % andel positive prøver) av *Listeria* spp. og *Listeria monocytogenes* (*L. m.*) i prøver fra overflaten av levende fisk og fra overflate og gjeller hos død fisk i tre ulike oppdrettsanlegg for atlantisk laks.

Anlegg	Beliggenhet	Prøvepunkt	Antall prøver	Antall (%)	
				<i>Listeria</i> spp.	<i>L. m.</i>
O-A	Fjord	Levende fisk	180	10 (6)	0
		Død fisk	180	4 (2)	0
		Totalt anlegg O-A	360	14 (4)	0
O-B	Eksponert	Levende fisk	159	0	0
		Død fisk	116	0	0
		Totalt anlegg O-B	275	0 (0)	0
O-C	Trondheimsleia	Levende fisk	120	17 (14)	4 (3)
		Død fisk	120	17 (14)	7 (6)
		Totalt anlegg O-C	240	34 (14)	11 (5)
Totalt (alle anlegg)			875	63 (7)	11 (1)

I forbindelse med tømning av merder og transport av fisk til slakteri ble det tatt svaberprøver av kulerekke i to merder fra ett av anleggene (**O-A**), men det ble ikke funnet *Listeria* i disse. Miljø- og vannprøver fra totalt fire brønnbåter som var involvert i transport av levende, slakteklar fisk fra de tre anleggene viste at forekomsten av *Listeria* også er lav i denne delen av verdikjeden. På grunn av et lavt antall positive prøver behandles resultatene fra båtene samlet. Det ble påvist *Listeria* arter i totalt 3 % av prøvene tatt fra brønnbåter (Tabell 5) og ingen *L. monocytogenes* ble påvist i prøvepunkter fra de fire båtene.

Tabell 5: Forekomst (antall positive prøver og % antall positive prøver) av *Listeria* spp. i prøver tatt i forbindelse med tømning av merder ved oppdrettsanlegg O-A, O-B og O-C og brønnbåttransport til slakteri.

Prøvepunkt	Antall prøver	Antall (%) <i>Listeria</i> spp.
Kulerekke merd	10	0
Slange, lasting av fisk	18	0
Organisk materiale i tank	63	3 (5)
Vann i tank	34	2 (6)
Lusefilter	7	0
Slangekobling brønnbåt/fabrikk	15	0
Totalt	147	5 (3)

Påvisning av *Listeria* i forbindelse med brønnbåttransport knyttes til to båter, hvorav majoriteten (80 %) av de positive prøvene i dette prosjektet kom fra én båt. Dette kan indikere at brønnbåt kan fungere som et reservoar og potensielt kontamineringspunkt for *Listeria* dersom bakteriestammer etablerer seg i båtens miljø. Tiltak som risikobasert prøvetaking, overvåkning, og rengjøring vil være viktig for å hindre etablering eller oppkonsentrering av *L. monocytogenes* i brønnbåter, noe som igjen kan medføre økt risiko for overføring av bakterien til primærprosesseringsanlegget.

I et tilsvarende Norsk kartleggingsstudie av *L. monocytogenes* i verdikjeden til laks ble det konkludert med at brønnbåttransport kan ha en betydning for spredning av *Listeria* fra sjøfase og inn i slakteri- og prosesseringslokaler for laks (Haldorsen, 2019). Selv om denne hypotesen ikke kunne bekreftes i det nåværende prosjektet, kan det ikke utelukkes at brønnbåtene utgjør en potensiell smittekilde for *Listeria* inn til slakteri. Påvisningsfrekvensen for *Listeria* på levende og død fisk var også markant lavere i det nåværende prosjektet, noe som kan ha betydning for funnene i brønnbåt.

Konklusjon

Resultatene presentert i denne rapporten viser at *L. monocytogenes* og andre *Listeria* arter kan påvises i fôr og produksjonsmiljø til fôr, i sjøfasen på overflaten av død og levende fisk i merdene samt i brønnbåter (brønnbåttank og vann). Forekomsten er relativt lav, og genetisk karakterisering av utvalgte stammer, spesielt helgenomsekvensering, vil kunne gi kunnskap om smitteveier for *Listeria* i verdikjeden til atlantisk laks. Data om forekomst, smitekilder og smitteveier gir grunnlag for å kunne sette inn målrettede tiltak for å redusere kontaminering med *Listeria* i slakte- og produksjonsprosessen.

Videre arbeid

Totalt 238 bakterieisolater identifisert som *L. monocytogenes* og som andre *Listeria*-arter (fra fôr og sjøfase) skal genetisk karakteriseres i arbeidspakke 6. En ny sekvenseringsmetode basert på Oxford Nanopore (ON)-teknologi (Krych et al., 2019) for screening av isolater på stammenivå skal benyttes for alle isolatene i prosjektet og dette utføres av København Universitet (KU). Metoden har tidligere vist at den kan differensiere mellom ulike miljøstammer innen arten *L. monocytogenes* (Thomassen et al., 2021). Utvalgte isolater fra denne screeningen vil bli helgenomsekvensert med samme teknologi (ON) ved KU for en mer sikker identifisering av stammer som muliggjør sporing av *L. monocytogenes* i verdikjeden.

Referanser

- Commission Regulation (EC) No 2073/2005 of 15 November 2005 on microbiological criteria for foodstuffs, p. 1–26 (2005).
- ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control). (2020). *ECDC: Annual epidemiological report for 2017*. ECDC.
- ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control) and EFSA (European Food Safety Authority). (2019). Multi-country outbreak of *Listeria monocytogenes* clonal complex 8 infections linked to consumption of cold-smoked fish products. *EFSA supporting publication*(2019:EN-1665), 20 pp. <https://doi.org/doi:10.2903/sp.efsa.2019.EN-1665>
- EFSA (European Food Safety Authority). (2013). Analysis of the baseline survey on the prevalence of *Listeria monocytogenes* in certain ready-to-eat foods in the EU, 2010–2011 Part A: *Listeria monocytogenes* prevalence estimates. *Efsa Journal*, 11(6), 3241. <https://doi.org/https://doi.org/10.2903/j.efsa.2013.3241>
- EFSA (European Food Safety Authority) and ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control). (2018). Multi-country outbreak of *Listeria monocytogenes* sequence type 8 infections linked to consumption of salmon products. *EFSA supporting publication*(2018:EN-1496), 16 pp. <https://doi.org/doi:10.2903/sp.efsa.2018.EN-1496>
- EFSA BIOHAZ Panel. (2018). *Listeria monocytogenes* contamination of ready-to-eat foods and the risk for human health in the EU. *Efsa Journal*, 16(1). <https://doi.org/ARTN513410.2903/j.efsa.2018.5134>
- FAO. (2020). *GLOBEFISH Highlights January 2020 ISSUE, with Jan. – Sep. 2019 Statistics – A quarterly update on world seafood markets* (Globefish Highlights Issue no. 1).
- FHI. (2010, 17.04.19). *Listeriose - veileder for helsepersonell* Folkehelseinstituttet. Retrieved 18.11.21 from <https://www.fhi.no/nettpub/smittevernveilederen/sykdommer-a-a/listeriose---veileder-for-helsepers/>
- Haldorsen, R. N. (2019). *Kartlegging av forekomst av Listeria monocytogenes i sjø. Sluttrapport, FHF prosjekt nr. 901492*.
- Hannisdal, A., Jakobsen, A. N., Hoel, S., Mehli, L., & Lerfall, J. (2020). Fareanalyse fra før til bord. *Norsk Sjømat*, (3), 46-49.
- Heir, E., Holck, A. L., & Langsrud, S. (2015). *Nye verktøy for kontroll med Listeria i laks og lakseprodukter*. NOFIMA Rapport.
- Heir, E., & Langsrud, S. (2013). *Smitteveier og smittekilder for Listeria i produksjonskjeden for sløyd og røkt laks* NOFIMA Rapport.
- Heir, E., Moretro, T., Simensen, A., & Langsrud, S. (2018). *Listeria monocytogenes* strains show large variations in competitive growth in mixed culture biofilms and suspensions with bacteria from food processing environments. *International Journal of Food Microbiology*, 275, 46-55. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.03.026>
- Heir, E., Solberg, L. E., Carlehög, M., Moen, B., Jensen, M. R., & Holck, A. L. (2021). Improved control of *Listeria monocytogenes* during storage of raw salmon by treatment with the fermentate Verdad N6 and nisin. *International Journal of Food Microbiology*, 336, 108895. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2020.108895>
- Hoel, S., Jakobsen, A. N., & Vadstein, O. (2017). Effects of storage temperature on bacterial growth rates and community structure in fresh retail sushi. *Journal of Applied Microbiology*, 123(3), 698-709. <https://doi.org/10.1111/jam.13527>
- Hoel, S., Mehli, L., Bruheim, T., Vadstein, O., & Jakobsen, A. N. (2015). Assessment of Microbiological Quality of Retail Fresh Sushi from Selected Sources in Norway. *Journal of Food Protection*, 78(5), 977-982. <https://doi.org/10.4315/0362-028x.Jfp-14-480>
- Jordan, K., Hunt, K., Lourenco, A., & Pennone, V. (2018). *Listeria monocytogenes* in the Food Processing Environment. *Current Clinical Microbiology Reports*, 5(2), 106-119. <https://doi.org/10.1007/s40588-018-0090-1>
- Krych, L., Castro-Mejia, J. L., Forero-Junco, L. M., Moesby, D. N., Mikkelsen, M. B., Rasmussen, M. A., Sykulski, M., & Nielsen, D. S. (2019). DNA enrichment and tagmentation method for species-level identification and strain-level differentiation using ON-rep-seq. *Communications Biology*, 2, 369. <https://doi.org/10.1038/s42003-019-0617-x>
- Lerfall, J., Hannisdal, A., Hoel, S., Jakobsen, A. N., Mehli, L., & Kjønvik, E. (2020). *Fareanalyse for å finne mulige kontamineringspunkter og smitteveier for L. monocytogenes ved produksjon av atlantisk laks (Salmo salar L.)*. NTNU Rapport.
- Linke, K., Ruckerl, I., Brugger, K., Karpiskova, R., Walland, J., Muri-Klinger, S., Tichy, A., Wagner, M., & Stessl, B. (2014). Reservoirs of listeria species in three environmental ecosystems. *Applied and Environmental Microbiology*, 80(18), 5583-5592. <https://doi.org/10.1128/aem.01018-14>
- Lunestad, B. T., & Skjerdal, T. (2008). *Listeria i sushi - sluttrapport fra prosjekt gjennomført av Veterinærinstituttet (Oslo) og Nasjonalt institutt for ernærings- og sjømatforskning (Bergen)*.
- Lyngstad, T. M., Krosness MM, Valcarcel SB, Lange H, Nygård K, Jore S, Kapperud G, MacDonald E, Brandal LT, Feruglio SL, Grøneng GM, Blystad H, & L., V. (2019). *Årsrapport 2018, Overvåkning av sykdommer som smitter fra mat, vann og dyr, inkludert vektorbårne sykdommer. Rapport 2018*. Folkehelseinstituttet.
- Lüth, S., Boone, I., Kleta, S., & Al Dahouk, S. (2019). Analysis of RASFF notifications on food products contaminated with *Listeria monocytogenes* reveals options for improvement in the rapid alert system for food and feed. *Food Control*, 96, 479-487. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2018.09.033>

- Mattilsynet. (2021, 07.01.21). *Tilsynskampanje 2021: Listeriatiltak i lakseslakteri*. Mattilsynet. Retrieved 23.11.21 from https://www.mattilsynet.no/mat_og_vann/produksjon_av_mat/fisk_og_sjomat/mottak_tilvirking_fisk/tilsynskampanje_2021_listeriatiltak_i_lakseslakteri.41715
- Miettinen, H., & Wirtanen, G. (2006). Ecology of *Listeria* spp. in a fish farm and molecular typing of *Listeria monocytogenes* from fish farming and processing companies. *International Journal of Food Microbiology*, 112(2), 138-146. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2006.06.016>
- Møretrø, T., Moen, B., Heir, E., Hansen, A. Å., & Langsrud, S. (2016). Contamination of salmon fillets and processing plants with spoilage bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 237, 98-108. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.08.016>
- Norges Sjømatråd. (2021, 06.01.21). *Stabil sjømateksport til tross for koronapandemien*. Norges Sjømatråd. Retrieved 18.11.21 from <https://seafood.no/aktuelt/nyheter/stabil-sjomeksport-til-tross-for-koronapandemien/>
- Skjerdal, T., Reitehaug, E., & Eckner, K. (2014). Development of performance objectives for *Listeria monocytogenes* contaminated salmon (*Salmo salar*) intended used as sushi and sashimi based on analyses of naturally contaminated samples. *International Journal of Food Microbiology*, 184, 8-13. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.03.031>
- Soon, J. M., Brazier, A. K. M., & Wallace, C. A. (2020). Determining common contributory factors in food safety incidents – A review of global outbreaks and recalls 2008–2018. *Trends in Food Science & Technology*, 97, 76-87. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.12.030>
- Thomassen, G. M. B., Krych, L., Knøchel, S., & Mehli, L. (2021). ON-rep-seq as a rapid and cost-effective alternative to whole-genome sequencing for species-level identification and strain-level discrimination of *Listeria monocytogenes* contamination in a salmon processing plant. *MicrobiologyOpen*, 10(6), e1246. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/mbo3.1246>
- Wang, S., & Orsi, R. H. (2013). *Listeria*. In J. G. J. Morris & M. E. Potter (Eds.), *Foodborne Infections and Intoxications*. Elsevier Inc.
- Zaremba, S. (2018). *Listeria monocytogenes in Norwegian fish farms from September to January* [Master thesis, Universitetet i Stavanger].

