



|                              |  |                     |  |
|------------------------------|--|---------------------|--|
| Titill / Title               | <i>Listeria</i> gagnagrunnur/ <i>Listeria</i> database   |                     |  |
| Höfundar / Authors           | Sigrún Guðmundsdóttir  |                     |  |
| Skýrsla Rf / IFL report      | 10-00  | Útgáfudagur / Date: |  |
| Verknr. / project no.        | 1427   |                     |  |
| Styrktaraðilar /<br>funding: | Tæknisjóður Rannís   |                     |  |
| Ágrip á íslensku:            | <p><i>Listeria</i> er baktería sem finnst víða í umhverfinu og hefur verið einangruð úr mörgum matvæategundum. Þessi baktería getur fjölgað sér í kæligeymslu en er hitanæg. <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. Erfiðlega hefur gengið að uppræta mengun þar sem smitleiðir hafa ekki verið þekktar. Þróun sameindafræðilegra aðferða gerir kleift að rekja uppruna mengunar. Í þessu verkefni voru <i>Listeria</i> stofnar einangraðir úr mönnum, dýrum, matvælum og vinnsluumhverfi matvæla, greindir með Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE) og gagnagrunnur settur á fót. Helstu niðurstöður voru þær að stofnar af mismunandi uppruna flokkuðust ekki saman, þ.e. mannastofnar og matvælastofnar. En í vinnsluumhverfi matvæla (reykts lax og rækju) mátti sjá að stofnar einangraðir úr hráefni, eftir þrif, í vinnslu og í lokaafurðum flokkuðust saman, eins flokkuðust saman stofnar sem einangraðir voru úr vinnsluumhverfi með ársmillibili.</p>  |                     |  |
| Lykilorð á íslensku:         | <i>Listeria</i> , PFGE, listeriosis, gagnagrunnur  |                     |  |
| Summary in English:          | <p><i>Listeria</i> is a widely spread, environmental bacterium and has been isolated from various foods. This bacterium can proliferate at refrigerated temperatures but is heat-labile. <i>L. monocytogenes</i> is pathogenic to humans, causing listeriosis. Due to an increasing consumption of ready-to-eat food, authorities require a better control of <i>Listeria</i> contamination. It has been difficult to eliminate <i>Listeria</i> as the sources are not always known. The development of molecular identification methods makes possible to trace the origin of food contamination. In this project <i>Listeria</i> strains were isolated from humans, animals, foods and food processing environments, typed using Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE) and a database established. Main results were that strains from different sources did not group together, i.e. strains from humans and foods. But in processing environment of food (cold-smoked salmon and shrimp), strains isolated from raw material, after cleaning and during processing and in final products grouped together. Moreover strains isolated in processing environment at a year interval also grouped together.</p> |                     |  |
| English keywords:            | <i>Listeria</i> , PFGE, listeriosis, database  |                     |  |

Efnisyfirlit:

|  |           |
|--|-----------|
| <b>1. INNGANGUR.....</b>   | <b>3</b>  |
| <b>2. EFNI OG AÐFERÐIR.....</b>  | <b>5</b>  |
| 2.1 Einangrun stofna .....   | 5         |
| 2.1.1 Sýnataka og ræktun.....  | 5         |
| 2.1.2 Staðfesting á <i>Listeria</i> .....                                      | 5         |
| 2.2 Serótýpugreining .....   | 6         |
| 2.3 Pulsed-Field Gel Electrophoresis .....                                     | 6         |
| 2.3.1 Ræktun .....   | 6         |
| 2.3.2 Einangrun DNA .....  | 6         |
| 2.3.3 Melting .....  | 6         |
| 2.3.4 Rafdráttur .....   | 6         |
| 2.3.5 Litun og myndataka .....   | 6         |
| 2.3.6 Úrvinnsla .....  | 7         |
| <b>3. NIÐURSTÖÐUR OG UMRÆÐUR.....</b>  | <b>7</b>  |
| 3.1 Tíðni <i>L. monocytogenes</i> í ýmsum matvörum .....                       | 7         |
| 3.2 Serótýpugreining .....   | 7         |
| 3.3. Greining á <i>L. monocytogenes</i> stofnum með PFGE .....                 | 8         |
| 3.3.1 Stofnar einangraðir úr mönnum .....                                      | 9         |
| 3.3.3 Stofnar einangraðir úr reyktum laxi og tilheyrandi vinnsluumhverfi ..... | 11        |
| 3.3.4 Stofnar einangraðir úr rækju og tilheyrandi vinnsluumhverfi .....        | 16        |
| 3.3.5 Stofnar einangraðir úr hrámjólk.....                                     | 19        |
| 3.3.6 Stofnar einangraðir úr öðrum matvælum og kjötvinnslu .....               | 22        |
| 3.3.7 Stofnar einangraðir úr sauðfé.....                                       | 25        |
| 3.3.8 Aðrar <i>Listeria</i> tegundir.....                                      | 27        |
| 3.4 Lokaorð .....  | 29        |
| <b>4. ÞAKKARORÐ.....</b>   | <b>29</b> |
| <b>5. HEIMILDIR .....</b>  | <b>30</b> |

## 1. Inngangur

*Listeria* er baktería sem finnst mjög víða í umhverfinu og hefur verið einangruð úr mörgum matvælategundum. Nokkrar tegundir hennar geta verið sjúkdómsvaldandi. Sjúkdómurinn, sem hún veldur, nefnist listeriosis. Sú tegund, sem veldur oftast listeriosis, er *Listeria monocytogenes* (*Lm*), en *L. ivanovii* og *L. seeligeri* hafa verið tengdar að minnsta kosti fjórum listeriosis tilfellum (Klima og Montville, 1995).

*L. monocytogenes* hefur verið einangruð meðal annars úr mjólk (gerilsneyddri og ógerilsneyddri), mjúkkum ostum, ís, hráu kjöti og fuglakjöti, hráum fiski og skelfiski, tilbúnum mat, krydduðum pylsum, grænmeti, matvælaværksmiðjum og jarðvegi (Baloga og Harlander, 1991). *Listeria* faraldrar hafa til dæmis verið raktir til svínakjöts (1992-1993) og mjúkra osta (1995 og 1997) í Frakklandi (Goulet, 1998). Þeir sem eru næmir fyrir þessum sjúkdómi eru vanfærar konur, nýfædd börn, gamalt fólk og einstaklingar sem eru ónæmisbældir. Algengustu sjúkdómsmyndir sýkinga af völdum *Listeria* eru heilahimnubólga, blóðeitrun, lífhimnubólga og hjartapelsbólga. Sýking á meðgöngu getur valdið fósturláti, andvana fæðingu og fæðingu fyrir tímann. Tíðni sýkinga er venjulega um 4-8 tilfelli á hverja milljón íbúa. Dánartíðni af völdum listeriosis er um 20-30% og sumstaðar allt að 45% (Loncarevic o.fl., 1997; Klima og Montville, 1995; FAO report, 2000). Á árunum 1978-1997 var tíðni *Listeria* á Íslandi 8,3 tilfelli á hverja milljón íbúa og dánartíðnin var 33% (Hjaltested o.fl., 2000). Í heilbrigðum einstaklingum veldur listeriosis oftast flensu einkennum, til dæmis má nefna að árið 1998 geisaði faraldur á Ítalíu þar sem um 1600 einstaklingar veiktust af magakveisu (Bille, 1998).

Nauðsynlegt er að ráða yfir aðferðum til þess að greina hvaðan mengun berst í matvæli. Nokkrar aðferðir, sem byggjast á greiningu svipgerðarbreytileika, hafa verið notaðar til að rekja hvaðan mengun berst, svo sem serótýpugreining og phagatýpugreining. Þessar aðferðir hafa hins vegar reynst ófullnægjandi því að serótýpugreining hefur ófullnægjandi aðgreiningarhæfni þar sem 90% stofnanna tilheyra serótýpum 1/2a, 1/2b og 4b (Moore og Datta, 1994). Einnig hefur komið í ljós að ekki hefur verið mögulegt að framkvæma phagatýpugreiningu á nema um 70% af stofnum. Auk þess virðist vera erfitt að bera saman phagatýpuniðurstöður því að aðferðirnar eru mismunandi. Það er því farið að nota sameindafræðilegar aðferðir til greininga í auknum mæli því að hægt er að greina alla stofna og þessar aðferðir eru góðar til þess að nota við faraldsfræðilegar rannsóknir (Nocera o.fl., 1993; Ojeniyi o.fl., 1996). Það hefur einnig verið sýnt fram á að hægt sé að nota Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE) til þess að spá fyrir um serótýpu stofnana (Brosch o.fl., 1994). Því er mikilvægt að framkvæma einnig serótýpugreiningu á *L. monocytogenes*. Sem dæmi má nefna að Destro o.fl. (1996) notuðu PFGE og RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) til þess að kortleggja útbreiðslu *L. monocytogenes* í rækjuverksmiðju. Báðar aðferðir reyndust vel því að þær gáfu sömu niðurstöður með endurteknum mælingum. Þegar niðurstöður þessara beggja aðferða voru settar saman jókst greiningarmáttur (discriminatory power) aðferðanna. Brosch o.fl. (1996) stóðu fyrir samanburði á PFGE á sömu stofnum milli nokkurra rannsóknastofa og kom þar fram að þessi aðferð hentaði mjög vel því að niðurstöðurnar voru sambærilegar milli rannsóknastofanna. Í tilraun þar sem fimm greiningaraðferðir voru skoðaðar gaf PFGE hæstan aðgreiningarstuðul og þegar tvær aðferðir voru settar saman hafði ribotyping og PFGE hæstan stuðul (Kerounanton o.fl., 1998).

Það hefur reynst erfitt að sýna fram á tengslin á milli stofna úr matvælum og sjúklingum með hefðbundnum aðferðum. Það hefur þó verið gert í nokkrum tilfellum, meðal annars tveimur í Svíþjóð þar sem sameindafræðilegar aðferðir voru notaðar. Annað tilfallið var þegar 9 manns urðu veikir en með því að nota Restriction Enzyme Analysis (REA) var hægt að rekja sex þessara tilfella til grafins silungs frá ákveðnum framleiðanda á svæðinu. REA sýndi fram á að *L. monocytogenes* stofnar, sem voru einangraðir úr 6 sjúklingum, voru allir af sama stofni (clonal) en þessi sami stofn var einnig einangraður úr gröfnum silungi (Ericsson o.fl., 1997). Hitt tilfallið var þegar gömul kona veiktist af heilahimnubólgu. *L. monocytogenes* var einangruð úr sjúklingnum, 23 sýni af matvælum úr ískáp sjúklingsins voru tekin og fannst *L. monocytogenes* í tveimur þeirra (svínakjöti og kryddpýlsu). Með því að nota PFGE var sýnt fram á að stofninn (clonal) úr sjúklingnum og kryddpýlsunni var sá sami (Loncarevic o.fl., 1997). Á Nýja-Sjálandi var PFGE-aðferðin notuð til þess að rekja hópsýkingu til ákveðins kræklingaframleiðanda (Brett o.fl., 1998). Eins hefur PFGE verið notað til þess að sýna fram á að *Lm* getur valdið iðrasýkingu í heilbrigðum einstaklingum. Þannig sýktust fimm einstaklingar af því að borða kaldreyktan regnbogasilung og tveir eftir að hafa borðað gervikrabbakjöt en einkennin lýstu sér í niðurgangi, uppköstum og hita. Stofnar, sem einangraðir voru úr saursýnum sjúklinga og matvælasýnum, sýndu óaðgreinanleg PFGE-munstur. Silungurinn hafði verið geymdur við of hátt hitastig í verslun (11.6°C) þannig að bakterían hafði náð að fjölga sér þar. Þessi tilfalli þykja styðja það að heilbrigðir einstaklingar geta fengið iðrasýkingu og hita af völdum *Lm* ef matvæla, sem innihalda mikið magn baktería (Miettinen o.fl., 1999a; Farber, 2000), er neytt

Autio o.fl. (1999) sýndu fram á með notkun PFGE hvaðan mengun barst í kaldreyktan regnbogasilung. Sýni voru tekin af hráefninu í framleiðsluferlinu og af lokaafurðinni. Niðurstöður PFGE sýndu að stofnarnir í lokaafurðinni voru þeir sömu og einangruðust í pæklun (brining) og niðurskurði (slicing) en voru ekki eins og þeir sem einangruðust úr hráefninu. Eins er margt sem bendir til þess að um sé að ræða svo kallaða "hússtofna" í matvælavinnslu en það er þegar sami stofninn er til staðar jafnvel svo árum skiptir. Rannsóknir á *Listeria* stofnum, sem voru einangraðir úr ísverksmiðju og greindir með PFGE, sýndu að sami stofninn hafði verið til staðar í verksmiðjunni í sjö ár (Miettinen o.fl., 1999b). PFGE-rannsóknir á stofnum úr svínasláturhúsum sýndu einnig að stofnar virðast viðhaldast þar á ákveðnum stöðum. Ein ástæðan fyrir því að stofnar geti viðhaldist þannig er að *L. monocytogenes* loðir vel við yfirborð og myndar "biofilm" sem verndar hana gegn sótthreinsiefnum (Giovannacci o.fl., 1999). Hnitmiðaðar sótthreinsunaraðgerðir, sem beindust að þeim stöðum sem *Listeria* stofnarnir höfðu einangrast á, útrýmdu stofnunum úr vinnsluumhverfinu. Sameindafræðilegar aðferðir hafa það fram yfir hefðbundnar aðferðir að þær gefa ítarlegri greiningu.

Á Rannsóknastofnun fiskiðnaðarins hafa á undanförunum árum verið mörg verkefni í tengslum við *Listeria*, til dæmis verkefni þar sem tíðni *Listeria* í reyktum fiski (FAIR CT 95-1207, styrkt af Evrópubandalaginu) og í rækjum og kjöti (P-97070, styrkt af Nordisk Industrifond) var rannsökuð. Helstu niðurstöður benda til þess að tíðni *Listeria* í reyktum fiski á tímabilinu 1996-1998 sé um 3% (3/102 sýni) (Lauzon o.fl., 1999). Tíðni hennar í vinnsluumhverfinu er nokkuð hærri. Tilgáta er um að mengunin berist með hráefninu en frekari greining myndi staðfesta uppruna mengunar. Einnig hefur Hollustuvernd ríkisins gert úttektir á matvælum (t.d. kjötáleggi). Í þessum úttektum hefur mikill fjöldi stofna verið einangraður. Einnig hafa stofnar verið einangraðir úr sjúklingum hér á landi á síðastliðnum 20 árum á Sýkladeild

Landspítalans. Hartemink og Georgsson (1991) gerðu úttekt á *Listeria* í sjávarafurðum (hráum reyktum fiski, harðfiski, frosnum skelfiski og rækjum, ásamt nokkrum tegundum salata) á Íslandi. Það er athyglisvert að nefna að flestra þessara afurða er neytt án hitunar en *Listeria* drepst við hita. Þessi rannsókn sýndi að 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 eða harðfiski. Mest var af *L. monocytogenes* en *L. innocua* greindist einnig. Í einu sýni greindist *L. welshimeri*. Þessar niðurstöður benda til nokkuð hárrar tíðni *Listeria* í sjávarafurðum á Íslandi.

Mikið af þessum stofnum, sem hafa einangrast, hafa verið geymdir en þó alls ekki allir. Í framhaldi af þessum verkefnum er nauðsynlegt að kortleggja dreifingu stofnanna, skoða skyldleika þeirra og hvernig má rekja þá því að rannsóknir erlendis hafa sýnt fram á fjölgun vandamála sem tengjast *Listeria*. Mikilvægt er að kannað sé hvort matvæli séu menguð hérlendis, í hve miklum mæli og hvernig útbreiðslu þeirrar mengunar er háttað, til dæmis hvort ákveðin klasasýking tengist tilteknum matvælafyrirtækjum. Tilgangurinn með þessu verkefni var að safna saman *Listeria* stofnum, aðallega *L. monocytogenes*, sem hafa verið geymdir og einangraðir úr mönnum, dýrum, matvælum og vinnsluumhverfi. Þessir stofnar voru allir greindir niður í stofna með PFGE og útbreiðsla þeirra kortlögð og tengsl þeirra könnuð.

## 2. Efni og aðferðir

### 2.1 Einangrun stofna

Í verkefni þessu voru notaðir *Listeria* stofnar sem einangraðir höfðu verið með hefðbundnum aðferðum. Þessir stofnar voru einangraðir úr mönnum, dýrum, matvælum og matvælaumhverfi á undanförunum árum. Mannastofnar voru einangraðir á Sýkladeild Landspítalans á árunum 1978-1997, dýrastofnar á Rannsóknastöð Háskólans í meinafræði að Keldum á árunum 1963-1999 og stofnar úr matvælum og matvælaumhverfi í verkefnum sem unnin voru á árunum 1996-1999 á Rannsóknastofnun fiskiðnaðarins. Hjá Hollustuvernd ríkisins voru tekin um 97 matvælasýni í þessu verkefni frá október 1999 til október 2000 og þau ræktuð með tilliti til *Listeria*. Þessir stofnar voru allir geymdir í TSB (Tryptic Soy Broth) og 20% glyceróli við -75°C.

#### 2.1.1 Sýnataka og ræktun

Vigtuð voru 25g af sýni og þeim blandað við 225 ml af UVM modified *Listeria* enrichment-seyði (UVM) (BBL) í Stomacher-poka í 2 mín. Ræktun fór síðan fram í Stomacher-pokanum við 30°C í 24 tíma. Úr UVM var 0,1 ml sáð í 10 ml FRASER seyði, sem inniheldur hærri styrk acriflavins, og það ræktað við 35°C í allt að 40 tíma. Síðan var strikað úr því á LOX agar (Oxoid) og ræktað við 35°C í 48 tíma. LOX agar inniheldur esculin sem *Listeria* sundrar og því verða kólóníurnar svartar.

#### 2.1.2 Staðfesting á *Listeria*

Svörtum kólóníum af LOX agar var strikað á TSA-YE agar (Difco) og þær ræktaðar í 35°C í 24 tíma. Kólóníur voru svo teknar til frekari staðfestingar á hvort um *Listeria* væri að ræða. Framkvæmd var Gram-litun, katalasa-próf, kvikleiki með "hanging drop" aðferðinni og hemólýsa (rauðkornarof) á blóðagar (ræktað við 35°C í 24 tíma).

*Listeria monocytogenes* er Gram-jákvæð, katalasa-jákvæð, kvik og hemólýserandi. Til tegundagreiningar voru stofnarnir settir í API Listeria (BIO MÉRIEUX SA/France).

## 2.2 Serótýpugreining

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

## 2.3 Pulsed-Field Gel Electrophoresis

### 2.3.1 Ræktun

*Listeria* stofnum var strikað á Tryptic Soy agarskálar og ræktaðir við 35°C yfir nótt. Kóloníu var sáð í Brain Heart Infusion (BHI) seyði (Difco) og það ræktað við 35°C yfir nótt. Frumur úr 2 ml af BHI-seyði voru þvegnar í 5 ml PIV 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 PIV buffer.

### 2.3.2 Einangrun DNA

Frumunum var síðan blandað við 1.3% low melting agarose (InCert agarose, FMC Bioproducts) í jöfnum hlutföllum, blandan var síðan sett í sprautur og látin liggja á ís í 20-30 mín. Agarósa plöggarnir voru síðan settir í lysis-lausn (6 mM Tris, 1M NaCl, 100 mM EDTA, 0.5% Brij 58, 0.2% sodium deoxycholate, 0.5% sodium lauroyl sarcosine) sem innihélt 20 ug/ml RNAase, 10 U/ml Lysostaphine og 1 mg/ml Lysozyme í 4 tíma við 37°C (lausninni var stöðugt haldið á hreyfingu). Plöggarnir voru síðan settir í ES buffer (0.5 M EDTA, 1% sodium lauroyl sarcosine) sem innihélt 50 mg/ml Proteinase K og haldið á hreyfingu yfir nótt við 50°C. Plöggarnir voru síðan þvegnir fjórum sinnum í TE buffer (100 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA) við 37°C í klukku tíma hvert skipti og síðan yfir nótt.

### 2.3.3 Melting

Þunn sneið (1 mm) var skorin af plöggunum og sett í 5U AscI og 10U ApaI (New England Biolabs) og stofnar einangraðir úr mönnum voru einnig settir í SmaI (New England Biolabs) skerðiensím við 37°C (AscI) yfir nótt og 24°C (ApaI og SmaI) í 4 tíma.

### 2.3.4 Rafdráttur

Sýnin voru síðan rafdrengin í 0,9% (AscI) og 1% (ApaI, SmaI) agarósa hlaupi (SeaKem GTG, FMC Bioproducts) í 0.5 X TBE buffer (45 mM Tris, 4.5 mM boric acid, 1 mM EDTA) í 20 tíma við 210 V (AscI) og 200 V (ApaI, SmaI) við 14°C í CHEF DRIII system (BioRad Laboratories, Richmond, USA). Púlstímarnir voru frá 1 s til 28 s í 10 tíma og 28 s til 30 s í 10 tíma fyrir AscI og frá 1 s til 18 s í 20 tíma fyrir ApaI og SmaI.

### 2.3.5 Litun og myndataka

Hlaupin voru lituð í epidíumbrómíði í 30 mín. og síðan aflituð. Mynd var tekin af þeim við útfjólubláttljós 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.

### 2.3.6 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 aríthmatískum meðaltölum. Notuð voru 1% þolmörk og genótýpur sem voru með meiri en 90% skyldleika flokkuðust saman (sama genótýpa).

## 3. Niðurstöður og umræður

### 3.1 Tíðni *L. monocytogenes* í ýmsum matvörum

Hjá Hollustuvernd ríkisins voru rannsókuð 97 sýni af ýmsum matvælum á tímabilinu okt. 1999 – okt. 2000 með tilliti til *Listeria monocytogenes*. Tafla 1 sýnir hvaða matvæli voru rannsókuð og hvernig sýnin skiptust á milli matvælaflokka. Af 97 sýnum voru þrjú sýni jákvæð fyrir *L. monocytogenes* eða um 3%.

**Tafla 1. Listi yfir þau matvæli sem rannsókuð voru með tilliti til *L. monocytogenes***

| Tegund sýnis    | Fjöldi sýna | Jákvæð | Neikvæð |
|-----------------|-------------|--------|---------|
| Hrámjólk        | 14          | 2      | 12      |
| Grænmeti        | 26          | 0      | 26      |
| Álegg:          |             |        |         |
| Kæfa            | 6           | 0      | 6       |
| Skinka          | 6           | 0      | 6       |
| Áleggspylsa     | 9           | 0      | 9       |
| Unnin kjötvara  | 3           | 0      | 3       |
| Hrá kjötvara    | 15          | 1      | 14      |
| Hrá fiskvara    | 1           | 0      | 1       |
| Þorramatur-súr  | 9           | 0      | 9       |
| Þorramatur-ósúr | 5           | 0      | 5       |
| Innmatur        | 3           | 0      | 3       |
| Sýni alls       | 97          | 3      | 94      |

### 3.2 Serótýpugreining

Í þessu verkefni voru 52 stofnar serótýpugreindir. Þeir voru valdir þannig að þeir væru af mismunandi PFGE- genótýpum og að 2-3 stofnar væru af sömu genótýpu þannig að hægt væri að skoða hvort stofnar í sömu genótýpu væru af sömu serótýpu. Af þessum 52 stofnum voru 12 stofnar einangraðir úr mönnum, 24 úr laxi og laxavinnslu, 13 úr rækju og rækjuvinnslu, einn stofn úr síld og tveir stofnar úr mjólk. Erfitt var að greina stóran hluta stofnanna með H-mótsermi en þeir voru allir af serovar 1/2. Ástæðan fyrir því að erfitt var að greina með H-mótsermi gæti verið sú að ekki sé hægt að serótýpugreina þessa stofna eða að stofnunum hafi ekki verið umsáð nægjanlega þannig að svipumótefnavakarnir væru orðnir nægjanlegir til þess að gefa kekkjunarsvar. Af þessari ástæðu hefur oft verið eingöngu notað O-mótsermi þannig að stofnar eru eingöngu greindir niður í serovar, þ.e. 1/2 eða 4 (Autio o.fl., 1999). Tafla 2 sýnir hvernig stofnarnir skiptust í serótýpur en þegar eingöngu 1/2 er tilgreint var ekki unnt að greina stofnana með H-mótsermi.

**Tafla 2. Skipting á serótýpuhópum valinna *Lm* stofna**

| Uppruni stofna          | 4b | 4ab | 1/2 | 1/2a | 1/2b | 1/2c |
|-------------------------|----|-----|-----|------|------|------|
| Stofnar úr mönnum       | 3  |     |     | 6    | 3    |      |
| Stofnar úr laxavinnslu  | 1  |     | 10  | 8    | 5    |      |
| Stofnar úr rækjuvinnslu | 1  | 2   | 4   | 4    | 1    | 1    |
| Stofn úr síld           |    |     |     |      | 1    |      |
| Stofnar úr mjólk        | 1  |     |     |      | 1    |      |

Þessar niðurstöður sýna að meirihluti matvælastofnanna er af serovari 1/2, 1/2a og 1/2b. Vitað er að þeir stofnar, sem sýkja menn, eru aðallega af serótýpu 1/2a, 1/2b og 4b (Rocourt og Bille, 1997). Af þessum niðurstöðum má því ætla að flestir (37/40) þeir stofnar, sem einangruðust úr matvælum og vinnslu, gætu sýkt menn. Eins og fyrr sagði voru valdir 2-3 stofnar af genótýpuhópi til þess að serótýpugreina. Í flestum tilfellum var sama serótýpa innan genótýpuhóps en oft var það þannig að ekki var hægt að greina nema í serovar 1/2 þannig að erfitt var að bera saman niðurstöðurnar við PFGE- genótýpur.

### 3.3. Greining á *L. monocytogenes* stofnum með PFGE

PFGE-tæknin var notuð til að aðgreina 381 *Listeria* stofna (349 *L. monocytogenes* og 32 *Listeria spp.*) með AscI skerðiensími en 295 af *L. monocytogenes* stofnunum voru einnig aðgreindir með ApaI skerðiensími. Auk þess voru allir stofnar einangraðir úr mönnum greindir með SmaI. Þessir stofnar voru af ýmsum uppruna, úr mönnum, dýrum, matvælum og vinnsluumhverfi matvæla. Stærstur hluti matvæla og vinnsluumhverfis stofnanna var úr reyktum laxi og vinnsluumhverfi hans og úr rækjum og vinnsluumhverfi þeirra. Þegar litið er á skyldleika stofna af mismunandi uppruna þá er hann lítill. Stofnar einangraðir úr mönnum flokkuðust aldrei með matvælastofnum en matvælastofnarnir flokkuðust saman eftir matvælum og stofnar, einangraðir í vinnsluumhverfi, flokkuðust yfirleitt saman eftir vinnsluhúsum. Hins vegar flokkuðust saman hráefnisýni, umhverfissýni og jafnvel sýni úr lokaafurðum. Eins flokkuðust saman stofnar sem voru einangraðir af ýmsum stöðum í vinnslunni, bæði við vinnslu og eftir þrif. Stofnar, sem voru einangraðir með árs millibili úr sama vinnsluhúsi, flokkuðust einnig saman. Þetta bendir til þess að um sé að ræða svokallaða "hússtofna", þ.e. stofna sem viðhaldast í vinnsluhúsum þrátt fyrir þrif en slíkir stofnar geta viðhaldist í húsum í nokkur ár (Miettinen o.fl., 1999a). Ein af ástæðunum fyrir því að stofnar einangraðir úr mönnum flokkast aldrei með matvælum gæti verið sú að stofnarnir voru einangraðir á mismunandi tíma. Mannastofnarnir voru einangraðir á tímabilinu 1978-1997 en stofnar úr matvælum voru einangraðir á árunum 1997-2000. Á tímabilinu sem mannastofnarnir voru einangraðir sást breyting í samsetningu serótýpu þeirra. Á fyrstu 5 árunum fannst einungis serótýpa 4b, síðan fjölgaði serótýpum 1/2a og 1/2b en serótýpum 4b fækkaði (Hjaltested o.fl., 2000). Þetta safn af mannastofnum gefur góða yfirsýn yfir hvaða *Lm* stofna var að finna á Íslandi á þessu tímabili því að það inniheldur alla stofna sem hafa einangrast hér á landi. Aftur á móti er nýlega byrjað að safna stofnum úr matvælum á Rf. Í ljósi þessa er mikilvægt að viðhalda þessum gagnagrunni og bæta inn í hann eftir því sem nýir stofnar einangrast. Tíðni *Listeria* í matvælum á Íslandi er tiltölulega lág (3,1% í úttektinni í þessu verkefni) og því eru ekki margir stofnar til úr matvælum en þó getur þessi baktería fundist í töluverðum mæli í vinnsluumhverfinu (Lauzon o.fl., 1999). Ástæður þess að til er mikið safn af stofnum úr vinnslu reykt lax og rækju eru þær að úttektir hafa verið gerðar í eldri verkefnum og stofna, sem einangraðir voru í þeim úttektum, var hægt að nota í þessu verkefni. Í úttekt, sem gerð var á reyktum laxi árið



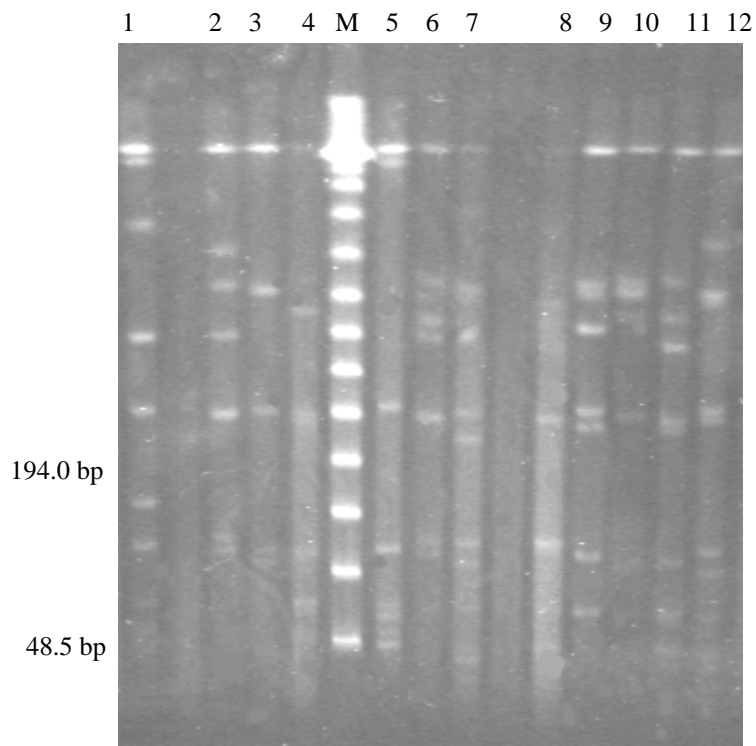
1997-1998, var tíðnin ekki nema 3% (3/102) þar sem eitt jákvætt sýni greindist með *L. monocytogenes* (Lauzon o.fl., 1999). Það má þá taka fram að margir stofnar, sem voru greindir nú, voru einangraðir úr sama sýni. Í mörgum tilfellum flokkuðust þeir saman en alls ekki í öllum; oft var það mikill munur á þeim að þeir aðgreindust.

### 3.3.1 Stofnar einangraðir úr mönnum

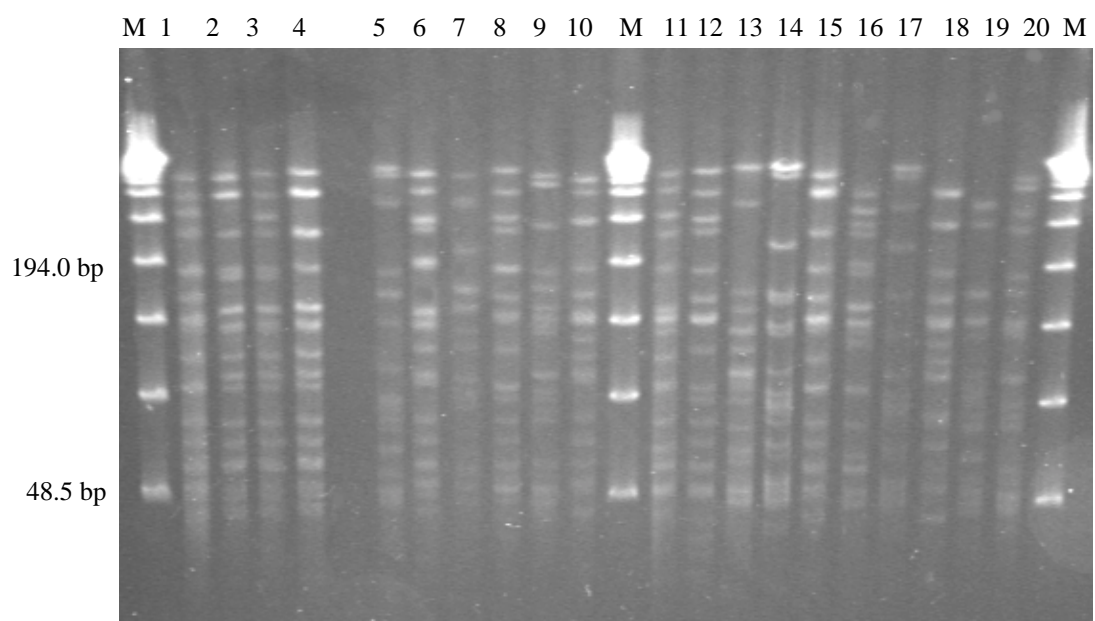
Greindir voru 47 stofnar sem einangraðir voru úr mönnum á árunum 1978-1997 en það eru öll tilfelli sem hafa greinst á þessum árum á Íslandi. Notuð voru þrjú skerðiensím til greiningar á mannastofnunum. Þessi tilfelli eru flest sporadísk tilfelli (stakstæð) en samt má sjá smá hópamyndun innan stofnanna. Myndir 1, 2 og 3 sýna nokkrar genótýpur sem fást við PFGE- greiningu á þessum stofnum með skerðiensímum AscI, ApaI og SmaI. Tafla 3 sýnir PFGE-týpur mannastofnanna ásamt serótýpum þeirra og hvenær þeir voru einangraðir. Taflan sýnir serótýpur allra mannastofnanna og þær upplýsingar eru fengnar frá Hjaltsted o.fl. (2000). Þar sést að serótýpur stofnanna eru mismunandi milli ára, á árunum 1978-1981 er eingöngu serótýpa 4b. Eftir það koma einnig stofnar af serótýpu 1/2a og 1/2b en eftir 1992 hafa eingöngu greinst stofnar af serótýpu 1/2a og 1/2b en 4b hverfur alveg. En þrátt fyrir þessi munstur í serótýpugreiningu er slík hópamyndun ekki eins augljós með PFGE-greiningu eins og búast mátti við vegna mikils greiningarmáttar aðferðarinnar.

**Tafla 3. PFGE- genótýpur og serótýpur *L. monocytogenes* stofna einangraðra úr mönnum á tímabilinu 1978-1997**

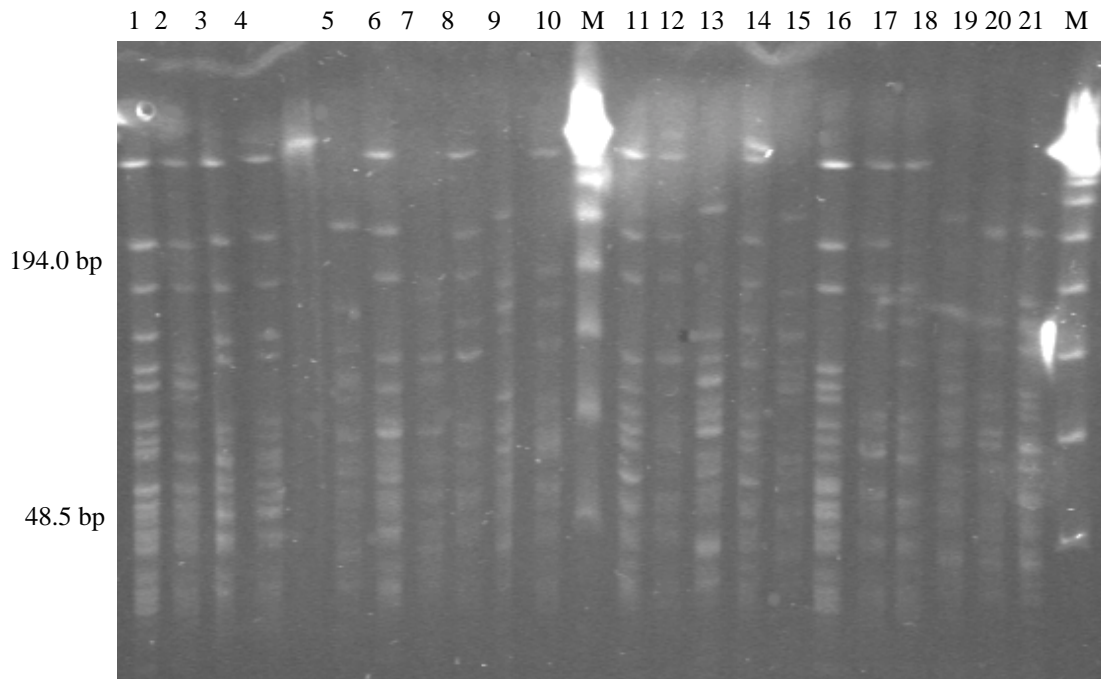
| PFGE<br>týpur | AscI<br>genótýpa | ApaI<br>genótýpa | SmaI<br>genótýpa | Serótýpur | Fjöldi<br>stofna | Ár einangrunar |
|---------------|------------------|------------------|------------------|-----------|------------------|----------------|
| 1a            | A                | A                | A                | 4b        | 2                | 1978           |
| 1b            | B                | A                | B                | 4b        | 1                | 1978           |
| 2a            | C                | B                | C                | 4b        | 5                | 1978-1983,1990 |
| 2b            | C                | D                | E                | 4b        | 1                | 1983           |
| 3             | D                | C                | D                | 4b        | 1                | 1981           |
| 4a            | E                | E                | F                | 1/2a      | 1                | 1983           |
| 4b            | L                | E                | F                | 1/2a      | 1                | 1989           |
| 5             | F                | F                | G                | 4b        | 2                | 1983           |
| 6             | G                | G                | H                | 1/2a      | 1                | 1985           |
| 7             | H                | H                | I                | 1/2b      | 1                | 1986           |
| 8             | I                | I                | J                | 1/2a      | 1                | 1987           |
| 9             | J                | J                | K                | 1/2b      | 1                | 1988           |
| 10a           | K                | K                | L                | 4b        | 1                | 1988           |
| 10b           | K                | K                | O                | 4b        | 1                | 1992           |
| 11            | M                | L                | M                | 1/2b      | 3                | 1990,1993      |
| 12a           | N                | M                | N                | 1/2a      | 2                | 1991,1996      |
| 12b           | T                | M                | T                | 1/2a      | 1                | 1992           |
| 13a           | O                | N                | P                | 1/2a      | 3                | 1992,1994      |
| 13b           | R                | Q                | P                | 1/2a      | 1                | 1995           |
| 14            | P                | O                | Q                | 1/2a      | 1                | 1993           |
| 15            | Q                | P                | R                | 1/2b      | 6                | 1993-1995      |
| 16            | S                | R                | S                | 1/2b      | 1                | 1995           |
| 17            | U                | S                | U                | 1/2a      | 1                | 1997           |
| 18            |                  | T                | V                | 1/2a      | 1                | 1997           |



Mynd 1. Nokkrar genótýpur greindar með *AscI* á stofnum einangruðum úr mönnum (*M* er lamda ladder til stærðarákvörðunar)



Mynd 2. Nokkrar genótýpur greindar með *ApaI* á stofnum einangruðum úr mönnum



Mynd 3. Nokkrar genótýpur greindar með *AscI* á stofnum einangruðum úr mönnum

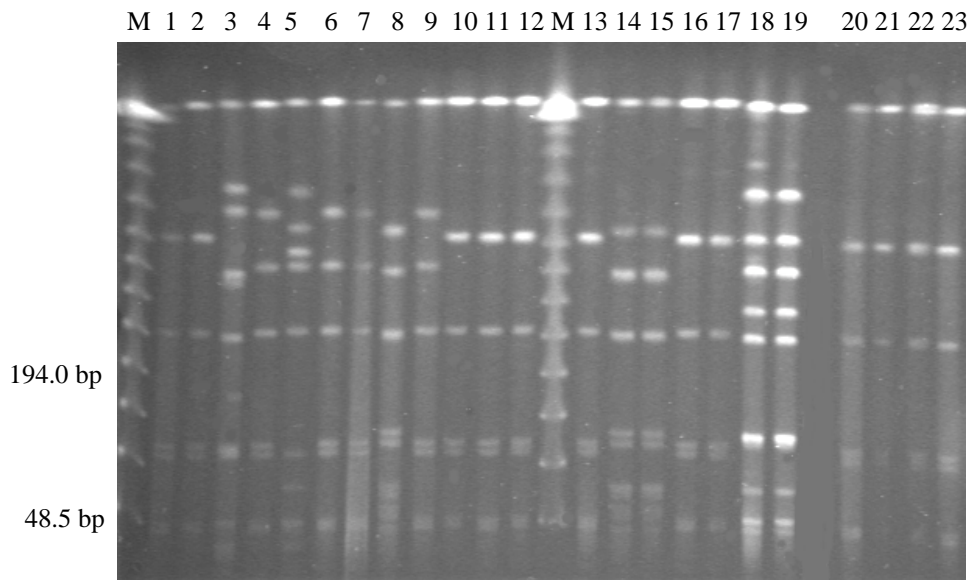
### 3.3.3 Stofnar einangraðir úr reyktum laxi og tilheyrandi vinnsluumhverfi

Greindir voru 105 stofnar með *AscI* en 95 stofnar með *ApaI* skerðiensími. Stofnar þessir voru einangraðir á tveggja ára tímabili (1997-1998) úr hráefni, vinnsluumhverfi og lokaafurðum í fjórum húsum sem framleiða reyktan lax og graflax (hús 1, 2, 3 og 4). Úr hráefni voru 20 stofnar, 54 stofnar úr vinnsluumhverfinu, 14 stofnar úr vinnsluumhverfi eftir þrif, 1 loftskýni, 7 stofnar úr lokaafurðum (6 úr reyktum laxi og 1 úr graflaxi) og 9 erlendir stofnar úr reyktum laxi. Stofnarnir skiptust þannig á milli húsa: hús 1: 64 stofnar, hús 2: 20 stofnar, hús 3: 5 stofnar og hús 4: 7 stofnar.

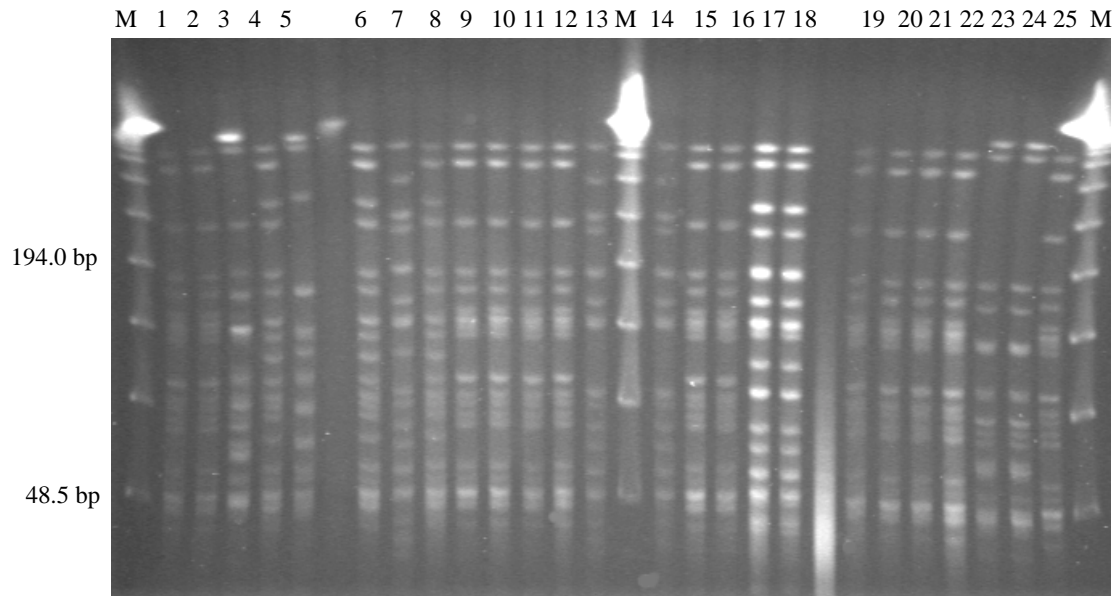
Greindir voru 9 stofnar með *AscI*, einangraðir úr reyktum laxi frá Danmörku og Hollandi, en þeir flokkuðust alveg sér og voru mjög ólíkir íslensku stofnunum. Myndir 4 og 5 sýna nokkrar genótýpur sem fást þegar stofnar úr reyktum laxi og vinnsluumhverfi eru greindir með skerðiensímum *AscI* og *ApaI*. Þar sést að stofnar, sem eru einangraðir eftir þrif og meðan á vinnslu stóð, flokkast saman. Stofnar einangraðir úr hráefni (hús 1) eru af sömu genótýpu og stofnar einangraðir í vinnslu eftir þrif og í lokaafurð. Eins sést að stofnar einangraðir úr húsum fjórum flokkast ekki saman. Myndir 6 og 7 sýna skyldleikatré stofnanna með *AscI* og *ApaI*. Þegar fleiri en einn stofn eru tilgreindir eru þeir meira en 90% skyldir. Á mynd 6 sést að fjórir hópar (sem hafa 40-50% skyldleika) myndast með *AscI* skerðiensími. Hópur 1 inniheldur 5 stofna af erlendum uppruna og 3 stofna úr vinnsluumhverfi í húsum 1 og 4. Hópur 2 er stærstur og í honum eru 79 stofnar úr öllum húsum og úr hráefni, vinnsluumhverfi eftir þrif og í vinnslu og úr lokaafurð. Eins flokkast saman stofnar sem eru einangraðir bæði 1997 og 1998. Í hópi 3 eru 14 stofnar, allir úr húsi 2 nema einn sem er úr húsi 1. Þessir stofnar eru úr hráefni, vinnsluumhverfi og lokaafurð en stofninn úr húsi 1 er úr vinnsluumhverfi eftir þrif. Í hópi 4 eru fjórir stofnar, allir úr reyktum laxi frá Hollandi. Stofnar úr mismunandi húsum flokkast aldrei saman með meira en 85% skyldleika en stofna úr öllum húsum er að finna innan hvers hóps. Einn hópur inniheldur eingöngu stofna frá Hollandi en þar sést að þeir stofnar eru mjög

ólíkir íslensku og dönsku stofnunum fyrir utan einn . Að öðru leyti virðast þessir hópar ekki aðgreina stofnana neitt.

Á mynd 7, þar sem notað er ApaI skerðiensím, sést að það eru einnig fjórir hópar sem myndast, tveir þeirra hafa um það bil 55% skyldleika en hinir 40%-50% skyldleika. Í hópi 1 eru 35 stofnar úr öllum húsum nema húsi 4 og þeir eru úr hráefni, loftskýni, vinnsluumhverfi eftir þrif og í vinnslu og úr lokaafurð. Í hópi 2 eru 13 stofnar úr öllum húsum nema húsi 1 og þeir eru aðallega úr vinnslu en þrjár stofnar eru úr hráefni og tveir eftir þrif. Í hópi 3 eru 37 stofnar úr húsum 1 og 2 og þeir eru úr hráefni, vinnsluumhverfi eftir þrif og í vinnslu og lokaafurð. Í hópi 4 eru 10 stofnar úr öllum húsum nema húsi 3 og þeir eru úr hráefni, vinnsluumhverfi eftir þrif og í vinnslu. ApaI virðist ekki gefa eins mikla aðgreiningu þar sem allt að 22 stofnar flokkast saman þegar það skerðiensím er notað. Þegar flokkun stofnanna er borin saman milli ensíma sést að ApaI gefur ívið betri greiningu í flestum tilfellum þar sem það greinir á milli stofna sem flokkast eins með AscI en þessi munur er þó mjög lítill. Fleiri bönd fást með ApaI og þau eru óskýrari, sem gerir úrvinnslu erfðari heldur en þegar AscI er notað.

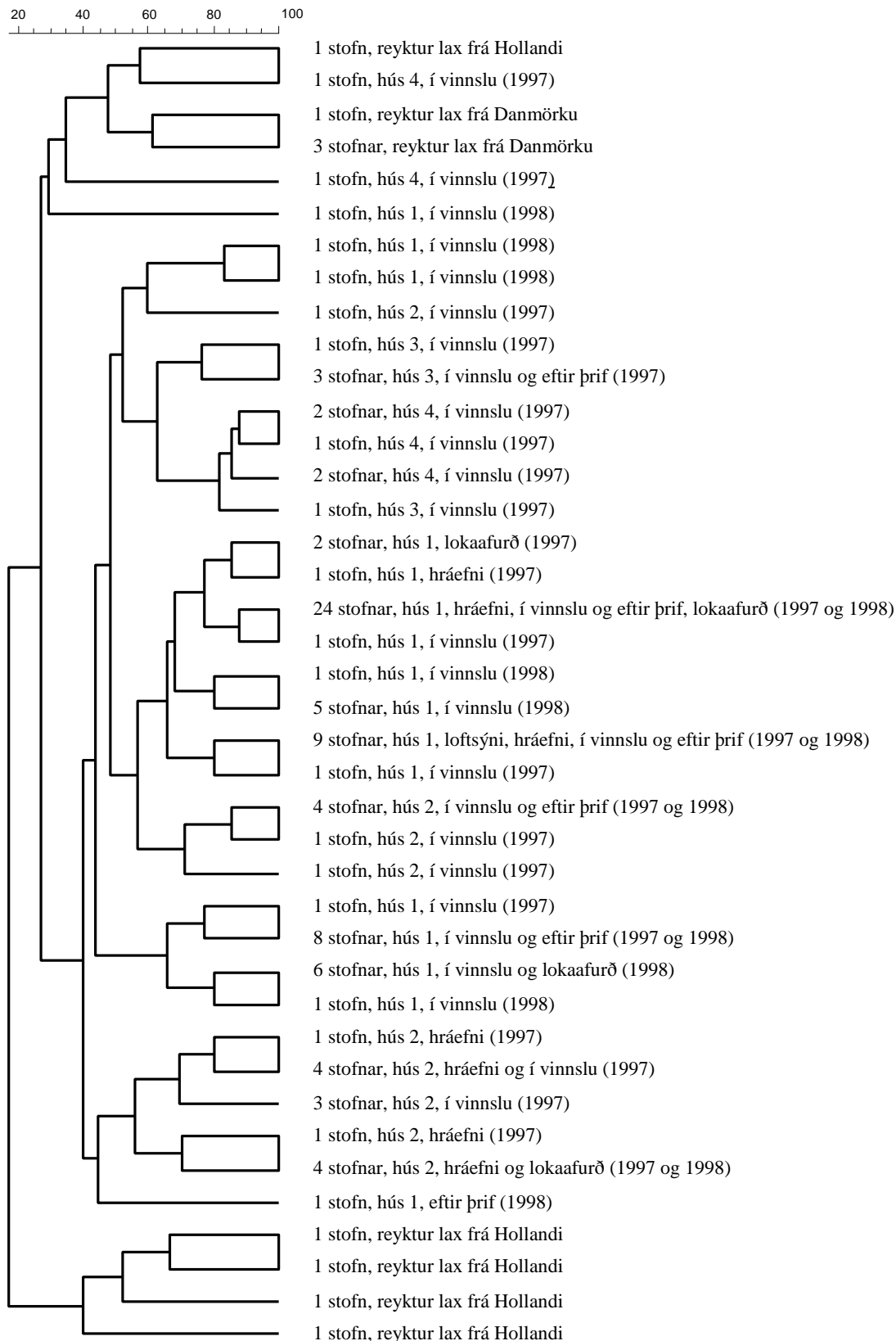


Mynd 4. Nokkrar genótýpur greindar með AscI á stofnum einangruðum úr vinnsluumhverfi lax. Hús 1: rásir 1 og 2, hráefni; 12, 13, 16, 17, 18, 19, 22, í vinnslu; 10, 11, 21, 23, eftir þrif; 20, loftskýni. Hús 2: rás 3, hráefni; 4, lokaafurð; 5, 6, 9, í vinnslu; 7, eftir þrif. Hús 3: rás 8, í vinnslu. Hús 4: rásir 14 og 15, í vinnslu.



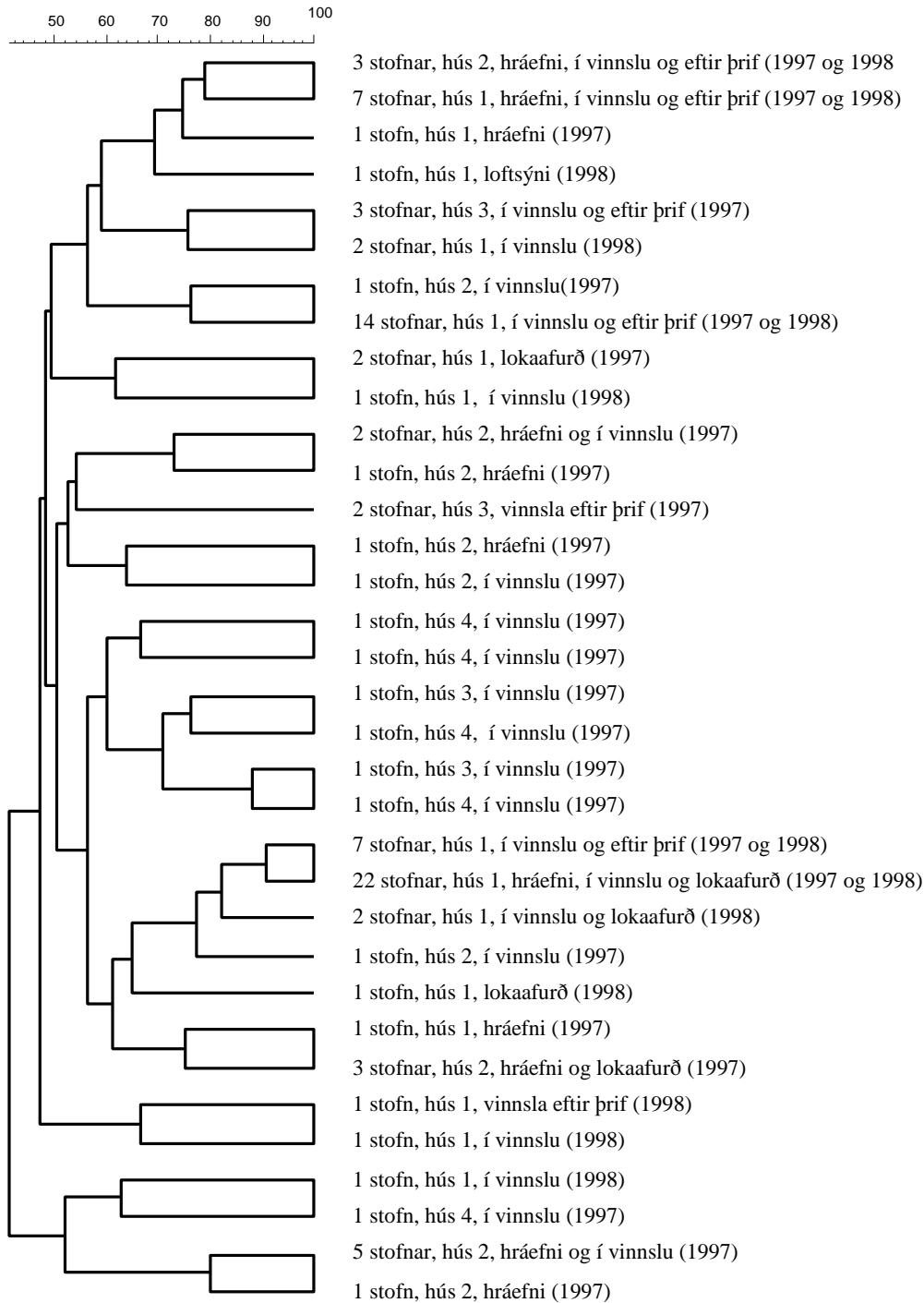
*Mynd 5. Nokkrar genótýpur greindar með *ApaI* á stofnum einangruðum úr vinnsluumhverfi lax. Hús 1: rásir 2, hráefni; 1, 11, 12, 15, 16, 17, 18, 21, 25, í vinnslu; 9, 10, 20, 22, eftir þrif; 19, loftskýni. Hús 2: rásir 3, 4, 24, hráefni; 5, 8, 23, í vinnslu; 6, eftir þrif. Hús 3: rás 7, í vinnslu. Hús 4: rásir 13 og 14 í vinnslu*

**Asci**



Mynd 6. Skyldleiki stofna einangraðra úr laxi, vinnslulínu reykt lax og lokaafurðum þegar notað er Asci skerðiensím á tímabilinu 1997-1998

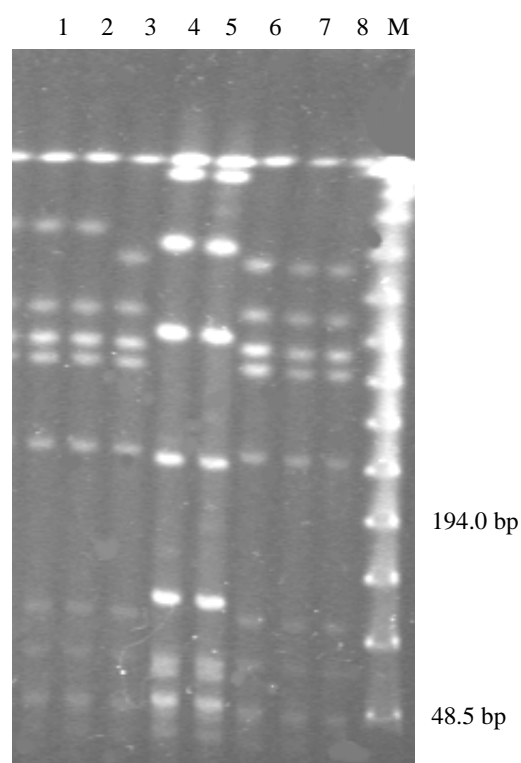
Dice (Opt:1.00%) (Tol 1.0%-1.0%) (H>0.0% S>0.0%) [0.0%-  
**Apal**



Mynd 7. Skyldleiki stofna einangraðra úr laxi, vinnslulínu reyktis lax og lokaafurðum þegar notað er Apal skerðiensím á tímabilinu 1997-1998

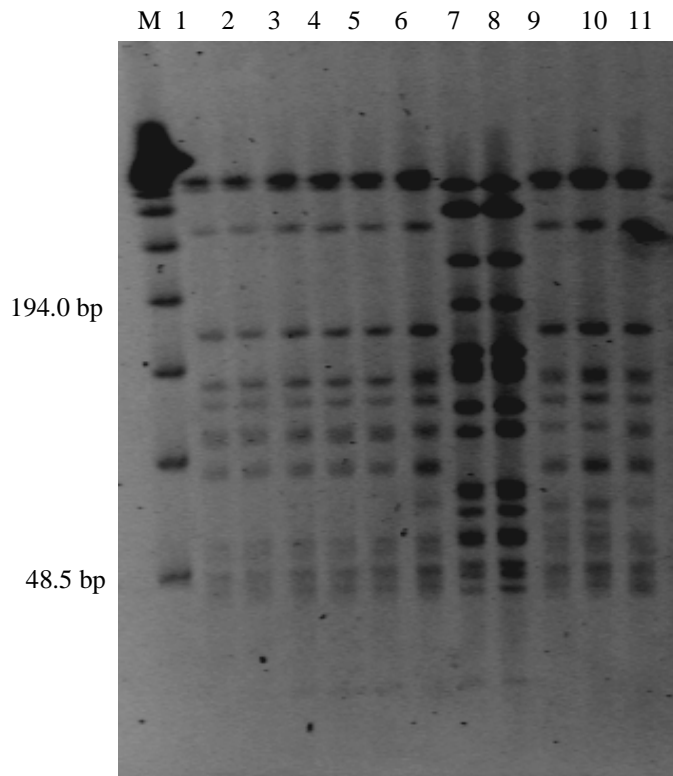
### 3.3.4 Stofnar einangraðir úr rækju og tilheyrandi vinnsluumhverfi

Greindir voru 88 stofnar með tveimur skerðiensímum (AscI og ApaI). Stofnarnir voru einangraðir á tveggja ára tímabili úr tveimur húsum (13 úr húsi 1 og 75 úr húsi 2) sem vinna rækju. Þeir voru einangraðir úr hráefni, vinnsluumhverfi og lokaafurð. Stofnarnir skiptust þannig að 8 voru úr ósoðinni rækju, fjórir úr rækjuskel, 75 úr vinnsluumhverfi (þar af 35 eftir þrif og 40 í vinnslu) og einn stofn var úr lokaafurð. Myndir 7 og 8 sýna dæmi um nokkrar genótýpur á stofnum sem voru einangraðir í vinnsluumhverfi einnar rækjuverksmiðju með AscI og ApaI skerðiensímum. Það er athyglisvert að benda á að stofnar úr ósoðinni rækju og vinnsluumhverfi, bæði í vinnslu og eftir þrif, flokkuðust saman. Myndir 9 og 10 sýna skyldleika stofna úr rækjum (ósoðinni og soðinni) og í vinnslu og eftir þrif með AscI og ApaI skerðiensímum. Þegar fleiri en einn stofn eru tilgreindir eru þeir 90-100% skyldir. Í vinnslunni sást að stofnar úr báðum húsunum flokkuðust saman. Skýringin gæti verið sú að sporadískir stofnar berast inn í vinnsluna úr umhverfinu eða með hráefninu en hráefnið, sem fór í húsin, var ekki frá sama aðila. Mynd 9 sýnir að AscI skerðiensímið myndar þrjá hópa og í stærsta hópnum eru stofnar með meira en 60% skyldleika en milli hópanna er u.þ.b. 45% skyldleiki. Í stærsta hópnum eru stofnar úr báðum húsunum sem flokkast eins. Á mynd 10 sést að það myndast einnig þrír hópar en stofnarnir aðgreinast meira sem þýðir að fleiri munstur fást. Fyrstu tveir hóparnir hafa 55% skyldleika og sá þriðji 45% skyldleika við þá. Ef flokkun stofnanna er skoðuð sést að ApaI gefur ívið betri greiningu en samt ekki í öllum tilfellum.



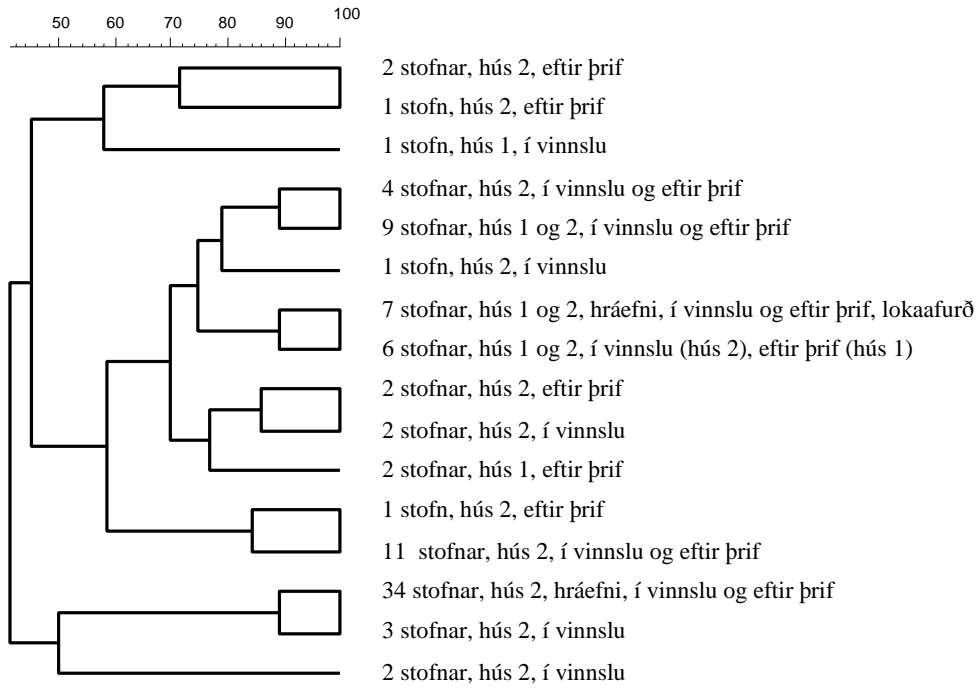
Mynd 7. Nokkrar genótýpur greindar með AscI á stofnum einangruðum úr ýmsum stöðum í vinnsluumhverfi rækju eftir þrif og í vinnslu (húsi 2)





*Mynd 8. Nokkrar genótýpur greindar með *ApaI* á stofnum einangruðum úr ýmsum stöðum í vinnsluumhverfi rækju eftir þrif og í vinnslu (hús 2)*

Dice (Opt:1.00%) (Tol 1.0%-1.0%) (H>0.0% S>0.0%) [0.0%-  
**Asci**



*Mynd 9. Skyldleiki stofna einangraðra úr rækju og vinnsluumhverfi í vinnslu og eftir þrif með AscI skerðiensími*

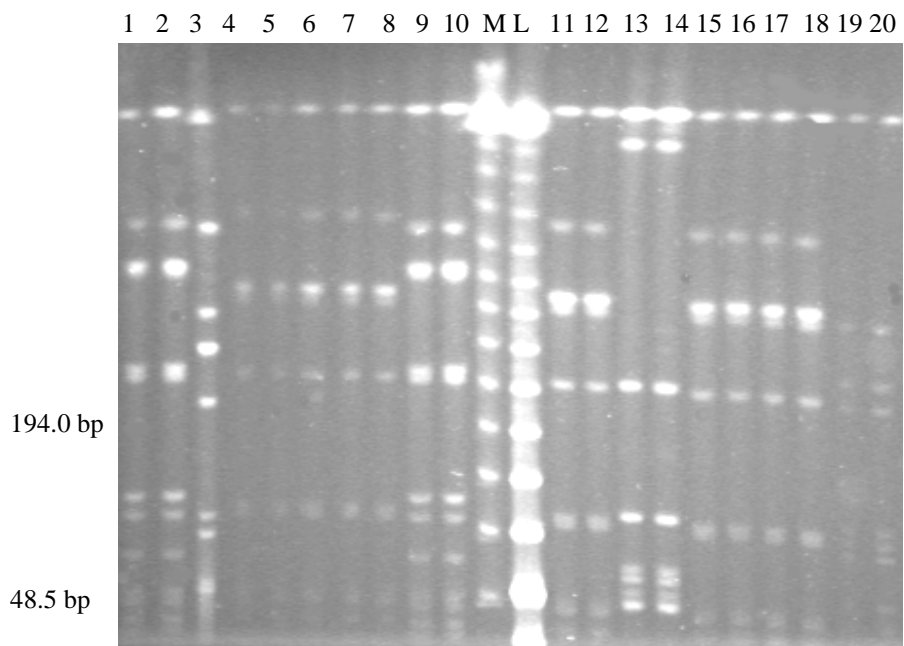
Dice (Opt:1.00%) (Tol 1.0%-1.0%) (H>0.0% S>0.0%) [0.0%-  
**Apal**



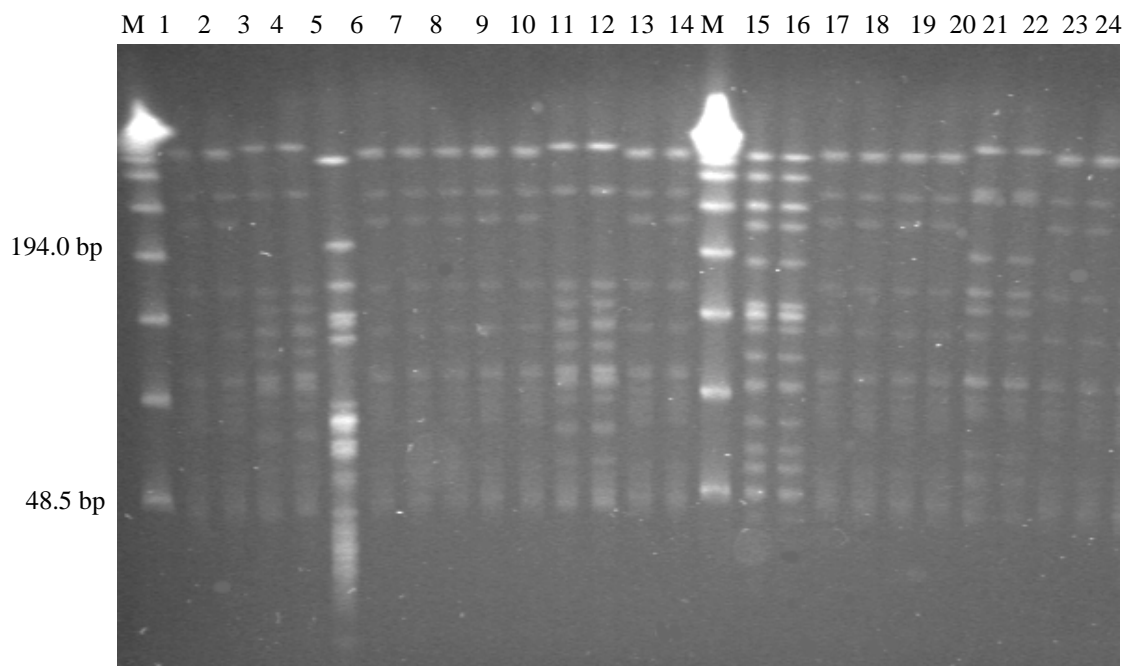
Mynd 10. Skyldleiki stofna einangraðra úr rækju og vinnsluumhverfi í vinnslu og eftir þrif með Apa I skerðiensími

### 3.3.5 Stofnar einangraðir úr hrámjólki

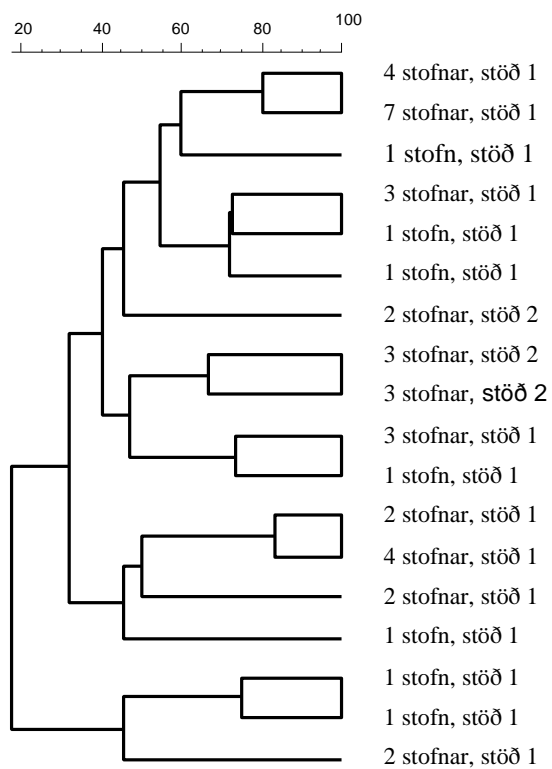
Greindir voru 42 stofnar með AscI en 39 af þeim stofnum voru greindir með ApaI. Stofnarnir voru einangraðir úr hrámjólki úr tveimur mjólkurstöðvum (34 stofnar úr stöð 1 og 8 stofnar úr stöð 2). Stofnarnir flokkuðust ekki saman milli stöðva. Stofnarnir úr stöð 2 hópuðust nær með AscI heldur en ApaI þar sem þeir dreifðust meira með stofnum úr stöð 1. Myndir 11 og 12 sýna nokkrar genótýpur sem fengust þegar stofnar einangraðir úr hrámjólki voru greindir með AscI og ApaI skerðiensímum. Myndir 13 og 14 sýna skyldleika stofnanna með AscI og ApaI skerðiensímum. Fjórir hópar mynduðust með báðum skerðiensímum. Þessi skerðiensím virðast bæði gefa álíka mikla greiningu á stofnunum.



Mynd 11. Nokkrar genótýpur greindar með *AscI* á stofnum einangruðum úr hrámjólk (stöð 1). *M* Lambda ladder, *L* low range marker.

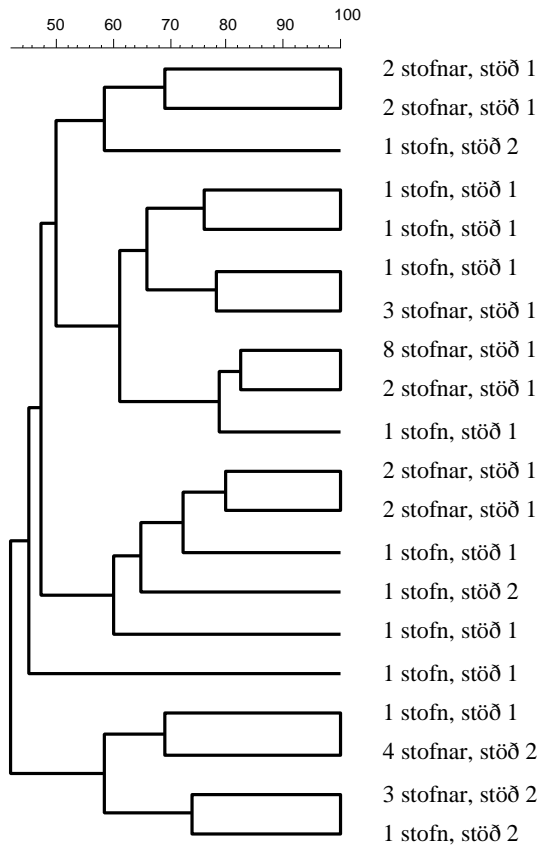


Mynd 12. Nokkrar genótýpur greindar með *ApaI* á stofnum einangruðum úr hrámjólk (stöð 1)



Mynd 13. Skyldleiki stofna einangraðra úr hrámjólk með *Ascl* skerðiensími

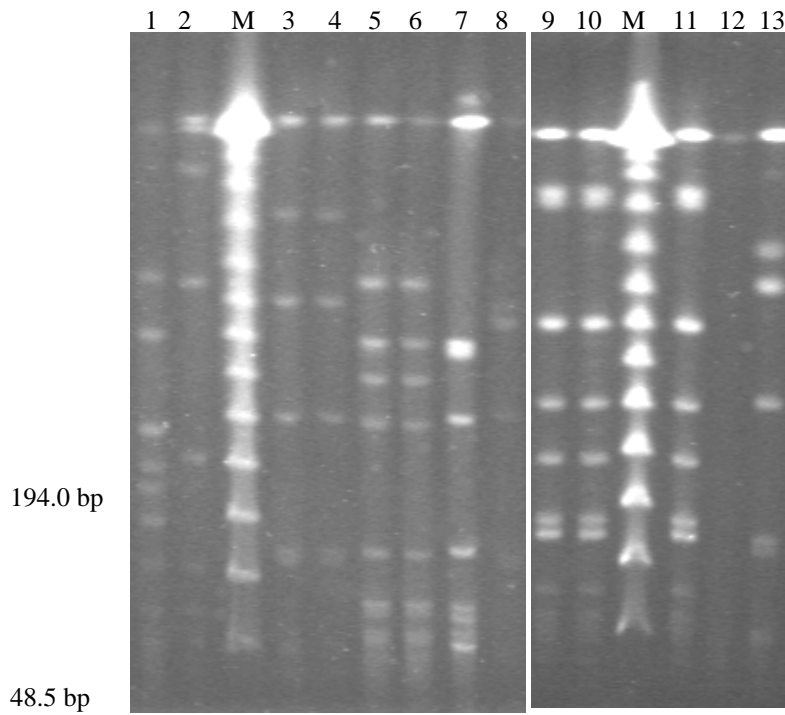
Dice (Opt:1.00%) (Tol 1.0%-1.0%) (H>0.0% S>0.0%) [0.0%-  
**Apal**



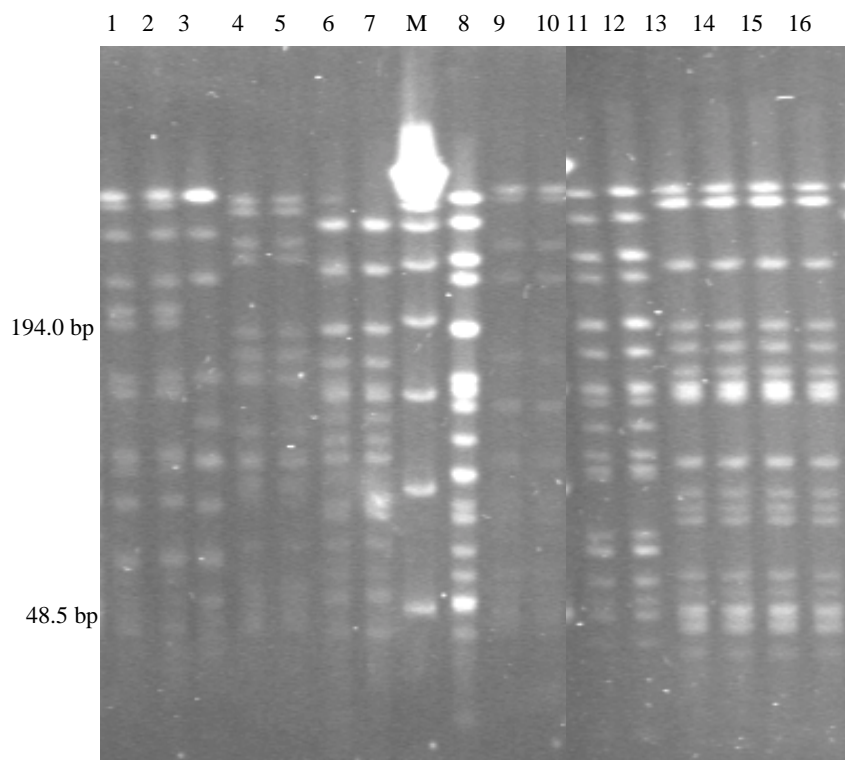
Mynd 14. Skyldleiki stofna einangraðra úr hrámjólk með ApaI skerðiensími

### 3.3.6 Stofnar einangraðir úr öðrum matvælum og kjötvinnslu

Greindir voru 31 stofnar sem voru einangraðir úr öðrum matvælum með AscI og ApaI (5 stofnar úr kjötfarsi, 3 stofnar úr humar, 3 stofnar úr loðnuhrognum, 10 stofnar úr síld og síldarframleiðslu og 10 stofnar úr kjötvinnslu). Myndir 15 og 16 sýna dæmi um nokkrar genótýpur sem fengust með AscI og ApaI skerðiensímum. Myndir 17 og 18 sýna skyldleika stofnanna með sömu skerðiensímum. Þessir stofnar eru af ólíkum uppruna þannig að vænta má að skyldleiki þeirra sé ekki mikill. Margir af stofnunum voru úr sama sýni en aðgreindust samt með AscI. Til dæmis voru allir 5 stofnarnir úr kjötfarsi úr sama sýni en samt aðgreinist einn stofninn frá fjórum, hins vegar aðgreindust þessir stofnar ekki með ApaI. Annars sýndu bæði skerðiensímin mjög svipaða greiningu á þessum stofnum.

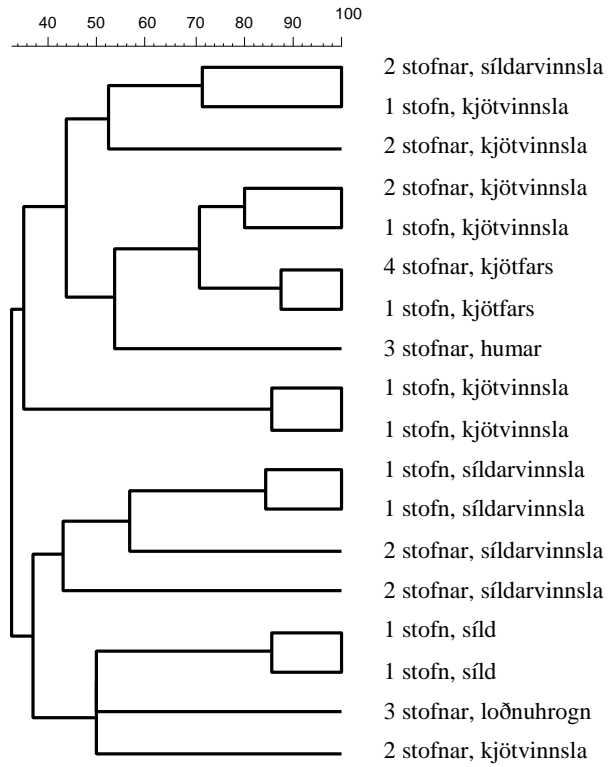


Mynd 15. Nokkrar genótýpur greindar með *AscI* á stofnum einangruðum úr ýmsum matvælum og kjötvinnslu (*M* *Lamda* ladder; rásir 1-8 kjötvinnsla; 9-12 humar, 13 loðnuhrogn)



Mynd 16. Nokkrar genótýpur greindar með *ApaI* á stofnum einangruðum úr ýmsum matvælum og kjötvinnslu (rásir 1-10 kjötvinnsla, 11-12 humar, 13-16 loðnuhrogn)

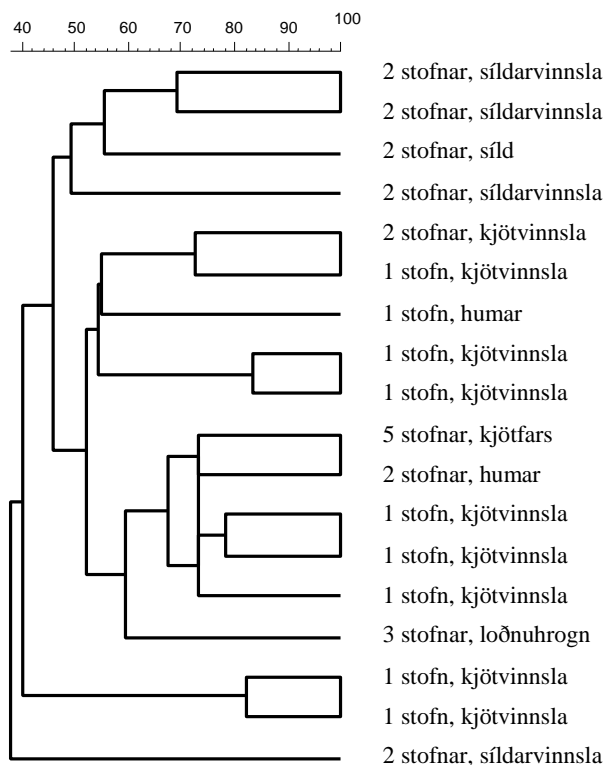
Dice (Opt:1.00%) (Tol 1.0%-1.0%) (H>0.0% S>0.0%) [0.0%-  
**Ascl**



Mynd 17. Skyldleiki stofna einangraðra úr ýmsum matvælum og kjötvinnslu með *Ascl* skerðiensími



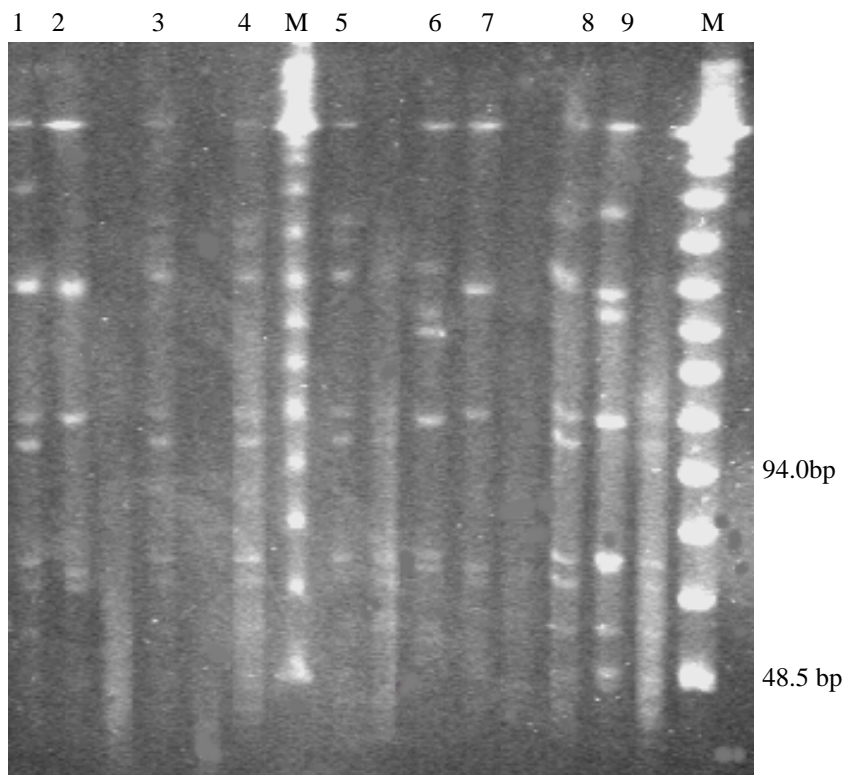
Dice (Opt:1.00%) (Tol 1.0%-1.0%) (H>0.0% S>0.0%) [0.0%-  
**Apal**



Mynd 18. Skyldleiki stofna einangraðra úr ýmsum matvælum og kjötvinnslu með Apal skerðiensími

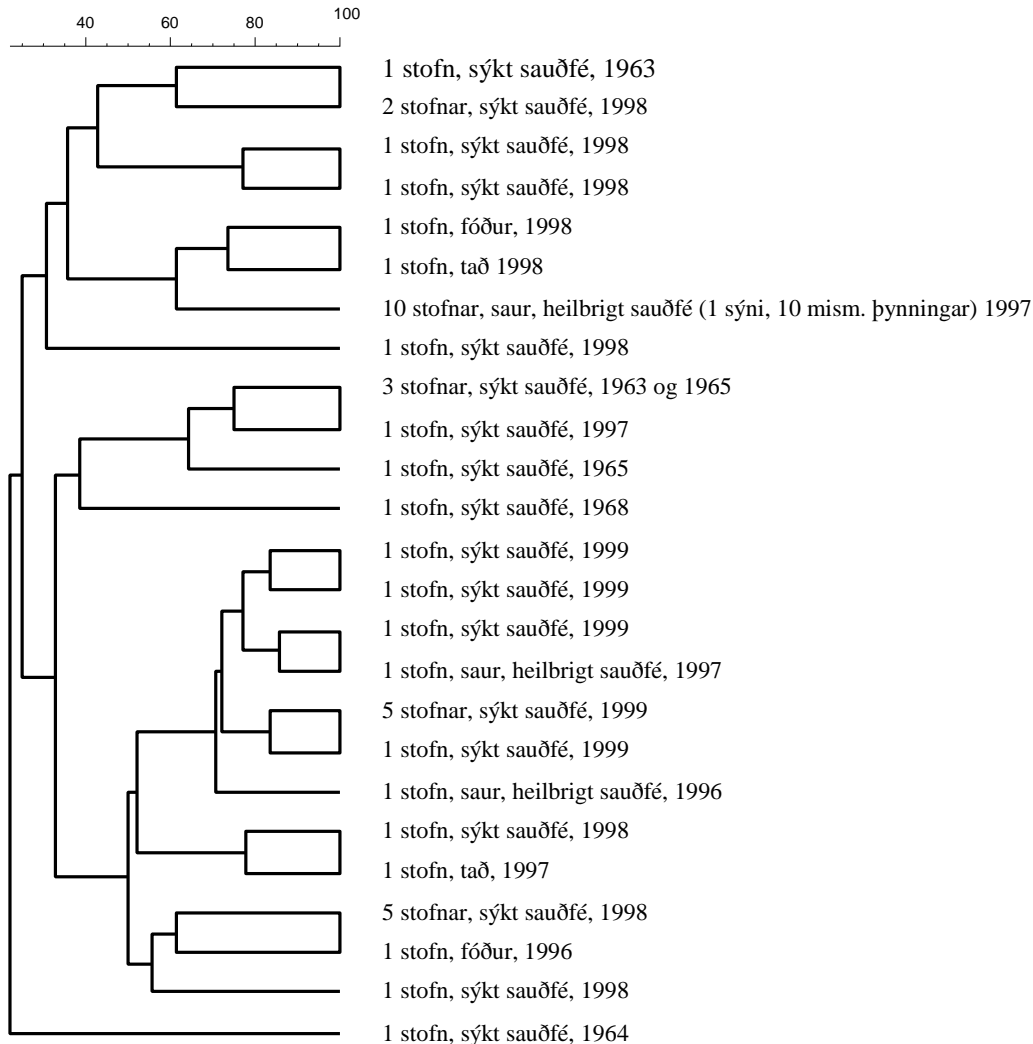
### 3.3.7 Stofnar einangraðir úr sauðfé

Greindir voru 47 stofnar, þar af 43 sem höfðu verið einangraðir úr sauðfé, meðal annars úr ýmsum líffærum ærfóstra og kindu (sýkt dýr) og úr saur heilbrigðs sauðfjár. Einnig voru tveir stofnar einangraðir úr fódri (þurrhey og saltsíld) og tveir stofnar voru einangraðir úr taði. Stofnarnir voru einangraðir á árunum 1963-1999. Stofnarnir flokkuðust ekki saman nema þeir sem einangrast höfðu úr sama ærfóstri eða úr sama líffæri. Mynd 19 sýnir dæmi um nokkrar genótýpur stofna með AscI sem voru einangraðir úr sauðfé, bæði heilbrigðu og sýktu. Mynd 20 sýnir skyldleika stofnanna en þar sést að skyldleiki þeirra er mjög lítill. Ein ástæða þess gæti verið að þetta eru stofnar sem voru einangraðir á mjög löngu tímabili og því lítill tengsl á milli þeirra.



Mynd 19. Nokkrar genótýpur greindar með *AscI* á stofnum einangruðum úr sauðfé. *M*, lamda ladder; 1-5 stofnar einangraðir úr heila og lifur þriggja ærfóstra; 6 saltsíld; 7-8 saur úr heilbrigðri kind; 9 tað.

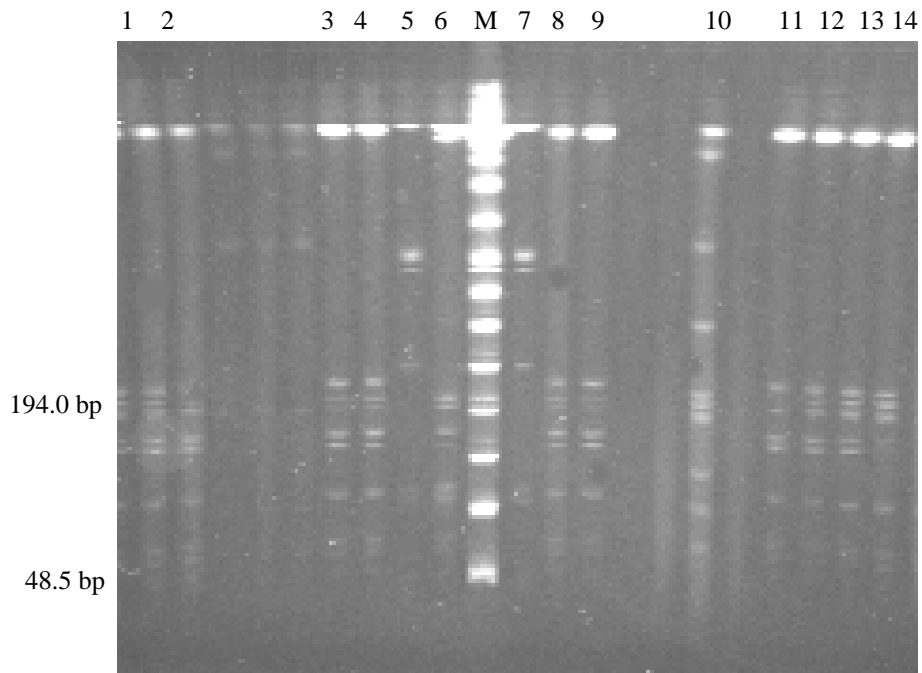
Dice (Opt:1.00%) (Tol 1.0%-1.0%) (H>0.0% S>0.0%) [0.0%-  
**Ascl**



Mynd 20. Skyldleiki greindra (*AscI* skerðiensím) stofna einangraðra úr sýktu og heilbrigðu sauðfé auk stofna úr taði og fóðri

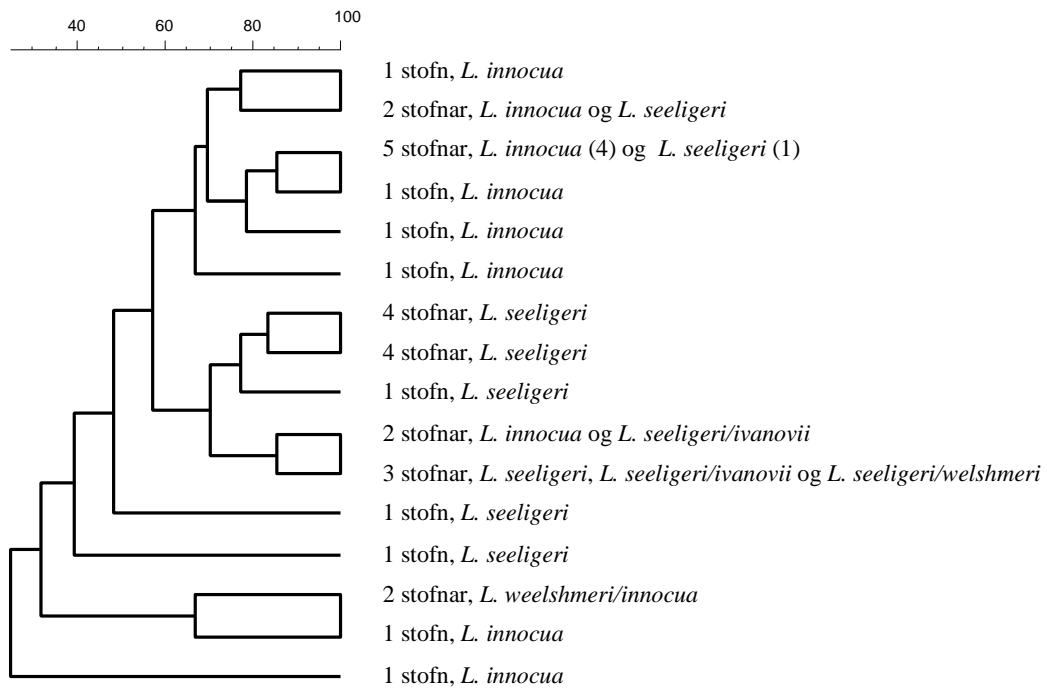
### 3.3.8 Aðrar *Listeria* tegundir

Skoðaðir voru 31 stofnar sem greindust sem annað en *Listeria monocytogenes*. Af þeim voru 12 stofnar *L. innocua*, 14 *L. seeligeri*, 1 *L. seeligeri/welshmeri*, 2 *L. seeligeri/ivanovii* og 2 *L. welshmeri/innocua*. Stofnarnir voru einangraðir úr hráefni og vinnslulínu reyktis lax. Stofnar þessir voru greindir með Api Listeria (BioMérieux). Mynd 21 sýnir dæmi um genótýpur sem fengust þegar mismunandi *Listeria* tegundir voru greindar með *AscI* skerðiensími. Mynd 22 sýnir skyldleika á milli tegundanna en þar sést að *L. seeligeri/welshmeri* stofninn og annar *L. seeligeri/ivanovii* stofninn flokkast með *L. seeligeri* þannig að ætla má að þeir stofnar séu af þeirri tegund og *L. welshmeri/innocua* eru líklega *L. welshmeri* þar sem munstur beggja stofnanna er mjög ólíkt *L. innocua*.



Mynd 21. Nokkrar genótýpur *Listeria* tegunda, sem fengust með *AscI* (M lamda ladder, 1-4,6,8-9,12-14 *L. seeligeri*, 5, 7 *L. welshmeri/innocua*, 10 *L. innocua*, 11 *L. seeligeri/ivanovii*)

Dice (Opt:1.00%) (Tol 1.0%-1.0%) (H>0.0% S>0.0%) [0.0%-  
**AscI**



Mynd 22. Skyldleiki *Listeria* stofna með *AscI* skerðiensími

### 3.4 Lokaorð

Í heildina benda þessar niðurstöður til þess að í matvælavinnslunni sé oftast um að ræða viðvarandi hússtofna, þ.e. stofna sem mynda líklega "biofilmu" og viðhaldast þannig í vinnsluumhverfinu í langan tíma (jafnvel ár) þrátt fyrir ítarleg þrif eftir vinnslu. Það er því nauðsynlegt að finna út hvort um slíka stofna sé að ræða og fara þá yfir sótthreinsiefni og þær þrifaaðferðir sem notaðar eru til þess að útrýma þessum stofnum. Eins flokkuðust saman stofnar úr hráefni og vinnslu sem bendir til þess að þeir berist einnig inn í vinnsluna með hráefninu.

Þegar litið er á heildar niðurstöður sést að AscI gefur færri bönd en ApaI og ApaI færri bönd en SmaI, þannig að ApaI og SmaI ættu að hafa meiri greiningarhæfni en AscI. Hins vegar er auðveldara að vinna með skýrari og færri bönd; því er AscI oft valið sem fyrsta ensím. ApaI er síðan notað til að fá nánari greiningu á stofnum sem eru eins með AscI. Því benda þessar niðurstöður til þess að ApaI skerðiensímið gefi aðeins meiri greiningu heldur en AscI en nauðsynlegt er að nota að minnsta kosti þessi tvö skerðiensím til greiningar.

Niðurstöður þessa verkefnis eru þær að ekki sjást tengsl á milli matvæla stofna og stofna úr mönnum en eins og áður sagðir gæti það verið vegna þess að stofnarnir eru einangraðir á ólíku tímabili. Hins vegar sýna þessar niðurstöður að ítarlegar greiningaraðferðir eru mikilvægar fyrir matvælaiðnaðinn þar sem *Listeria* finnst víða í vinnsluumhverfinu. Þegar greindar eru aðrar tegundir en *L. monocytogenes* sést greinilegur munur á stofnum. Í þeim tilfellum þar sem greining með API LISTERIA er ekki fullnægjandi væri hægt að nota PFGE til þess að greina milli tegunda. Einnig sýna þessar niðurstöður að þar er oft um að ræða sömu stofna sem eru viðvarandi í vinnslunni, bæði fyrir og eftir þrif og með allt að ársmillibili. Í framhaldi af þessu verkefni er nauðsynlegt að skoða vinnsluumhverfið nánar og skoða hvort stofnar séu þar viðvarandi yfir lengri tíma en sýnt er í þessu verkefni. Nauðsynlegt er fyrir iðnaðinn að bregðast við því að stofnar séu stöðugt fyrir hendi í vinnslunni. Slík húsflóra er mjög alvarlegt vandamál því að hún getur verið ónæg fyrir hreinsiefnum sem notuð eru, hún getur því vaxið, borist í lokaafurðina og valdið fyrirtækjunum ómældum skaða á mörkuðum héraðum og erlendis.

### 4. Þakkarorð

Verkefni þetta var styrkt af Tæknisjóði Rannsóknarráðs Íslands. Höfundur vill einnig þakka þeim sem lánuðu stofna í þetta verkefni, Ólafi Steingrímssyni (Sýkladeild Landspítalans) fyrir stofna úr mönnum, Kristínu Guðmundsdóttir (Tilraunastöð Háskólans í meinafræði að Keldum) fyrir stofna úr dýrum og Margréti Geirsdóttur fyrir stofna sem einangruðust hjá Hollusutvernd ríkisins

## 5. Heimildir

FAO Report, *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>

**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*, Vol. 65, No. 1, pp. 150-155.

**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*, Vol. 57, No. 8, pp. 2324-2331.

**Bille, J.** 1998. Fyrirlestur á ráðstefnu "XIII International Symposium on listeriosis problems, June 28-July 2, 1998, Halifax, N-S, Canada.

**Brett, M.; Short, P. og McLauchlin, J.** (1998). A small outbreak of listeriosis associated with smoked mussels. *International Journal of Food Microbiology*, 43, pp. 223-229.

**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*, Vol. 60, No. 7, pp. 2584-2592.

**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). *International Journal of Food Microbiology*, 32, pp. 343-355.

**Chakraborty, T.; Ebel, F.; Wehland, J.; Dufrenne, J. og Notermans, S.** (1994). Naturally occurring virulence-attenuated isolates of *Listeria monocytogenes* capable of inducing long term protection against infection by virulent strains of homologous and heterologous serotypes. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 10, pp. 1-10.

**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*, Vol. 62, No. 2, pp. 705-711.

**Ericsson, H.; Eklöv, A.; Danielsson-Tham, M.-L.; Loncarevic, S.; Mentzing, L.-O.; Persson, I.; Unnerstad, H. og Tham, W.** 1997. An Outbrake of Listeriosis Suspected To Have Been Caused by Rainbow Trout. *Journal of Clinical Microbiology*, Vol. 35, No 11, pp. 2904-2907.

**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.

**Giovannacci, I.; Ragimbeau, C.; Queguiner, S.; Salvat, G.; Venduvre, J-L.; Carlier, V. og Ermel, G.** (1999). *Listeria monocytogenes* in pork slaughtering and cutting plants use of RAPD, PFGE and PCR-REA for tracing and molecular epidemiology. *International Journal of Food Microbiology*, 53, pp. 127-140.

**Goulet, V.** 1998. Fyrirlestur á ráðstefnu "XIII International Symposium on listeriosis problems, June 28-July 2, 1998, Halifax, N-S, Canada.

**Hartemink, R. og Georgsson, F.**, 1991. Incidence of *Listeria* species in seafood and seafood salads. *International Journal of Food Microbiology*, 12, pp. 189-196.

**Hjaltested, Einar, Sigrún Gudmundsdóttir, Már Kristjánsson, Kristín Jónsdóttir, Karl G. Kristinsson og Ólafur Steingrímsson.** 2000 The molecular epidemiology of human listerial infections in Iceland. In Progress.

**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*. *International Journal of Food Microbiology*, 43, pp. 61-71.

**Klima, R. A. og Montville, T. J.** 1995. The regulatory and industrial responses to listeriosis in the USA: A paradigm for dealing with emerging foodborne pathogens. *Trends in Food Science & Technology Vol.6* pp. 87-93.

**Lauzon, Hélène L., Birna Guðbjörnsdóttir, og Hjörleifur Einarsson.** 1999. Contamination with *Listeria monocytogenes*. Annar þáttur Evrópuverkefnisins "Gæði og öryggi reyktis fisks" CT95-1207, lokaskýrsla, 26 bls.

**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, pp 65-68.

**Miettinen, M.; Björkroth, J. og Korkeala, H.** (1999a). Characterization of *Listeria monocytogenes* from an ice cream plant by serotyping and pulsed-field gel electrophoresis. *International Journal of Food Microbiology*, 46, pp. 187-192.

**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*, vol. 37, no. 7. pp. 2358-2360.

**Moore, M. A. og Datta, A. R.** 1994. DNA fingerprinting of *Listeria monocytogenes* strains by pulsed-field gel electrophoresis. *Food Microbiology*, 11, pp. 31-38.

**Nocera, D.; Altwegg, M.; Martinetti, Lucchini, G.; Bannerman, E.; Ischer, F.; Rocourt, J. og Bille, J.** 1993. Characterization of *Listeria* Strains from a Foodborne

Listeriosis Outbreak by rDNA Gene Restriction Patterns Compared to Four Other Typing Methods. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. Vol.12, No.3, pp. 162-169.

**Ojeniyi, B.; Wegener, H. C.; Jensen, N. E. og Bisgaard, M.** 1996. *Listeria monocytogenes* in poultry and poultry products: epidemiological investigations in seven Danish abattoirs. Journal of Applied Microbiology, 80, pp. 395-401.

**Rocourt, J. og Bille, J.** 1997. Foodborne listeriosis. **Error! No index entries found.** World Health Stat. Q. 50, pp 67-73