



Universitetet  
i Stavanger

DET TEKNISK-NATURVITENSKAPELIGE FAKULTET

## MASTEROPPGAVE

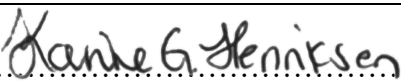
**Studieprogram/spesialisering:**

Master i biologisk kjemi/molekylær biologi

Vårsemesteret, 2020

Åpen

**Forfatter:** Karine Giske Henriksen

  
.....  
(signatur forfatter)

**Fagansvarlig:** Peter Ruoff

**Veiledere:** Trond Løvdal og Bjørn Roth, Nofima Stavanger

**Tittel på masteroppgaven:** Forekomst av *Listeria monocytogenes* i et matfiskanlegg i Hardangerfjorden

**Engelsk tittel:** The Occurrence of *Listeria monocytogenes* in a Fish Farm in the Hardanger Fjord

**Studiepoeng:** 60

**Emneord:**

*Listeria monocytogenes*  
Oppdrettsanlegg  
Merd  
Sjøvann  
Atlantisk laks  
Sesongvariasjon  
Sjøtemperatur

**Sidetall:** 45

+ **vedlegg:** 7

**Stavanger, 15. juni 2020**



---

Universitetet  
i Stavanger



## Sammendrag

I denne masteroppgaven er forekomsten av bakterien *Listeria monocytogenes* undersøkt i et oppdrettsanlegg for atlantisk laks (*Salmo salar*). Endringer i forekomsten ble observert for å undersøke tilstedeværelse og mulige sesongvariasjoner. Samspillseffekten mellom mengden *L. monocytogenes* og klima ble også undersøkt.

*L. monocytogenes* finnes overalt i naturen og er bakterien som forårsaker den livstruende, matbårne sykdommen listeriose. Eldre, gravide, immunkompromitterte og spedbarn er i risikogruppen for å få sykdommen, etter inntak av mat kontaminert med *L. monocytogenes*. Matprodusentene har derfor systemer for sporbarhet og tilbakekalling av produkter fra markedet hvis *L. monocytogenes* blir detektert. I oppdrettsnæringen er det mye fokus på kartlegging og overvåkning av forekomsten av *L. monocytogenes* i matprodukter og produksjonslokaler, men det er gjort lite studier på forekomsten av *L. monocytogenes* i oppdrettsanleggene, selv om dette er en potensiell kontamineringskilde.

I denne studien ble det tatt vannprøver fra ett oppdrettsanlegg i Hardangerfjorden fra oktober 2019 til mai 2020. Det ble tatt tre vannprøver ved hver prøvetakning og disse ble analysert kvantitativt med real-time PCR og kvalitativt ved dyrkning (NMKL 136 *Listeria monocytogenes*). Av vannprøvene analysert med real-time PCR var 33 av 39 av prøvene positive for *L. monocytogenes*. Det var en kontinuerlig tilstedeværelse av *L. monocytogenes* i vannet i oppdrettsanlegget, hvor minst 1 av 3 prøver var positive ved hver prøvetakning. Prøveresultatene viste at det var en sesongvariasjon, med en økning av forekomsten av *L. monocytogenes* mellom slutten av januar til slutten av mars. Det ble ikke påvist noen sammenheng mellom mengden *L. monocytogenes* i vannet og nedbør eller lufttemperatur. Det ble påvist en moderat korrelasjon ( $R=-0,42$ ) mellom mengden *L. monocytogenes* i vannet og sjøtemperatur. Denne korrelasjonen var statistisk signifikant ( $p=0,0081$ ), og viser en økning i forekomst av *L. monocytogenes* i vannet ved lavere sjøtemperatur. Prøvene analysert med NMKL 136 var alle negative. Deteksjonsgrensen er høyere for NMKL 136 enn for real-time PCR, og NMKL 136 påviser kun levende bakterier i motsetning til real-time PCR. Prøveresultatene viser at nivået av *L. monocytogenes* i vannet er lavt, men at det er en kontinuerlig tilstedeværelse av *L. monocytogenes* som kan påvises ved hjelp av real-time PCR.

## Forord

Denne masteroppgaven ble skrevet som en avslutning på en master i biologisk kjemi ved Universitetet i Stavanger. Oppgaven ble utført og skrevet i samarbeid med matforskningsinstituttet Nofima. Arbeidet ble utført på mikrobiologisk laboratorium hos Nofima i Måltidets hus i Stavanger, i tidsperioden august 2019 til juni 2020. Jeg vil takke Nofima for et godt samarbeid, og for lån av utstyr, materiell og laboratorium.

Jeg vil først og fremst takke min veileder forsker Trond K. Løvdal for gode retningslinjer, veiledning under hele skriveprosessen og arbeidet på laboratoriet, motivasjon, og deling av fagkunnskap og artikler. En stor takk rettes til seniorforsker Bjørn Roth for tildeling av oppgave, inkludering i prosjektet og god veiledning.

Den siste tiden under masteroppgaven har vært en spesiell tid, på grunn av koronapandemien. Dette har satt begrensninger for min utførelse av laboratoriearbeidet. Her vil jeg rette en stor takk til forsker Trond K. Løvdal og næringsmiddeltekniker Karin S. Tranøy for å være behjelpelige med å organisere prøvetakning, sending av prøveutstyr og utføre laboratoriearbeidet for meg i denne perioden. Jeg hadde ikke klart det uten dem.

En stor takk rettes til de som jobber på oppdrettsanleggene hvor vannprøvene ble tatt. Jeg har følt meg velkommen hos dere, og dere har alltid vært behjelpelige når jeg har vært der for å ta prøver, samt å ta prøver for meg og sende i posten. Jeg vil også takke Hav Line for inkludering i prosjektet med slaktebåten «Norwegian Gannet», deling av kontakter, og tildeling av oppgaven.

I tillegg vil jeg takke mine medstudenter, Frida Bårdsen og Maren Skare, for et godt samarbeid og en fin tid på laboratoriet, og Håkon B. Johannessen for hjelp til statistiske analyser. Jeg vil også takke mine medstudenter, Karina K. Varhaug, Therese N. Østebrød og Mari Varhaug, for sosiale lunsj- og kaffepauser.

Karine Giske Henriksen

Stavanger, 2020

# Innholdsfortegnelse

Sammendrag .....	i
Forord .....	ii
1. Introduksjon .....	1
1.1 Bakgrunn .....	1
1.2 Teknologiutvikling i Norge .....	2
1.3 <i>Listeria monocytogenes</i> og listeriose.....	3
1.4 <i>Listeria monocytogenes</i> i oppdrettsnæringen .....	6
1.4.1 <i>Listeria monocytogenes</i> i sjøvann og slakteri.....	6
1.4.2 Bearbeidede produkter .....	10
1.5 Mål med oppgaven .....	13
1.6 Prinsipp for metoder .....	14
1.6.1 Kultivering ved bruk av Fraser-metoden .....	14
1.6.2 Real-time PCR.....	14
2. Material og metoder .....	18
2.1 Material.....	18
2.2 Sentrifugering av vannprøver .....	20
2.3 DNA-ekstraksjon i sjøvann .....	23
2.4 Deteksjon av <i>Listeria monocytogenes</i> .....	23
2.4.1 Kultivering av vannprøver .....	23
2.4.2 Kultivering av fiskeprøver .....	23
2.4.3 Real-time PCR av sentrifugerte vannprøver .....	24
2.5 Korrelasjonstester .....	26
3. Resultater.....	27
3.1 Kvantifisering av <i>Listeria monocytogenes</i> i vannprøver fra lokalitet 1 .....	27
3.2 Påvisning av <i>Listeria monocytogenes</i> i vannprøver fra lokalitet 1 .....	28
3.3 Kvantifisering av <i>Listeria monocytogenes</i> i vannprøver fra lokalitet 2 .....	29

3.4	Påvisning av <i>Listeria monocytogenes</i> i fiskeprøver fra lokalitet 2.....	29
3.5	Korrelasjon mellom <i>Listeria monocytogenes</i> og værforhold .....	30
3.5.1	<i>Listeria monocytogenes</i> og gjennomsnittstemperatur .....	30
3.5.2	<i>Listeria monocytogenes</i> og nedbør.....	31
3.5.3	<i>Listeria monocytogenes</i> og sjøtemperatur.....	32
4.	Diskusjon.....	33
4.1	Metodeevaluering .....	33
4.2	Kvantifisering og påvisning av <i>L. monocytogenes</i> .....	34
4.3	Korrelasjon mellom <i>Listeria monocytogenes</i> og værforhold .....	37
4.3.1	<i>Listeria monocytogenes</i> og temperatur .....	37
4.3.2	<i>Listeria monocytogenes</i> og nedbør.....	37
4.3.3	<i>Listeria monocytogenes</i> og sjøtemperatur.....	38
5.	Konklusjon .....	40
6.	Referanser.....	41
7.	Vedlegg .....	46
A.	Kjemikaler og medier.....	46
B.	Værdata fra lokalitet 1 .....	48

# 1. Introduksjon

## 1.1 Bakgrunn

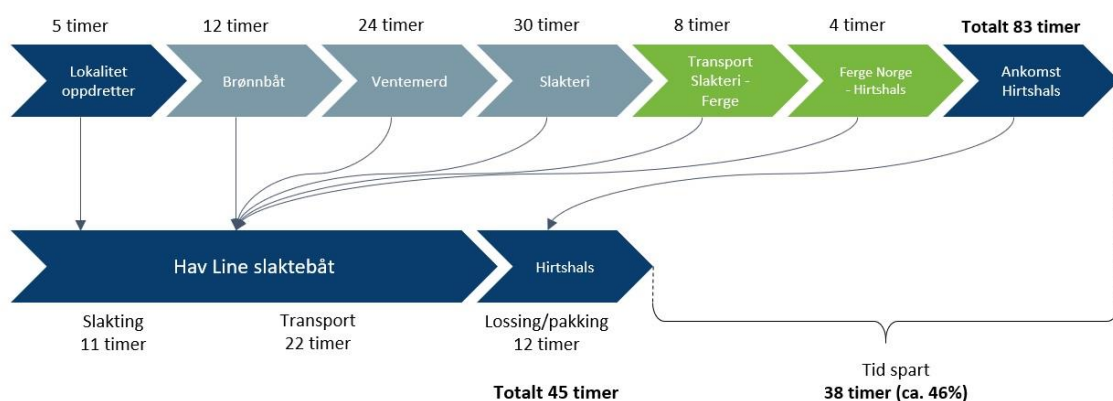
Sjømat er et av de mest eksporterte råstoffene i Norge. Den største arten som eksporteres målt i volum og verdi er atlantisk laks (*Salmo salar*) (Larsen, Pettersen, Aandahl & Bessesen, 2019). Norge er den største produsenten av laks i verden og norsk laks har blitt et viktig varemerke for Norge (Larsen et al., 2019; Solheim & Roang, 2015). I 2019 eksporterte Norge 1,1 million tonn laks til en verdi av 72,5 milliarder kroner. Dette er en volumøkning på 6 % og en verdiøkning på 7 %, eller 4,8 milliarder kroner sammenlignet med i 2018 (Sørli, Aandahl & Pettersen, 2020). Laksen som blir eksportert er hovedsakelig ubearbeidet; 84 % blir eksportert som hel fisk, mens 16 % av råstoffet bearbeides før det blir eksportert (Larsen et al., 2019).

I dagens samfunn er det fokus på helse, lettvinthet og miljø når det kommer til valg av mat. Laks blir betegnet som en fet fisk som er kjent for å ha et høyt innhold av fler- og enumettede fettsyrer, omega-3 og omega-6. Laks har også et rikt innhold av proteiner, vitaminer og mineraler (Mattilsynet, Helsedirektoratet & UiO, 2017). Økt helsefokus har gjort laks til en mer attraktiv råvare på grunn av næringsinnholdet. Det har også vært mer fokus på at matvarer ikke skal varmebehandles eller prosesseres for å beholde mest mulig av næringsstoffene. Det forventes en fremtidig vekst i oppdrettsnæringen på grunn av et økende globalt behov for å sikre proteinrik mat for antatt befolkningsvekst fram mot år 2030 (Bank, 2013; FAO, 2016). Lakseindustrien står ovenfor kritiske utfordringer som kan begrense framtidig vekst. Én av disse er utfordringer knyttet til kontaminasjon med den humanpatogene bakterien *Listeria monocytogenes* (*L. monocytogenes*), siden denne bakterien foreløpig ikke er helt under kontroll i næringsmiddelproduksjonen (Buchanan, Gorris, Hayman, Jackson & Whiting, 2017). Virksomheter som produserer, importerer, omsetter eller serverer matvarene er pliktige til å sikre mattryggheten til produktene (Mattilsynet, 2012).

Det har tidligere blitt gjort undersøkelser av smitteveier og smitekilder for *L. monocytogenes* i produksjonskjeden for røkt og sløyd laks (Heir & Langsrud, 2013). Opprinnelsen til bakteriell kontaminering, vektorene og miljøfaktorene som kontrollerer spredning og etablering av *L. monocytogenes* i matfiskanlegg og lakseslakterier er det ikke gjort tilstrekkelige undersøkelser av.

## 1.2 Teknologit utvikling i Norge

Norge er et høykostland og har dermed store lønnskostnader. I 2013 var timelønnskostnadene i industrien i Norge 55 % høyere enn gjennomsnittet av handelspartnerne i EU (Digre et al., 2014). På grunn av de økende lønnskostnader må det stilles strengere krav til markedsorientering, teknologit utvikling og utnyttelse av naturgitte fortrinn dersom sjømatindustrien skal være lønnsom, og den norske industriens konkurransevne skal opprettholdes. Norge har fortrinn som nærhet til råstoffet, store naturressurser som rent vann og fornybar energi, sterk økonomi, nærhet til markeder som Europa og Russland, og høyt utdannet arbeidskraft. Dette må utnyttes. For å fortsette å være konkurransedyktig i industrien må kostnadene reduseres (Digre et al., 2014). Teknologit utvikling og effektivisering av norsk produksjon er nødvendig for å kunne møte internasjonal konkurranse. For at sjømatindustrien skal være lønnsom i fremtiden med den forventede utviklingen, er det viktig å sette søkelys på økt automatisering, samt behov for mer innovasjon innenfor produkt, marked og strategi. Dette vil kreve økt etter- og videreutdanning av dagens arbeidskraft samt økt og oppdatert kompetanse blant nyansatte (Digre et al., 2014).



**Figur 1.2.1.** En estimert tidslinje for oppdrettslaks, fra merdkant til EU-markedet. Den konvensjonelle metoden er sammenlignet med Hav Line-metoden i et scenario med 1.000 tonn sløyd fisk. Figuren er rekonstruert fra Hav Line (Arnesen, 2018)

Carl-Erik Arnesen, CEO i Hav Line Gruppen AS, har brukt et scenario med 1.000 tonn fisk i et eksempel for å sammenligne tidssparelsen ved bruk av Hav Line-metoden sammenlignet med den konvensjonelle metoden (Figur 1.2.1). I den konvensjonelle metoden er estimert tid fra fisken er på merdkanten til den når EU-markedet 83 timer, og ved bruk av Hav Line-metoden



er estimert tidsbruk 45 timer (Arnesen, 2018). Flere av stegene i den konvensjonelle metoden er satt sammen ved bruk av Hav Lines slaktebåt «Norwegian Gannet» (Figur 1.2.2). Tidsbesparelsen øker ved å redusere ventetiden og antall steg, samt gjennom færre operasjoner og redusert transport. Dette vil i tillegg til tidsbesparelse gi biologiske-, miljø- og kostnadsgevinster (Arnesen, 2018).



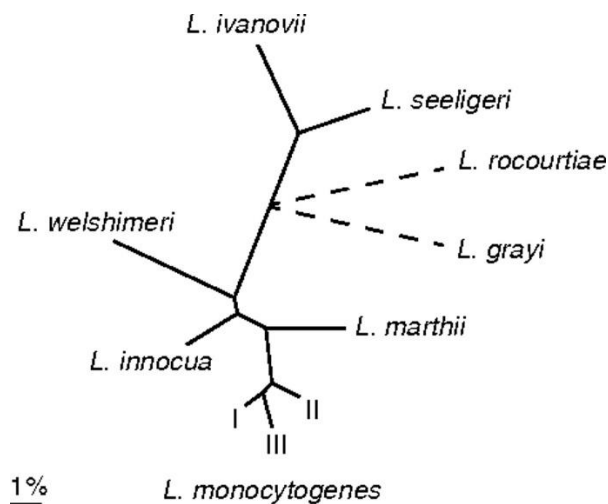
**Figur 1.2.2.** «Norwegian Gannet»: Flytende slakteri for oppdrettslaks.  
Foto: Hav Line

Transporten av fisk på veien reduseres på grunn av den høye kapasiteten til slaktebåten (Arnesen, 2018). Ketil Solvik-Olsen, tidligere samferdselsminister i Norge, uttrykte i en pressemelding i 2017 at regjeringen fokuserer på å flytte transport av gods fra vei til sjø og bane for å øke transportsikkerheten og redusere både slitasje på veinettet og miljøpåvirkningen fra transportsektoren (Stephansen & Midtbø, 2017). Carl-Erik Arnesen mener at «Norwegian Gannet» tilfredsstiller de nasjonale politiske målene for å flytte transport av gods fra vei til sjø. «Norwegian Gannet» har en teoretisk slaktekapasitet på 160.000 tonn laks pr. år og en slakte- og transportkapasitet på 100.000 fisk (Arnesen, 2018; Berge, 2018). Én last kan erstatte opptil 50 trailere på veien (Arnesen, 2018).

### **1.3 *Listeria monocytogenes* og listeriose**

*Listeria*-arter er korte (0,5 – 2 µm), smale, Gram-positive stavformede bakterier. Noen celler kan være kurvet. De forekommer alene eller i korte kjeder. Slekten er fakultative anaerobe bakterier og er ikke spore-dannede. *L. monocytogenes* er katalase positiv, oksidase negativ og fermenterer karbohydrater. Bakterien beveger seg ved hjelp av flageller over hele overflaten

(peritrich) under vekst på 20 – 25 °C, og har en karakteristisk «tumlende» bevegelighet. Den danner flageller og er bevegelig når den dyrkes ved temperaturer under 30 °C, men danner ikke flageller når den dyrkes ved 37 °C. Den optimale veksttemperaturen er 30 – 37 °C (SMIs, PHE & NHS, 2016).



**Figur 1.3.1.** Fylogeni for de åtte *Listeria*-artene beskrevet før 2009. Etter dette har det blitt beskrevet ni nye arter. Fylogenetreet viser kun forholdet mellom artene, og er dermed rotløst. Tre av serogruppene av *L. monocytogenes* er vist (Cossart, 2011).

I *Listeria*-slekten finnes det 17 arter, inkludert de 9 siste *Listeria*-artene som har blitt beskrevet etter 2009 (Figur 1.3.1). Disse artene er *Listeria monocytogenes*, *Listeria seeligeri*, *Listeria ivanovii*, *Listeria welshimeri*, *Listeria marthii*, *Listeria innocua*, *Listeria grayi*, *Listeria fleischmannii*, *Listeria floridensis*, *Listeria aquatica*, *Listeria newyorkensis*, *Listeria cornellensis*, *Listeria rocourtia*, *Listeria weihenstephanensis*, *Listeria grandensis*, *Listeria riparia*, og *Listeria booriae* (Orsi & Wiedmann, 2016). Både *L. monocytogenes* og *L. ivanovii*, blir ansett som patogene, men kun *L. monocytogenes* skal være patogen hos mennesker (Orsi & Wiedmann, 2016).

I mikroskop kan *L. monocytogenes* se ut som streptokokker, siden de kan ha en rund form når de blir smurt utover. Bakterien hydrolyserer eskulin og er hemolytisk på blodagar med en smal sone av hemolyse rundt koloniene, som varierer med blod fra forskjellige arter. Bakterien produserer syre fra rhamnose, men ikke fra xylose (NMKL, 2010). For å skille *L. monocytogenes* fra andre *Listeria*-arter har hemolytisk aktivitet på blodagar blitt brukt som

en markør, men ytterlig biokjemisk karakterisering er nødvendig for å skille de forskjellige artene (SMIs et al., 2016).

*L. monocytogenes* er bakterien som forårsaker den livstruende, matbårne sykdommen listeriose (Gray & Killinger, 1966; Jørgensen et al., 2017). I USA er *L. monocytogenes* den tredje største årsaken til matbåren død på grunn av mikrober (Orsi & Wiedmann, 2016; Scallan et al., 2011). Bakterien finnes nesten overalt i naturen; i jord, slam, vegetasjon, elver, tjern og i tarmen hos mange dyrearter. Den kan derfor også bli funnet i ferske matprodukter av dyr eller planter (Jay, Loessner & Golden, 2005). Spiseklare matvarer som røkt fisk, gravet fisk og røkt fisk uten varmebehandling kan inneholde den patogene bakterien (Mattilsynet, 2012; Schlech, 2000). Hovedruten til infeksjon er kontaminert mat eller vann (Jørgensen et al., 2017). For friske personer er ikke bakterien farlig, siden det må svært mange bakterier til for å gjøre friske personer syke. Personer i risikogrupper kan derimot bli alvorlig syke (Buchanan et al., 2017; Jay et al., 2005). Personer i risikogruppene er for eksempel gravide, spedbarn, eldre og personer med nedsatt immunforsvar (Jay et al., 2005; Mattilsynet, 2012). *L. monocytogenes* forekommer jevnlig, og de fleste mennesker vil være smittet en eller annen gang i løpet av livet. Det er estimert at cirka 1-5 % av befolkningen er bærere av *L. monocytogenes* til enhver tid (VKM et al., 2018). Listeriose er en alvorlig invasiv infeksjon med høy dødelighet (25-30 %) og sykehusinnleggelse (>92 %) (Buchanan et al., 2017). Nyfødte kan også bli født med listeriose. Symptomer på listeriose hos mennesker kan være feber, spontanabort, hjernehinnebetennelse eller blodforgiftning (Jay et al., 2005). Hos dyr kan symptomene være nervesykdom eller spontanabort (Jørgensen et al., 2017).

Det er derfor viktig at matprodusenter, spesielt de som produserer spiseklare matprodukter, har ordentlige rutiner for å forebygge forekomsten av *L. monocytogenes* i sine produkter. Forekomsten av *L. monocytogenes* i matprodukter og produksjonslokalene må nøye overvåkes, og matprodusentene må ha systemer for sporbarhet og tilbakekalling av produkter fra markedet hvis *L. monocytogenes* blir detektert (Faucher & Charette, 2015; Jørgensen et al., 2017). Sveits introduserte i 1999 en kvantitativ grense på 100 *L. monocytogenes* cfu/g (Jemmi, Pak & Salman, 2002), og etter det har også EU, Norge, Canada, Australia og New Zealand satt en øvre grense på 100 cfu/g innenfor holdbarhetstiden for en rekke næringsmidler, inkludert spiseklare produkter der *L. monocytogenes* kan vokse, som f. eks røkt laks (Løvdal, 2015). USA har derimot nulltoleranse for *L. monocytogenes*, noe som fører til mange tilbakekallinger av spiseklare produkter fra markedet på grunn av potensiell listeriose-fare (Goetz, 2013).

Kontaminering av *L. monocytogenes* i kommersielle matvarer kan føre til forbrukerklager, tilbakekallinger og generelt dårlig PR, og bidrar i stor grad til økonomiske tap for matindustrien.

#### **1.4 *Listeria monocytogenes* i oppdrettsnæringen**

*L. monocytogenes* isoleres ofte fra slakterier som foredler oppdrettslaks i Norge (Lunestad, Truong & Lindstedt, 2013; Løvdal, Giske, Bjørlykhaug, Eri & Mork, 2017) og i utlandet (Dordevic et al., 2016; Rotariu, Thomas, Goodburn, Hutchison & Strachan, 2014). Kontroll av *L. monocytogenes* er en stor utfordring for produsenter av laks, og enkelte produkter av laks og ørret utgjør en potensiell helserisiko. Dette har ført til økt fokus på dokumentasjon og kontroll av *L. monocytogenes* i egen produksjon (Heir & Langsrud, 2013).

##### **1.4.1 *Listeria monocytogenes* i sjøvann og slakteri**

Det har tidligere blitt gjort studier på smitteveier og smittekilder for *L. monocytogenes* i produksjonskjeden for laks. Heir & Langsrud (2013) utførte typing av *L. monocytogenes* isolater. Resultatene viser at hvert anlegg har persistente stammer, såkalte «husstammer». Prøvene hvor *L. monocytogenes* hadde høyest forekomst i studien var i miljøprøver (sluk og gulv) etterfulgt av utstyrprøver (transportbånd og vakuumpustyr) (Heir & Langsrud, 2013). Hverken i studien av Heir og Langsrud, eller i studien utført av Miettinen & Wirtanen (2006) ble det påvist *L. monocytogenes* fra rund laks/ørret, noe som indikerer at fisken blir smittet under prosesseringen i disse slakteriene.

Hansen, Vogel & Gram (2006) undersøkte prevalensen og overlevelsesevnen til *L. monocytogenes* i miljøer utenfor slakteri og foredlingsanlegg, altså i sitt naturlige miljø, ved hjelp av Random Amplification of Polymorphic DNA (RAPD). Denne studien viste at *L. monocytogenes* hadde en dårlig overlevelsesevne i sjøvann. I tillegg viste undersøkelsen at *L. monocytogenes* overlevde lengre ved 5 °C enn ved 20 °C i sitt naturlige miljø. Typingen av *L. monocytogenes* fra prosessanleggene var homogene, men de dominerende subtypene av *L. monocytogenes* ble kun funnet sporadisk i miljøet utenfor prosessanlegget. Isolatene fra prøvene tatt utenfor prosessanleggene hadde også et større mangfold av subtyper av *L. monocytogenes*. Det er derfor usikkert om *L. monocytogenes* fra oppdrettsanleggene har noen sammenheng med *L. monocytogenes* i produkt (Hansen et al., 2006).

En studie utført av Miettinen & Wirtanen (2006) kan derimot indikere at det er en sammenheng mellom *L. monocytogenes* i oppdrettsanleggene og i produkt, fordi de samme pulstypene ble funnet i isolater fra produktet, prosesseringslokalene og råfisk. I denne studien var avrenningsvann fra bekker og elver hovedkontaminasjonskilden for *L. monocytogenes* i vannet

i oppdrettsanlegget. Etter at vannet var fritt for *L. monocytogenes*, tok det flere måneder før fisken var *Listeria*-fri. Slamprøver fra havbunnen under oppdrettsanleggene var de prøvene som lengst opprettholdte *L. monocytogenes* kontaminasjonen.

Mellom oktober 2015 og mai 2018 var det et multinasjonalt utbrudd av listeriose. Isolater fra 12 listeriosetilfeller ble identifisert ved hjelp av hel-genom sekvensering (whole genome sequencing; WGS). Det er kun en liten del av EU/EEA landene som rutinemessig bruker denne avanserte metoden for å karakterisere *L. monocytogenes* isolater. Dette gjør det vanskelig å bestemme omfanget av utbruddet. Listerioseutbruddet ble knyttet til konsum av laks eksportert fra Norge som ble kald-røkt i Polen. På grunn av manglende WGS data fra oppdrettsanlegg, prosesseringsanlegg og produkt var det ikke mulig å avdekke hvor kontaminasjonen av *L. monocytogenes* kom fra (EFSA & ECDC, 2018b). Ved hjelp av WGS bestemmes organismenes totale arvemateriale (DNA). Sammenlignet med andre tradisjonelle metoder som PFGE og MLVA, gir WGS-analyser mer sensitive, spesifikke og presise resultater, som viser slektskapet mellom to isolater (Jackson et al., 2016). WGS har revolusjonert hvordan folkehelse- og forvaltnings-sektoren – både nasjonalt og internasjonalt – gjennomfører sporing, sykdomsoppklaring og rutinemessig overvåkning av patogene bakterier i matkjeden (Allard et al., 2019; EFSA, 2018). I tillegg til å koble bakterieisolater fra pasienter til smitekilden, kan teknologien brukes til en effektiv kartlegging av smitekilder og -veier i matkjeder og for bedrifter innen matforedling (Balamurugan, Leen, Wiedmann & Orsi, 2019; Fagerlund et al., 2016).

I en rekke *Listeria*-utbrudd har persistens av *L. monocytogenes* i prosesseringsanlegg blitt antatt å være hovedårsaken (Ferreira, Wiedmann, Teixeira & Stasiewicz, 2014). Dette er ikke godt dokumentert i forskningslitteraturen og kan være utdatert. En alternativ hypotese er at etablering av persistente *L. monocytogenes*-stammer ikke lenger er hovedproblemet, men at *L. monocytogenes* kontinuerlig blir introdusert inn i slakteriene i varierende grad gjennom året, avhengig av vær og forskjellige miljøfaktorer. Denne hypotesen er begrunnet av data samlet av industrien selv igjennom interne rutinekontroller, som viser at *L. monocytogenes* jevnlig er tilstede i miljøet utenfor slakteriene (Haldorsen, 2019; Seroylas, 2019). Grunnen til dette kan være at produksjon av laks i seg selv bidrar til kontaminering av nærliggende miljø, eller at matfiskanleggene i seg selv ikke bidrar til spredning, men lider av kontaminering utenfra, fra for eksempel avrenning fra land. Begge hypotesene understreker viktigheten av råstoffet som en kilde til *L. monocytogenes* spredning inn i produksjon og prosessering (Eklund et al., 1995; Hansen et al., 2006; Miettinen & Wirtanen, 2006).

I tillegg til kontaminering fra nærliggende miljø, kan fôr være en mulig kilde til *Listeria*-kontaminering. Dette skjer imidlertid veldig sjeldent. Under produksjon av fôr behandles fôret med høy temperatur. Selv om *L. monocytogenes* tåler noe mer varme enn de fleste andre ikke-sporedannede matbårne bakterier, kan man forutsette at varmebehandlingen i fiskefôrprosessen vil drepe *L. monocytogenes* (Doyle, Mazzotta, Wang, Wiseman & Scott, 2001). Man kan imidlertid ikke utelukke rekontaminering av fôret ved et senere trinn i prosessen. Dette kan blant annet forekomme mens fôret er i siloene, eller for eksempel kommer i kontakt med sjøsprøyt eller fugler; men for at dette skal skje må det være brudd på rutiner og regler. EUs Zoonose-rapporter for 2014-2017 viser at det ble gjennomført svært få kartlegginger av *L. monocytogenes*-forekomst i fôr. Av 28 fôrprøver som ble undersøkt i et av medlemslandene i 2017, var kun 1 prøve positiv (EFSA & ECDC, 2018a).

Haldorsen (2019) undersøkte forekomsten av *L. monocytogenes* på ulike prøvepunkter i fire sjøanlegg. Forekomsten var prosentvis størst på dødfisk og dødfisk-utstyr i merd (45 %), etterfulgt av prøver fra brønnbåt (18 %), fôringsanlegg (18 %), fôr i fôrsilo (15 %) og overflateprøver av laks i sjø (5 %). Resultatene i denne studien kan tyde på at fisk kan bli smittet med *L. monocytogenes* i sjø, og at dødfisk i merd er en smitterisiko, muligens på grunn av fôrrester, samt at brønnbåter kan fungere som vektorer for *L. monocytogenes*. I en studie gjennomført av Seroylas, ble det anslått at 20 % av brønnbåtene som leverte laks til ett spesifikt slakteri stod for 80 % av smitten inn i dette slakteriet, og at det samme gjaldt for lokalitetene som leverte laks til slakteriet. Zaremba (2018) undersøkte tilstedeværelsen av *L. monocytogenes* fra vann og overflaten av fisk fra fem oppdrettsanlegg og tilhørende brønnbåter i tidsrommet september 2017 til januar 2018. Det ble ikke påvist *L. monocytogenes* i noen av de 126 prøvene som ble tatt (Zaremba, 2018). Data fra et slakteri har imidlertid vist at påvisning av *L. monocytogenes* i en utblødningstank er størst om høsten (40,6 %) og våren (37,5 %) (Seroylas, 2019). Været ser ut til å spille en stor rolle når det gjelder forekomsten av *L. monocytogenes* i matfiskanlegg (Miettinen & Wirtanen, 2006; Seroylas, 2019).

Rørvik (1995) undersøkte tilstedeværelsen av *L. monocytogenes* og *Listeria*-arter i et prosesseringsanlegg for laks som bestod av et røykeri og et slakteri. Av totalt 475 prøver var 16 % av prøvene positive for *L. monocytogenes*, mens andre *Listeria*-arter ble funnet i 22 % av prøvene. Slakteriet var sporadisk kontaminert, men *L. monocytogenes* ble ikke funnet i noen av de 50 prøvene av slaktet fisk. Undersøkelsen viste, ved hjelp av elektroforetisk typing (ET), at isolatene av *L. monocytogenes* i røykeriet skilte seg ut fra isolatene fra sjøvann, slakteri, og fisk (fôr slakting). Dette tyder på at det er «husstammer» av *L. monocytogenes* som har etablert seg

i røykeriet. Kilden til *Listeria*-kontaminasjonen ble ikke funnet, men siden det ble påvist andre stammer i isolatene fra råfisk enn i lokalene og sluttprodukt, og at frekvensen av påvisning var lavere, antas det at råfisk ikke var kilden til *Listeria*-kontaminasjonen. Rørvik (1997) tok også prøver av røkt laks og avløp. I denne undersøkelsen ble det påvist *L. monocytogenes* i 33 % av prøvene av røkt laks, og i 63 % av avløpsprøvene fra røykeriet. Det ble utført multivariable analyser av data av hygiene, personell, produksjonslokaler og bakteriologi. Resultatene viste at jobbrotasjonen var den største risikofaktoren for å påvise *L. monocytogenes* i røkt laks.

Flere studier viser at det er en kontinuerlig tilstedeværelse av *L. monocytogenes* i sjøvannet i oppdrettsanlegg. Når et oppdrettsanlegg er kontaminert med *L. monocytogenes*, vil bakterien gradvis forsvinne dersom tilførselen av ny kontaminering stoppes (Miettinen & Wirtanen, 2006). Det er flere mulige kilder til kontamineringen; avrenningsvann fra bekker og elver, fôr, dødfisk, dødfisk-utstyr og sedimenter på havbunnen. Noen studier viser at det er en økning av *L. monocytogenes* i vannet etter en periode med kraftig nedbør (Miettinen & Wirtanen, 2006) og at det kan være en sesongvariasjon (Seroylas, 2019). Prevalensen av *L. monocytogenes* i fersk fisk er rapportert å variere betydelig; fra 0 til 50 % (Ben Embarek, 1994). Andre studier har funnet at prevalensen i rå fisk er lav; fra 0-1 % til 10 % (Gram, 2001). Prøver fra rund laks/ørret viser at fisken generelt sett har lav forekomst av *L. monocytogenes* (Heir & Langsrud, 2013; Miettinen & Wirtanen, 2006).

### 1.4.2 Bearbeidede produkter

Varmebehandling er en av de mest vanlige metodene brukt for å oppnå sikre fiskeprodukter med en forlenget holdbarhet. I tillegg til varmebehandling er mer moderne og ukjente metoder opplistet i *Tabell 1.4.2.1*.

**Tabell 1.4.2.1.** Oversikt over metoder brukt for å hemme mikrobiologiskvekst på lakseprodukter, og dermed forlenge holdbarheten.

Metode	Beskrivelse	Referanse(r)
Modifisert atmosfærepakking (MAP)	I MAP blir luften i pakken erstattet av en gassblanding med gunstigere gasskomposisjon. I fiskeprodukter er CO <sub>2</sub> den viktigste gassen, på grunn av de bakteriostatiske og fungistatiske egenskapene. Gassen hemmer vekst av mange bakterier inkludert <i>L. monocytogenes</i> . Dermed hemmes flere bakterier når CO <sub>2</sub> -konsentrasjonen øker.	A review of modified atmosphere packaging of fish and fishery products – significance of microbial growth, activities and safety (Sivertsvik, Jeksrud & Rosnes, 2002) Effect of modified atmosphere packaging on the growth of spoilage microorganisms and <i>Listeria monocytogenes</i> on fresh cheese (Brown, Forauer & D'Amico, 2018).
Røyking	Røyking av laks er en konserveringsmetode som samtidig setter en røkt smak på fisken. Man skiller mellom kaldrøkt og varmrøkt laks. Kaldrøyking skjer vanligvis på 19-22 °C og varmrøyking ved rundt 70-80 °C. Kaldrøyking kan hemme veksten av <i>L. monocytogenes</i>	<i>Listeria monocytogenes</i> in the smoked salmon industry (Rørvik, 2000)



	<p>i produktet. Varmrøyking kan eliminere <i>L. monocytogenes</i> fra produktet. <i>L. monocytogenes</i> vokser raskt i røkt laks ved oppbevaring. Derfor er det viktig å unngå rekontaminering etter røyking.</p>	
Lett varmebehandling	<p>Tradisjonell varmebehandling av laks kan forårsake en kvalitetsendring i lipid- og proteinfraksjonene i produktet. Derfor utvikles det metoder for en raskere varmebehandling, hvor varmemengden begrenses ved å redusere temperaturen eller fokusere på varmebehandling av potensielle infiserte området. Dielektrisk oppvarming, Shaka-teknologi og overflatepasteurisering er eksempler på teknologier som møter denne tilnærmingen.</p>	<p>Recent Advances in Minimal Heat Processing of Fish: Effects on Microbiological Activity and Safety (Rosnes, Skåra &amp; Skipnes, 2011)</p>
Høytrykksprosessering (HP)	<p>HP går ut på å utsette produkter for høyt trykk for å øke holdbarheten. HP er vanligere for landbruksprodukter enn for sjømat. Brukes ofte sammen</p>	<p>Høytrykksprosessering av sjømat (Rode &amp; Hovda, 2012)</p>

	<p>med MAP eller vakuumpakning av produkter, men kan også øke holdbarheten alene. Studier indikerer at trykk &lt; 450 MPa har liten inaktiveringseffekt på <i>L. monocytogenes</i>.</p>	
Bakteriosiner	<p>Bakteriosiner er antibakterielle proteiner produsert av bakterier som dreper eller hemmer vekst av andre bakterier. Flere melkesyrebakterier produserer forskjellige typer bakteriosiner. Nisin er det mest brukte bakteriosinet brukt som konserveringsmiddel i mat.</p> <p>I tillegg undersøkes det hvilke muligheter det er for å bruke beskyttende kulturer som for eksempel melkesyrebakterier på næringsmiddelet eller i produktpakningen for å hemme vekst av bakterier som <i>L. monocytogenes</i>.</p>	<p>Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation (Cleveland, Montville, Nes &amp; Chikindas, 2001)</p> <p><i>Listeria</i> i sjømat (Bredholdt &amp; Eie, 2002).</p>
Eteriske oljer (planteoljer)	<p>Behandling med eteriske oljer er ikke noe som blir brukt pr. dags dato, men studier viser at noen oljer kan ha en</p>	<p>Antimicrobial resistance of essential oils against <i>Staphylococcus aureus</i>, <i>E. coli</i> and <i>Listeria</i></p>

	antibakterielleffekt. I forsøk utført av Kleiberg <i>et al.</i> (2016) viste det seg at spesielt timian-, kløver- og tetreolje hemmer vekst av <i>L. monocytogenes</i> , <i>Escherichia coli</i> og <i>Staphylococcus aureus</i> . Det negative med denne behandlingen er at det setter en bismak på produktet.	<i>monocytogenes</i> (Kleiberg <i>et al.</i> , 2016).
--	-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-------------------------------------------------------

### 1.5 Mål med oppgaven

Målet med oppgaven var å observere mengden *L. monocytogenes* i et oppdrettsanlegg med laks over tid. Det ble tatt vannprøver av sjøvannet i merden fra oktober 2019 til mai 2020. Oppdrettsanlegget er lokalisert i et fjordmiljø. Vannprøvene ble analysert kvantitativt med qPCR og kvalitativt med Fraser-metoden (NMKL, 2010). Korrelasjonen mellom mengden *L. monocytogenes* i vannet og gjennomsnittstemperatur de siste 7 døgnene før prøvetakning ble beregnet. I tillegg ble korrelasjonen mellom mengden *L. monocytogenes* i vannet og total nedbør de siste 7 døgnene før prøvetakning beregnet, samt korrelasjon med sjøvannstemperaturen. Hvorvidt mengden *L. monocytogenes* varierte med sesong ble også observert.

- Hvor mye *L. monocytogenes* er det i oppdrettsanlegget?
- Er det sesongvariasjon?
- Er det sammenheng med vær?
  - Lufttemperatur
  - Nedbør
  - Sjøtemperatur

Som et sammenligningsgrunnlag var planen å ta prøver fra lokalitet 2 parallelt med lokalitet 1, for å se om det var store forskjeller mellom oppdrettsanleggene, men her ble fisken slaktet tidlig i prøvetakningen og den ble dermed avsluttet. Det ble tatt prøver av fisken fra denne lokaliteten som ble slaktet dag 4, 10, 14, 18, 21 etter slakt og i tillegg til kaldrøkt laks.

## **1.6 Prinsipp for metoder**

### ***1.6.1 Kultivering ved bruk av Fraser-metoden***

NMKL 136 *L. monocytogenes* (Fraser-metoden) ble brukt for påvisning og kvantifisering av *L. monocytogenes* (NMKL, 2010). Fraser-metoden brukes til å detektere *L. monocytogenes* i næringsmidler og fôr og for kvantifisering i næringsmidler. I påvisningsdelen blir det brukt to-trinns oppformering. I primæroppformeringen brukes en oppformeringsbuljong med redusert selektivitet (Half-Fraser buljong). Om primæroppformeringen skifter farge fra gul til svart er testen preliminært positiv. Den primære oppformeringskulturen blir deretter oppformert videre i den sekundære oppformeringsbuljongen (Fraser buljong). Skifter sekundæroppformeringen farge fra gul til svart er testen preliminært positiv. Den sekundære oppformeringskulturen strykes ut på Brilliance *Listeria* agar, som er en selektiv, kromatisk agar. Turkise kolonier indikerer tilstedeværelse av *Listeria*-arter, og hemolyse rundt de turkise koloniene indikerer tilstedeværelse av *L. monocytogenes*. Ved turkise kolonier med hemolyse benyttes biokjemisk karakterisering.

Ved bruk av Fraser-metoden påvises kun levende bakterier. I tillegg kan *L. monocytogenes* bli utkonkurrert av andre bakterier, noe som kan gi falske negative resultater. Fraser-metoden har en høyere deteksjonsgrense sammenlignet med real-time PCR. Fordelen med å bruke Fraser-metoden er at det er mulig å dyrke opp bakterien til senere eksaminering.

### ***1.6.2 Real-time PCR***

I denne oppgaven ble real-time PCR brukt til påvisning og kvantifisering av *L. monocytogenes* i sentrifugerte vannprøver.

Metoden har lavere deteksjonsgrense enn Fraser-metoden. I tillegg er både døde og levende bakterier med i beregningen. Hvis det er døde bakterier til stede i prøven er det ikke lenge siden disse var levende. *L. monocytogenes* som lever fritt i sjøvann desimeres med 6 Log i løpet av ca. 3 uker (Hansen et al., 2006).

Polymerase-kjedereaksjon, PCR, er en metode for å amplifisere spesifikke sekvenser av et DNA- eller cDNA-templat. Sekvensen blir amplifisert ved bruk av sekvensspesifikke oligonukleotider, en varmestabil DNA-polymerase og varmesykluser (Invitrogen, 2008). Ved bruk av PCR kan én kopi av et DNA-fragment amplifiseres til opptil flere millioner kopier, som gjør det mulig å kvantifisere det aktuelle DNA-fragmentet (Arya et al., 2005; Kubista et al., 2006). I tradisjonell PCR blir deteksjon og kvantifikasjon av amplifiserte sekvenser utført etter den siste PCR-syklusen er fullført og involverer post-PCR analyser som gel-elektroforese og

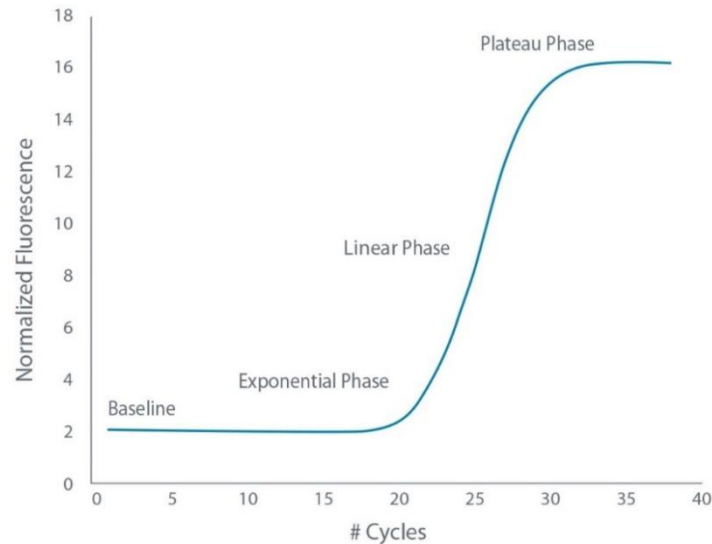
bildeanalyser (Invitrogen, 2008). I real-time PCR blir PCR-produktene kontinuerlig målt i hver syklus. Ved å overvåke reaksjonen under den eksponentielle amplifikasjonsfasen kan startmengde av målorganismen beregnes med stor presisjon (Invitrogen, 2008).

I teorien skal PCR amplifisere DNA eksponentielt og doble antall DNA-molekyler til stede i hver syklus. Teoretisk sett kan antall sykluser og mengden PCR sluttprodukt bli brukt til å kalkulere startmengden av det genetiske materialet (sammenlignet med en kjent standard), men flere faktorer kompliserer beregningen av konsentrasjonen. PCR er ikke nødvendigvis eksponentiell i begynnelsen av hver syklus, og etter hvert flater reaksjonen ut. Derfor bør mengden DNA bli målt når reaksjonen fortsatt er i den eksponentielle amplifikasjonsfasen. Real-time PCR ble utviklet for å unngå problemene i tradisjonell PCR. Mengden DNA blir målt etter hver syklus via fluorescerende fargestoff som øker mengden fluorescenssignal proporsjonalt til antall molekyler av PCR-produkt som blir generert i den eksponentielle fasen i reaksjonen (Invitrogen, 2008).

Forandringen i fluorescensen under reaksjonen er målt av et instrument som kombinerer varmesykluser og skanning. Ved å plote fluorescens mot antall sykluser genererer real-time PCR-instrumentet et amplifikasjonsplott som viser akkumulasjon av produkt over hele PCR reaksjonen (Invitrogen, 2008).

PCR-amplifikasjonen består av fire faser (*Figur 1.6.2.1*). Den første fasen er lagfasen. Her foreligger en eksponentiell amplifikasjon, men det fluorescerende signalet har ikke krysset den optiske deteksjonsgrensen til PCR-instrumentet (Arya et al., 2005; Schefe, Lehmann, Buschmann, Unger & Funke-Kaiser, 2006). PCR-instrumentet klarer ikke fange opp lysmengden fra når fluorescenssignalet er lavt, men etter 15-20 sykluser blir signalet sterkt nok. I den andre fasen, eksponentiell fase, er den eksponentielle amplifikasjonen av PCR-produkter over den optiske deteksjonsgrensen. I den neste fasen, lineærfase, gir den eksponentielle amplifikasjonen en dobling i PCR-produkter i hver syklus (Schefe et al., 2006). I denne fasen er forholdet mellom de nydannede PCR-produktene og mengden utgangstemplat kvantitativt. Etter en stund vil PCR-reaksjonen over tid avta eksponentielt og gå i en nedgangsfase, siden primerne blir oppbrukt. Denne fasen vil resultere i platåfasen, hvor ingen flere PCR-produkter dannes (Arya et al., 2005; Schefe et al., 2006). Ved endepunktkvantifisering, hvor mengden PCR-produkt måles til slutt i amplifikasjonen, vil ikke resultatene være helt presise. Ved real-time PCR vil derimot mengden PCR-produkt som akkumuleres per syklus måles kontinuerlig (Arya et al., 2005; Schefe et al., 2006). Dette gjøres ved at real-time PCR-instrumentet måler

dannet fluorescerende signal kontinuerlig under PCR-prosedyren, som direkte er proporsjonal med mengden PCR-produkt dannet (Invitrogen, 2008; Kubista et al., 2006).



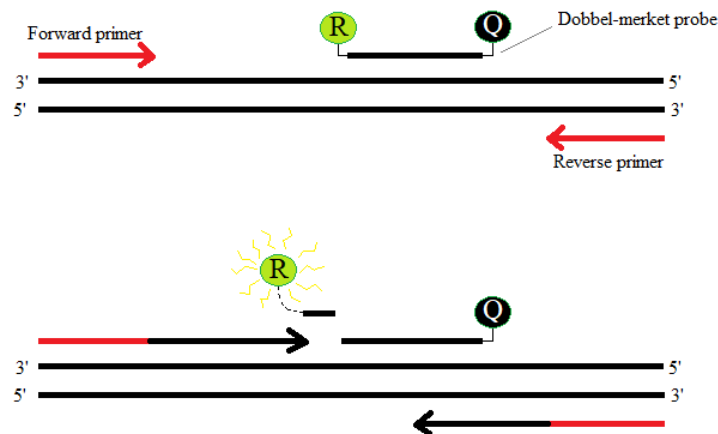
**Figur 1.6.2.1.** PCR amplifikasjonsstadier. I den eksponentielle fasen er den eksponentielle amplifikasjonen over den optiske deteksjonsgrenen. I lineærfasen er det en fordobling av mål-genet og denne fasen gir mest nøyaktig kvantifikasjon. Det er i denne fasen real-time PCR målingene blir tatt. I platåfasen minsker reaksjonskomponentene og gjør at amplifikasjonen flater ut. PCR-produktene vil ikke lengre bli fordoblet. Det er i dette stadiet PCR (endepunkt) målinger blir tatt (Biocompare, 2017).

Det finnes flere typer real-time fluorescens PCR kjemier, men de mest utbredte er 5' nuklease assayer som TaqMan® assay og SYBR® Green fargebasert assay (Invitrogen, 2008). I denne oppgaven er det brukt TaqMan. Dette er et probebasert system bestående av to primere og en probe. I likhet med andre real-time PCR prinsipper brukes dobbeltrådet DNA. I TaqMan kjemi er det to standard målspesifikke primere, i tillegg til én sekvensspesifikk oligo som kalles probe. Proben er bundet til to molekyler. På 5' enden av proben er det festet et fluorescerende molekyl som kalles en reporter. Den kalles en reporter fordi den reporterer fluorescenssignaler når det dannes PCR-produkt. På 3' enden er det bundet et molekyl som kalles en quencher. Quencheren slukker fluorescenssignalet når både reporteren og quencheren er festet til proben (*Figur 1.6.2.2*).

## PCR prosessen foregår i tre hovedtrinn:

- 1. Denaturering (~95 °C):** Ved høy temperatur denatureres DNA-et. Hydrogenbindingene mellom nukleotidene i spiralen brytes, og danner singeltrådet DNA.
- 2. Primerbinding (~60 °C):** Temperaturen senkes slik at den er lav nok til at primerne og DNA-proben binder seg. Dette er vist øverst i *Figur 1.6.2.2*.
- 3. Polymerisering:** Temperaturen økes igjen. Taq polymerase finner primerne og starter ekstensjonsfasen ved å lage en ny, komplementær DNA-tråd. Når Taq treffer proben, blir reporteren revet løs fra proben og quencheren, og reporteren sender ut et permanent fluorescerende signal. Dette er vist nederst i *Figur 1.6.2.2*.

### Trinnene gjentas 30-50 ganger



**Figur 1.6.2.2.** TaqMan proben er avhengige av to primere i tillegg til en probe merket med både en reporter og en quencher. Figuren øverst viser en probe merket med både en reporter og en quencher. Quencheren hemmer fluorescenssignalet når begge er festet til proben. Når forward primeren treffer 5'enden til proben, løses reporter molekylet fra proben og fluorescenssignalet blir ikke lenger hemmet av quencheren, men sendes permanent ut. Derfor vil fluorescenssignalet være proporsjonalt med dannet PCR produkt.

Figuren er rekonstruert fra Invitrogen (2008).

## 2. Material og metoder

### 2.1 Material

Det ble tatt prøver fra to lokaliteter. Lokalitet 1 var lokalisert i et fjordområde nær bebyggelse. Lokalitet 2 var lokalisert ut i havet uten bebyggelse i umiddelbar nærhet. Ved de to lokalitetene ble det tatt vannprøver av sjøvannet i oppdrettsanleggene.

Ved lokalitet 1 ble en autoklavert glassflaske festet på en vannprøvetaker (Water sampling probe sub 15, *Labolytic AS*). Glassflasken ble senket under vann med åpen ventil (*Figur 2.1.1*) og etter at flasken var fylt opp av vann ble ventilen lukket (*Figur 2.1.2*) og flasken heiset opp (*Figur 2.1.3*). Vannet ble deretter overført til en autoklavert polypropylenflaske (215-5684, *VWR*). Oversikt over prøvene tatt ved lokalitet 1 er oppsummert i *Tabell 2.1.1*.



**Figur 2.1.1.**  
Vannhenter med  
åpen ventil.



**Figur 2.1.2** Vannhenter med  
lukket ventil.



**Figur 2.1.3.** Vannhenter heises opp  
etter prøvetakning.

Ved lokalitet 2 ble vannprøvene tatt ved at en autoklavert plastflaske ble senket under vann til flasken ble fylt opp. Deretter ble korken på flasken skrudd på mens flasken var under vann. En oversikt over vannprøvene ved lokalitet 2 er oppsummert i *Tabell 2.1.2*. I tillegg til vannprøvene ble det også tatt prøver av fisken etter slakt (*Tabell 2.1.3*).



**Tabell 2.1.1.** Oversikt over prøver tatt ved lokalitet 1. Ved denne lokaliteten ble det tatt vannprøver fra merdene med laks. oversikten viser hvilke metoder som er brukt til å analysere prøvene.

Dato	Type prøve	Metode
17.10.2019	3 prøver à 500 ml SVs	Real-time PCR
06.11.2019	3 prøver à 500 ml SVs	Real-time PCR
20.11.2019	3 prøver à 500 ml SVs	Real-time PCR
20.11.2019	3 prøver à 500 ml SVs	Fraser
12.12.2019	3 prøver à 500 ml SVs	Real-time PCR
12.12.2019	3 prøver à 500 ml SVs	Fraser
07.01.2020	3 prøver à 500 ml SVs	Real-time PCR
07.01.2019	3 prøver à 500 ml SVs	Fraser
07.01.2020	3 prøver à 100 ml SVf	Fraser
22.01.2020	3 prøver à 500 ml SVs	Real-time PCR
22.01.2020	3 prøver à 500 ml SVs	Fraser
22.01.2020	3 prøver à 100 ml SVf	Fraser
10.02.2020	3 prøver à 500 ml SVs	Real-time PCR
10.02.2020	3 prøver à 500 ml SVs	Fraser
10.02.2020	3 prøver à 100 ml SVf	Fraser
24.02.2020	3 prøver à 500 ml SVs	Real-time PCR
24.02.2020	3 prøver à 500 ml SVs	Fraser
24.02.2020	3 prøver à 100 ml SVf	Fraser
20.03.2020	3 prøver à 500 ml SVs	Real-time PCR
20.03.2020	3 prøver à 500 ml SVs	Fraser
20.03.2020	3 prøver à 100 ml SVf	Fraser
01.04.2020	3 prøver à 500 ml SVs	Real-time PCR
01.04.2020	3 prøver à 500 ml SVs	Fraser
01.04.2020	3 prøver à 100 ml SVf	Fraser
15.04.2020	3 prøver à 500 ml SVs	Real-time PCR
15.04.2020	3 prøver à 500 ml SVs	Fraser
27.04.2020	3 prøver à 500 ml SVs	Real-time PCR
27.04.2020	3 prøver à 500 ml SVs	Fraser

11.05.2020	3 prøver à 500 ml SVs	Real-time PCR
11.05.2020	3 prøver à 500 ml SVs	Fraser

SVs = Sentrifugert sjøvann fra merd (beskrevet i avsnitt 2.2), SVf = Filtrert sjøvann fra merd (beskrevet i avsnitt 2.2).

**Tabell 2.1.2.** Oversikt over vannprøver tatt ved lokalitet 2.

Dato	Prøve	Metode	Kommentar
29.07.2019	1 prøve à 500 ml SVs	Real-time PCR	Tilsendt prøve
17.10.2019	2 prøver à 500 ml SVs	Real-time PCR	Merd med fisk
06.11.2019	3 prøver à 500 ml SVs	Real-time PCR	Merd uten fisk

SVs = Sentrifugert sjøvann fra merd

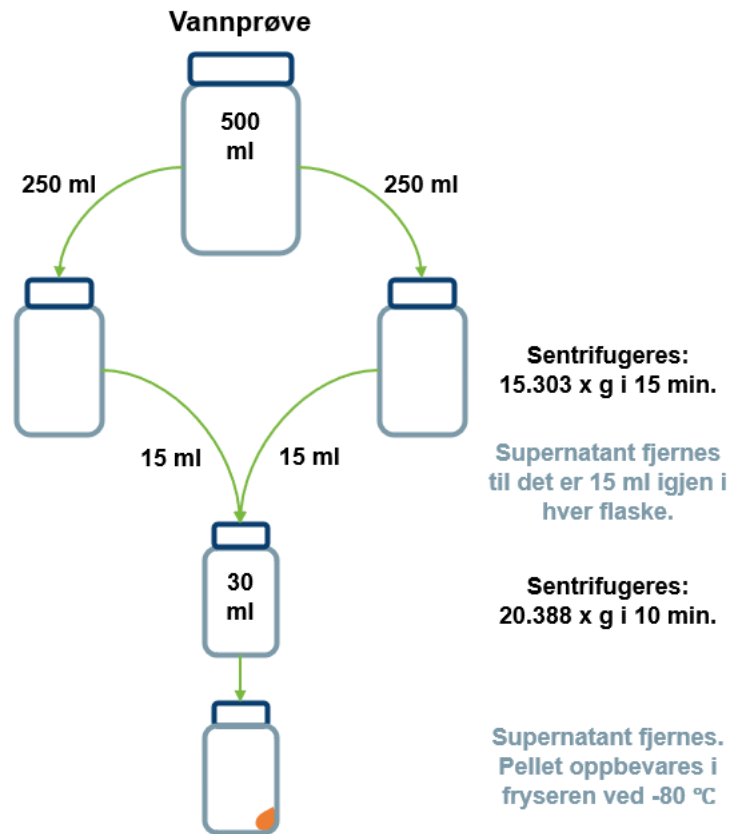
**Tabell 2.1.3.** Oversikt over prøver som har tilknytning til lokalitet 2. Prøvene i tabellen er både slaktet fisk og røkt fisk fra lokalitet 2.

Dato	Prøve	Metode	Kommentar
29.10.2019	2 prøver à 10 g FP x 3	Fraser	Dag 4 etter slakt
04.11.2019	2 prøver à 10 g FP x 3	Fraser	Dag 10 etter slakt
08.11.2019	2 prøver à 10 g FP x 3	Fraser	Dag 14 etter slakt
12.11.2019	2 prøver à 10 g FP x 3	Fraser	Dag 18 etter slakt
15.11.2019	2 prøver à 10 g FP x 3	Fraser	Dag 21 etter slakt
15.11.2019	7 prøver à 10 g RFP	Fraser	Nedkjølt på is
15.11.2019	6 prøver à 10 g RFP	Fraser	Superkjølt

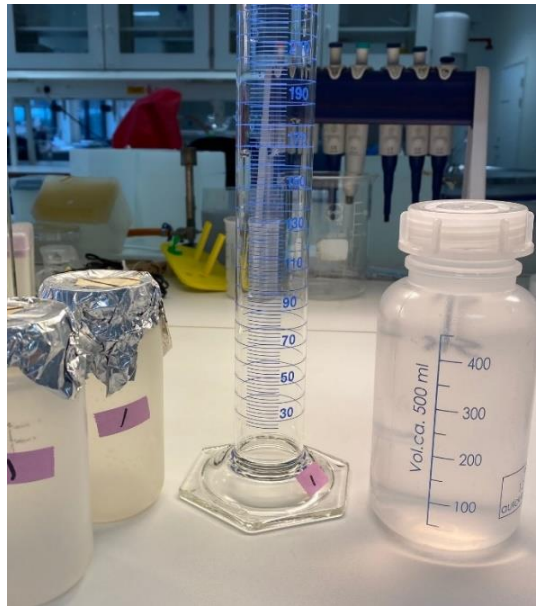
FP = Fiskeprøve med laks med skinn, RFP = Fiskeprøve av kaldrøkt laks uten skinn

## 2.2 Sentrifugering av vannprøver

Vannprøvene ble sentrifugert for å konsentrere prøvene som illustrert i *Figur 2.2.1*. Vannprøvene på 500 ml ble fordelt på to 250 ml sentrifugebøtter (*Figur 2.2.2*) (Nalgene, *Thermo Scientific*). Sentrifugebøttene ble veid på en analytisk vekt før sentrifugering for å balansere sentrifugen. Sentrifugebøttene ble deretter sentrifugert ved 15.303 x g i 15 minutter. Mesteparten av supernatanten ble fjernet og pelleten ble resuspendert i resterende væske. Det ble overført 15 ml fra to av 250 ml sentrifugeflaskene til et 40 ml sentrifugerør (Nalgene, *Thermo Scientific*). Sentrifugerøret ble sentrifugert på 20.388 x g i 10 minutter. Supernatanten ble fjernet og pelleten ble oppbevart i fryseren ved -80 °C.



**Figur 2.2.1.** Oversikt over sentrifugeringen av vannprøvene. Vannprøver på 500 ml ble fordelt på to sentrifugebøtter á 250 ml og ble sentrifugert på 15.303 x g i 15 min. Supernatanten ble fjernet til det var 15 ml væske igjen i hver flaske. Pelleten ble resuspendert og væsken fra begge bøttene ble overført til et 40 ml sentrifugerør. Røret ble sentrifugert på 20.388 x g i 10 minutter. Til slutt ble supernatanten fjernet og pelleten ble oppbevart i fryseren ved -80 °C



**Figur 2.2.2.** Sentrifugebøtter, målekolbe og 500 ml vannprøve.

Et utvalg av vannprøvene (*Tabell 2.1.1*) ble filtrert for å konsentrere prøven på filteret, og for å sammenligne resultatet med de sentrifugerte vannprøvene. Det ble filtrert 100 ml av vannprøven med et 0,45  $\mu\text{m}$  filter (BM047045W, *Membrane Solutions*) og vakuumpumpe (VP 80, VP 133, *VWR*). Oppsettet er vist i *Figur 2.2.3*.



**Figur 2.2.3.** Filtrering av vannprøve. Oppsett for filtrering. Büchner flaske med filter i korken. Koblet til en vakuumpumpe med en silikonlange.

## 2.3 DNA-ekstraksjon i sjøvann

Det ble gjort DNA-ekstraksjon av vannprøvene før de ble analysert med real-time PCR. Dette ble gjort for å isolere og rense DNA-et i prøvene, og fjerne kontaminasjon og enzym-hemmere.

Pelleten (Fra sentrifugert vannprøve fra avsnitt 2.2) ble tatt ut av fryser og tint ved romtemperatur. Pelleten ble resuspendert i 180 µl lysis buffer (TE-buffer, 20 mg/ml lysozym (L6876-1G, *Sigma-Aldrich*)). Prøven ble inkubert på 37 °C i 30 minutter. 25 µl proteinase K (*Qiagen*) og 200 µl Buffer AL (*Qiagen*) ble tilsatt og prøven ble blandet godt med vortex-blander. Prøven ble inkubert på 56 °C i 30 minutter. 200 µl 96-100 % etanol ble tilsatt og prøven ble blandet med vortex-blander. Prøven ble overført til DNeasy mini spinn kolonne (*Qiagen*) og plassert i et 2 ml oppsamlingsrør (*Qiagen*). Prøven ble sentrifugert ved 6.000 x g i 1 minutt. Gjennomløpet og oppsamlingsrøret (*Qiagen*) ble kastet. Mini spinn kolonnen ble plassert i et nytt 2 ml oppsamlingsrør. 500 µl Buffer AW1 ble tilsatt og prøven ble sentrifugert ved 17.000 x g i 4 minutter. Vaskebufferen og oppsamlingsrøret (*Qiagen*) ble kastet. Mini spinn kolonnen ble plassert i et 1,5 ml Eppendorfrør og 100 µl Buffer AE ble tilsatt direkte på membranen. Prøven ble inkubert ved romtemperatur i 1 minutt, og sentrifugert ved 6.000 x g i 1 minutt for å eluere ut DNA. DNA konsentrasjon og kvalitet ble sjekket med et nanofotometer (*Implen*) og notert. Prøven ble fryst ved -20 °C.

## 2.4 Deteksjon av *Listeria monocytogenes*

### 2.4.1 Kultivering av vannprøver

Pelleten (Fra sentrifugert vannprøve fra avsnitt 2.2) ble tatt ut av fryser og tint ved romtemperatur. Pellet ble resuspendert i 1 ml autoklavert Milli Q rensset vann og overført til et 15 ml Falconrør med 9 ml primær oppformeringsbuljong (Half-Fraser). Primær oppformeringskultur ble inkubert ved 30 °C i 24 timer. Etter inkubering ble 100 µl av primær oppformeringskultur overført til 9,9 ml av sekundær oppformeringsbuljong (Fraser buljong). Sekundær oppformeringskultur ble inkubert ved 37 °C i 48 timer. Etter inkubering ble 10 µl av sekundær oppformeringskultur strøket ut på Brilliance *Listeria* agar og inkubert ved 37 °C i 24-48 timer.

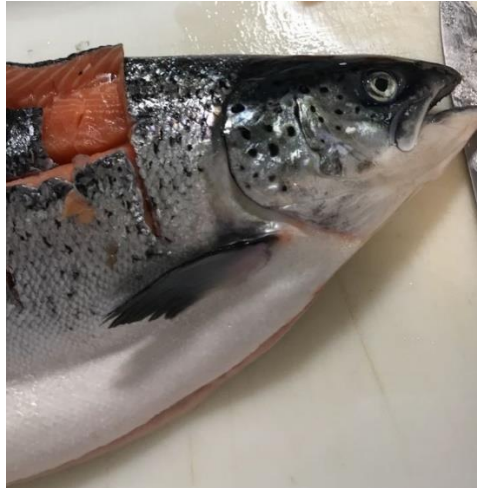
Filter fra filtret vannprøve (avsnitt 2.2) ble overført til et 15 ml falconrør med 10 ml primær oppformeringsbuljong (Half-Fraser). Videre ble Fraser-metoden fulgt som beskrevet over.

### 2.4.2 Kultivering av fiskeprøver

Fra område vist i *Figur 2.4.2.1* ble det skjært ut en prøve på ca. 10 g fisk med skinn. Prøven ble plassert i en homogeniseringspose med filter. Homogeniseringsposen ble tilsatt ca. 90 g

(1:10 forhold) primær oppformeringsbuljong (Half-Fraser buljong) Primæroppformeringen ble homogenisert i en homogeniseringsmaskin (Smasher, *BioMérieux SA*, France), og 10 ml ble overført til et 15 ml Falconrør. Videre ble Fraser-metoden fulgt som beskrevet i avsnitt 2.4.1.

For røkt fisk ble det utført på samme måte som beskrevet ovenfor, men disse prøvene ble tatt uten skinn.



**Figur 2.4.2.1.** Prøvetakning av laks. Det ble skjært ut 10 g fisk med skinn fra område vist i figuren. Denne prøven ble analysert kvalitativt ved bruk av Fraser-metoden.

### ***2.4.3 Real-time PCR av sentrifugerte vannprøver***

Ved utførelse av real-time PCR ble *L. monocytogenes*, genesig Standard kit (*Primerdesign*) benyttet. *L. monocytogenes* primer/probe mix ble resuspendert i 165 µl RNase/DNase fritt vann. *L. monocytogenes* positive kontroll templat ble resuspendert i 500 µl template preparation buffer. Reaksjonsblandingen ble forberedt i henhold til *Tabell 2.4.3.1.*

**Tabell 2.4.3.1.** Reaksjonsblanding.

<b>Komponent</b>	<b>Volum</b>
PrecisionPLUS 2X qPCR Master Mix	10 µl
<i>L. monocytogenes</i> primer/probe mix	1 µl
RNase/DNase free water	4 µl
<b>Totalt volum pr. prøve</b>	<b>15 µl</b>

Det ble pipettert 90 µl template preparation buffer i fem Eppendorfrør merket 2-6. 10 µl positive kontroll templat ble pipettert i rør 2. Røret ble blandet med en vortex-blander. Det ble pipettert 10 µl fra rør 2 over til rør 3, og røret ble blandet med en vortex-blander. Dette ble gjentatt til fortyningsserien var fullført i henhold til *Tabell 2.4.3.2*.

**Tabell 2.4.3.2.** Standardkurve. Oversikt over Eppendorfrør og antall kopier av *L. monocytogenes* pr. µl., hvor antall kopier tilsvarer antall bakterier.

Standardkurve	Antall kopier
Rør 1 Positiv kontroll ( <i>Primerdesign</i> <sup>TM</sup> )	2 x 10 <sup>5</sup> pr. µl
Rør 2	2 x 10 <sup>4</sup> pr. µl
Rør 3	2 x 10 <sup>3</sup> pr. µl
Rør 4	2 x 10 <sup>2</sup> pr. µl
Rør 5	20 pr. µl
Rør 6	2 pr. µl

En brønnplate med 96 brønner ble fylt med paralleller av hver prøve. Hver brønn ble fylt med 15 µl reaksjonsblanding. Brønnene til de negative kontrollene ble fylt med 5 µl RNase/DNase fritt vann. Brønnene til prøvene ble fylt med 5 µl av isolert DNA (fra avsnitt 2.3) fra hver prøve. Brønnene for den positive standard kurven ble fylt med 5 µl av fortyningene fra fortyningsserien (rør 6-2 fra *Tabell 2.4.3.2*), startet med lavest og deretter økende konsentrasjon. Det ble laget paralleller for negativ kontroll, positiv standardkurve og prøvene. Real-time PCR instrumentet ble satt opp etter amplifikasjonsforholdene vist i *Tabell 2.4.3.3*.

**Tabell 2.4.3.3.** Oppsett for amplifikasjonsforhold under real-time PCR ved bruk av Precision PLUS 2X qPCR Master Mix (*Primerdesign*)

Antall sykluser	Steg	Tid	Temperatur (°C)
1	Aktivering av enzym	2 min	95 °C
50	Denaturering	10 s	95 °C
	Samling av data*	60 s	60 °C

\* Fluorogenisk data blir samlet i løpet av dette steget igjennom FAM kanalen.

## 2.5 Korrelasjonstester

Real-time PCR resultatene ble satt inn i tabeller og beregninger ble utført i Microsoft Excel (Microsoft Inc., USA). Værdata fra de siste syv dagene før prøvetaking ble hentet fra YR historikk (<https://www.yr.no/nb>) fra nærmeste værstasjon til prøvetakningspunkt. Sjøtemperatur ble hentet fra <https://www.barentswatch.no/fiskehelse/> for lokalitet 1. Her ble det brukt sjøtemperaturmålingen fra den uken vannprøven er tatt.

Korrelasjon mellom *L. monocytogenes* (bakterier per liter) og **nedbør** (mm, totalt de siste syv dagene før prøvetaking), **gjennomsnittstemperatur** (siste syv dager) og **sjøtemperatur** (målt den uken) ble testet. Pearsons korrelasjonskoeffisient,  $R$  (eq. 1), ble beregnet ved hjelp av statistikkprogrammet «R», i tillegg til signifikans. Signifikansnivået ble satt til  $p < 0,05$ . Korrelasjonstestene ble utført med hjelp fra Håkon B. Johannessen (student, Universitetet i Stavanger).

$$R = \frac{\sum(x - \bar{x})(y - \bar{y})}{\sqrt{\sum(x - \bar{x})^2 \sum(y - \bar{y})^2}} \quad (\text{eq. 1})$$

Hvor  $\mathbf{x}$  og  $\mathbf{y}$  er to vektorer med lengden  $n$  (antall prøver/data),  $\mathbf{R}$  er Pearsons korrelasjonskoeffisient og  $\bar{x}$  og  $\bar{y}$  korresponderer henholdsvis til gjennomsnittet av  $x$  og  $y$ -verdiene.

Pearsons korrelasjonskoeffisient ligger mellom -1 og 1, hvor en høyere absoluttverdi viser et sterkere forhold mellom variablene. En absoluttverdi på 1 indikerer et perfekt lineært forhold, mens en korrelasjon nær 0 indikerer ikke-lineært forhold mellom variablene.



### 3. Resultater

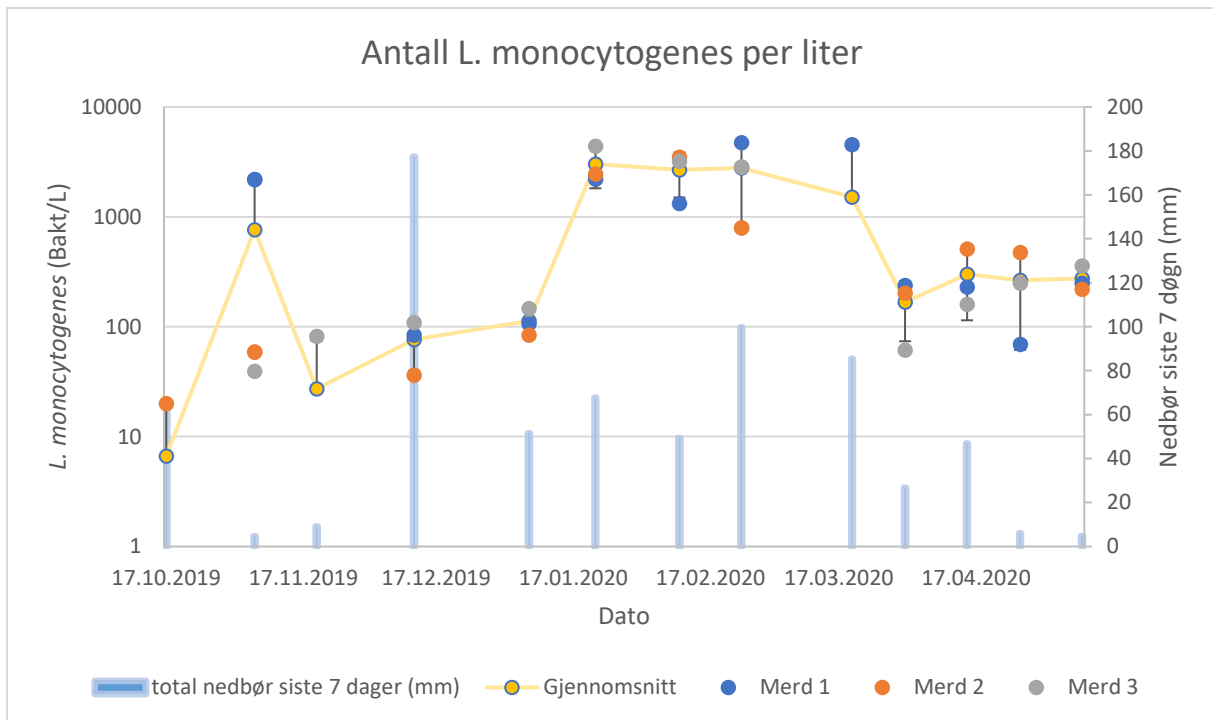
#### 3.1 Kvantifisering av *Listeria monocytogenes* i vannprøver fra lokalitet 1

Ved lokalitet 1 ble det tatt vannprøver fra tre merder i samme oppdrettsanlegg. Dette oppdrettsanlegget ligger i et fjordmiljø. Alle prøvene ble kvantifisert ved hjelp av real-time PCR. Resultatene fra real-time PCR for vannprøvene tatt ved lokalitet 1 er vist i *Tabell 3.1.1*.

**Tabell 3.1.1.** Oversikt over resultatene og positive vannprøver tatt ved lokalitet 1. Dato for prøvetakning, prøver fra tre merder og resultater fra real-time PCR.

Dato	Prøve 1 ( <i>L. monocytogenes</i> /l)	Prøve 2 ( <i>L. monocytogenes</i> /l)	Prøve 3 ( <i>L. monocytogenes</i> /l)	Positive prøver
17.10.2019	0	<100	0	1/3
06.11.2019	2185	<100	<100	3/3
20.11.2019	0	0	<100	1/3
12.12.2019	<100	<100	109	3/3
07.01.2020	107	<100	147	3/3
22.01.2020	2209	2455	4406	3/3
10.02.2020	1327	3494	3214	3/3
24.02.2020	4727	793	2837	3/3
20.03.2020	4546	0	0	1/3
01.04.2020	238	202	<100	3/3
15.04.2020	230	512	160	3/3
27.04.2020	<100	474	250	3/3
11.05.2020	249	219	358	3/3
<b>Positive prøver totalt</b>	<b>11/13</b>	<b>11/13</b>	<b>11/13</b>	<b>33/39</b>

Basert på resultatene fra real-time PCR er det satt opp et diagram hvor antall bakterier per liter og nedbør er plottet mot datoene prøvene ble tatt (*Figur 3.1.1*).



**Figur 3.1.1.** Antall bakterier per liter plottet mot prøvene tatt fra merd 1, 2 og 3 mot datoer for prøvetakning. Total nedbør fra de siste syv døgnene (mm) er også plottet mot de samme datoene (sekundærakse). Plottet inkluderer gjennomsnittsverdi av prøvemålingene med standardavvik. Det er også satt inn en linje mellom gjennomsnittsverdiene av prøvemålingene.

### 3.2 Påvisning av *Listeria monocytogenes* i vannprøver fra lokalitet 1

Alle sentrifugerte vannprøver fra Tabell 2.1.1 som ble analysert ved hjelp av Fraser-metoden var negative for *L. monocytogenes* og andre *Listeria*-arter. Det samme gjelder de filtrerte prøvene. På *Brilliance*-skålene var det noe vekst, men koloniene var ikke turkise og er dermed ikke *Listeria*-arter.

### 3.3 Kvantifisering av *Listeria monocytogenes* i vannprøver fra lokalitet 2

En oversikt over resultatene fra real-time PCR fra vannprøvene tatt i lokalitet 2 er vist i *Tabell 3.3.1*.

**Tabell 3.3.1.** Vannprøver fra lokalitet 2 analysert med real-time PCR. Oversikt over datoer for prøvetakning, beregnet antall bakterier per liter.

Dato	Antall bakterier per liter
17.10.2019	0
17.10.2019	0
06.11.2019	95
06.11.2019	24
06.11.2019	81

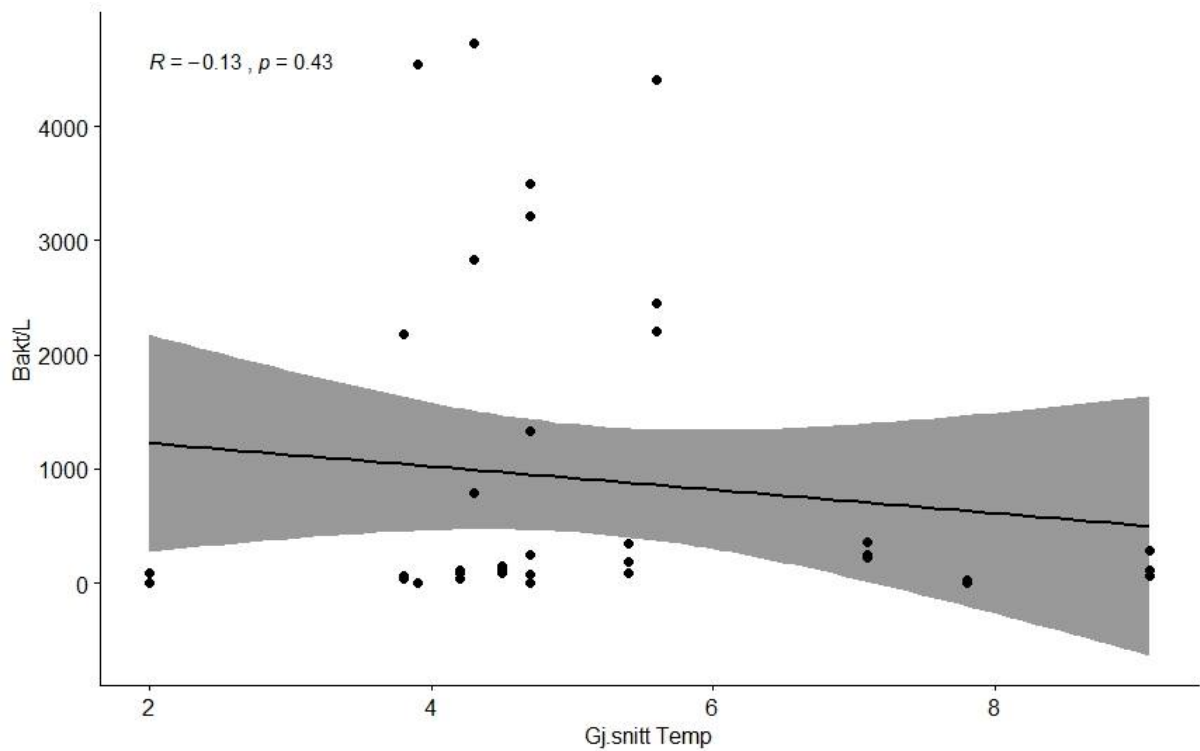
### 3.4 Påvisning av *Listeria monocytogenes* i fiskeprøver fra lokalitet 2

Alle fiskeprøvene som ble tatt av slaktet fisk fra lokalitet 2 som ble analysert ved hjelp av Fraser-metoden var negative for *L. monocytogenes* og andre *Listeria*-arter. Det samme gjelder de røykte fiskeprøvene.

### 3.5 Korrelasjon mellom *Listeria monocytogenes* og værforhold

#### 3.5.1 *Listeria monocytogenes* og gjennomsnittstemperatur

Resultatene fra Pearson korrelasjonstest utført i statistikkprogrammet «R» viser at  $R = -0,13$  og  $p = 0,43$  (Figur 3.5.1.1).

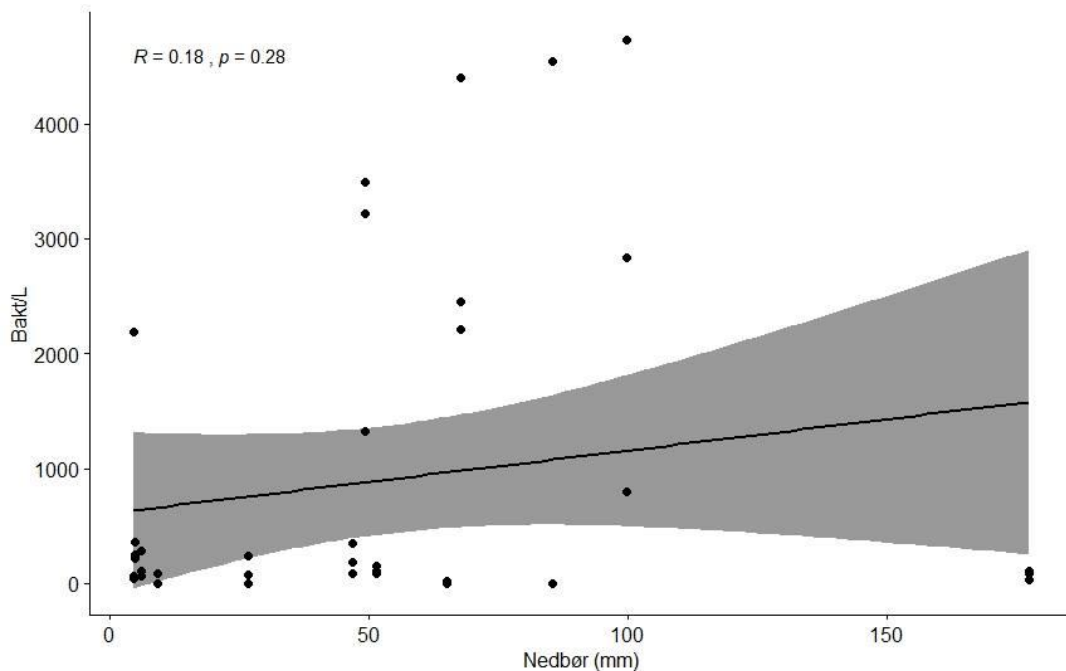


**Figur 3.5.1.1.** Pearsons korrelasjonstest plottet i statistikkprogrammet «R».

Her er antall *L. monocytogenes* per liter plottet mot gjennomsnittstemperaturen de siste syv dagene før prøvetakning. Plottet viser at  $R = -0,13$  og  $p = 0,43$ .

### 3.5.2 *Listeria monocytogenes* og nedbør

Resultatene fra Pearson korrelasjonstest utført i statistikkprogrammet «R» viser at  $R = 0,18$  og  $p = 0,28$  (Figur 3.5.2.1). Figur 3.5.2.2 viser værhistorikk hentet fra <http://www.yr.no/nb> fra målestasjonen nærmest lokaliteten.



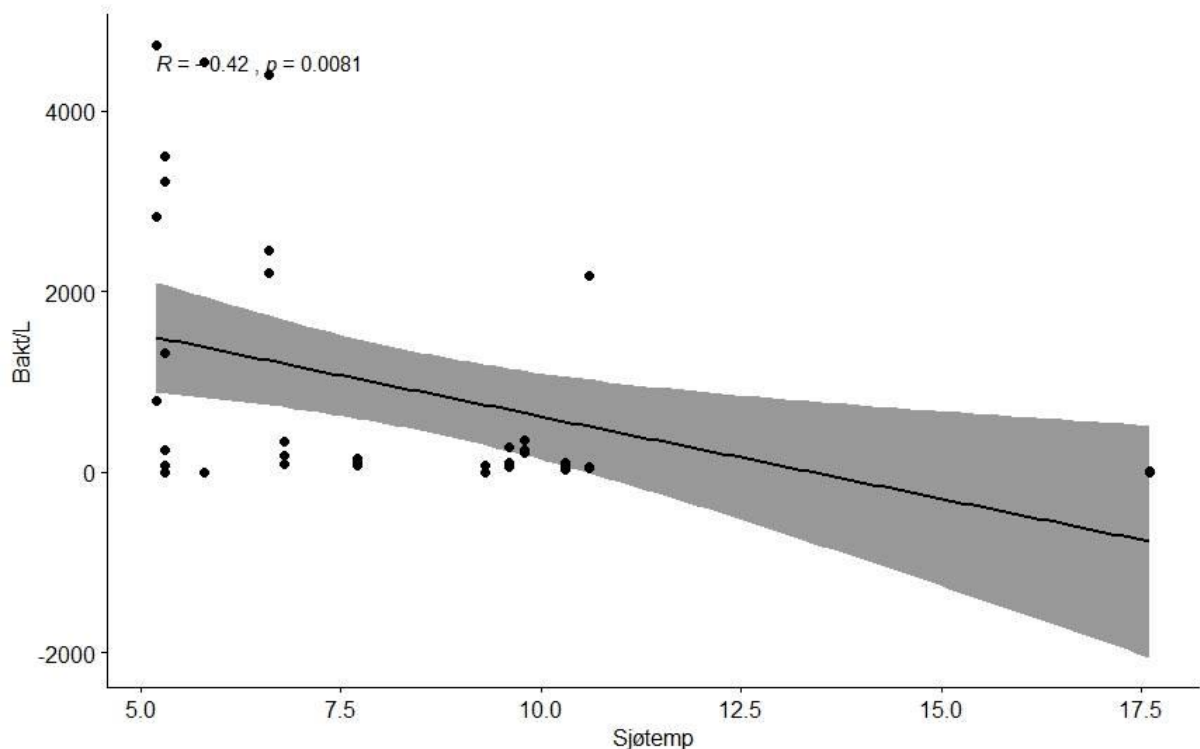
**Figur 3.5.2.1.** Pearsons korrelasjonstest plottet i statistikkprogrammet «R». Her er antall *L. monocytogenes* per liter plottet mot totalnedbør (mm) de siste syv dagene før prøvetakning. Plottet viser at  $R = 0,18$  og  $p = 0,28$ .

Måned	Temperatur gj.snitt	Normal	Avvik	Nedbør totalt mm	Normal mm
<u>September 2019</u>	11,0°	10,5°	0,5°	233,1	157,0
<u>Oktober 2019</u>	6,5°	7,1°	0,6°	121,6	181,0
<u>November 2019</u>	3,2°	3,1°	0,1°	14,0	163,0
<u>Desember 2019</u>	4,0°	0,9°	3,1°	389,7	169,0
<u>Januar 2020</u>	4,5°	-0,2°	4,7°	263,0	144,0
<u>Februar 2020</u>	3,3°	-0,4°	3,7°	281,8	94,0
<u>Mars 2020</u>	4,2°	1,7°	2,5°	199,8	110,0
<u>April 2020</u>	6,9°	5,2°	1,7°	136,2	51,0
<u>Mai 2020</u>	8,9°	10,2°	1,3°	63,3	50,0

**Figur 3.5.2.2.** Utklipp fra yr-historikk (<http://www.yr.no/nb>). Figuren viser en oversikt over værhistorikk målestasjon nærmest lokalitet 1.

### 3.5.3 *Listeria monocytogenes* og sjøtemperatur

Resultatene fra Pearson korrelasjonstest utført i statistikkprogrammet «R» viser at  $R = -0,42$  og  $p = 0,0081$  (Figur 3.5.3.1). Det ble også gjort en korrelasjonstest med log-verdiene av antall *L. monocytogenes* per liter. Her ble resultatene hvor antall bakterier per liter var 0 gjort om til 1 for å gjøre det mulig å utføre testen. Resultatene for den korrelasjonstesten viste at  $R = -0,47$  og  $p = 0,002$ . Det ble også laget et diagram i Excel hvor *L. monocytogenes* (bakterier per liter) ble plottet mot sjøtemperaturen ( $^{\circ}\text{C}$ ).



**Figur 3.5.2.1.** Pearsons korrelasjonstest plottet i statistikkprogrammet «R». Her er antall *L. monocytogenes* per liter plottet mot sjøtemperatur ( $^{\circ}\text{C}$ ) målt uken ved prøvetakning. Plottet viser at  $R = -0,42$  og  $p = 0,0081$ .

## 4. Diskusjon

### 4.1 Metodeevaluering

Flaskene vannprøvene ble tatt med ble senket under vannoverflaten under prøvetaking. Dette ble ikke gjort på en fast dybde, og forekomsten av *L. monocytogenes* kan muligens variere etter hvilken dybde prøven er tatt på, men alle prøvene er tatt av overflatevann på maksimum én meters dybde. Ved hver av prøvetakingene ble det tatt prøver fra tre forskjellige merder. Likevel har alle blitt beregnet som samme prøvepunkt, på grunn av at merdene ligger rett ved siden av hverandre og har samme vanntilførsel og gjennomstrømning mellom nettene. Selv om de er oppdelt i merd 1, 2 og 3 har gjennomsnittresultatene til de tre prøvepunktene blitt brukt i beregning av sesongvariasjon.

For å konsentrere vannprøvene ble prøvene sentrifugert. Ved sentrifugering av vannprøver er det en mulighet for at ikke alt biologisk materiale blir værende i pelleten, og dermed forsvinner med supernatanten. I tillegg var ikke pelleten synlig for øyet. Det er derfor mulig at resultatene er underestimerte og dermed ikke helt kvantitative. Teoretisk sett skal sentrifugeringen av sentrifugebøttene (250 ml) på 15.303 x g i 15 minutter, og sentrifugerørene (40 ml) på 20.388 x g i 10 minutter være tilstrekkelig for å konsentrere prøvene.

Real-time PCR har lavere deteksjonsgrense enn Fraser-metoden. Forootan *et al.* (2017) undersøkte kvantifiseringen i real-time PCR, og fant en nedre kvantifiseringsgrense på tre molekyler per reaksjon under perfekte forhold. Presisjonen for kvantifiseringen blir lavere jo nærmere man kommer deteksjonsgrensen. Under real-time PCR i denne studien er det laveste punktet på i standardkurven 2 bakterier/ $\mu$ l, det vil si 10 bakterier per reaksjon. Dette punktet i standardkurven ble alltid påvist. I tillegg ble den negative kontrollen alltid negativ. Dette er ikke en selvfølge når man gjør 50 sykluser, og viser at resultatene fra real-time PCR er pålitelige.

Resultatene i denne undersøkelsen støtter også opp med at Fraser-metoden har en høyere deteksjonsgrense enn real-time PCR. Selv om 85 % av vannprøvene som ble tatt ved lokalitet 1 var positive, var ingen av prøvene analysert med Fraser-metoden positive. I tillegg detekteres både levende og døde bakterier i real-time PCR, mens i Fraser-metoden er det kun mulig å påvise levende bakterier. *L. monocytogenes* har også lav overlevelsessevne i sjøvann (desimeres med 6 log i løpet av 3 uker ved 20 °C), slik at mange av bakteriene kan ha dødd under transport med lite næring til stede i vannet. Dette kan også være en av årsakene til at det ikke er noen positive utslag på prøvene analysert med Fraser-metoden. I studien utført av Zaremba (2018)

ble deteksjonsgrensen for to stammer av *L. monocytogenes* isolert fra lakseslakteri, S12 og MB5, bestemt. Deteksjonsgrensen i autoklavert Milli-Q var 10-1000 cfu/l og i autoklavert, filtrert sjøvann var den 2-20 cfu/l. Begge disse testene ble utført på autoklavert vann, og *L. monocytogenes* har dermed ikke konkurranse fra andre bakterier. Andre bakterier kan utkonkurrere *L. monocytogenes* (Heir & Langsrud, 2014) og dermed påvirke deteksjonsgrensen i sjøvann. I denne studien ble det observert vekst av lyse kolonier på Brilliance *Listeria* Agar skålene. Brilliance *Listeria* Agar skålene skal i utgangspunktet være selektive for *Listeria*-arter, det vil si at andre bakterier ikke skal vokse, eller vokser svært dårlig, på skålene. Samtidig er skålene kromatiske og kolonier av *Listeria*-arter skal få en turkis farge. Ingen av koloniene var turkise, og prøvene er derfor negative for *L. monocytogenes*.

Det ble undersøkt om filtrering av vannprøvene forbedret påvisningsevnen av *L. monocytogenes* i vannprøvene. Dette er en metode som har vist seg å ha gode resultater i tidligere studier (Besse et al., 2004; Eri, 2016; Zaremba, 2018). I denne studien hadde ikke filtrering av prøvene noen effekt og ga det samme resultat som de sentrifugerte prøvene.

## 4.2 Kvantifisering og påvisning av *L. monocytogenes*

Resultatene fra real-time PCR viser at 33/39 (85 %) av vannprøvene tatt ved **lokalitet 1** var positive (Tabell 3.1.2). Ved hver prøvetakingsdato var minst 1 av 3 prøver som var positive. Dette viser at det er en kontinuerlig tilstedeværelse av *L. monocytogenes* i sjøvannet i oppdrettsanlegget i den perioden prøvene ble tatt. Estimeringen av antall bakterier per liter viser at mengden *L. monocytogenes* i vannet ligger på et lavt nivå (<4 Log/l). I Figur 3.1.1 observeres en økning i konsentrasjonen i prøvene tatt mellom 22.01.2020-20.03.2020. Disse prøvene ligger > 1000 bakterier per liter. Dette viser at det i denne studien er en sesongvariasjon. Resultatene fra prøvene analysert med Fraser-metoden var alle negative. Prøveresultatene støtter opp de lave resultatene fra real-time PCR.

Mulige kontamineringskilder til *L. monocytogenes* i oppdrettsanleggene, er det ikke gjort noen direkte undersøkelser på i denne studien. Tidligere studier viser at det kan komme fra avrenningsvann fra bekker og elver, fôr, dødfisk, dødfiskutstyr og sedimenter fra havbunnen. Denne lokaliteten var lokalisert i et fjordsystem hvor vann fra snøsmelting fra fjellet renner via fosser ut i sjøvannet, i tillegg til bekker. Dette avrenningsvannet kan ta med seg *L. monocytogenes* fra jord og vegetasjon. Siden dette vannet har lav temperatur, er det stor sannsynlighet for at *L. monocytogenes* overlever over lengre tid. Samtidig består fosser og



bekker av ferskvann, og ikke sjøvann, noe som igjen gjør at *L. monocytogenes* har lavere overlevelsessevne (Hansen et al., 2006), men det tar ikke lang tid før vannet kommer ut i sjøen. Studien utført av Haldorsen (2019) viste at fisk kan bli kontaminert av *L. monocytogenes* i oppdrettsanlegg, men også at dødfisk i oppdrettsanlegget akkumulerer bakterien og kan bidra til å kontaminere levende fisk. Bakterien ble kun påvist hos 5 % av levende fisk i merden, mens hos dødfisk ble det påvist hos 45 %. Forekomsten av *L. monocytogenes* i vannet var lav, men det ble påvist *L. monocytogenes* i 18 % av fôrprøvene. Derfor ble fôrrester sett på som en potensiell kontamineringskilde for *L. monocytogenes* (Haldorsen, 2019). Fôr i seg selv er i utgangspunktet fritt for *L. monocytogenes*, så i dette tilfellet må fôret ha blitt rekontaminert etter det har ankommet oppdrettsanlegget. Dette kan for eksempel ha skjedd i siloene eller ved kontakt med sjøsprøyt eller fugler. For at dette skal skje må det ha vært brudd på rutiner og regler. For å minske smittefaren fra dødfisk og dødfisk-utstyr er det viktig at dødfisk fjernes fra merden så snart som mulig for å unngå å smitte levende fisker og spre *L. monocytogenes* i sjøvannet. I tillegg må dødfisk-utstyr rengjøres og desinfiseres nøye mellom hver gang det brukes. Når det kommer til fôret i siloene, er det viktig at siloene også blir rengjort med jevne mellomrom, i tilfellet fôret har vært utsatt for rekontaminering.

Under hele prøvetakningsperioden i denne studien ble det påvist *L. monocytogenes* i oppdrettsanlegget, med en sesongvariasjon. Siden det alltid var *L. monocytogenes* til stede i oppdrettsanlegget er det stor sannsynlighet for at *L. monocytogenes* følger laksen inn i slakteriet. Sesongvariasjonene kan ha blitt påvirket av forskjellige faktorer. Tidligere studier viser at det er lav forekomst av *L. monocytogenes* på rund laks (Heir & Langsrud, 2013; Miettinen & Wirtanen, 2006), men likevel kan *L. monocytogenes* følge fisken inn til slakterier med brønnbåter som vektor. Brønnbåtene tar opp vann fra oppdrettsanlegget når de transporterer fisken til slakteriet, og siden det er en kontinuerlig tilstedeværelse av *L. monocytogenes* i vannet er det stor sannsynlighet for at disse bakteriene overføres til slakteriet. Det er omstridt om *L. monocytogenes* fra oppdrettsanlegg har noen sammenheng med *L. monocytogenes* i produkt. En studie utført av Miettinen og Wirtanen (2006) kan indikere at det har en sammenheng, siden de samme pulstypene ble funnet i råfisk, prosesseringslokalene og produkt, men en annen studie utført av Hansen, Vogel og Gram (2006) kan tyde på at det ikke har noen sammenheng, siden de dominerende subtypene av *L. monocytogenes* i prosessanleggene kun ble funnet sporadisk i miljøet utenfor prosessanlegget. Det ser ut som at brønnbåter er en viktig vektor, og de tar med seg *L. monocytogenes* inn i slakteriene. Dette viser studien utført av Seroylas (2019), hvor det ble anslått at 20 % av brønnbåtene som leverte laks

til ett spesifikt slakteri stod for 80 % av kontamineringen i dette slakteriet. I samme studien utført av Haldorsen (2019) viste det seg at 0,14 % av prøvene tatt av en ren brønnbåt var positive for *L. monocytogenes*, men 18 % av prøvene tatt etter at fisken var kommet om bord og båten lå til kai ved slakteriet var positive. Dette kan vise at fisken og/eller sjøvann fra merden har tatt med seg *L. monocytogenes* til brønnbåten. I utgangspunktet skulle det ikke ha blitt påvist *L. monocytogenes* i en ren brønnbåt, selv om det ikke var mange positive prøver i studien av Haldorsen (2019). Dette tyder på at hygienen og rengjøringen av brønnbåtene ikke er utført grundig nok, og øker i seg selv faren for spredningen av *L. monocytogenes* inn til slakteriet. En mulighet for å minske kontamineringsrisikoen er bruk av slaktebåter, som for eksempel «Norwegian Gannet», i stedet for brønnbåter og slakterier. Slik unngås bruk av brønnbåter, og fisken blir slaktet om bord i båten. Fisken transporteres samtidig som den blir slaktet, noe som gjør at tidsbesparelsen øker og fisken vil være ferskere når den når markedet. Ved å redusere antall steg og tid vil også holdbarheten forlenges, og det er lettere å få kontroll over kontaminering og kontamineringskilder ved færre steg.

Det kan spekuleres i om det er en sammenheng mellom tilstedeværelsen av *L. monocytogenes* i oppdrettsanlegg og slakterier. Det er umulig å unngå at *L. monocytogenes* blir med videre til slakteriet når det kontinuerlig er til stede i oppdrettsanlegget, derfor er det viktig at oppdrettsnæringen er klar over denne smitterisikoen. *L. monocytogenes* blir kontinuerlig introdusert inn i slakteriene, i større grad ved økt tilstedeværelse i oppdrettsanleggene. Siden det er forskjellige økosystemer i oppdrettsanlegget og slakteriet, er det noen genotyper som egner seg bedre til å etablere seg i slakteriene. *L. monocytogenes* akkumulerer i nisjer og danner biofilmer på steder det er vanskelig å komme til, for eksempel i sløyemaskiner og mellom fliser. Derfor kan det være vanskelig å fjerne kontamineringen selv ved godt renhold. Det er mulig å ta en hel genom sekvensering av isolatene fra oppdrettsanleggene, brønnbåtene, slakteriene og produkt for å undersøke nærmere hvilke genotyper som finnes i de forskjellige miljøene.

Ved **lokalitet 2** ble det kun tatt fem vannprøver; to med fisk i merden og tre etter fisken var fjernet. Disse prøvene er ikke nok til å si noe om nivået av *L. monocytogenes* i vannet. I tillegg ble det tatt to parallelle prøver av sløyd laks dag 4, 10, 14, 18 og 21 etter slakt. Alle disse ble testet med Fraser-metoden og alle prøvene var negative for *L. monocytogenes*. Disse resultatene forteller lite om mattryggheten med hensyn til andre bakterier, men viser at laksen ikke er kontaminert med *L. monocytogenes*. Ved denne lokaliteten ble det tatt to vannprøver ved første prøvetaking (17.10.2019) som var før fisken ble hentet og slaktet om bord «Norwegian

Gannet». Prøvene ble analysert med real-time PCR og viste begge 0 bakterier per liter (Tabell 3.3.1).

Det ble også tatt 13 prøver av kaldrøykt laks. Av disse var syv av prøvene nedkjølt på is, og seks superkjølt. Disse prøvene ble testet med Fraser-metoden, alle var negative for *L. monocytogenes*. Dette viser at laksen ikke var kontaminert, og at den ikke har blitt rekontaminert med *L. monocytogenes* etter den ble kaldrøykt. Siden alle prøvene var negative, er det ikke mulig å si hvilken metode for nedkjøling som er best med hensyn til *Listeria*-kontaminering.

### **4.3 Korrelasjon mellom *Listeria monocytogenes* og værforhold**

Denne studien baserer seg kun på én sesong og én lokalitet. Klima- og miljøfaktorer, som vær og vind varierer fra år til år, og fra sted til sted. Derfor er ikke resultatene fra denne studien universelt overførbare i tid og sted.

#### **4.3.1 *Listeria monocytogenes* og temperatur**

Resultatene fra Pearson korrelasjonstest viser at det ikke er korrelasjon mellom antall *L. monocytogenes* per liter og gjennomsnittstemperaturen de siste syv dagene før prøvetaking. Temperatur er ofte autokorrelert med nedbør. Ved mye nedbør er det ofte mildt vær, og omvendt. Viser til diskusjon om *L. monocytogenes* og nedbør (4.3.2) på grunn av samspill mellom temperatur og nedbør.

#### **4.3.2 *Listeria monocytogenes* og nedbør**

Resultatene fra Pearson korrelasjonstest viser at det er liten korrelasjon mellom antall *L. monocytogenes* per liter og totalnedbør de siste syv dagene før prøvetaking. Siden  $p > 0,05$  er den for høy til at korrelasjonen er statistisk signifikant. Denne studien viser derfor at det ikke er noen korrelasjon mellom de to faktorene. Tidligere studier har vist at det er en sammenheng mellom forekomst av *L. monocytogenes* og nedbør, og at mengden *L. monocytogenes* i oppdrettsanleggene har økt etter en periode med kraftig nedbør (Miettinen & Wirtanen, 2006). I denne studien ble totalnedbøren fra de siste syv dagene før prøvetaking brukt til å gjøre beregninger av korrelasjon. Her er det usikkert om syv dager er tilstrekkelig, eller om perioden skulle ha vært utvidet. I Figur 3.1.1 observeres en økning av mengde *L. monocytogenes* i vannet etter perioden med mest nedbør. Selv om det ikke er noen korrelasjon mellom *L. monocytogenes* (bakterier per liter) og totalnedbør (mm siste 7 d før prøvetaking) i denne studien, ser det ut som at kraftig nedbør kan gi en økning i forekomsten av *L. monocytogenes* i sjøvannet i ettertid. Hvis perioden for beregning av totalnedbør hadde

vært lengre kunne resultatene sett annenledes ut, men i denne studien ble det valgt å bruke syv dager.

Her kan det også være andre faktorer som spiller inn, i tillegg til nedbør. Det kan spekuleres i om at det er en økning av *L. monocytogenes* i vannet ved økt nedbør, men at det i tillegg må være lav nok temperatur i sjøvannet til at bakterien overlever. Ved kraftig nedbør vil ferskvannet komme i elver og bekker ned til sjøen og legge seg i et lag oppå sjøvannet. Sjøvann har en høyere tetthet enn ferskvann på grunn av høyere saltkonsentrasjon. I et slikt fjordmiljø vil det være mye ferskvann, og tidevannet vil komme nedenfra. Strømmen vil fortsatt kun gå én vei selv om vannet stiger og synker på grunn av tidevannet. Denne lokaliteten ligger i en forsmalning av fjorden hvor det er mye gjennomstrømming. Derfor er dette punktet et godt prøvepunkt som kan representere fjordsystemet. Fjordsystemet vil bestå av mye ferskvann, og *L. monocytogenes* har ikke høy overlevelsessevne i ferskvann sammenlignet med saltvann (Hansen et al., 2006). En del av forsøkets tanke var at mengden *L. monocytogenes* i vannet kom til å øke i mars/april da møkkingen startet, husdyrene går ute og folk drar på hyttene, men resultatene viser at forekomsten ikke blir påvirket av dette i denne studien. Prøvene viser generelt sett en god vannkvalitet. Mengden *Escherichia coli* i de samme vannprøvene ble også kvantifisert, og her var kun 3/39 prøver positive hvor den høyeste prøven var på 41 bakterier per liter (Bårdsen, 2020). Oppdrettsanlegget har en god gjennomstrømming av sjøvann, og selv om det er lokalisert i et fjordmiljø viste prøvene at de ikke hadde noen store problemer med avrenning fra landbruk. Dette kan variere fra år til år, for eksempel med nedbør og temperatur. I denne studien er det undersøkt for kun én lokalitet.

I *Figur 3.5.2.2* observeres at desember til mars/april har vært noen regntunge måneder sammenlignet med det som er normalt. Det har vært en nedbørsmengde på over 1000 mm i denne perioden. Samtidig kan man se at mengden *L. monocytogenes* i vannet øker mellom januar og mars. Dette kan ha en sammenheng, men i denne studien er det ikke gjort systematiske uttak i forhold til værforhold, og det ble ikke funnet noen signifikans i denne studien.

### **4.3.3 *Listeria monocytogenes* og sjøtemperatur**

Resultatene fra Pearson korrelasjonstest utført i statistikkprogrammet «R» viser at  $R = -0,42$  og  $p = 0,0081$  (*Figur 3.5.3.1*). Dette viser at det kan være en moderat, negativ korrelasjon mellom antall *L. monocytogenes* per liter og sjøtemperaturen den uken prøven ble tatt. Siden  $p < 0,05$  er korrelasjonen statistisk signifikant, og man kan med 95 % sikkerhet si at korrelasjonen mellom *L. monocytogenes*-nivået i vannet og sjøtemperaturen er forskjellig fra 0.

Korrelasjonstesten viser at mengden *L. monocytogenes* i vannet vil minske med økende sjøtemperatur. I undersøkelsen utført av Hansen, Vogel og Gram (2006) fant de ut at *L. monocytogenes* hadde høyere overlevelsessevne i naturlig sjøvann ved 5 °C enn ved 20 °C. Dette stemmer overens med resultatene i denne studien. *Figur 3.5.2.1* viser at prøvene tatt ved sjøvannstemperaturer mellom 5,2-6,6 °C har et høyere nivå *L. monocytogenes* enn prøvene tatt ved høyere sjøvannstemperaturer.

I denne studien er det ikke utført mange målinger ved høyere sjøtemperaturer. De fleste av prøvene er tatt ved lavere temperaturer, men korrelasjonstesten viser tydelig at det er en korrelasjon mellom sjøtemperatur og mengden *L. monocytogenes* i vannet. Her skulle det ha blitt gjort videre studier hvor man får med flere prøver fra høyere sjøvannstemperaturer. I tillegg hadde det vært interessant å finne ut i hvilket temperaturintervall det er størst forekomst av *L. monocytogenes* i vannet. Denne studien viser at det er høyest forekomst ved 5,2-6,6 °C, men her skulle det ha blitt gjort flere målinger på lavere og høyere temperaturer for å samle mer informasjon. Det ser ut som at sjøtemperaturen er en viktig faktor når det kommer til sesongvariasjonen i denne studien. Siden tradisjonelle oppdrettsanlegg er åpne merder i sjøen, er det ikke mulig å regulere sjøtemperaturen. De siste årene har det blitt utviklet alternativer til tradisjonelle oppdrettsanlegg som; landbaserte-, havbaserte- og lukkede-oppdrettsanlegg. Her, spesielt i landbaserte- og lukkede-oppdrettsanlegg, hadde det vært interessant å studere mikrobiologien i vannet under mer kontrollerte forhold.

I tillegg til høyere overlevelsessevne ved lave temperaturer, kan forekomsten av *L. monocytogenes* også bli påvirket av totalantallet bakterier (kimtall) i vannet. Hvis det er en høy mengde av andre bakterier i vannet, kan disse konkurrere med *L. monocytogenes* om næringsstoffene i vannet, og *L. monocytogenes* kan da tape denne konkurransen. Det kan derfor være en lavere mengde *L. monocytogenes* i vannet når kimtallet er høyere. Dette kan vise hvorfor det vokste andre bakterier på Brilliance *Listeria* Agar platene selv om ikke *L. monocytogenes* ble påvist.

Det ble også tatt en Pearsons korrelasjonstest i statistikkprogrammet «R» med log (bakterier per l) og sjøtemperaturen. Her ble 0-verdiene endret til 1 for å gjøre det mulig å ta log av verdiene. Denne testen viste at  $R=-0,47$  og  $p=0,002$ . Her er p-verdien enda lavere, noe som støtter opp at resultatene er statistisk signifikante.

## 5. Konklusjon

I denne studien ble mengden *L. monocytogenes* i et oppdrettsanlegg målt fra oktober 2019 til mai 2020. Oppdrettsanlegget (lokalitet 1) var lokalisert i et fjordmiljø, i en forsmalning av fjorden med god gjennomstrømning av sjøvann. Dette er et punkt som kan representere hele fjordmiljøet. Prøvene viste at det var en god vannkvalitet i oppdrettsanlegget. Ved hver prøvetakning var det prøver som var positive for *L. monocytogenes*. Derfor konkluderes det med at det var en kontinuerlig tilstedeværelse av *L. monocytogenes* i oppdrettsanlegget. Prøvene var generelt sett på et lavt nivå, med en økning mellom januar og mars. Det var derfor sesongvariasjon i denne perioden. Det ble også undersøkt om tilstedeværelsen av *L. monocytogenes* i vannet hadde en samspillseffekt med klima. Mengden *L. monocytogenes* i oppdrettsanlegget hadde ingen signifikant korrelasjon med lufttemperatur eller nedbør i denne studien, og derfor ble det ikke funnet noen sammenheng mellom faktorene i denne studien. Det ble funnet en moderat korrelasjon mellom mengden *L. monocytogenes* i vannet og sjøtemperatur, hvor forekomsten av *L. monocytogenes* var høyere ved lavere sjøtemperatur. Det konkluderes med at det var sammenheng mellom forekomsten av *L. monocytogenes* i oppdrettsanlegget og sjøtemperatur. Resultatene indikerer at sjøvann fra matfiskanlegg er en større kilde enn tidligere antatt til *L. monocytogenes* kontaminering via brønnbåt og inn i slakteri, og at hypotesene om persistente stammer i slakteri kanskje må revurderes.

## 6. Referanser

- Allard, M. W., Strain, E., Rand, H., Melka, D., Correll, W. A., Hintz, L., ... Brown, E. W. (2019). Whole genome sequencing uses for foodborne contamination and compliance: Discovery of an emerging contamination event in an ice cream facility using whole genome sequencing. *Infection, Genetics and Evolution*, 73, 214-220.  
<https://doi.org/10.1016/j.meegid.2019.04.026>
- Arnesen, C. E. (2018). Hav Line metoden - Et nytt konsept innen havbruk. *Enovakonferansen*: Enova. Hentet fra [https://www.enova.no/download?objectpath=/upload\\_images/54cf71aaa5f9430bb774ddfabc58dcd2.pdf](https://www.enova.no/download?objectpath=/upload_images/54cf71aaa5f9430bb774ddfabc58dcd2.pdf)
- Arya, M., Shergill, I. S., Williamson, M., Gommersall, L., Arya, N. & Patel, H. R. (2005). Basic principles of real-time quantitative PCR. *Expert Rev Mol Diagn*, 5, 209-219.
- Balamurugan, J., Leen, B., Wiedmann, M. & Orsi, R. H. (2019). Comparative Analysis of Tools and Approaches for Source Tracking *Listeria monocytogenes* in a Food Facility Using Whole-Genome Sequence Data. *Frontiers in Microbiology*, 10.  
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00947>
- Bank, W. (2013). *World Bank: FISH TO 2030 prospects for fisheries and aquaculture* (World Bank 83177-GLB).
- Ben Embarek, P. K. (1994). Presence, detection and growth of *Listeria monocytogenes* in seafoods - a review. *International Journal of Food Microbiology*, 23, 17-34.
- Berge, A. (2018). Dåpsfest på Bryggen for "Norwegian Gannet". Hentet fra <https://ilaks.no/dapsfest-pa-bryggen-for-norwegian-gannet/>
- Besse, N. G., Audinet, N., Beaufort, A., Colin, P., Cornu, M. & Lombard, B. (2004). A contribution to the improvement of *Listeria monocytogenes* enumeration in cold-smoked salmon. *International Journal of Food Microbiology*, 91, 119-127.
- Biocompare. (2017). qPCR Checklist: Steps to Better Results. Hentet 25.03.2020 fra <https://www.biocompare.com/Bench-Tips/343854-qPCR-Checklist-Steps-to-Better-Results/>
- Bredholdt, S. & Eie, T. (2002). *Listeria i sjømat* (8754). MATFORSK - Norsk institutt for næringsmiddelforskning.
- Brown, S. R. B., Forauer, E. C. & D'Amico, D. J. (2018). Effect of modified atmosphere packaging on the growth of spoilage microorganisms and *Listeria monocytogenes* on fresh cheese. *Journal of Dairy Science*, 101, 7768-7779.
- Buchanan, R., Gorris, L., Hayman, M., Jackson, T. & Whiting, R. (2017). A Review of *Listeria monocytogenes*: An Update on Outbreaks, Virulence, Dose-response, Ecology, and Risk Assessments. *Food Control*, 75, 1-13.
- Bårdsen, F. (2020). *E. coli i sjøvann på oppdrettslokalteter for laks: indikator for fekal forurensing og vannkvalitet* Universitetet i Stavanger.
- Cleveland, J., Montville, T. J., Nes, I. F. & Chikindas, M. L. (2001). Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. *International Journal of Food Microbiology*, 71, 1-20.
- Cossart, P. (2011). Illuminating the landscape of host-pathogen interactions with the bacterium *Listeria monocytogenes*. *PNAS*, 108, 19484-19491.  
<https://doi.org/https://doi.org/10.1073/pnas.1112371108>
- Digre, H., Bar, E. M. S., Mathiassen, J. R., Standal, D., Grimsmo, L., Henriksen, K., ... Asche, F. (2014). *Lønnsom foredling av sjømat i Norge*. regjeringen.no. Hentet fra [https://www.regjeringen.no/contentassets/00b7a7a3ebc141fdb9d62fbd2ca9ea6/rapport\\_sintef\\_nou.pdf](https://www.regjeringen.no/contentassets/00b7a7a3ebc141fdb9d62fbd2ca9ea6/rapport_sintef_nou.pdf)

- Dordevic, V., Trbovic, D., Lakicevic, B., Nastasijevic, I., Jankovic, V., Baltic, T. & Dimitrijevic, M. (2016). Microbiological safety and quality of salmon: health benefits and risk. *meat technology*, 57.
- Doyle, M. E., Mazzotta, A. S., Wang, T., Wiseman, D. W. & Scott, V. N. (2001). Heat Resistance of *Listeria monocytogenes*. *Journal of Food Protection*, 64, 410-429. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-64.3.410>
- EFSA. (2018). Outcome of EC/EFSA questionnaire (2016) on use of Whole Genome Sequencing (WGS) for food- and waterborne pathogens isolated from animals, food, feed and related environmental samples in EU/EFTA countries, EFSA supporting publication, 49.
- EFSA & ECDC. (2018a). The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and foodborne outbreaks in 2017. *EFSA Journal*, 262.
- EFSA & ECDC. (2018b). Multi-country outbreak of *Listeria monocytogenes* sequence type 8 infections linked to consumption of salmon products.
- Eklund, M. W., Poysky, F. T., Paranjpye, R. N., Lashbrook, L. C., Peterson, M. E. & Pelroy, G. A. (1995). Incidence and Sources of *Listeria Monocytogenes* in Cold-Smoked Fishery Products and Processing Plants. *Journal of Food Protection*, 58, 502-508.
- Eri, I. B. (2016). *Deteksjon av Listeria monocytogenes i norske lakseslakterier; risikofaktorer for kontaminering under prosessering* Universitetet i Bergen.
- Fagerlund, A., Langsrud, S., Schirmer, B. C. T., Moeretoe, T., Heir, E. & Boneca, I. G. (2016). Genome Analysis of *Listeria monocytogenes* Sequence Type 8 Strains Persisting in Salmon and Poultry Processing Environments and Comparison with Related Strains. *PLoS ONE*, 11(3). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0151117>
- FAO. (2016). The State of World Fisheries and Aquaculture 2016. Contributing to food security and nutrition for all.
- Faucher, S. P. & Charette, S. J. (2015). *Bacterial pathogens in the non-clinical environment* Frontieres Media.
- Ferreira, V., Wiedmann, M., Teixeira, P. & Stasiewicz, M. J. (2014). *Listeria monocytogenes* Persistence in Food-Associated Environments: Epidemiology, Strain Characteristics, and Implications for Public Health. *Journal of Food Protection*, 77, 150-170. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-13-150>
- Forootan, A., Sjoback, R., Bjorkman, J., Sjogreen, B., Linz, L. & Kubista, M. (2017). Methods to determine limit of detection and limit of quantification in quantitative real-time PCR (qPCR). *Biomolecular Detection and Quantification*, 12, 1-6.
- Goetz, G. (2013). String of smoked salmon products recalled for *Listeria* potential. Hentet fra <https://www.foodsafetynews.com/2013/01/another-smoked-salmon-recall-for-potential-Listeria-contamination/>
- Gram, L. (2001). Potential hazards in cold-smoked fish: *Listeria monocytogenes*. *Journal of Food Science*, 66, 1072-1081.
- Gray, M. L. & Killinger, A. H. (1966). *Listeria monocytogenes* and listeric infections. *Bacteriological Reviews*, 30(2), 309-382.
- Haldorsen, R. N. (2019). *Kartlegging av forekomst av Listeria monocytogenes i sjø* (901492). FHF. Hentet fra <https://www.fhf.no/prosjekter/prosjektbasen/901492/?fileurl=https://fhfno.sharepoint.com/sites/pdb/Publisertedokumenter/301078190603%20FHF%20rapport%20Listeria%20i%20sj%C3%B8%20FINAL.PDF&filename=Sluttrapport:%20Kartlegging%20av%20forekomst%20av%20Listeria%20monocytogenes%20i%20sj%C3%B8>
- Hansen, C. H., Vogel, B. F. & Gram, L. (2006). Prevalence and Survival of *Listeria monocytogenes* in Danish Aquatic and Fish-Processing Environments. *Journal of Food Protection*, 69, 2113-2122.





- Orsi, R. H. & Wiedmann, M. (2016). Characteristics and distribution of *Listeria* spp., including *Listeria* species newly described since 2009. *Applied microbiology and biotechnology*, 100, 5273-5287. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7552-2>
- Rode, T. M. & Hovda, M. B. (2012). *Høytrykksprosessering av sjømat*. Nofima. Hentet fra [https://nofimaas.sharepoint.com/sites/public/\\_layouts/15/guestaccess.aspx?guestaccess\\_token=U%2FtsnZ4YDI8N0i9Q1UuIQEga2m%2BH7zlgq7w4gFgV0L4%3D&docid=0772f68a165754c55b23129d5cf3317b3](https://nofimaas.sharepoint.com/sites/public/_layouts/15/guestaccess.aspx?guestaccess_token=U%2FtsnZ4YDI8N0i9Q1UuIQEga2m%2BH7zlgq7w4gFgV0L4%3D&docid=0772f68a165754c55b23129d5cf3317b3)
- Rosnes, J. T., Skåra, T. & Skipnes, D. (2011). Recent Advances in Minimal Heat Processing of Fish: Effects on Microbiological Activity and Safety. *Food Bioprocess Technol*, 4, 833-848. <https://doi.org/10.1007/s11947-011-0517-7>
- Rotariu, O., Thomas, D. J. I., Goodburn, K. E., Hutchison, M. L. & Strachan, N. J. C. (2014). Smoked salmon industry practices and their association with *Listeria monocytogenes*. *Food Control*, 35, 284-292.
- Rørvik, L. M. (2000). *Listeria monocytogenes* in the smoked salmon industry. *International Journal of Food Microbiology*, 62, 183-190.
- Rørvik, L. M., Caugant, D. A. & Yndestad, M. (1995). Contamination pattern of *Listeria monocytogenes* and other *Listeria* spp. in a salmon slaughterhouse and smoked salmon processing plant. *International Journal of Food Microbiology*, 25, 19-27.
- Rørvik, L. M., Skjerve, E., Knudsen, B. R. & Yndestad, M. (1997). Risk factors for contamination of smoked salmon with *Listeria monocytogenes* during processing. *International Journal of Food Microbiology*, 37, 215-219.
- Scallan, E., Hoekstra, R. M., Angulo, F. J., Tauxe, R. V., Widdowson, M. A., Roy, S. L., ... Griffin, P. M. (2011). Foodborne illness acquired in the United States—major pathogens. *Emerg Infect Diseases*, 17, 7-15. <https://doi.org/10.3201/eid1701.P11101>.
- Scheffe, J. H., Lehmann, K. E., Buschmann, I. R., Unger, T. & Funke-Kaiser, H. (2006). Quantitative real-time RT-PCR data analysis: current concepts and the novel "gene expression's CT difference" formula. *J Mol Med (Berl)*, 84, 901-910.
- Schlech, W. F. (2000). Foodborne listeriosis. *Clinical Infectious Diseases*, 31, 770-775.
- Seroylas, D. (2019). *Detection of sources of Listeria monocytogenes contamination in helix tank in a salmon processing plant in Norway using lean six sigma*, NTNU.
- Sivertsvik, M., Jeksrud, W. K. & Rosnes, J. T. (2002). A review of modified atmosphere packaging of fish and fishery products – significance of microbial growth, activities and safety. *International Journal of Food Science and Technology*, 37, 107-127.
- SMI, PHE & NHS. (2016). Identification of *Listeria* species, and other Non-Sporing Gram Positive Rods (except *Corynebacterium*). *UK Standards for Microbiology Investigations*, (3.2).
- Solheim, S. & Roang, C. (2015). Solberg: -Laksen er Norges Ikea. Hentet fra <https://www.nrk.no/norge/solberg--laksen-er-norges-ikea-1.12274859>
- Stephansen, S. & Midtbø, T. (2017). Mer gods fra vei til sjø og bane. I *Statsbudsjettet 2018*. regjeringen.no. Hentet fra <https://www.regjeringen.no/no/aktuelt/mer-gods-fra-vei-til-sjo-og-bane/id2575336/>
- Sørli, D., Aandahl, P. T. & Pettersen, I. K. (2020). Sjømateksport for 107,3 milliarder kroner i 2019. Hentet fra <https://seafood.no/aktuelt/nyheter/sjomateksport-for-1073-milliarder-kroner-i-2019/>
- VKM, Skjerdal, T., Eckner, K., Kapperud, G., Lassen, J., Grahek-Ogden, D., ... Wasteson, Y. (2018). *Listeria monocytogenes* - vurdering av helseråd til gravide og andre utsatte grupper. *Uttalelse fra Faggruppe for hygiene og smittestoffer i Vitenskapkomiteen for mat og miljø* (13). Hentet fra <https://vkm.no/download/18.4c35160163e59b88af4eb5b/1529408385432/Listeria%20>

[monocytogenes%20-%20vurdering%20av%20hels%C3%A5d%20til%20gravide%20og%20andre%20utatte%20grupper.pdf](#)

Zaremba, S. (2018). *Listeria monocytogenes* in Norwegian fish farms from September to January UiS.

## 7. Vedlegg

### A. Kjemikalier og medier

Oppskrifter på medier og informasjon om kjemikalier, kit, materialer og utstyr brukt til å utføre analysene i oppgaven.

**Tabell A-1.** Oversikt over medier og kjemikalier

<b>1. 0,5 M EDTA, pH 8,0</b>
Na <sub>2</sub> EDTAxH <sub>2</sub> O 186,12 g/l (CAS 6381-92-6, <i>Sigma</i> )
NaOH – pH justert til 8,0
<b>2. 1 M Tris-HCl, pH 8,0</b>
Tris base 121,1 g/l (CAS 77-86-1, <i>Sigma</i> )
konsentrert HCl – pH justert til 8,0
<b>3. TE-buffer</b>
1 M Tris-HCl, pH 8,0 (punkt 2 i <i>Tabell A-1</i> ) 10 ml/l → 10 mM
0,5 M EDTA, pH 8,0 (punkt 1 i <i>Tabell A-1</i> ) 2 ml/l → 1 mM
<b>4. Half Fraser</b>
Fraser <i>Listeria</i> Selective Enrichment Broth (base) 55 g/l (katalog nr. 110398, <i>Merck</i> )
FRASER <i>Listeria</i> Ammonium iron (III) citrate 2 ampuller/l (CAS 1185-57-5, <i>Sigma-Aldrich</i> )
Fraser <i>Listeria</i> Selective supplement 2 ampuller/l (katalog nr. 100093, <i>Sigma-Aldrich</i> )
<b>5. Full Fraser</b>
Fraser <i>Listeria</i> Selective Enrichment Broth (base) 55 g/l (katalog nr. 110398, <i>Merck</i> )
FRASER <i>Listeria</i> Ammonium iron (III) citrate 2 ampuller/l (CAS 1185-57-5, <i>Sigma-Aldrich</i> )
Fraser <i>Listeria</i> Selective supplement 4 ampuller/l (katalog nr. 100093, <i>Sigma-Aldrich</i> )

**Tabell A-2.** Oversikt over kit og kjemikalier

<b>1. Lysozym (L6876-1G, <i>Sigma-Aldrich</i>)</b>
<b>2. Brilliance <i>Listeria</i> Agar, ferdiglagde agarplater (PO1102, <i>Oxoid</i>)</b>
<b>3. Kit: <i>Listeria monocytogenes</i> genesig® Standard Kit (<i>Primerdesign Ltd.</i>)</b>
- <i>L. monocytogenes</i> primer/probe mix
- RNase/DNase fritt vann
- Template preparation buffer
- Positive Control Template
<b>4. Precision™ PLUS 2X qPCR Master Mix with ROX (katalog nr. Precision-R, <i>Primerdesign Ltd.</i>)</b>
<b>5. Kit: DNeasy Blood &amp; Tissue (katalog nr. 69504, <i>Qiagen</i>)</b>

- Proteinase K
- Buffer AL
- Buffer AW1
- Buffer AE

**Tabell A-3.** Laboratorieutstyr

1. DNeasy Blood & Tissue kit (katalog nr. 69504, <i>Qiagen</i> )
- DNeasy Mini Spinn kolonne in 2 ml Collection tubes
- 2 ml oppsamlingsrør
2. 1,5 ml Eppendorfrør
3. MicroAmp Fast Optical 96-Well Reaction Plate with Barcode, 0,1 ml ( <i>Applied Biosystems</i> )
4. Nanofotometer ( <i>Implen</i> )
5. Sentrifuge: Zentrifugen, Rotina 420R ( <i>Hettich</i> )
6. Sentrifuge: Heraeus Multifuge X3 FR Centrifuge ( <i>Thermo Scientific</i> )
7. Sentrifuge: Avanti J-26XP (Beckman Coulter)

## B. Værdata fra lokalitet 1

Værdata hentet fra de siste syv dagene før prøvetakning. Data er hentet fra nærmeste værstasjon til prøvetakningspunktet fra YR historikk (<https://www.yr.no/nb>).

**Tabell B-1-1.** Værdatahistorikk fra værstasjon i nærheten av lokalitet 1. Værdata fra de siste syv dagene før prøvetakning den 17.10.2019

Dato	Min. temp (°C)	Maks. temp (°C)	Gj.snitt temp (°C)	Nedbør (mm)
11.10	5,7	9,1	7,3	15
12.10	6,7	9,8	8,1	34
13.10	6,5	8,8	7,0	11
14.10	4,5	10,3	6,8	4,6
15.10	6,7	11,0	8,2	0
16.10	7,4	10,1	8,6	0,3
17.10	5,6	10,5	8,4	0

**Tabell B-1-2.** Værdatahistorikk fra værstasjon i nærheten av lokalitet 1. Værdata fra de siste syv dagene før prøvetakning den 06.11.2019

Dato	Min. temp (°C)	Maks. temp (°C)	Gj.snitt temp (°C)	Nedbør (mm)
31.10	2,1	6,2	4,4	2,6
01.11	2,9	5,6	3,6	2,0
02.11	0,9	7,7	3,8	0
03.11	2,3	6,8	5,4	0
04.11	3,4	6,5	4,6	0
05.11	0,9	6,0	2,5	0
06.11	-0,4	4,3	2,5	0

**Tabell B-1-3.** Værdatahistorikk fra værstasjon i nærheten av lokalitet 1. Værdata fra de siste syv dagene før prøvetakning den 20.11.2019

Dato	Min. temp (°C)	Maks. temp (°C)	Gj.snitt temp (°C)	Nedbør (mm)
14.11	0,3	4,7	2,5	0
15.11	0,1	4,7	1,6	0
16.11	1,3	6,3	3,3	0
17.11	1,6	7,1	3,2	0,6
18.11	1,2	3,7	2,6	0
19.11	0,3	2,2	1,2	8,6
20.11	-1,9	1,7	-0,1	0

**Tabell B-1-4.** Værdatahistorikk fra værstasjon i nærheten av lokalitet 1. Værdata fra de siste syv dagene før prøvetakning den 12.12.2019

Dato	Min. temp (°C)	Maks. temp (°C)	Gj.snitt temp (°C)	Nedbør (mm)
06.12	4,7	8,5	5,4	57,8
07.12	3,0	5,5	4,0	5,0
08.12	0,0	7,8	2,5	7,3
09.12	2,4	6,0	3,4	40,4
10.12	-0,3	5,6	3,0	0,8
11.12	3,9	7,4	5,9	51,9
12.12	2,9	6,8	5,2	14,2

**Tabell B-1-5.** Værdatahistorikk fra værstasjon i nærheten av lokalitet 1. Værdata fra de siste syv dagene før prøvetakning den 07.01.2020

Dato	Min. temp (°C)	Maks. temp (°C)	Gj.snitt temp (°C)	Nedbør (mm)
01.01	3,6	8,9	6,2	0,0
02.01	4,4	10,6	8,3	0,0
03.01	2,0	10,7	4,6	31,4
04.01	0,2	4,5	3,2	8,2
05.01	0,1	3,8	1,1	0,3
06.01	1,0	3,8	3,3	8,9
07.01	2,4	8,2	5,0	2,7

**Tabell B-1-6.** Værdatahistorikk fra værstasjon i nærheten av lokalitet 1. Værdata fra de siste syv dagene før prøvetakning den 22.01.2020

Dato	Min. temp (°C)	Maks. temp (°C)	Gj.snitt temp (°C)	Nedbør (mm)
16.01	3,7	9,4	7,3	16,6
17.01	4,6	8,6	6,2	3,5
18.01	3,8	5,4	4,4	6,1
19.01	2,9	6,7	4,2	6,5
20.01	1,4	6,7	5,8	2,1
21.01	6,0	12,0	7,5	27,6
22.01	1,1	6,8	4,0	5,3

**Tabell B-1-7.** Værdatahistorikk fra værstasjon i nærheten av lokalitet 1. Værdata fra de siste syv dagene før prøvetakning den 10.02.2020

Dato	Min. temp (°C)	Maks. temp (°C)	Gj.snitt temp (°C)	Nedbør (mm)
04.02	-2,0	2,2	-0,7	9,5
05.02	-2,8	9,5	4,1	0,1
06.02	4,1	9,3	6,3	3,4
07.02	1,2	5,1	2,9	0,2
08.02	0,5	9,1	5,4	0,0
09.02	4,4	8,0	5,6	3,7
10.02	1,8	7,3	3,9	32,4

**Tabell B-1-8.** Værdatahistorikk fra værstasjon i nærheten av lokalitet 1. Værdata fra de siste syv dagene før prøvetakning den 24.02.2020

Dato	Min. temp (°C)	Maks. temp (°C)	Gj.snitt temp (°C)	Nedbør (mm)
18.02	3,1	8,7	5,1	26,0
19.02	1,3	5,6	2,7	9,8
20.02	0,8	7,6	4,1	1,1
21.02	0,9	9,3	5,7	16,4
22.02	2,9	10,1	5,5	29,1
23.02	2,5	7,3	4,3	17,1
24.02	1,1	5,2	2,5	0,2

**Tabell B-1-9.** Værdatahistorikk fra værstasjon i nærheten av lokalitet 1. Værdata fra de siste syv dagene før prøvetakning den 20.03.2020

Dato	Min. temp (°C)	Maks. temp (°C)	Gj.snitt temp (°C)	Nedbør (mm)
14.03	-2,7	3,1	0,3	0,0
15.03	1,0	8,6	4,9	17,3
16.03	3,1	8,9	4,9	10,4
17.03	2,5	8,8	6,4	8,9
18.03	2,3	7,9	4,5	27,1
19.03	1,2	7,1	3,7	21,2
20.03	-0,4	7,0	2,9	0,6



**Tabell B-1-10.** Værdatahistorikk fra værstasjon i nærheten av lokalitet 1. Værdata fra de siste syv dagene før prøvetakning den 01.04.2020

Dato	Min. temp (°C)	Maks. temp (°C)	Gj.snitt temp (°C)	Nedbør (mm)
26.03	5,1	6,7	5,7	22,1
27.03	4,8	9,4	6,2	2,6
28.03	2,4	7,7	4,1	0,3
29.03	-1,5	3,5	1,7	0,1
30.03	2,4	8,8	5,3	0,6
31.03	1,6	6,5	4,0	0,0
01.04	4,6	9,4	5,9	1,0

**Tabell B-1-11.** Værdatahistorikk fra værstasjon i nærheten av lokalitet 1. Værdata fra de siste syv dagene før prøvetakning den 15.04.2020

Dato	Min. temp (°C)	Maks. temp (°C)	Gj.snitt temp (°C)	Nedbør (mm)
09.04	4,7	7,5	5,3	3,5
10.04	3,2	9,1	5,2	0,0
11.04	2,8	5,5	4,6	0,0
12.04	4,2	9,7	6,2	18,4
13.04	2,0	7,0	3,8	6,7
14.04	2,4	6,4	4,4	0,1
15.04	4,8	11,6	8,2	18,1

**Tabell B-1-12.** Værdatahistorikk fra værstasjon i nærheten av lokalitet 1. Værdata fra de siste syv dagene før prøvetakning den 27.04.2020

Dato	Min. temp (°C)	Maks. temp (°C)	Gj.snitt temp (°C)	Nedbør (mm)
21.04	4,9	18,4	10,4	0,0
22.04	4,6	18,3	10,4	0,0
23.04	4,9	17,1	10,2	0,0
24.04	5,8	14,8	9,2	0,0
25.04	3,1	14,4	8,3	0,0
26.04	4,2	12,8	8,5	0,1
27.04	5,1	9,3	6,7	5,9

**Tabell B-1-13.** Værdatahistorikk fra værstasjon i nærheten av lokalitet 1. Værdata fra de siste syv dagene før prøvetakning den 11.05.2020

Dato	Min. temp (°C)	Maks. temp (°C)	Gj.snitt temp (°C)	Nedbør (mm)
05.05	1,5	11,9	6,8	0,0
06.05	5,1	11,7	8,4	0,0
07.05	3,6	12,8	8,6	0,8
08.05	6,6	10,7	7,8	0,1
09.05	5,0	10,8	7,6	2,0
10.05	2,4	9,7	5,0	0,8
11.05	2,2	9,0	5,6	1,1