

Verkefnaskýrsla Rf

08 - 03



Rannsóknastofnun fiskiðnaðarins

MARS 2003

**STOFNAGREINING Á *LISTERIA* Í MATVÆLUM –
BIOFILMU MYNDUN**

Sigrún Guðmundsdóttir
Birna Guðbjörnsdóttir



Titill / Title	Stofnagreining á <i>Listeria</i> í matvælavinnslu - Biofilmu myndun		
Höfundar / Authors	Sigrún Guðmundsdóttir og Birna Guðbjörnsdóttir		
Skýrsla Rf / IFL report	8-03	Útgáfudagur / Date:	31.03.2003
Verknr. / project no.	010650001		
Styrktaraðilar / funding:	RANNÍS		
Ágrip á íslensku:	<p><i>Listeria</i> er baktería sem finnst víða í umhverfinu og hefur verið einangruð úr mörgum matvælategundum. Þessi baktería getur fjölgað sér í kæligeymslu en er hitanæm. <i>L. monocytogenes</i> veldur sjúkdómi í mönnum sem kallaður er listeriosis. Með aukinni neyslu tilbúinna rétta án frekari eldunar hafa kröfur af hálfu yfirvalda leitt til meira eftirlits með <i>Listeria</i> mengun. <i>Listeria</i> getur fest sig við yfirborð í matvælavinnslu og myndað "biofilmu" sem erfitt er að fjarlægja við þrif því hún getur orðið ónæm fyrir sótthreinsiefnum. Eins hefur gengið erfiðlega að uppræta mengun þar sem smitleiðir hafa ekki verið þekktar. Með Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE) er hægt að rekja uppruna mengunar. Markmið þessa verkefnis var að greina <i>L. monocytogenes</i> stofna úr vinnslu á reykjum laxi og rækju. Framkvæmdar voru 4 úttektir og stofnarnir sem voru einangraðir voru síðan greindir með PFGE, hluti þeirra var serótýpugreindur. Niðurstöðurnar voru settar inn í <i>Listeria</i> gagnagrunn Rf og allir stofnar sem hafa einangrast á tímabilinu 1997-2001 notaðir. Einnig voru valdir 16 stofnar og viðloðun þeirra könnuð. Helstu niðurstöður voru þær að það eru greinilega um "hússtofna" að ræða, þar sem ein PFGE týpa var ríkjandi í hverju vinnsluhúsi. Eins mátti sjá að í vinnsluumhverfi voru stofnar einangraðir úr hráefni, eftir þrif, í vinnslu og í lokaafurðum í sömu PFGE týpu, eins flokkuðust saman stofnar sem einangraðir voru úr vinnsluumhverfi yfir allt tímabilið. Stofnar úr laxa og rækjuvinnslu flokkuðust hins vegar ekki saman. Rannóknir á viðloðun sýndu að ekki var munur á viðloðun stofna sem voru viðvarandi eða tilfallandi í vinnsluhúsunum.</p>		
Lykilorð á íslensku:	<i>Listeria monocytogenes</i> , PFGE, biofilma, stofnagreiningar		
Summary in English:	<p><i>Listeria</i> is a bacteria widely found in the environment and has been isolated from many food types. This bacteria can grow in cold storage but is sensitive to heat. <i>L. monocytogenes</i> can cause illness in humans, called listeriosis. With increased consumption of ready-to-eat foods without further heating, demands from authorities have lead to more inspection on <i>Listeria</i> contamination. <i>Listeria</i> can adhere to surfaces in food processing and form a biofilm which is difficult to remove by cleaning since it can get immune to disinfectants. Furthermore, it has been difficult to eliminate contamination since contamination routes have been unknown. With the use of molecular identification technique, especially Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE) it is possible to trace origin of contamination. The aim of this project was to type <i>L. monocytogenes</i> strains isolated from cold-smoked salmon and cooked peeled shrimp processing, as well as build up a database allowing for the tracing of contamination. Four additional surveys were performed and the strains isolated typed using PFGE, and part of the strains were also serotyped. The results were gathered into a <i>Listeria</i> database which now includes strains from 1997 to 2001. Moreover, 16 strains were selected and their ability to adhere to a steel surface studied. The main results indicate that there is obviously an "in-house" flora, since one PFGE type was dominating in each processing plant. Strains isolated from raw material, processing area before and after cleaning and final products belonged to same PFGE type and strains isolated at different time also grouped together. No similarity was found among strains isolated from cold-smoked salmon processing and cooked peeled shrimp processing. Studies on adherence showed that there was no difference between persistent and sporadic strains.</p>		
English keywords:	<i>Listeria monocytogenes</i> , PFGE, biofilma, molecular typing		

Styrknúmer: 010650001

Stofnagreining á *Listeria* í matvælum - Biofilmu myndun

Rannsóknastofnun fiskiðnaðarins
Verkefnisstjóri: Sigrún Guðmundsdóttir
Birna Guðbjörnsdóttir

EFNISYFIRLIT

1. INNGANGUR	1
2. EFNI OG AÐFERÐIR.....	5
2.1 Mat á þrifum og greining á <i>Listeria</i> og <i>Listeria monocytogenes</i>	6
2.1.1 Sjónmat.....	6
2.1.2 ATP-ljósæling	6
2.1.3 Penslun	7
2.1.4 Örverumælingar í framleiðslusýnum	7
2.1.5 <i>Listeria</i> einangrun	7
2.2 Hitastig.....	8
2.3 Innra eftirlit.....	8
2.4. PFGE greining	9
2.4.1. Ræktun	9
2.4.2. Einangrun DNA.....	9
2.4.3. Melting	10
2.4.4. Rafdráttur	10
2.4.5. Litun og myndataka.....	10
2.4.6. Úrvinnsla	10
2.5. Serótýpugreining	11
2.6. Biofimu rannsóknir	11
2.6.1. Hreinsun stálplatna	12
2.6.2. Ræktunarseyði.....	12
2.6.3. Festing örvera á yfirborð.....	12

3. NIÐURSTÖÐUR OG UMRÆÐUR	13
3.1 Tíðni <i>Listeria</i> og <i>Listeria monocytogenes</i>	13
3.3 Aðrar mælingar	15
3.3.1 Framleiðslusýni	15
3.3.2 Mat á hreinlæti með hefðbundinni penslun og ATP-mælingu	15
3.4 Hitastig og innra eftirlit	16
3.5. PFGE greining	17
3.6. Serotýpugreining	20
3.6.1. Samanburður á PFGE-týpum og serotýpugreiningu	21
3.7. Biofimu rannsóknir	22
3.7.1. Talningaraðferð	22
3.7.1. ATP mæling	24
4. LOKAORÐ	26
5. HEIMILDIR.....	30

1. INNGANGUR

Á undanförunum árum hefur fjölgun matareitrunartilfella leitt til þess að *Listeria monocytogenes* hefur verið rannsökuð meira en nokkru sinni. *L. monocytogenes* er kuldaþolin sjúkdómsvaldandi baktería sem þrífst vel við lágt hitastig eins og t.d. í kæligeymslum (0-4°C). *L. monocytogenes* er mjög útbreidd í náttúrunni og er sjúkdómsvaldandi í mönnum og hefur verið einangruð úr ýmsum matvælum bæði úr jurta- og dýraríkinu.

Listeria er oft talin jarðvegsbaktería en hún hefur einnig einangrast úr dýrum, jurtum, súrhevi og auk þess úr ýmsum matvælum. *Listeria* getur borist í matvæli á ýmsan hátt t.d. með menguðu vatni, saur meindýra, fugla og manna og beint eða óbeint frá óhreinu umhverfi. *Listeria* getur vaxið í matvælum við margvísleg skilyrði. Almenn er talið að *Listeria* vaxi við hitastig á milli 0-45°C, við pH 5-9 og í NaCl styrk undir 10%. Bakterían drepst við hitameðferð. Talið er að hitastig yfir 72°C nægi til að drepa bakteríuna, en hún þolir vel frystingu. *L. monocytogenes* getur valdið sjúkdómi í mönnum, listeriosis. Þeir sem eru næmir fyrir þessum sjúkdómi eru vanfærar konur, nýfædd börn, gamalt fólk og einstaklingar sem eru ónæmisbæddir. Algengustu sjúkdómsmyndir sýkinga af völdum *L. monocytogenes* eru heilahimnubólga, blóðeitrun, lífhimnubólga og hjartaþelsbólga. Sýking á meðgöngu getur valdið fósturláti, andvana fæðingu og fæðingu fyrir tímann. Tíðni sýkinga er venjulega um 4-8 tilfelli á hverja milljón íbúa og dánartíðni af völdum listeriosis 20-30% (1). Á Íslandi var tíðni listeriosis á tímabilinu 1978-1997 8.5 tilfelli á hverja milljón íbúa og dánartíðnin 31% (19). Í heilbrigðum einstaklingum getur *L. monocytogenes* valdið flensulíkum einkennum og iðrasýkingu með hita (5, 15). Það er almennt talið að *L. monocytogenes* sýkingar sem berast í menn komi aðallega úr matvælum. En *Listeria* hefur verið einangruð úr mörgum matvælum, meðal annars mjólk (gerilsneyddri og ógerilsneyddri), mjúkum ostum, ís, hráu kjöti og fuglakjöti, hráum fiski og skelfiski, tilbúnum mat, krydduðum pylsum, grænmeti, matvælaverksmiðjum og jarðvegi (4). Þau matvæli sem listeriosis eru oftast tengd eru tilbúin til neyslu, hafa langt geymsluþol í kæli og er neytt án frekari hitunar (1). Upphaflega voru *Listeria* sýkingar taldar tilfallandi en síðan hafa faraldrar hafa verið raktir til svínakjöts (1992-1993) og mjúkra osta (1995 og 1997) í Frakklandi, gerilsneyddrar mjólkur (1983), mexíkanskra osta (1985) og pylsutegundar (1998) í USA,

grænmetis (1981) í Kanada, grafins regnbogasilungs (1999) í Svíþjóð og kaldreykts regnbogasilungs og smjörs (1999) í Finnlandi (16, 24, 32).

Á undanförunum árum hafa því áhyggjur manna af mengun *Listeria* í matvælum aukist en það eru aðallega tvær ástæður fyrir því. Í fyrsta lagi vegna aukinna krafa neytenda um kæld tilbúin matvæli sem innihalda minna magn rotvarnarefna og hafa lengra geymsluþol. Í öðru lagi vegna þess að þess má vænta að áhættuhópar (eldra fólk og ónæmisbældir einstaklingar) muni stækka. Af þessum ástæðum er mikilvægt að hægt sé að rekja *Listeria* í matvælum og matvælavinnslu (14).

Margar sjávarafurðir t.d. fiskur, rækja, krabbi, humar og hörpuðiskur hafa verið taldar mikilvægur uppruni listeríumengunar í fæði manna. Mörg þessara matvæla fara þó í gegnum einhvers konar vinnslu sem drepur *Listeria* eins og t.d. suða. Þrátt fyrir að hún drepist við suðu hefur hún fundist í fullunninni vöru. Matvæli geta mengast meðan á vinnslu stendur m.a. vegna krossmengunar, lélegra þrifa eða slæmra framleiðsluhátta. Sá eiginleiki *Listeria* að geta vaxið við kæligeymslu (0-4°C) hefur það í för með sér að takamarka verður geymsluþol vörunnar með tilliti til þessa.

Lengi vel var erfitt að sýna fram á tengsl milli stofna úr matvælum og sjúklingum því eldri aðferðir sem byggðu á svipgerðarbreytileika höfðu ófullnægjandi aðgreiningarhæfni. Það var ekki fyrr en með tilkomu aðferða sem byggðu á arfgerðarbreytileika að hægt var að rekja uppruna stofna. Sýnt hefur verið fram á að Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE) er sú aðferð sem hefur einna mestan greiningarmátt af hinum ýmsu aðferðum sem hafa verið þróaðar (7, 8, 11, 12, 13, 20).

Það hefur verið sýnt fram á tengsl stofna úr sjúklingum og matvælum með sameindafræðilegum aðferðum í nokkrum tilfellum, meðal annars í Svíþjóð. Eitt tilfelli var þegar 9 manns urðu veikir. Með því að nota Restriction Enzyme Analysis (REA) var hægt að rekja sex þessara tilfella til grafins silungs frá ákveðnum framleiðenda á svæðinu. Með REA var sýnt fram á að *L. monocytogenes* stofnar sem voru einangraðir úr sex sjúklingum voru allir af sama stofni (clonal), en þessi sami stofn var einnig einangraður úr gröfnum silungi (13). Annað tilfelli var þegar öldruð kona sýktist af heilahimnubólgu. *L. monocytogenes* var einangruð og 23 sýni af matvælum úr ísskáp sjúklingsins voru tekin. *L. monocytogenes* fannt í tveimur sýnum (svínakjöti og kryddpylsu). Með því að nota PFGE var sýnt fram á að stofninn úr sjúklingnum og kryddpylsunni var sá sami (22). Á Nýja Sjálandi var PFGE aðferðin notuð til þess að

rekja hópsýkingu til ákveðins kræklingaframleiðanda (6). Eins hefur PFGE verið notað til þess að sýna fram á að *L. monocytogenes* getur valdið iðrasýkingum í heilbrigðum einstaklingum. Til dæmis sýktust fimm einstaklingar af því að borða kald-reykta regnbogasilung og tveir eftir að hafa borðað gervi krabbakjöt en einkennin lýstu sér í niðurgangi, uppköstum og hita. Stofnar sem voru einangraðir úr saursýnum sjúklinga og matvælasýnum sýndu óaðgreinanleg PFGE munstur. Silungurinn hafði verið geymdur við of hátt hitastig í versluninni (11.6°C) þannig að bakterían hafði náð að fjölga sér í vörunni. Þessi tilfelli styðja það að heilbrigðir einstaklingar geta fengið iðrasýkingu með hita af völdum *L. monocytogenes* ef matvæla er neytt sem innihalda mikið magn baktería (15, 27). Autio o.fl. (2) sýndu fram á með notkun PFGE hvaðan mengun barst í kaldreykta silung. Sýni voru tekin af hráefni, í framleiðsluferli og af lokaafurð. Niðurstöður PFGE sýndu að stofnarnir í lokaafurðinni voru þeir sömu og einangruðust á svæðum þar sem þæklun (brining) og niðurskurður (slicing) fóru fram, en voru ekki eins og þeir sem einangruðust úr hráefninu. En erfitt er að þvo þessar vélar og því á *Listeria* oft auðvelt með að festa sig þar og menga síðan vöruna. Stofnar sem fundust í hráefni fundust ekki aftur í vinnsluferlinu eða í lokaafurð.

Rannsóknir hafa sýnt að sumir stofnar eru yfirgnæfandi og viðvarandi í verksmiðju eða vinnslulínu í mörg ár. Hnitmiðuð sótthreinsun sem beindist að þeim stöðum sem *L. monocytogenes* stofnarnir höfðu einangrast á, útrýmdu stofnunum úr vinnsluumhverfinu. Rannsóknir á *L. monocytogenes* stofnum sem voru einangraðir úr ís-verksmiðju og greindir með PFGE sýndu að einn stofninn hafði verið til staðar í verksmiðjunni í sjö ár (28). Autio o.fl. rannsökuðu stofna sem voru einangraðir úr fiskvinnslu og sýndi fram á að einn stofn var yfirgnæfandi í að minnsta kosti eitt ár. Með hnitmiðaðri sótthreinsun tókst að útrýma þessum stofni. Viðloðun stofna skiptir því gríðarlegu máli hvað varðar hvernig til tekst með þrif og sótthreinsun (3). Lundén o.fl. (23) fundu tvo stofna sem voru viðvarandi í fuglajakjötsverksmiðju í tvö ár, á meðan aðrir stofnar voru tilfallandi. Það er líklegast að þessi mengun yfir svo langan tíma sé vegna þátta sem hefur áhrif á stofninn í vinnsluumhverfinu frekar heldur en að það sé stöðugt ný mengun sem berst inn með hráefninu.

Autio o.fl. skoðuðu *L. monocytogenes* stofna einangraða úr mismunandi matvælum og frá mismunandi framleiðendum í nokkrum löndum (þó aðallega frá Finnlandi). Þau sýndu að stofnar úr matvælum sem voru einangraðir í ýmsum löndum og á mismunandi tíma

voru eins, en það bendir til að stofnar þurfa ekki að vera sérhæfðir á ákveðnu landssvæði eða að finnast á ákveðnum tíma, þ.e. sami stofn getur fundist yfir langt tímabil. Eins voru sömu PFGE-týpur greindar í mismunandi matvælum frá mismunandi framleiðendum. Samt sem áður voru einnig ákveðnar PFGE-týpur aðeins greindar í ákveðnum matvælum en þá frá mörgum framleiðendum. Stofnar af sex PFGE-týpum voru eingöngu einangraðir úr fiskafurðum frá nokkrum fiskvinnslum, en sumar þeirra voru staðsettar í mismunandi löndum. Þessar niðurstöður gætu verið tilviljun eða þær gætu bent til að þessar PFGE-týpur séu tengdar við hráan fisk og/eða fiskeldi (aquatic environment). Nánari rannsóknir eru nauðsynlegar til að kanna hvort þessir stofnar eru eingöngu tengdir fiskafurðum. Það voru nokkrar PFGE-týpur sem fundust eingöngu í ákveðnum vinnsluhúsum en á hinn bóginn voru einnig PFGE-týpur sem fundust í mörgum vinnsluhúsum. Þetta bendir til að viðvarandi húsflóru stofnar eru ekki alltaf einkenandi fyrir ákveðna vinnslu. Sumir stofnar gætu verið dreifðari í náttúrunni en aðrir og koma því oft og endurtekið inn í vinnsluhúsin með hráefninu. Á hinn bóginn gætu verið margbreytilegir *L. monocytogenes* stofnar í náttúrunni og þar með í hráefninu og frumvinnslunni, en aðeins nokkrir stofnar sem valda viðloðandi mengun. Þessir stofnar gætu haft einkenni eins og aukna viðloðunarhæfni á snertifleti í matvælavinnslu og ónæmi fyrir sótthreinsiefnum sem gerir þeim kleift að lifa af og aðlagast í vinnsluumhverfinu og veldur því sífelldri mengun sem leiðir til mengunar í lokaafurðum. Sameindafræðilegar aðferðir eru mikilvægar til þess að rekja saman tilfelli af *L. monocytogenes* sýkingum. Það getur verið líklegt að fleiri en ein matvælategund geti haft *L. monocytogenes* stofna af sömu PFGE típu þannig að faraldur gæti í reynd verið af tveimur eða fleirum tillfallandi uppruna. Því er mjög mikilvægt að nota auk sameindafræðilegra upplýsinga, faraldsfræðileg gögn og upplýsingar um neyslu sjúklinga (3).

Þrátt fyrir að greining á arfgerðarbreytileika sé mun betri en greining á svipgerðarbreytileika er ein aðferð sem hefur haldið velli og er en mikið notuð til grunnflokunar á *L. monocytogenes*, en það er serótýpugreining. Sú aðferð byggir á því að mótsermi er notað til þess að greina mótefnavaka á yfirborði (somatic) frumnanna (O-antigen) og á svipum (H-antigen). Þessi aðferð greinir *L. monocytogenes* í 13 týpur á grundvelli þessara mótserma. Flest listeriosis tilfelli eru tengd 3 serótýpum, 1/2a, 1/2b og 4b. Flestir matvælatengdir faraldrar eru af serótýpu 4b en serótýpur 1/2a og 1/2b eru

frekar tengdir tilfallandi tilfellum. Serótýpa 1/2c er algeng í matvælum en hefur ekki tengst sýkingum í fólki. Með arfgerðargreining eins og PFGE hefur serótýpunum verið skipt í tvo hópa; í hóp I eru serótýpunar 1/2b, 3b, 4b, 4d og 4e en í hóp II eru serótýpunar 1/2a, 3a, 1/2c og 3c (10, 29)

Á Rannsóknastofnun fiskiðnaðarins hafa á undanförunum árum verið unnin mörg verkefni í tengslum við *Listeria*. Til dæmis verkefni þar sem tíðni *Listeria* í reyktum fiski (styrkt af Evrópubandalaginu) og rækjum og kjöti (styrkt af Nordisk Industrifund) er rannsökuð. Helstu niðurstöður benda til þess að tíðni *Listeria monocytogenes* í reyktum fiski á tímabilinu 1996-1998 er um 3% (3/102 sýni)(21). Tíðni þessarar bakteríu í vinnsluumhverfinu er nokkru hærri. Hartemink og Georgsson gerðu úttekt á *Listeria* í sjávarafurðum (hráum og reyktum fiski, harðfiski, frosnum skelfiski og rækjum, ásamt nokkrum tegundum salata) á Íslandi. Flestra afurðanna er neytt án frekari hitunar. Tíðni *Listeria* tegunda var 56% í hráum fiski, 29% í reyktum fiski, 9% í rækjum og 32% í salati, en engin *Listeria* fannst í skelfiski né harðfiski. Þessar niðurstöður benda til nokkuð hárrar tíðni *Listeria* í sjávarafurðum á Íslandi (18). Á undanförunum árum hefur verið unnið að uppbyggingu *Listeria* gagnagrunns á Rf (Rannís verkefni nr. 990230099) með því að nota PFGE greiningaraðferðina. Niðurstöður þeirrar vinnu sem þegar hefur verið framkvæmd verða notaðar í samantekt á niðurstöðum úr þessu verkefni. Með því fæst samanburður stofna yfir lengri tíma (1997-2001) (17).

2. EFNI OG AÐFERÐIR

Sýni voru tekin í einni rækjuvinnslu (hús C) og einni vinnslu sem kald-reykir lax (hús A), farið var tvisvar sinnum á mismunandi árstíma (vor og í byrjun vetrar). Sýni voru tekin á 15-20 stöðum í umhverfi vinnslunnar með penslun og sýnin síðan ræktuð með tilliti til *Listeria*. Sýnin voru tekin eftir þrif, áður en vinna hófst og eftir að vinnsla var búin að vera í gangi u. þ. b. tvær klst. Þá voru einnig tekin nokkur sýni af framleiðslunni þ.e. rækju- og laxasýni. Til að fá nánari upplýsingar um hreinlætisástand og um heilnæmi vörunnar voru nokkur sýni úr umhverfi rannsökuð með tilliti til iðragerla og afurðasýni sett í kólí- og saurkólímælingu. Sýni voru einnig tekin með ATP-mæli til að meta árangur þrifa. Sjónmat var gert á þeim stöðum sem sýnin voru tekin. Hitastig í húsinu var mælt á nokkrum stöðum og einnig hitastig í afurðum á ýmsum stigum vinnslunnar.

Hráefnisflæði og vinnsluferlið var kannað.

Allir stofnarnir sem einangruðust úr úttektunum fjórum voru greindir með PFGE auk stofna sem til voru úr húsi B (rækjuvinnsla). Úr rækjuvinnslu voru greindir 83 stofnar (28 úr húsi B og 55 úr húsi C) og 107 stofnar úr laxi (67 úr húsi A, 38 úr fyrirtæki A og tveir úr húsi G). Til þess að auka gildi þessara rannsókna voru stofnar einangraðir úr vinnslu á reyktum laxi og rækju sem greindir voru í verkefninu “*Listeria* gagnagrunnur” (990230099) einnig teknir með í samanburði á stofnunum. Þannig að auk þessara húsa sem þegar er búið að nefna voru notaðar niðurstöður á greiningu stofna sem voru einangraðir úr húsum D, E, F og G en í þeim húsum var unninn kald-reyktur lax. Sama aðferðarfræði var notuð við greiningu allra stofnanna. Með þessu var hægt að skoða og bera saman stofna yfir lengra tímabil eða frá 1997 til 2001.

2.1 Mat á þrifum og greining á *Listeria* og *Listeria monocytogenes*

2.1.1 Sjónmat

Hreinlætisástand véla og umhverfis var ákvarðað með sjónmati. Notað var skema fyrir sjónmat sem starfsmenn Rannsóknastofnunar fiskiðnaðarins hafa notað og einkunnir gefnar í samræmi við lýsingar á því.

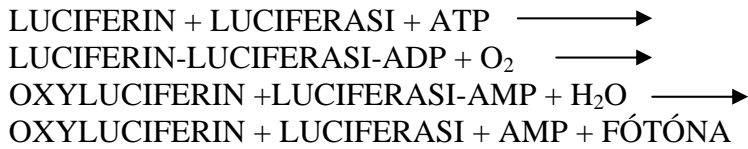
Einkunnir vegna sjónmats eftir þrif:

1. GOTT: Ekkert athugavert, engin sjáanleg skán eða óhreinindi.
2. SÆMILEGT: Engar sjáanlegar fiskleifar, hreistur, bein, roð, fiskhold, lítilsháttar skán.
3. SLÆMT: Sjáanlegar fiskleifar, allmikil skán, fletir litaðir.

2.1.2 ATP-ljósmæling

ATP (adenosine-5- triphosphate) er orkuefni sem finnst í öllum lifandi frumum bæði örverufrumum og vefjafrumum. Ef menn gefa sér að góð þrif fjarlægi allar frumur af yfirborði þeirra flata sem hreinsa á, er hægt að taka stroksýni af yfirborðinu og leggja mat á þrifin með því að mæla hvort ATP finnst. Með þessari mælingu er ATP losað úr frumunum. Mældar eru hlutfallslegar ljóseiningar (Relative Light Units (RLU)) sem samsvarar magni ATP í sýninu.

Ljósmælingin byggir á eftirfarandi hvarfi:



Luciferasi er ensím unnið úr eldflugu og hvetur það ATP hvarfið og myndar ljós sem hægt er að mæla. Við mælinguna var notaður System-Sure ljósmælir frá Celsis-Lumac. Sérstakur ATP-pensill er notaður og hann vættur í ATP-fríum hlutleysi og síðan rúllaður yfir 10 cm² flöt og mældur innan tveggja klst. Mæling er framkvæmd samkvæmt leiðbeiningum frá framleiðanda og niðurstaða fengin í s.k. RLU einingum.

2.1.3 Penslun

Hefðbundin Rf aðferð var notuð við penslunina og pensill settur í *Listeria*-ræktun. Dauðhreinsuðum pensli var dýft í D/E neutralizing broth (Difco) til að bleyta í honum. Penslinum var síðan rúllað eftir nokkrum stöðum á viðkomandi tæki. Penslinum var stungið ofan í dauðhreinsað glas og brotinn þannig að bómullarhnoðrinn færi ofan í glasið og var 10 ml af UVM seyði bætt í glasið og ræktað skv. lýsingu hér á eftir.

2.1.4 Örverumælingar í framleiðslusýnum

Sýnin voru tætt í blandara. 25g af sýninu voru vigtuð í “stomacherpoka” og 225 gr af Butterfield’s buffer þynningarvatni blandað saman við. Þannig fékkst 1/10 þynning. Sýnið var blandað í maga í eina mínútu. Notuð var yfirborðssáning með 0,5% Plate Count Agar (Difco) samkvæmt lýsingu í aðferðabók á örverustofu Rf (Skjal: Ghb-oAB-00301 frá 15.07.97). Sýnin voru síðan ræktuð við 30°C í 48 klst. Einnig var kannaður fjöldi kólígerla og saurkólígerla og var MPN-aðferð (most probably number) notuð með forræktun í Lauryl Tryptose broth (Difco) í 35°C í 24-48 klst og staðfestingarpróf í Brilliant Green Bile (Difco) fyrir kólígerla alls í 35°C í 48 klst og í *E. Coli* medium (Difco) fyrir saurkólígerla sem ræktað er í vatnsbaði við 44,5°C í 24 klst.

2.1.5 *Listeria* einangrun

Listeria-ræktun var framkvæmd samkvæmt lýsingu í aðferðabók á örverustofu Rf. USDA aðferðin var notuð til greiningar á *Listeria* (26).

Þá var pensillinn settur í 10 ml af UVM modified enrichment broth (Difco). Ræktað var við 30°C í 24 klst, 0,1 ml af UVM var síðan sáð í 10 ml af Fraser broth (Difco) og

ræktað við 35°C í 26 klst +/-2 klst. Lykkjufylli úr svörtu Fraser broth var strikað á eitt sérhæft æti, MOX (Difco) og ræktað við 35°C í allt að 48 klst. Staðfestingarpróf var gert á svörtum kólóníum sem ræktast á MOX, eftirfarandi próf voru gerð: Gram-litun, katalasa próf (3% H₂O₂), kvikleikapróf, greining á haemolysu á blóðagar og prófun í API-*Listeria* (greiningarlykill fyrir *Listeria*, BioMérieux SA/France). Blóðagar er samsettur úr Lab-lemco Powder (10g), Bacto-peptone (10g), NaCl (5g), Agar (12g) og 1000 ml af afjónuðu vatni. Þessi blanda er síðan soðin þar til uppleyst og sett í þrýstisjóðara til dauðhreinsunar (121°C í 15 mín). Eftir dauðhreinsun er agarinn kældur niður í 45°C og þá er bætt í 50 ml/L af hestablóði (Tilraunastöð Háskólans að Keldum). *Listeria*-ræktun var einnig framkvæmd á framleiðslusýnum en þá voru sett 25 g af sýni í 225 ml af forræktunaræti UVM modified enrichment broth. Framhaldið var síðan það sama og með penslunarsýnin.

2.2 Hitastig

Hitastig var mælt í móttöku og í véla-, snyrti- og þökkunarsal með "Thermometer" TFX 492 frá Ebro (FTC; Reykjavík).

2.3 Innra eftirlit

Vinnureglur og vinnuferlið var skráð eftir munnlegum upplýsingum og einnig samhliða sýnatöku (sjá töflu 1).

Tafla 1. Dæmi um upplýsingar varðandi innra eftirlit sem safnað var samhliða sýnatöku

almennar upplýsingar	teg framleiðslu
	ástand vatns
	HACCP eða innra eftirlit
framleiðsluhúsnæði	kross-mengun
	viðhaldsástand
upplýsingar um starfsfólk	hrelnæti og heilnæmi
	hlífðarfatnaður
framleiðsluaðferðir	uppruni og meðhöndlun hráefnis
	söltunaraðferð
	skurður
	handþvottur og sótthreinsun fótabúnaðar
	þvotta- og sótthreinsiaðferðir

2.4. PFGE greining

2.4.1. Ræktun

L. monocytogenes stofnum var strikað á Tryptic Soy Agar (TSA, Difco) skálar með viðbættu 0.6% yeast extract (Difco) og ræktaðir við 35°C yfir nótt. Kóloníu var síðan sáð í Brain Heart Infusion (BHI) seyði (Difco) og það ræktað við 35°C yfir nótt. Frumur úr tveimur ml af BHI seyði voru þvegnar í 5 ml PettIV buffer (10mM Tris, 1M NaCl) og spunnar niður við 2500 snúninga á mínútu (EconoSpin, Sorvall Instruments, USA) í 15 mín. við 4°C. Botnfallið var síðan leyst upp í 0.5 ml PettIV buffer.

2.4.2. Einangrun DNA

Aðferðin var framkvæmd samkvæmt Maslow o.fl. með þeim breytingum sem lýst er (25). Frumunum var blandað við 1.3% low melting agarose (InCert agarose, FMC bioproducts) í jöfnum hlutföllum, blandan var síðan sett í sprautur og lätin liggja á ís í 10-20 mín. Agarósa plöggarnir voru síðan settir í lysis-lausn (6mM Tris, 1M NaCl, 100 mM EDTA, 0,5% Brij 58, 0.2% sodium deoxycholate, 0.5% lauroyl sarcosine) sem innihélt 20 ug/ml RNase, 10 U/ml Lysostaphine og 1 mg/ml Lysozyme í 4 klst við 37°C (lausninni var haldið stöðugt á hreyfingu). Plöggarnir voru síðan settir í ES buffer (0.5M EDTA, 1% sodium lauroyl sarcosine) sem innihélt 50 mg/ml Proteinase K og haldið á hreyfingu yfir nótt við 50°C (Hybridisation skápur, Techne Ltd., Bretland). Plöggarnir voru síðan þvegnir fjórum sinnum í TE buffer (100mM Tris-HCl, 10 mM EDTA) við 37°C í klukkutíma hvert skipti og síðan yfir nótt.

2.4.3. Melting

Þunn sneið (ca. 1 mm) var skorin af plöggnum og sett í 5U AscI og 10U ApaI (New England Biolabs) skerðiensím og látið standa við 37°C og 24°C yfir nótt. Þetta var gert samkvæmt leiðbeiningum framleiðanda.

2.4.4. Rafdráttur

Sýnin voru síðan rafdregin í 0.9% (AscI) og 1% (ApaI) agarósa hlaupi (SeaKem GTG, FMC Bioproducts) í 0.5 x TBE buffer (45 mM Tris, 4.5 mM bór sýra, 1 mM EDTA) í 20 klst við 210V (AscI) og 200V (ApaI) við 14°C í CHEF DRIII system (BioRad Laboratories, Richmond, USA). Púlstímarnir voru frá 1s til 28 s í 10 klst og 28s til 30 s í 10 klst fyrir AscI og frá 1s til 18s í 20 klst fyrir ApaI.

2.4.5. Litun og myndataka

Agarósahlaupin voru lituð í ethidíumbrómíði í 30 mín og síðan aflituð í 10 mín. Mynd var tekin af þeim við útfjólublátt ljós með GelDoc 2000 Documentation System (BioRad Laboratories, Richmond, USA). Lamda-ladder PFG marker (New England Biolabs) var notaður til stærðarákvörðunar á DNA bútum. Myndirnar voru geymdar sem TIFF-skrár.

2.4.6. Úrvinnsla

Allar niðurstöður voru færðar inn í GelCompar II hugbúnaðarforrit (Applied Maths, Kortrijk, Belgíu) og niðurstöður fyrir hvern stofn bornar saman. Skyldleiki stofna var sýndur með “Dice coefficient correlation” og skyldleikatré (dendogram) gert með “unweighted pair group” aðferð með “arithmatískum” meðaltölum. Notuð voru 1% þolmörk. Auk þess voru allir stofnarnir bornir saman sjónrænt og var að miklu leyti stuðst við þær niðurstöður auk GelCompar greiningarinnar, þar sem greiningin með GelCompar sýndi aðgreiningu á stofnum sem voru eins þegar þeir voru bornir saman sjónrænt. Af þessum sökum sýndi skýrsla á samanburði stofna í verkefninu *Listeria* gagnagrunnur mikinn breytileika, þar sem eingöngu var stuðst við GelCompar greiningu í þeirri skýrslu.

2.5. Serótýpugreining

Serótýpugreining var framkvæmd með *Listeria* O og H- mótsermi (Denka Seiken, Tókýó, Japan) samkvæmt leiðbeiningum frá framleiðanda.

2.6. Biofilmu rannsóknir

Markmiðið með “Biofilmu” rannsóknunum var að skoða hversu langan tíma það tekur hreinrækt af *L. monocytogenes* að festast á glerblásið stál (mynda biofilmu). Þetta var framkvæmt með því að velja 16 stofna sem höfðu verið greindir með PFGE og serótýpu. Leitast var við að velja stofna sem voru af PFGE títum sem voru viðvarandi í vinnsluhúsunum (bæði rækju og reyktur lax) og þá sem komu tilfallandi inn (stofnar sem einangruðust einu sinni í vinnslunni). Eins voru stofnar af mismunandi serótýpum valdir. Tafla 2 sýnir lista yfir þá stofna sem valdir voru, taflan sýnir uppruna stofnanna, hvar þeir voru einangraðir, PFGE típu, serótýpu og hvort þeir voru viðvarandi í vinnsluhúsunum eða tilfallandi (V/T). Til þess að geta skoðað fjölbreytileika stofnanna í tíma voru fjórir stofnar valdir úr eldri úttektum, 12 stofnar voru einangraðir í úttektum þessa verkefnis.

Tafla 2: Stofnar sem valdir voru í biofilmu rannsóknir. V: viðloðandi stofnar, T: tilfallandi stofnar

Rf no.	Uppruni	Hús	PF-týpa	Serótýpa	V/T
B-31	Rækjuskel	B	66-60	1/2a	V
B-208	Vinnsla	C	130-119	1/2	T
B-210	Vinnsla	C	127-127	4	T
B-213	Umhverfi	C	131-129	4b	T
B-218	Vinnsla	C	97-119	4b	V
B-242	Vinnsla	B	66-60	1/2c	V
B-249	Vinnsla	C	97-132	4b	T
B-270	Vinnsla	C	128-134	1/2c	T
L-72	Vinnsla	A	52-29	1/2a	V
L-141	Vinnsla	A	58-34		T
L-345	Vinnsla	A	52-29	1/2b	V
L-423	Umhverfi	A	52-125	1/2a	T
L-429	Vinnsla	A	87-124	1/2a	V/T
L-435	Lokaafurð	A	52-124	1/2a	V
L-481	Vinnsla	Fyrirt. A	97-119	4b	V
L-494	Lokaafurð	Fyrirt. A	52-124	1/2a	V

2.6.1. Hreinsun stálplatna.

Nýtt glerblásið stál var notað og það var klippt niður í 20x80x1.5 mm búta. Bútarnir voru síðan hreinsaðir til að losna við yfirborðsefni. Fyrst voru bútarnir látnir liggja í 1N NaOH í 24 klst. Þeir voru svo skolaðir með eimuðu vatni og látnir liggja í acetoni í eina klst til að hreinsa fitu af þeim. Að lokum voru þeir skolaðir með vatni og þurrkaðir í lofti. Bútarnir voru settir í tilraunaglös, þeim lokað með álpappír og þau dauðhreinsuð í þrýstisjóðara við 121°C í 15 mín (23).

2.6.2. Ræktunarseyði.

Til að fá aðstæður sem líkastar vinnslu umhverfi var ákveðið að nota rækjuseyði til ræktunar stofnanna þegar þeir voru settir á stálbútana. Áður höfðu verið prófuð þrjú mismunandi ræktunarseyði og kom rækjuseyði best út úr þeim prófunum (niðurstöður ekki birtar).

Rækjuseyðið var útbúið á eftirfarandi hátt: einn hlutur rækja á móti tveim hlutum af eimuðu vatni. Þetta var soðið í 2 mín. og síð í gegnum tvær síur fyrst grófa og svo fínna síu, síðan var vökvinn settur í gegnum tvöfaldan kaffifilter. Salt innihald var stillt þannig að það var 2.74% og pH var stillt á 7.7. Seyðið var síðan dauðhreinsað í þrýstisjóðara við 121°C í 15 mín.

2.6.3. Festing örvera á yfirborð.

Aðferðin var framkvæmd samkvæmt Lundén o.fl (23) með breytingum. Stofnarnir voru ræktaðir í Tryptic Soy Broth (TSB) með viðbættu 0.6% yeast extracti við 35°C í 20-24 klst. Stofnunum var umsáð þrisvar sinnum áður en þeim var sáð í rækjuseyði. Þegar ræktirnar voru 10^{7-8} frumur/ml var útbúin þynning með því að einn ml af rækt var þynnt í 100 ml af rækjuseyði. Festing frumanna við yfirborð var síðan könnuð með því að einn ml af þeirri þynningu var sáð í 30 ml af rækjuseyði í tilraunaglassi með stálsýni (upphafsræktun var því 10^{4-5} frumur/ml). Til að kanna hvort munur væri á því að rækta stofnana í rækjuseyði annars vegar og TSB hins vegar voru þrjár stofnar einnig ræktaðir samhliða í TSB. Tilraunaglösin voru síðan sett á hristara (70 rpm) og höfð við stofuhita. Biofilmmyndun *Listeria* stofnanna var könnuð með því að taka sýni þrisvar sinnum eftir fjórar klst, 24 klst og 72 klst. Eftir 48 klst ræktun var rækjuseyði skipt úr fyrir TSB til að hressa upp á næringu fyrir bakteríurnar. Í lok hvers tíma voru stálplöturnar teknar og

lausar frumur losaðar af með því að skola þær. Stálplöturnar voru settir í tóma petriskál með dauðhreinsuðu vatni og skálin hrist 20 sinnum, þetta var endurtekið einu sinni. Fastar bakteríur á plötunum voru metnar með þremur aðferðum, talningu á Tryptic Soy Agar (TSA, Difco) með viðbættu 0.6% yeast extracti, ATP mælingu og með því að lita plöturnar með Agridine Orange (Merck) (stofnar ræktaðir í TSB voru ekki litaðir með AO). Þrjár plötur voru notaðar fyrir hverja aðferð. Þannig að fyrir hvern stofn voru notaðar 27 plötur.

Talningaraðferð

Hefðbundin penslun með bómullarpinna. Pinnanum var rúllað jafnt og þétt yfir stálsýnið og hann síðan brotinn í þynningarglas með 10 ml af þynningarbuffer. Útbúnar voru viðeigandi þynningar. Eftir fjórar klst voru gerðar þynningar frá 0 uppí 10^3 , eftir 24 klst frá 10^1 uppí 10^4 og eftir 72 klst frá 10^2 uppí 10^5 . Sýnum var síðan sáð á TSA skálar og ræktað við 35°C í 20-24 klst og þá kóloníur taldar á skálunum.

ATP mæling

ATP (Adenosine-5-trophosphate) er orkuefni sem finnst í öllum lifandi frumum, bæði örverufrumum og vefjafrumu. Ljósmaeling með ATP mæli (Celsis Lumac) er notuð. ATP er losað úr frumunum. Mældar eru hlutfallslegar ljóseiningar (Realitive light units(RLU)) sem samsvarar magni ATP í sýninu. Sýni voru tekin með sérstökum ATP-pinna sem var rúllað yfir stálbútinn. Pensillinn var síðan vættur í ensímlausn og lausnin sett í kúvettu og mæld í ATP-mælinum.

Agridine Orange litun

Stálbútarnir voru litaðir með 0.05% acridine orange (epifluorescence) í tvær mín. Bútarnir voru síðan hreinsaðir með dauðhreinsuðu eimuðu vatni og þurrkaðir í lofti. Sýnin voru síðan skoðuð í smásjá við UV-ljós og frumur taldar á 20 mismunandi sjónsviðum (23).

3. NIÐURSTÖÐUR OG UMRÆÐUR

3.1 Tíðni *Listeria* og *Listeria monocytogenes*

Töflur 3 og 4 sýna tíðni *L. monocytogenes* í þeim vinnslum sem skoðaðar voru. Af 145 sýnum sem tekin voru í rækjuvinnslu eftir þrif og í vinnslu voru 7% *Listeria* jákvæð og

greindust þau öll sem *L. monocytogenes*. Engin sýni af hráefni voru menguð af *L. monocytogenes* og ekkert af afurðasýnum teknum eftir suðu þar með talin lokaafurð. Aðalstaðirnir sem reyndust mengaðir voru gólf, suðupottar, pillunarvél og sýni tekin fyrir utan vinnsluna en þau sýni teljast til umhverfishópsins í töflu 3.

Tafla 3. Tíðni *Listeria* og *L. monocytogenes* í rækjuvinnslu.

Uppruni	Fjöldi sýna	<i>Listeria</i> jákvæð sýni	
		<i>Listeria</i> spp.	Þar af <i>L. monocytogenes</i>
Hráefni	10	0	0
Umhverfi	108	8	8
Loft	5	0	0
Þekill	2	0	0
Vinnslusýni	10	2	2
Lokaafurð	10	0	0
Sýni alls	145	10 (7%)	10 (7%)

Af 124 sýnum sem voru tekin við vinnslu á reyktum laxi reyndust 11% menguð með *L. monocytogenes*. Ekki greindist mengun í hráefni en 20% af sýnum teknum af lokaafurð voru menguð með *L. monocytogenes*. Afgangur af sýnum hafði verið geymdur þannig að hægt var að taka sýni aftur af þessum menguðu lokaafurðum. Það var gert til að meta fjölda baktería. Ekki náðist að einangra aftur *Listeria* úr sama sýni sem bendir til þessi að fjöldi *L. monocytogenes* í grammi af sýni hafi verið <0,3 frumur/g en margar þjóðir eru nú farnar að setja mörk fyrir magn *Listeria* í afurðum og er algengt að það sé miðað við 100 frumur/g í lok geymslutímans. Um 11% af sýnum teknum úr umhverfi voru menguð með *L. monocytogenes* og voru þau öll tekin úr niðurföllum eða af gólfi.

Tafla 4. Tíðni *Listeria* og *L. monocytogenes* í vinnslu á reyktum laxi.

Uppruni	Fjöldi sýna	<i>Listeria</i> jákvæð sýni	
		<i>Listeria</i> spp.	Þar af <i>L. monocytogenes</i>
Hráefni	8		
Umhverfi	91	11	10
Þekill	2		
Vinnslusýni	8	1	1
Lokaafurð	15	3	3
Sýni alls	124	15(12%)	14(11%)

3.3 Aðrar mælingar

3.3.1 Framleiðslusýni

Niðurstöður annarra mælinga í afurðasýnum eru sýndar í töflu 5 og 6. Þær sýna að ástand hráefnis var mjög gott og eins ástand lokaafurðar. Við vinnslu á rækju þá lækkar fjöldi baktería í sýnum teknum eftir suðu. En við suðuna drepast langflestar bakteríur sem eru í hráefninu.

Tafla 5. Örverugreining á forsoðinni rækju. Sýni tekin á mismunandi stöðum í vinnsluferlinum

Sýni	Fjöldi sýna	Heildar-gerla-fjöldi/g (30°C)	Kóli alls MPn/g	Saur-kóli MPN/g
Hráefni	10	10 ⁴	0,7-46	<0,3-2,3
Rækjuskel	4	10 ¹ -10 ⁴	<0,3-24	<0,3
E. pillun	4	10 ¹ -10 ²	<0,3-0,4	<0,3
E.handhreinsun	2	10 ¹ -10 ²	<0,3	<0,3
Pækill	2	10 ⁴	<0,3-9,3	<0,3
Lokaafurð	10	10 ¹ -10 ²	<0,3	<0,3
Sýni alls	32			

Af sýnum teknum af afurðum á mismunandi stigum í vinnsluferlinum á reyktum laxi var aðeins ákvarðaður heildarfjöldi baktería í grammi af sýni og var hann á bilinu 100-1000 bakteríur/g af sýni og var aðeins aukning á seinni stigum ferilsins eins og kemur fram í töflu 6. Kald-reyking sem slík hefur lítil sem engin áhrif á fjölda baktería sem eru í hráefninu.

Tafla 6. Örverugreining á reyktum laxi. Sýni tekin á mismunandi stöðum í vinnsluferlinum

Sýni	Fjöldi sýna	Heildar-gerla-fjöldi/g (30°C)
Hráefni	10	10 ²
Fiskur eftir saltsprautun	2	10 ²
F. eftir roðflettingu	2	10 ²
F. eftir skurð	2	10 ³
Lokaafurð	15	10 ² -10 ³
Sýni alls	31	

3.3.2 Mat á hreinlæti með hefðbundinni penslun og ATP-mælingu

Hreinlæti og þrif var metið með sjónmati með því að mæla ATP (niðurstöður ekki sýndar). Áberandi var að þrif voru ekki nógu góð í móttöku (í rækju- og laxavinnslu) og á suðusvæði samanborið við sýni sem tekin voru á svæðum þar sem verið var að meðhöndla soðna/reykta afurð. Koma verður í veg fyrir hvers konar umgang á milli þessara svæða meðan vinnsla er í gangi. Þarna er mikil hættu á "kross-mengun" en hún

getur átt sér stað frá hráefni, tækjum, áhöldum, starfsfólki og frá umhverfinu yfir í lokaafurð sem er tilbúin til neyslu.

3.4 Hitastig og innra eftirlit

Hitastig var mælt í umhverfi og í vinnslusýnum meðan á vinnslu stóð og sjást mæligildin í töflum 7 og 8. Þar kemur einnig fram tími sem ákveðin vinnsluþrep taka.

Tafla 7. Tími og hitastig við vinnslu á rækju

		Hitastig °C	
Vinnsluþrep	Tími	Rækja	Umhverfi
Hráefni	2-6 dagar	0-3°C	<4°C
Hráefni - frosið	Þiðið yfir nótt	0-3°C	<4°C
Lagering	16-20 klst	0-4°C	7-12°C
Suða	15 sek	72-75°C	75
Pillun		20-30°C	10-12°C
Handhreinsun		6-11°C	17-20°C
Pæklun		8-12°C	8-11°C
Frysting		-35°C	9-12°C
Pökkun		<-18°C	12-16°C
Geymsla - frost		<-18°C	-27°C

Stærð hráefnis hefur áhrif á tíma við suðu á rækju og einnig á söltunar- og reykferlið við vinnslu á reyktum laxi.

Tafla 8. Tíma og hitastig við framleiðslu á reyktum laxi

		Hitastig °C	
Framleiðsla	Tími	Fiskur	Herbergi
Hráefni		0-2°C	10-12°C
E. flökun		5-6°C	
Sprautusöltun/pæklun		4°C	10-12°C
Geymsla f. reykingu	allt að 12 klst		4°C
Reyking	þurrkur 4 klst		15- 20°C
	reykur 4 klst		20-25
Geymsla eftir reyk	24 klst	0-2°C	0-4°C
Roðfletting/ Skurður			12-14°C
Pökkun			12-14°C
Geymsla lokaafurða (kælir)	3-4 vikur		0-4°C

3.5. PFGE greining

Alls voru greindir 83 stofnar úr rækjuvinnslu og 107 stofnar úr reyktum laxi og vinnsluumhverfi á tímabilinu 2000-2001. Þeir voru einangraðir í þeim úttektum sem framkvæmdar voru í þessu verkefni, auk þess voru greindir stofnar sem einangraðir voru í öðrum úttektum í viðkomandi vinnsluhúsum. Einnig voru stofnar greindir sem höfðu einangrast úr fyrirtæki A en það vann meðal annars úr afurð úr húsi A. Hins vegar eru teknar saman niðurstöður á greiningu á öllum stofnum sem einangraðir voru úr vinnslu á reyktum laxi og rækjuvinnslu og framkvæmdar voru í eldra verkefni. Þannig fæst betra yfirlit yfir stofnagreiningar á *L. monocytogenes* í þessum vinnsluhúsum, þar sem tímabilið sem stofnarnir voru einangraðir á verður lengra (1997-2001). Í þessari skýrslu eru því kynntar niðurstöður á greiningu 375 stofna (1-3 stofnar úr hverju sýni), 203 stofnar úr vinnslu á kald-reyktum laxi og 172 úr rækjuvinnslu. Tafla 9 sýnir hvernig allir stofnarnir skiptast á milli húsa og hvar þeir voru einangraðir í vinnsluumhverfinu. Hús B og C framleiða rækju, hús A, D, E, F og G framleiða reyktan lax. Fyrirtæki A framleiðir sjávarafurðir meðal annars úr kald-reyktum laxi, einn stofn var einangraður úr eldisstöð.

Tafla 9: Skipting stofna eftir vinnsluhúsum og hvar þeir eru einangraðir í vinnslunni.

	Hús A	Hús B	Hús C	Fyrirt. A	Hús D	Hús E	Hús F	Hús G	Eldi	Í heild
Hráefni	10		7	22	6				1	
Vinnsla	65	67	53	5	7	6	4			
Eftir þrif	10	39	3		3	1	1			
Loftsýni	1									
Lokaafurð	34			11	3			2		
Umhverfi	9		3							
Samtals	130	106	66	38	19	7	5	2	1	

Rækjuvinnsla: Í heildina voru greindir 172 stofnar úr rækjuvinnslu, 106 úr húsi B og 66 úr húsi C. Í húsi B var ein PFGE-týpa ríkjandi (ApaI 66- AscI 60) (sjá mynd 1) en 93 af 106 stofnum (87.7%) flokkuðust í þá týpu. Í þeirri týpu voru stofnar einangraðir bæði í vinnslu og eftir þrif. AscI týpa 66 skiptist í fernt með ApaI (týpur 60, 95, 59 og 65), 7 stofnar voru síðan í þremur viðbótar títípum. Tveir stofnar voru í týpu AscI 97- ApaI 96 en AscI 97 var ríkjandi í húsi C, þó svo að ApaI 96 fannst ekki þar. Stofnarnir fjórir sem eftir eru tilheyrðu þrem PFGE títípum.

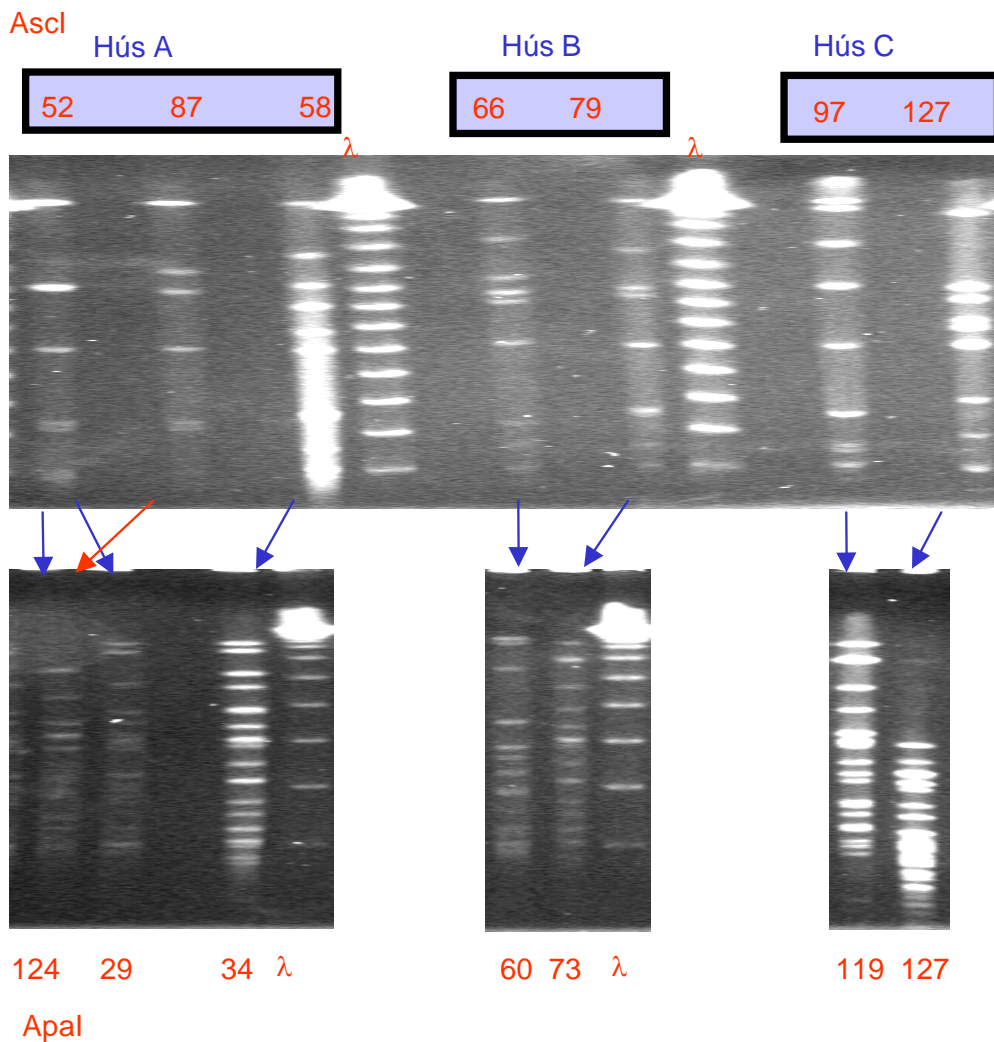
Í húsi C var einnig ein ríkjandi PFGE-týpa (AscI 97- ApaI 119) (sjá mynd 1) en 43 af 66 (65.0%) stofnum tilheyrðu þeirri týpu. ApaI týpa 119 skiptist í tvennt, auk AscI 97- ApaI 119 var týpa AscI 130- ApaI 119 en þar flokkuðust tveir stofnar. Í PFGE-týpunni þar sem flestir stofnar flokkuðust, voru stofnar einangraðir úr hráefni, vinnslu og umhverfi. Þeir 21 stofn sem eftir voru flokkuðust í 6 PFGE-týpur. En af þeim voru 9 stofnar af týpu AscI 66- ApaI 60 og þrír stofnar af týpu AscI 66- ApaI 59 en þær týpur fundust í húsi B. Ekki er vitað um nein tengsl á milli þessara tveggja húsa. Níu stofnar skiptust svo í þær fjórar PFGE týpur sem eftir eru.

Kald-reyktur lax: Það var farið nær eingöngu í hús A en af 202 stofnum úr laxavinnslu voru 130 úr húsi A, 38 stofnar voru úr fyrirtæki A, 20 úr húsi D, 7 úr húsi E, fjórir úr húsi F og tveir úr húsi G, auk þess var einn stofn úr eldisstöð sem hús A fékk hráefni frá. Í húsi A sést að það er viðvarandi PFGE-týpa í vinnsluhúsinu síðan að minnsta kosti 1997. Af 130 stofni sem var einangraður þar, 121 (93%) stofn í sömu PFGE- týpu með AscI (týpu 52) en þessi hópur skiptist í þrennt þegar ApaI var notað, 60 stofnar í ApaI 124 og 58 stofnar í ApaI 29 (sjá mynd 1) og þrír stofnar í ApaI 125. Auk þess þá skiptist ApaI týpa 124 í tvennt með AscI þar sem voru 60 stofnar af PFGE-týpu AscI 52- ApaI 124 og 6 stofnar af týpu AscI 87- ApaI 124 (sjá mynd 1). Þessir stofnar voru úr hráefni, vinnslulínu fyrir og eftir þrif og í lokaafurð, en sýnin voru tekin yfir allt sýnatökutímabilið (1997-2001). Það sem eftir var af stofnunum (3) tilheyrðu tveim PFGE-týpum. Í fyrirtæki A, sem framleiddi vörur úr reyktum laxi frá húsi A, fannst sama PFGE-týpa og í húsi A (AscI 52-ApaI 29). Af 38 stofnum sem einangraðir voru 2001 voru 28 stofnar af þeirri PFGE-týpu. Hins vegar voru þeir 10 stofnar sem eftir voru af sömu PFGE-týpu sem var ríkjandi í húsi C (AscI 97- ApaI 119). Ekki er vitað um tengsl á milli húsa, en þau eru á sama landsvæði. Einn stofn sem var einangraður úr fiskeldis stöð sem sá húsi A fyrir hráefni var einnig af týpu AscI 52- ApaI 29. Stofnar sem tilheyrðu týpu AscI 52- ApaI 29 fundust því í hráefni úr fiskeldisstöð, hráefni, vinnslu fyrir og eftir þrif og úr lokaafurð í húsi A og auk þess í fyrirtæki sem framleiddi vöru úr reyktum laxi frá húsi A.

Í húsi D voru 19 stofnar einangraðir, þeir flokkuðust í 10 PFGE-týpur. Flestir stofnar voru í týpu AscI 94- ApaI 90 eða 5 stofnar (26.3%), fjórir af þeim voru úr hráefni en einn úr vinnslu. AscI týpa 94 skiptist einnig í ApaI týpu 22 og 94 en einn stofn var í hvorri týpu. Í PFGE týpu AscI 54- ApaI 30 voru þrír stofnar (úr vinnslu og lokaafurð) en AscI

týpa 54 skiptist einni í ApaI 37 en þar var einn stofn. Í týpu AscI 96- ApaI 93 voru einnig þrjár stofnar (hráefni og lokaafurð). Þeir 5 stofnar sem eftir eru flokkuðust í fjórar PFGE-týpur.

Í húsi E einangruðust 7 stofnar, þeir flokkuðust í fjórar PFGE-týpur. Í týpunni þar sem flestir stofnar flokkuðust voru þrjár (42.8%) stofnar, allir úr vinnslu. Í húsi F einangruðust 5 stofnar, þeir flokkuðust í fjórar PFGE-týpur. Tveir stofnar voru í týpu AscI 65- ApaI 45 en hún skiptist auk þess í ApaI 54 en þar var einn stofn. PFGE-týpa AscI 92- ApaI 84 innihélt einn stofn en AscI týpa 92 fannst einnig í húsi E. Úr húsi G voru tveir stofnar, þeir flokkuðust báðir í týpu AscI 52- ApaI 124, en það var stærsta týpan í húsi A. Þessir stofnar einangruðust úr lokaafurð (30).



Mynd 1. Dæmi um nokkrar PFGE-týpur sem einangruðust úr 3 vinnsluhúsum (hús A, B og C). Efri myndin sýnir AscI týpur en þær neðri Apa I týpur. Örvarnar benda á þær týpur sem eru saman.

Þessar niðurstöður sýna að greiningarmáttur þessara tveggja ensíma er mjög álíka þó hefur ApaI örlítið betri greiningarmátt. En það er í samræmi við niðurstöður Brosch o.fl. en þar sem AscI gefur færri bönd (oft 8-14) heldur en ApaI (18-23 bönd) þá er auðveldar að túlka þær niðurstöður (7). Á mynd 1 sést þessi munur á fjölda banda eftir hvort ensímið er notað. Hins vegar sýndu niðurstöður Autio o.fl að AscI hafði örlítið betri greiningarmátt (3).

3.6. Serótýpugreining

Alls voru 45 stofnar sem einangraðir voru í þessu verkefni serótýpugreindir. Af þeim var 21 stofn úr rækjuvinnslu og 18 úr vinnslu á reyktum laxi og 6 úr fyrirtæki A sem framleiddi afurðir úr reyktum laxi úr húsi A. Töflur 10 og 11 sýna niðurstöður greiningarinnar og hvaðan stofnarnir eru. Áður var búið að greina 26 stofna, 8 úr rækjuvinnslu og 18 úr laxavinnslu, þessir stofnar eru aðgreindir í töflum 10 og 11 og eru stjörnumerktir. Alls hefur því 71 stofn (29 úr rækjuvinnslu og 41 úr laxavinnslu) verið serótýpugreindir.

Tafla 10: Skipting stofna úr rækjuvinnslu í serótýpur, stjörnumerktar tölur eru stofnar sem voru serótýpugreindir í verkefninu "Listeria gagnagrunnur"

	1/2	1/2a	1/2b	1/2c	4	4ab	4b
Hráefni(hús B)		1*					1
Hráefni (hús C)			1*				1
Umhverfi (hús C)							1
Vinnsla (hús C)	1	1*		1	1		5
Vinnsla (hús B)	2*			9			
Eftir þrif (hús B)				1, 1*		1*	1*

Tafla 11. Skipting stofna úr laxavinnslu í serótýpur, stjörnumerktar tölur eru stofnar sem voru serótýpugreindir í verkefninu "Listeria gagnagrunnur"

	1/2	1/2a	1/2b	4b
Umhverfi (hús A)		1		
Hráefni (hús A)	1*			
Vinnsla (hús A)	1*	9, 3*	2*	
Eftir þrif (hús A)	1*	1*		
Loftsýni (hús A)			1*	
Lokaafurð (hús A)		7		
Hráefni (hús D)			1*	
Vinnsla (hús D)			1*	
Lokaafurð (hús D)		1*		
Lokaafurð (hús G)		1		
Hráefni (fyrirt. A)				1
Vinnsla (fyrirt. A)				1
Lokaafurð (fyrirt. A)		4		
Eftir þrif (hús F)		1*		

3.6.1. Samanburður á PFGE-týpum og serótýpugreiningu

Tölur 12 og 13 sýna hvernig serótýpunar flokkast eftir PFGE-týpum. Þegar serótýpugreiningin er borin saman við PFGE greiningu sést að PFGE týpunar þar sem flestir stofnar flokkuðust í rækjuvinnslunni eins og AscI 66- ApaI 60 (hús B) þar sem 14 stofnar voru serótýpugreindir að þeir eru aðallega af serótýpu 1/2c eða 11 stofnar. Stofnarnir þrír sem eftir eru greindust í 1/2, 1/2a og 1/2b. Ekki var hægt að greina H antigenið á þeim stofnum sem greindust sem serovar 1/2 þetta gæti stafað af því að of fáar svipur voru á frumunum. Af týpu AscI 97-ApaI 119 (hús C og fyrirtæki A) voru 8 stofnar serótýpugreindir og voru allir í 4b, týpa AscI 97- ApaI 132 (einn stofn) var einnig í 4b.

Í laxavinnslu voru flestir stofnar af serótýpu 1/2a en í PFGE týpu AscI 52 – ApaI 124 þar sem flestir stofnarnir flokkuðust voru allri stofnar af þeirri serótýpu. Þetta er í samræmi við niðurstöður annarra að stofnar úr reyktum laxi eru aðallega af serótýpu 1/2, sérstaklega 1/2a (11), þó var stofninn úr silungi sem Ericsson o.fl tengdu við listeriosis tilfelli af serótýpu 4b (13).

Buchrieser o.fl hafa sýnt fram á að það er ekkert samband á milli PFGE-týpa og mismunandi serótýpu, t.d. voru sumir stofnar af serótýpu 1/2a, 1/2b og 1/2c í sömu PFGE-týpu eins og þessar niðurstöður sýna (9).

Tafla 12: Skipting PFGE-týpa eftir serótýpu í stofnum úr vinnsluumhverfi rækju

PFGE- týpur	1/2	1/2a	1/2b	1/2c	4	4ab	4b
66-60 (hús B)	1	1	1	11			
66-95 (hús B)	1						
80-81 (hús B)						1	
79-73 (hús B)							1
97-119 (hús C)							6
97-132 (hús C)							1
130-119 (hús C)	1						
127-127 (hús C)					1		
131-129 (hús C)							1
66-59 (hús C)		1					
128-134 (hús C)				1			

Tafla 13: Skipting PFGE-týpa eftir serótýpu í stofnum úr vinnsluumhverfi reyktis lax

PFGE- týpur	1/2	1/2a	1/2b	4b
52-124 (hús A, fA, G)		19		
52-29 (hús A)	4	4	3	
52-125 (hús A)		1		
99-98 (hús A)	1	1		
87-124 (hús A)		1		
94-90 (hús D)		1	1	
54-30 (hús D)		1		
55-122 (hús D)			1	
65-45 (hús F)		1		
97-119 (fyrirt.A)				2

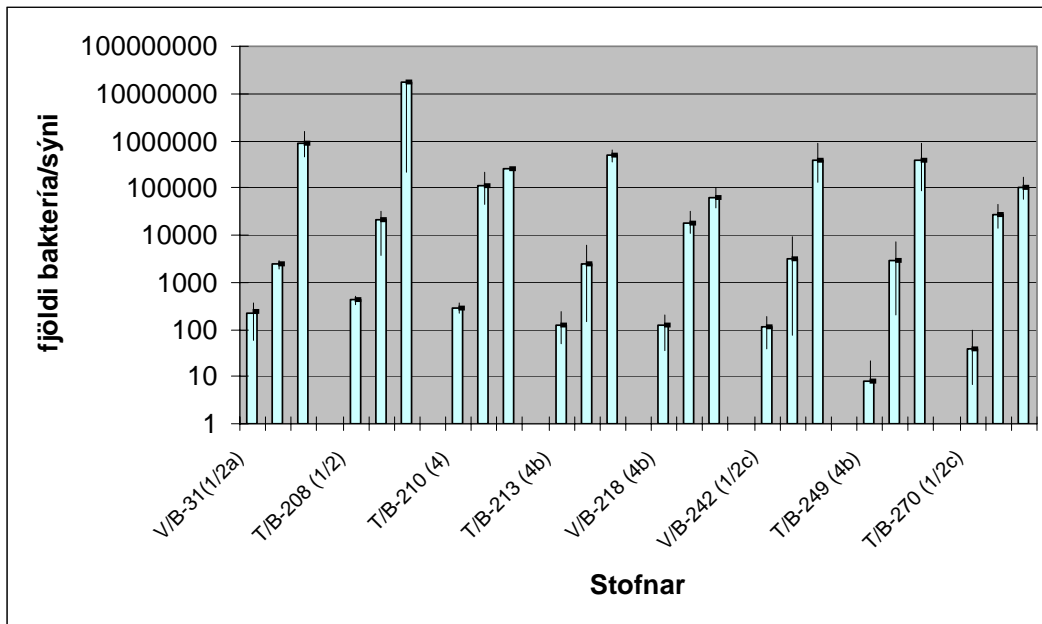
3.7. Biofimu rannsóknir

3.7.1. Talningaraðferð

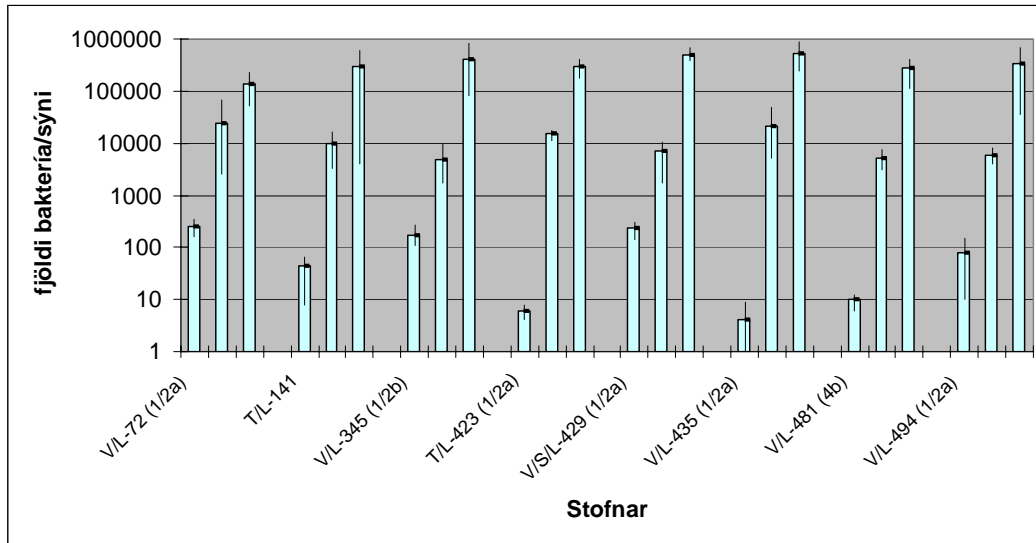
Myndir 2 og 3 sýna niðurstöður talninga á stofnunum úr rækju- og laxavinnslu eftir fjórar, 24 og 72 klst. Niðurstöðurnar eru færðar á log skala. Myndirnar sýna að ekki er hægt að sjá mun á biofilmu myndun stofnanna eftir því hvort þeir eru viðloðandi eða tilfallandi í vinnsluhúsunum (sjá yfirlit yfir stofnana í töflu 2). Sá stofn (mynd 2) sem sýnir hæsta talningu eftir fjórar og 72 klst er stofn sem kom tilfallandi inn í hús C og einu sinni. Það eru tveir tilfallandi stofnar í rækjuvinnslu sem gefa lága talningu (<100) eftir fjórar klst en eftir 24 og 72 klst eru þeir orðnir sambærilegir öðrum stofnum. Í laxavinnslu eru 5 stofnar sem gefa lága talningu (<100) eftir fjórar klst en ná sér síðan

upp eftir 24 og 72 klst. Tveir þeirra eru tilfallandi og þrír viðloðandi þannig að ekki er hægt að segja að tilfallandi stofnar gefi lægri talningu eftir fjórar klst.

Þegar rækjuseyði og TSB var borið saman eru niðurstöður talninga mjög sambærilegar nema eftir 24 tíma þá fæst hærri talning í TSB (niðurstöður ekki sýndar). Þar sem munurinn var lítil var ákveðið að nota rækjuseyðið þar sem það líkir betur eftir vinnsluumhverfinu sem stofnarnir voru einangraðir úr.



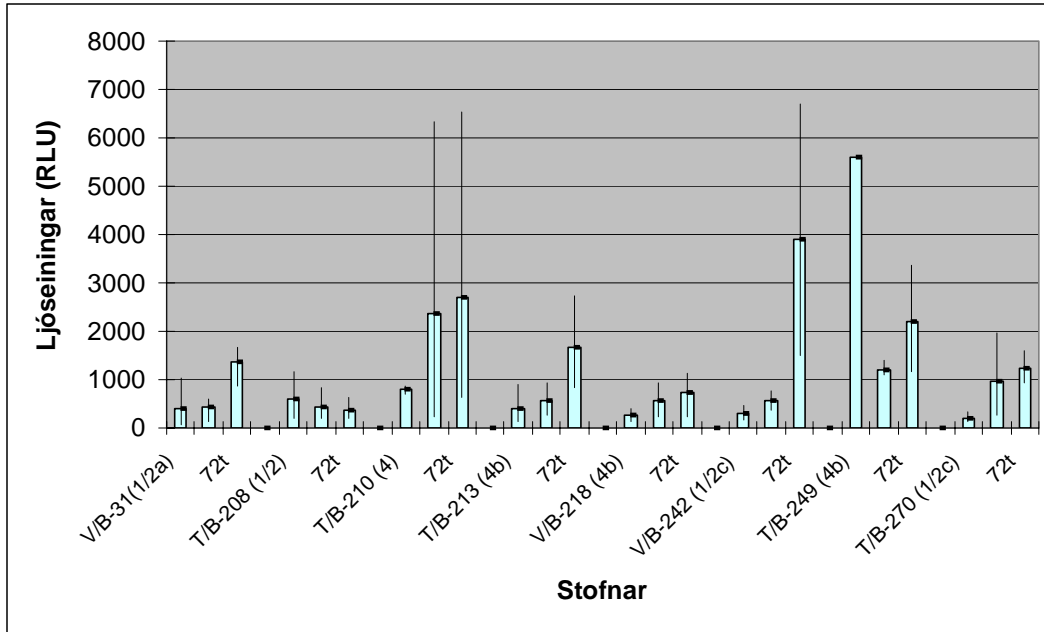
Mynd 2. Samanburður á festingu stofna úr rækjuvinnslu á glerblásið stál. Þrjár súlur eru fyrir hvern stofn, þ.e. eftir fjórar, 24 og 72 klst. Fjöldi baktería er áætlaður með hefðbundinni penslun. Súlurnar sýna meðaltal þriggja mælinga, strikin sýna hæsta og lægsta mæligildi



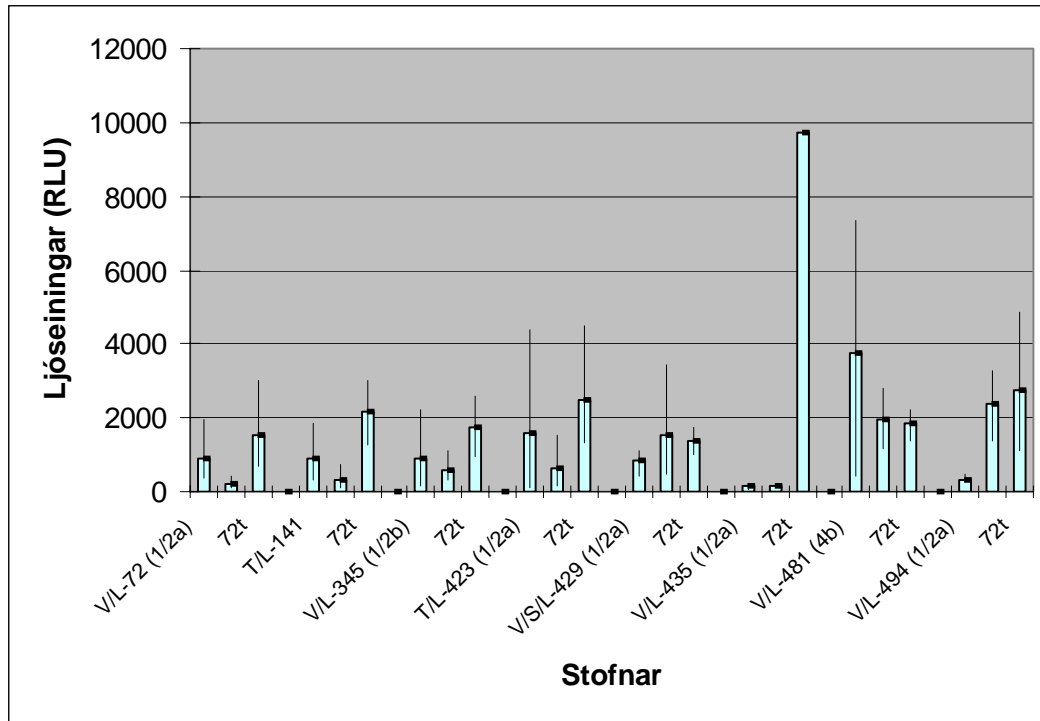
Mynd 3. Samanburður á festingu stofna úr laxavinnslu á glerblásið stál. Þrjár súlur eru fyrir hvern stofn, þ.e. eftir fjórar, 24 og 72 klst. Fjöldi baktería er áætlaður með hefðbundinni penslun. Súlurnar sýna meðaltal þriggja mælinga, strikin sýna hæsta og lægsta mæligildi.

3.7.1. ATP mæling

Myndir 4 og 5 sýna niðurstöður ATP-mælinga á stofnunum úr rækju- og laxavinnslu eftir fjórar, 24 og 72 klst. Þegar þær mælingar eru skoðaðar sést að mikill munur er á hæsta og lægsta mæligildi, mælingarnar þrjár gáfu mjög mismunandi niðurstöður. Þannig að erfitt er að meta niðurstöður þessara mælinga, þær eru mjög álíka fyrir alla stofnana og ekki sést munur á viðloðandi og tilfallandi stofnum.



Mynd 4. Samanburður á festingu stofna úr rækjuvinnslu á glerblásið stál. Þrjár súlur eru fyrir hvern stofn, þ.e. eftir fjórar, 24 og 72 klst. ATP-mælingar. Súlnurnar sýna meðaltal þriggja mælinga, strikin sýna hæsta og lægsta mæligildi



Mynd 5. Samanburður á festingu stofna úr laxavinnslu á glerblásið stál. Þrjár súlur eru fyrir hvern stofn, þ.e. eftir fjórar, 24 og 72 klst. ATP-mælingar. Súlnurnar sýna meðaltal þriggja mælinga, strikin sýna hæsta og lægsta mæligildi

3.7.3. Agridine Orange litun

Þegar farið var að skoða Agridine Orange lituðu plöturnar sáust mjög fáar frumur og enginn munur var á milli sýnatökutíma. Líklegt má telja að eitthvað hafi misfarist við litunina. Eins voru erfiðleikar með hugbúnaðinn til þess að skoða plöturnar. Því eru þær niðurstöður ekki birtar.

4. LOKAORÐ

Ein vinnsla á rækju og ein á reyktum laxi voru heimsóttar tvisvar sinnum á einu ári hvor um sig, um vor og í byrjun vetrar, árið 2001 (alls fjórar úttektir). Um það bil 124 sýni voru tekin samtals í vinnslu á reyktum laxi og 145 sýni í rækjuvinnslu. Sýni voru tekin af hráefni, afurðum á ýmsum þrepum vinnslunnar, af tækjum, þækli, lofti, hlífðarfatnaði o. fl. Samhliða sýnatökunum var innra eftirlit og viðhaft hreinlæti við vinnslu skoðað. Í þessum úttektum fannst *Listeria* í sýnum teknum úr umhverfi og úr lokafurð (reyktur lax)

en ekki í hráefni. Í rækjuvinnslunni hefur hún greinst endurtekið úr sýnum teknum af tækjum en ekki í lokaafurð.

L. monocytogenes var oftast einangruð á lághættusvæði, hún greindist ekki í fullunninni rækju en greindist í 20% sýna teknum af reyktum laxi en fjöldi baktería í laxinum var svo lítil að bakterían greindist ekki í magngreiningu. Sýni sem voru tekin eftir þrif og þegar vinnsla var í gangi greindust jákvæð (2%). Úr laxavinnslunni hefur *Listeria* greinst úr niðurföllum og sýnum teknum af gólfi eftir þrif og þegar vinnsla var í gangi en það þarf ekki endilega að vera vísbending um lélegar þrifaaðferðir þar sem *Listeria* er mjög útbreidd í náttúrunni og getur því auðveldlega borist inn í vinnsluna með hráefni, körum og fólki.

Niðurstöðurnar benda til að mengunarleið *L. monocytogenes* getur sterklega verið frá vinnsluumhverfi. Þrifaaðferðir og þá sérstaklega á hrásvæði duga ekki nógu vel til að útrýma mengun af völdum *Listeria* og getur bakterían því borist auðveldlega á milli svæða ef ekkert er að gert til að fyrirbyggja það. Það verður að stjórna umgengni og vinnubrögðum með ákveðnum hætti til að draga úr líkum á beinni mengun frá umhverfinu. Hægt er t.d að stjórna þrifum, hitastigi, setja umgengisreglur og að gera hráefniskröfur. Þrif og sótthreinsun á gólfflötum/niðurföllum þurfa að vera markviss.

Famleiðandi þarf að hafa sýnatökuplan sem beinist að *Listeria* þar sem sýni eru tekin úr umhverfinu með reglulegu millibili. Sýnatökustaðir og tíðni skulu vera byggð á þekkingu og reynslu sem fengist hefur í viðkomandi vinnslu. Úttektir sem þessar eru nauðsynlegar til að hægt sé að gera virkt sýnatökuplan. En eitt er ljóst að hreinlætis- og umgengisreglur á öllum stigum vinnslunnar eru mjög mikilvægar til að koma í veg fyrir endurmengun á afurðinni.

Þó svo að *L. monocytogenes* hafi verið einangruð úr lokaafurð og úr vinnsluumhverfi hefur aðaluppspretta mengunar enn ekki verið staðfest. Það er mjög mikilvægt að hægt sé að staðsetja uppruna mengunarinnar svo hægt sé að fyrirbyggja og hafa stjórn á því að matvæli mengist við vinnslu. Mikilvægast er að geta komið í veg fyrir að bakterían nái að festa sig í sessi inni í vinnslurýminu þannig að þrif og sótthreinsun nái ekki að vinna á henni. Þegar vinnsla fer síðan í gang þá nær bakterían að skjótast af og til út úr felustað sínum og menga þannig umhverfið og afurðina sem ferðast um vinnslulínuna. Þessa stöðu er aðeins hægt að bæta með því að staðsetja uppruna mengunarinnar með ábyggilegum aðferðum.

Stofnarnir sem einangruðust í þessum úttektum voru greindir með PFGE, auk þess voru niðurstöður PFGE greininga á stofnum úr rækju- og laxavinnslu úr verkefninu "*Listeria* gagnagrunnur" settar saman með niðurstöðum þessa verkefnis. Með því fæst greining á stofnum yfir mun lengra tímabil.

PFGE niðurstöður sýna að greinilega er um hússtofna að ræða þar sem hvert vinnsluhús hefur einkennandi PFGE-týpu. Í laxavinnslu var ein PFGE-týpa þar sem flestir stofnar flokkuðust, sem einangraðist ekki í öðrum húsum en fannst þó í lokaafurð (2 sýni) úr húsi G. Eins var í rækjuvinnslunni þannig að aðeins nokkrir stofnar af stærstu PFGE-týpunni í húsi B einangruðust í húsi C. Hins vegar flokkuðust ekki saman stofnar úr rækju og laxavinnslu. En í fyrirtæki A einangruðust stofnar bæði úr laxa og rækjuvinnslu. Vitað er að þar voru framleiddar vörur úr reyktum laxi úr húsi A þannig að þar eru tengsl. Hins vegar eru einu tengslin sem vitað er um við hús C að það er á sama landssvæði og fyrirtæki A. Þetta bendir til að stofnar hér virðast sérhæfa sig að ákveðinni vinnslu. Þar gætu komið við sögu þættir eins og mismunandi aðlögun að saltstyrk og pH gildi en *L. monocytogenes* er mjög þolin gangvart þessum þáttum. Þessar niðurstöður eru í samræmi við niðurstöður annara þar sem sömu stofnar fundust endurtekið yfir langt tímabil (3, 28, 30, 33).

Í biofilmu rannsóknunum voru valdir stofnar af mismunandi uppruna, þannig að PFGE-týpunar dreifðust, valdir voru stofnar sem bæði voru viðvarandi í vinnsluhúsum og eins þeir sem komu stöku sinnum (sporadískir) inn í vinnsluhúsin. Tilgátan var sú að stofnar sem væru viðvarandi festust betur og fljótar við stálplötur en þeir sem komu inn stöku sinnum. En niðurstaða talninga sýndi að svo var ekki. Viðloðun stofnanna virtist vera sú sama, ekki var hægt að sjá mun á milli viðvarandi og tilfallandi stofna. Það sýndi sig í þessum tilraunum að ATP-mæling var ekki góður mælikvarði til að meta viðloðun stofnanna þar sem mikill munur var yfirleitt milli sýnanna þriggja sem tekin voru eftir hvern tíma.

Agridine orange litunin sýndi ekki mikinn árangur, mjög fáar frumur lituðust þannig að erfitt var að meta fjölda þeirra og þær niðurstöður því ekki birtar hér.

Niðurstöður þessara biofilmurannsókna eru ekki í samræmi við niðurstöður Lundén o.fl. þar sem greinilegur munur var á biofilmumyndun stofna eftir því hvort þeir voru viðloðandi eða ekki. Í þeirri rannsókn voru valdir stofnar sem voru viðloðandi og tilfallandi í fuglakjötsframleiðslu og í ís verksmiðju. Viðvarandi stofnar úr báðum

verksmiðjum sýndu meiri viðloðun með hærri frumutalningum eftir stuttan snertitíma. Þau fundu einnig að stofnar af serótýpu 1/2c sýndu meiri viðloðun en stofnar af öðrum serótýpum (23). Í þessari rannsókn var einn stofn af serótýpu 1/2c sem hafði verið viðloðandi í rækjuvinnslu, en hann sýndi ekki meiri viðloðun en aðrir stofnar (sjá mynd 2)

Megin niðurstaða þessa verkefnis er að *Listeria monocytogenes* virðist vera viðvarandi í vinnsluhúsum á Íslandi. Stofnarnir sem þar finnast eru flestir af sömu PFGE-týpu en hins vegar virðast týpurnar einskorðast við ákveðna vinnslu tegund og jafnvel vinnsluhús. Í framhaldi af þessum rannsóknum væri því áhugavert að skoða fleiri vinnslutegundir til að sjá hvort þessi aðgreining haldist.

Ekki var hægt að sýna fram á mun á viðloðun viðvarandi og tilfallandi stofna sem einangruðust úr vinnslunum.

5. HEIMILDIR

1. *Ad hoc* Expert Consultations on risk assessment of microbiological hazards in foods, 2000. Report of the joint FAO/WHO Expert Consultation on risk assessment of microbiological hazards in foods, FAO Headquarters, Rome (Italy), 17-21 July 2000, 50 pages. <http://www.fao.org/waicent/faoinfo/economic/ESN/pagerisk/report.pdf>
2. Autio, T.; Hielm, S.; Miettinen, M.; Sjöberg, A.; Aarnisalo, K.; Björkroth, J.; Mattila-Sandholm, T. og Korkeala, H. (1999). Sources of *Listeria monocytogenes* Contamination in a Cold-Smoked Rainbow Trout Processing Plant Detected by Pulsed-Field Gel Electrophoresis Typing. *Applied and Environmental Microbiology*, 6:150-155.
3. Autio, T., Lundén, J., Fredriksson-Ahomaa, Björkroth, J., Sjöberg, A-M. and Korkeala, H. (2002). Similar *Listeria monocytogenes* pulsotypes detected in several foods originating from different sources. *Int. J. of Food Microb.* 77:83-90.
4. Baloga, A. O. og Harlander, S. K. 1991. Comparison of Methods for Discrimination between Strains of *Listeria monocytogenes* from Epidemiological Surveys. *Applied and Environmental Microbiology*, 57:2324-2331.
5. Bille, J. 1998. Fyrirlestur á ráðstefnu "XIII International Symposium on listeriosis problems, June 28-July 2, 1998, Halifax, N-S, Canada.
6. Brett, M.; Short, P. og McLauchlin, J. (1998). A small outbreak of listeriosis associated with smoked mussels. *Int. J. of Food Microb.* 43:223-229.
7. Brosch, R.; Chen, J.; og Luchansky, J. B. 1994. Pulsed-Field Fingerprinting of Listeriae: Identification of Genomic Divisions for *Listeria monocytogenes* and Their Correlation with Serovar. *Applied and Environmental Microbiology*, 60:2584-2592.
8. Brosch, R.; Brett, M.; Catimel, B.; Luchansky, J.; Ojeniyi, B. og Rocourt, J. 1996. Genomic fingerprinting of 80 strains from the WHO multicenter international typing study of *Listeria monocytogenes* via pulsed-field gel electrophoresis (PFGE). *Int. J. of Food Microb.* 32:343-355.
9. Buchrieser, C.; Brosch, R. og Rocourt, J. (1991). Use of pulsed field gel electrophoresis to compare large DNA-restriction fragments of *Listeria monocytogenes* strains belonging to serogroups 1/2 and 3. *Int. J. of Food Microb.* 14:297-304.
10. Buncic, S.; Avery, S.; Rocourt, J og Dimitijevic, M. (2001). Can food-related environmental factors induce different behaviour in two key serovars, 4b and 1/2a, of *Listeria monocytogenes*? *Int. J. of Food Microb.* 65:201-212.
11. Dauphin, G.; Ragimbeau, C. og Malle, P. (2001). Use of PFGE typing for tracing contamination with *Listeria monocytogenes* in three cold-smoked salmon processing plants. *Int. J. of Food Microb.* 64:51-61.
12. Destro, M. T.; Leitao, M. F. og Farber, J. M. (1996). Use of Molecular Typing Methods To Trace the Dissemination of *Listeria monocytogenes* in a Shrimp Processing Plant. *Applied and Environmental Microbiology*, 62:705-711.
13. Ericsson, H.; Eklöv, A.; Danielsson-Tham, M.-L.; Loncarevic, S.; Mentzing, L.-O.; Persson, I.; Unnerstad, H. og Tham, W. (1997). An Outbreak of Listeriosis Suspected To Have Been Caused by Rainbow Trout. *Journal of Clinical Microbiology*, 35:2904-2907.
14. FAO Expert Consultation. (1999). The trade impact of *Listeria* in fish products, University of Massachusetts, Amherst (USA), 17-20 May 1999, 38 pages.
15. Farber, J.M.; Daley, E.M.; Mackie, M.T. and Limerick, B. (2000). A small outbreak of listeriosis, potentially linked to the consumption of imitation crab meat. *Lett. in appl. Microb.* 31:100-104.
16. Goulet, V. (1998). Fyrirlestur á ráðstefnu "XIII International Symposium on listeriosis problems, June 28-July 2, 1998, Halifax, N-S, Canada.

17. Guðmundsdóttir, S. (2000). *Listeria* gagnagrunnur. Rf skýrsla no. 10-00.
18. Hartemink, R. og Georgsson, F., (1991). Incidence of *Listeria* species in seafood and seafood salads. *Int. J. of Food Microb.* 12:189-196.
19. Hjaltested, E., Gudmundsdóttir, S., Kristjánsson, M., Jónsdóttir, K., Kristinsson, K.G., Steingrímsson, Ó. (2002). Listeriosis in Iceland, 1978-2000: A Description of Cases and Molecular Epidemiology. *Scand. J of inf. dis.* 34:735-741.
20. Kerouanton, A.; Brisabois, A.; Denoyer, E.; Dilasser, F.; Grout, J.; Salvat, G. og Pichard, B. (1998). Comparison of five typing methods for the epidemiological study of *Listeria monocytogenes*. *Int. J. of Food Microb.* 43:61-71.
21. Lauzon, H.L.; Guðbjörnsdóttir, B. og Einarsson, H. (1999). Contamination with *Listeria monocytogenes*. Annar þáttur verkefnisins "Gæði og öryggi reyktis fisks" CT95-1207, lokaskýrsla, 26 bls.
22. Loncarevic, S.; Danielsson-Tham, M.-L.; Martensson, L.; Ringnér, A.; Runehagen, A. og Tham, W. (1997). A case of foodborne listeriosis in Sweden. *Letters in Applied Microbiology*, 24:65-68.
23. Lundén, J.M.; Miettinen, M.K.; Autio, T.J. og Korkeala, H.J. (2000). Persistent *Listeria monocytogenes* Strains Show Enhanced Adherence to Food Contact Surface after Short Contact Times. *Journal of Food Protection*, 63:1204-1207.
24. Maijala, R., Lyytikäinen, Johansson, T., Autio, T. Haavisto, L. and Honkanen-Buzalski, T. (2001) Exposure of *Listeria monocytogenes* within an epidemic caused by butter in Finland. *Int. J. of Food Microb.* 70:97-109.
25. McClain, D. og Lee, W. H. (1989). FSIS method for the isolation and identification of *Listeria monocytogenes* from processed meat and poultry products. *Lab. Comm. No. 57* revised May 24, 1989. U.S.Dept. of Agric (USDA), FSIS, Microbiol.Div., Beltsville, Md. pp.1-12.
26. Maslow, J, Slutsky, A. and Arbeit, R. (1993). Application of pulsed-field gel electrophoresis to molecular epidemiology. In: Persing, D. Smith, T. Tenover, F. and White, T. (eds). *Diagnostic Molecular Microbiology, Principles and Application*. American Society of Microbiology, Washington, pp. 563-572.
27. Miettinen, M.; Siitonen, A.; Heiskanen, P.; Haajanen, H.; Björkroth, J. og Korkeala, H. (1999). Molecular Epidemiology of an Outbreak of Febrile Gastroenteritis Caused by *Listeria monocytogenes* in Cold-Smoked Rainbow Trout. *Journal of Clinical Microbiology*, 37:2358-2360.
28. Miettinen, M.; Björkroth, J. og Korkeala, H. (1999). Characterization of *Listeria monocytogenes* from an ice cream plant by serotyping and pulsed-field gel electrophoresis. *Int. J. of Food Microb.* 46:187-192.
29. Nadon, C.; Woodward, D.; Young, C.; Rodgers, F. Og Wiedman, M. (2001). Correlation between Molecular Subtyping and Serotyping of *Listeria monocytogenes*. *Journal of Clinical Microbiology*, 39:2704-2707.
30. Norton, D.; McCamey, M.; Gall, K.; Scarlett, J.; Boor, K. og Wiedmann, M. (2001). Molecular Studies on the Ecology of *Listeria monocytogenes* in the Smoked Fish Processing Industry. *Applied and Environmental Microbiology*, 67:198-205.
31. Orozco, Lorena, N. (2001). The occurrence of *Listeria monocytogenes* and Microbiological Quality of Cold Smoked and Gravád Fish on the Icelandic Retail Market. Skýrsla nemenda Sjávarútvegsskóla sameinuðu þjóðanna.
32. Rocourt, J., Jacquet, C. og Rely, A (2000). Epidemiology of human listeriosis and seafoods. *Int. J. of Food Microb.* 62:197-209.
33. Senczek, D.; Stephan, R. og Unterman, F. (2000). Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) typing of *Listeria* strains isolated from a meat processing plant over a 2-year period. *Int. J. of Food Microb.* 62:155-159.