

Renholdskontroll for forbygging av Listeria

6. MARS 2018

Solveig Langsrud, Seniorforsker Nofima



FISKERI- OG HAVBRUKSNÆRINGENS
FORSKNINGSFOND

Unngå Listeria på produkt – fire områder med ulike aktører



Internasjonalt anerkjent regime for håndtering av Listeria – «seek and destroy»

Tiltak for økt kontroll med listeria i laksenæringen: Hovedprosjekt

Dette hovedprosjektet er en videreføring av et tidligere forprosjekt FHF-900315 med tittel "Kartlegging av bedriftspraksis som hemmer og fremmer forekomst av listeria i norske lakseprodukter: Forprosjekt..."

Prosjektnummer: 900521 Varighet: 2010 - 2014

Fagfelt: Havbruk Kvalitet laksefisk



Veiledning for forebygging, overvåking og fjerning av listeria i laksenæringen

En leveranse i prosjektet «Tiltak for økt kontroll med listeria i laksenæringen»
FHF #900521 - januar 2015

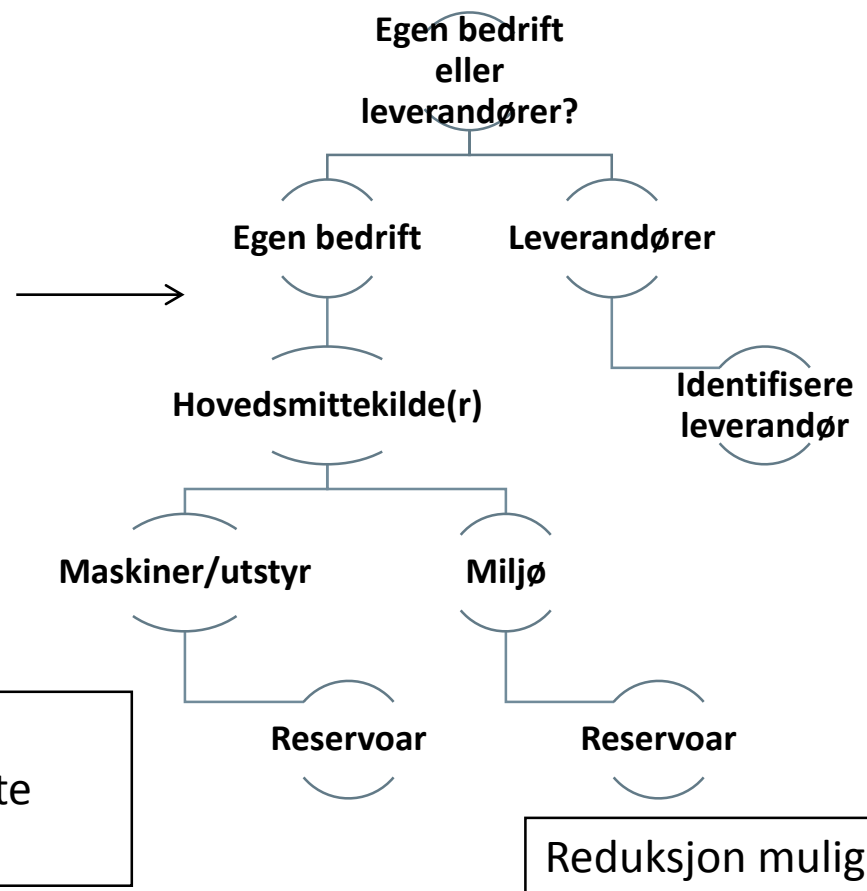
Even Heir, Solveig Langsrud og Therese Hagtvedt

Reduksjon mulig:

- Nedvask
- Bedre rutiner

Fjerning mulig:

Bytte deler, varme, konsentrerte midler



Fjerning av Listeria fra produkt: Veksthemming mulig, ingen gode løsninger for fjerning

Fordeler og ulemper med seek-destroy-strategi

Ulemper

Motivasjon:

- Fokus på å løse problemer som har oppstått framfor kvalitet
- Fokus på personer fremfor tilrettelegging av arbeid
- Sene tilbakemeldinger ved avvik

Effektivitet:

- Sen deteksjon av problemområder – produkter med Listeria allerede ute på markedet
- Sen deteksjon av årsaker – dårlig tid til å sette inn riktige tiltak og vanskeligere å håndtere
- Høye kostnader gir begrenset antall prøver

Fordeler

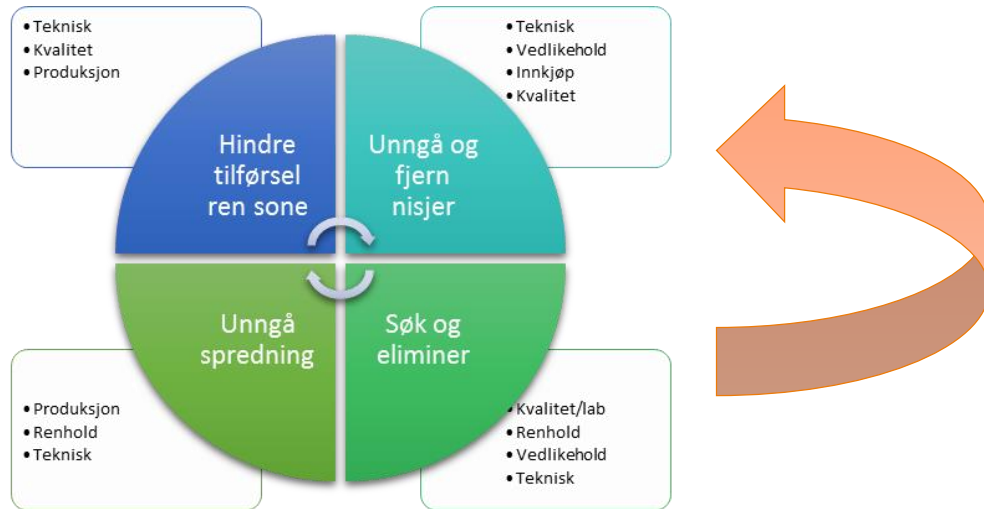
Motivasjon

- Målrettet arbeid rettet mot en klar trussel
- Godt utgangspunkt for forbedring av prosess

Effektivitet

- Detekterer problemområder og setter inn ressursene på rett plass
- Passer for bedrifter som i utgangspunktet har en god hygiene og som har utstyr med god hygienisk design

Idé: Fra overvåking av reservoarer til overvåking av nisjer



Fremtidens strategi (?): Unngå Listeria ved omfattende prøvetakingsprogram for å finne og fjerne nisjer. Metodikk som gir raskt svar slik at avvik korrigeres før problem oppstår

Forutsetning: Listeria etablerer seg ikke hvor som helst, men i nisjer som har spesielle karakteristika som kan måles

Forebygging av listeria i produksjonsanlegg for laks

FHF-finansiert prosjekt

Prosjektperiode: 1. januar 2017— 15 mai 2018

Prosjektleder: Solveig Langsrud, Nofima

Ansvarlig FHF: Kristian Prytz

Styringsgruppe

Rudi Jakobsen

Lerøy Seafood Group ASA - Kvalitetssjef

Marit Skjærvik

Sinkaberg-Hansen AS - Kvalitetsleder fabrikk

Anita Rørlien

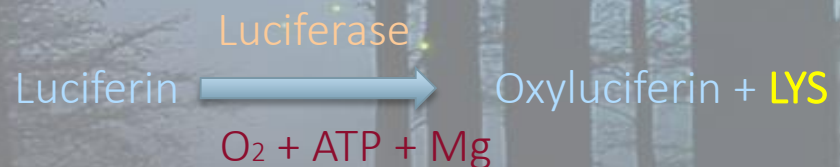
Lerøy Fossen AS - Kvalitetsleder

Sissel Djuvik

Lerøy Fossen AS -

Undersøke om renholdskontroll med ATP-metoden kan benyttes som supplement eller delvis erstatter for Listeria- og kimtallanalyser i bedrifter som i utgangspunktet har en god hygienisk status

Kan ATP-metoden brukes for å finne og overvåke *Listeria*-nisjer?



Smuss = Celler (bakterier, vev, blod..)

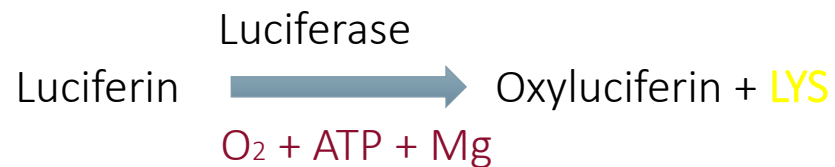
Listeria kan etablere seg

Forutsetninger for at metoden skal være effektiv:

- Et prøvepunkt med høye ATP-nivåer er en nisje hvor *Listeria monocytogenes* kan etablere seg -> tiltak for å fjerne smuss nødvendig
- Et prøvepunkt med lave ATP-nivåer representerer et område der *Listeria monocytogenes* ikke kan etablere seg - > ingen tiltak nødvendig
- ATP-instrumentene gir et riktig bilde av ATP-nivåene

Arbeidspakke 1:

- Gir ATP-instrumentene et riktig bilde på ATP-nivå når de brukes i praksis?
- Gir ATP-nivået et riktig bilde av smussnivået?



Smuss = Celler (bakterier, vev, blod..)



Forhold som kan ødelegge målingen:

- hemming av enzymet luciferase
- ineffektive enzymer/detergenter

Ulike typer smuss gir ulike ATP-signaler

ATP instrumenter og tester

SystemSure Plus
Ultrasnap
Supersnap



3M
Cleantrace



Kan ulike komponenter uten ATP påvirke målingene?

Salt

Reduserer utslag

Røksyre

Reduserer utslag

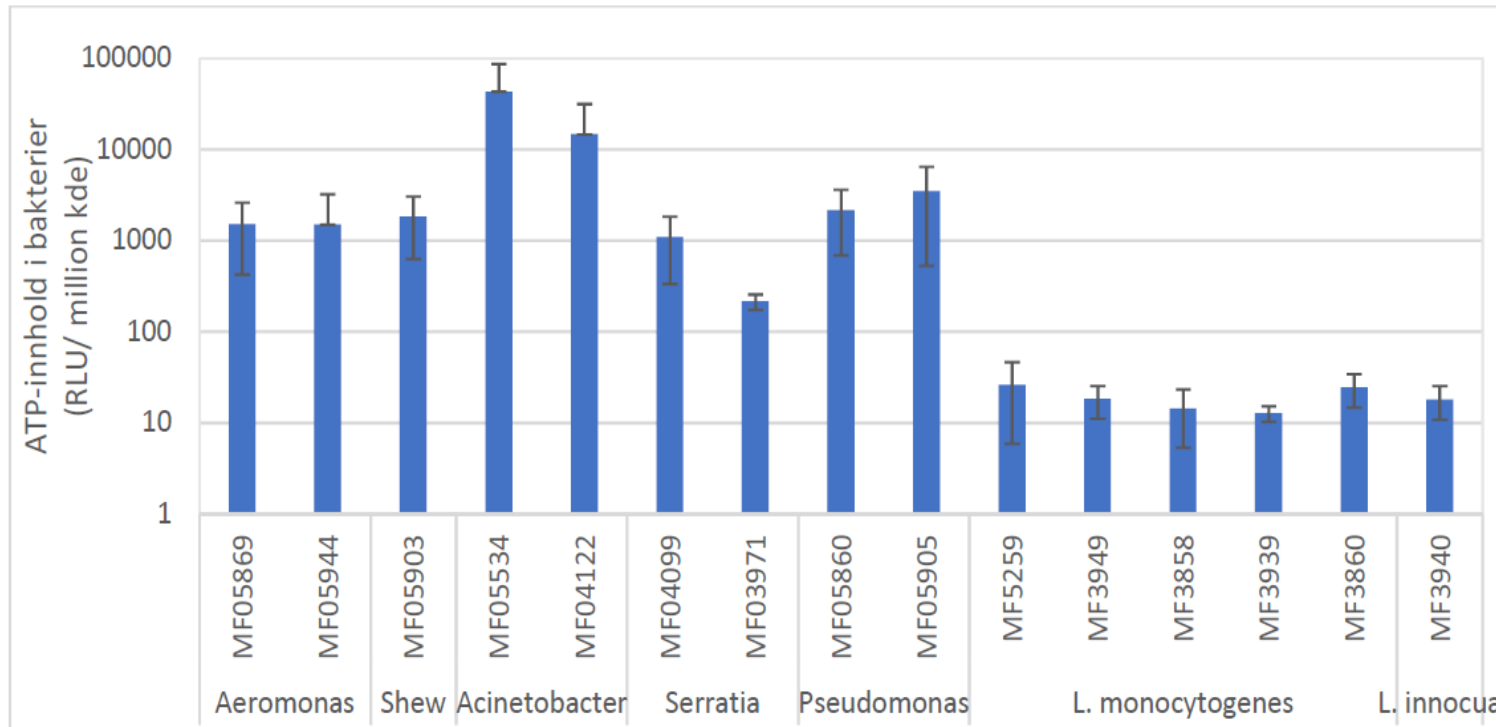
Olje

Ingen påvirkning

Vaske- og desinfeksjonsmidler

Lite påvirkning

Er det sammenheng mellom antall bakterier og ATP-nivå?



Store forskjeller på ATP-nivå i ulike bakterier

- Lavt utslag for *Listeria* – 1 mill *Listeria* gir utslag på 20
- Høyere utslag for andre bakterier – men må ha 10 000-100 000 bakterier for å få et utslag på 100.
- Ikke sensitive nok for direkte påvisning

Er det ulik mengde ATP i ulikt smuss?

- Fettrikt smuss:
 - Fettrik del (bukfett) fra ørret skjæres ut
 - Mekanisk blanding med vann 50%
- Proteinrikt smuss:
 - Proteinrik del (loin) fra ørret skjæres ut
 - Mekanisk blanding med vann 50%
- Blod
 - Ingen fortynning



	Cleantrace (RLU/10 µl)	Ultrasnap (RLU/10 µl)	Fett (%)
Muskel	$4,2 \times 10^3$ ($\pm 1,5 \times 10^3$)	313 (± 114)	11,0*
Fettrand	227 (± 76)	26 (± 14)	70,9*
Blod	$5,3 \times 10^6$ ($\pm 3,9 \times 10^6$)	$4,8 \times 10^5$ ($\pm 2,2 \times 10^5$)	1,8

10 ul = 0.01 gram smuss

Oppsummering Arbeidspakke 1 :

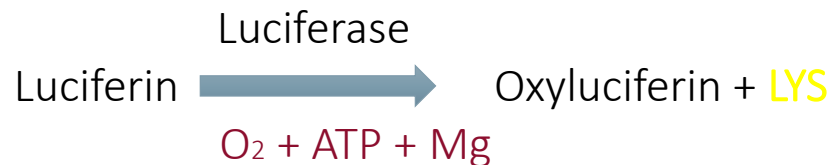
Gir ATP-instrumentene et riktig bilde på ATP-nivå når de brukes i praksis?

- Lineær sammenheng ATP og RLU-utslag
- Kan gi lavere utslag i salte forhold og i nærvær av røyksyre
- Systematiske forskjeller på instrumenter

Gir ATP-nivået et riktig bilde av smussnivået?

- Ulike typer smuss gir ulike nivåer ATP (per gram)
- Ulike typer bakterier gir ulike nivåer ATP, deteksjonsgrensen for lav ved renholdskontroll (?)
- Metoden klarer ikke påvise total-ATP i noen rå prøver (klarer ikke bryte ned membranen og frigjøre ATP?)

Arbeidspakke 2: Er det sammenheng mellom ATP-metoden og nisjer for Listeria?



Smuss = Celler (bakterier, vev, blod..)



Listeria kan feste seg lettere, vokse og etablere seg?

1. Gir ATP-metoden høyest utslag i nisjer der Listeria i stor grad fester seg?
2. Gir ATP-metoden høyest utslag i nisjer der Listeria i stor grad vokser?
3. Gir ATP-metoden sjelden/aldri utslag i nisjer hvor Listeria ikke fester seg eller vokser?

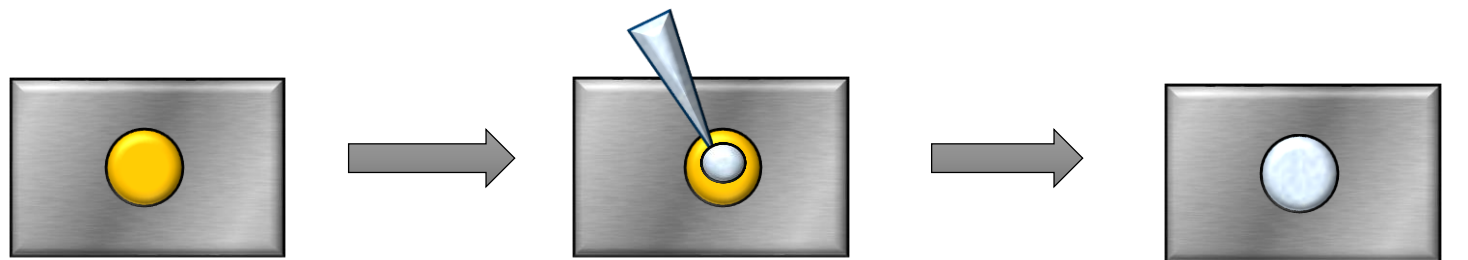
Hvordan finne ut dette?

Undersøke sammenheng mellom festing av Listeria til overflater med og uten smuss

Undersøke sammenheng mellom vekst av Listeria på overflater med og uten smuss

Undersøke om lavere nivåer smuss gir mindre festing/vekst

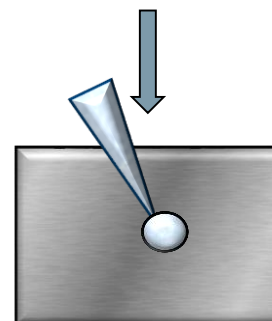
Hvordan fester *Listeria* seg på overflater i nærvær av ulike typer smuss?



100 ul smuss tørkes inn på stålkupong:
1 time i boks med lokk
1-1,5 time uten lokk

Tilsetter 100 ul bakteriesuspensjon på smusset

Oppbevarer i tett boks, 100% relativ fuktighet, 12C



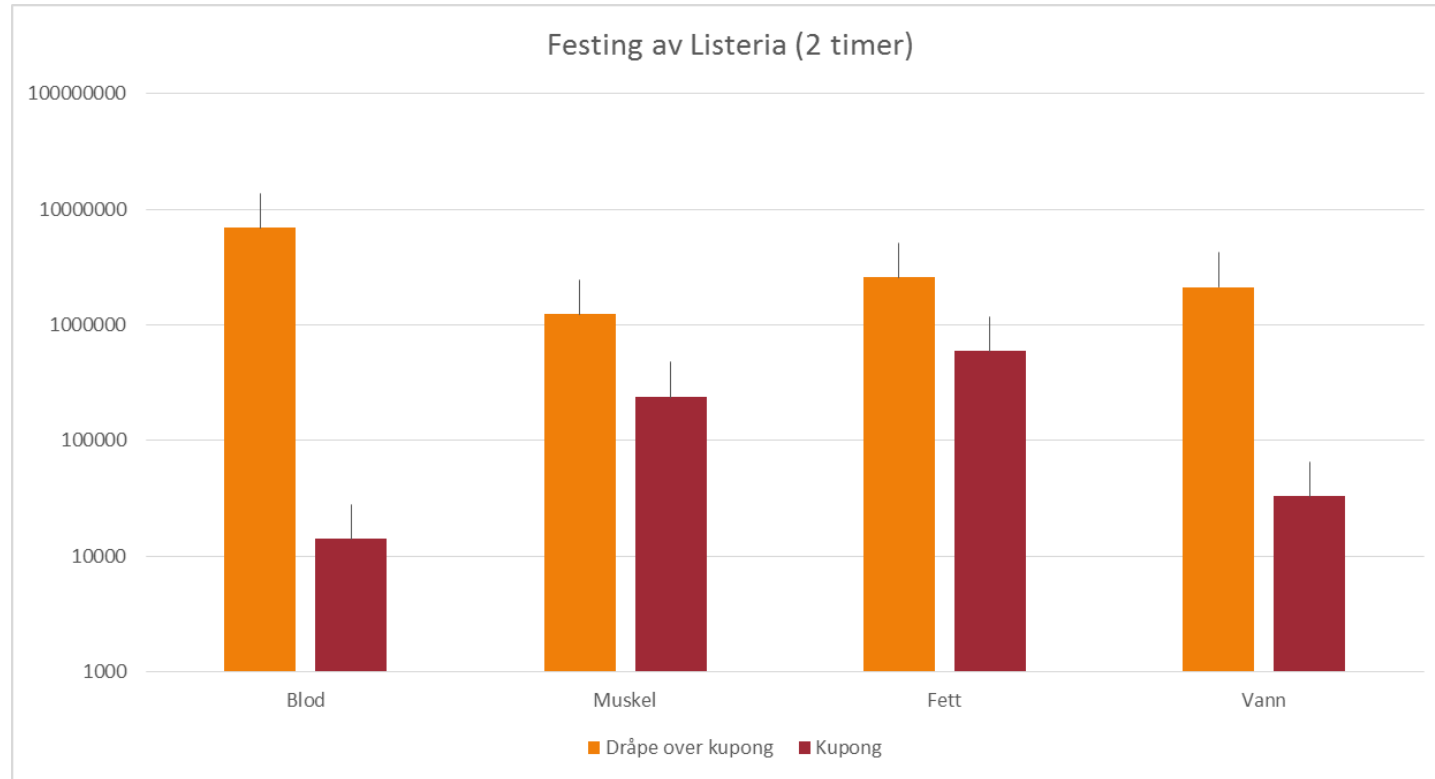
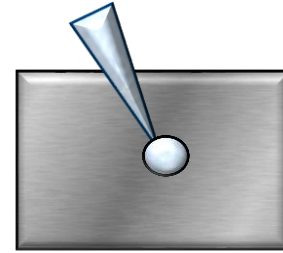
Tar ut dråpen – måler ATP og bakterietall i dråpe og på kupong



Smuss

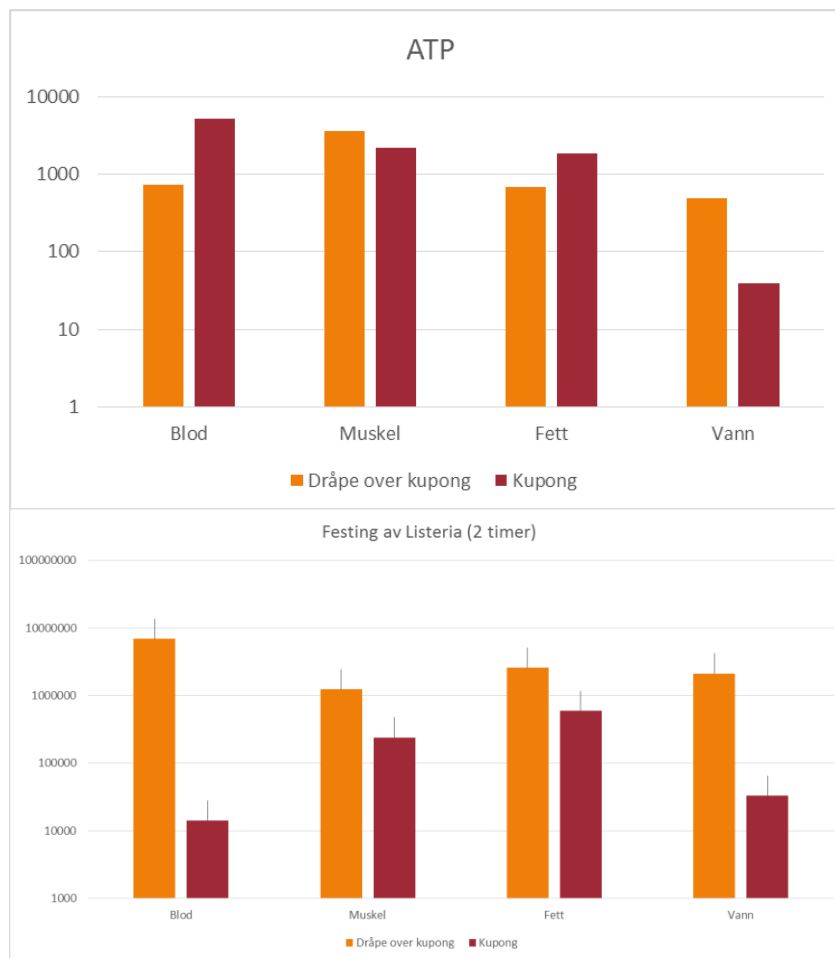
- 25% fettrikt smuss i vann
- 16.5% proteinrikt smuss i vann
- Blod

Listeria fester seg til overflatter med fett eller protein



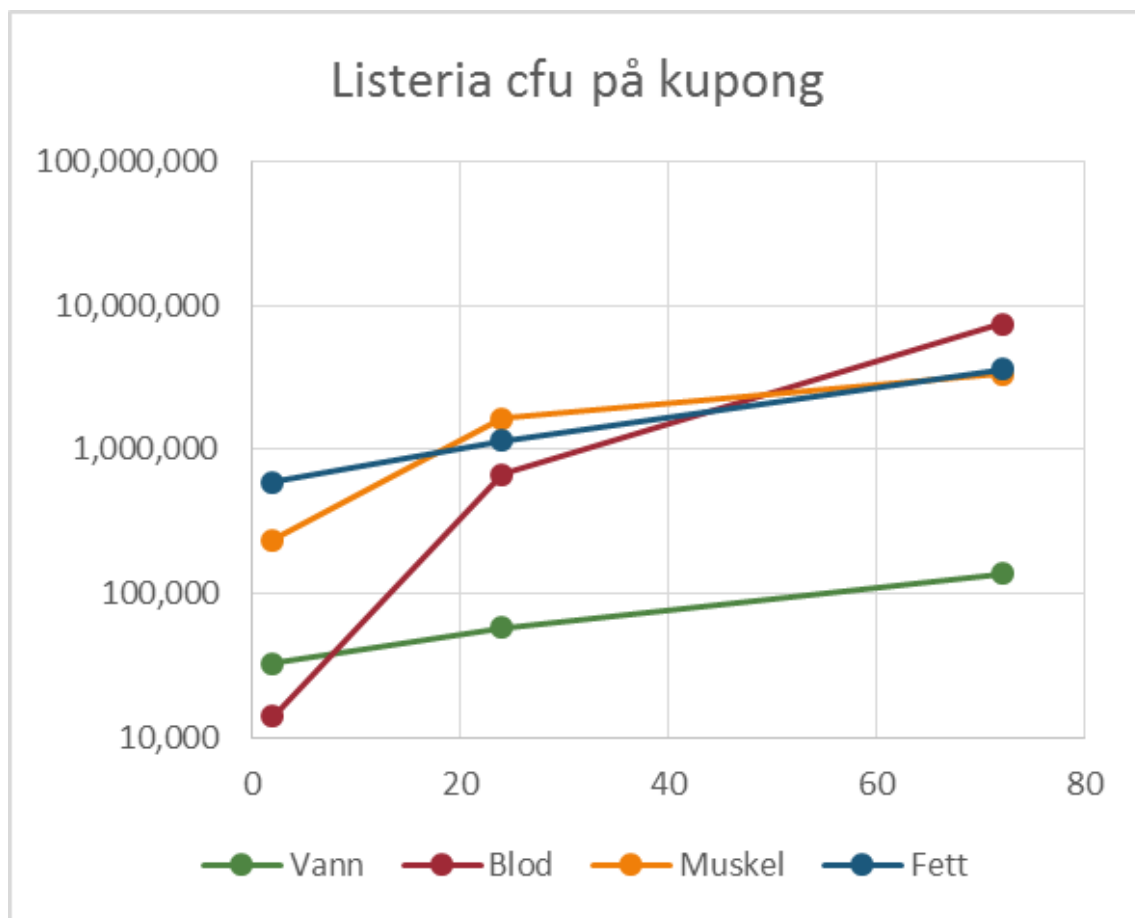
- Blodsmuss gir dårligere festing enn fett/proteinholdig smuss
- En større andel av bakteriene fester seg enn å bli i løøsning for fett og proteinholdig smuss

Høy ATP betyr ikke at Listeria foretrekker å feste seg der



- Blod: Høye ATP-verdier for lave Listeriatall
- Muskel og fett: Gir utslag i både høyere ATP og høyere festing – men ikke direkte korrelasjon med bakterietallet
- ATP påviser smuss, men smuss betyr ikke nødvendigvis mer feste av Listeria

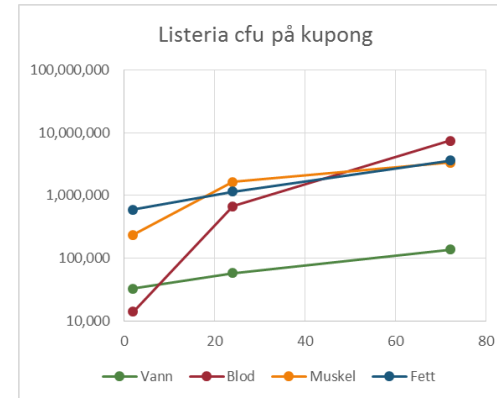
Listeria vokser godt som biofilm på alle typer smuss



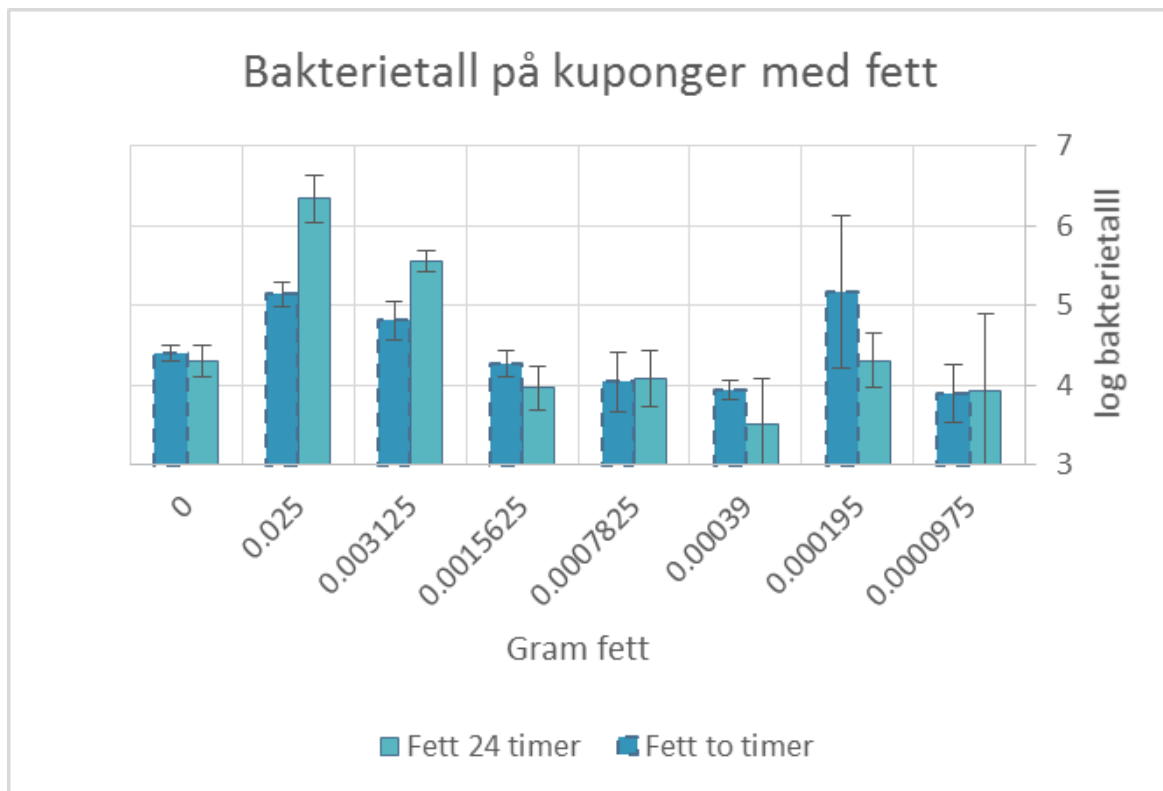
- Vekst på alle smusstyper, ca like mye Listeria etter ett døgn

Hva er nedre grense for at *Listeria* fester seg og vokser på en overflate?

- Problem med forsøkene over: Smuss-nivået meget høyt – vil vi kunne påvise nisjer ved lave konsentrasjoner smuss?
- Hva skjer om vi fortynner ned smusset?
- Biofilmforsøkene ble gjentatt, men med ulike mengder smuss



I nisjer med fett kan Listeria vokse uten at ATP slår ut

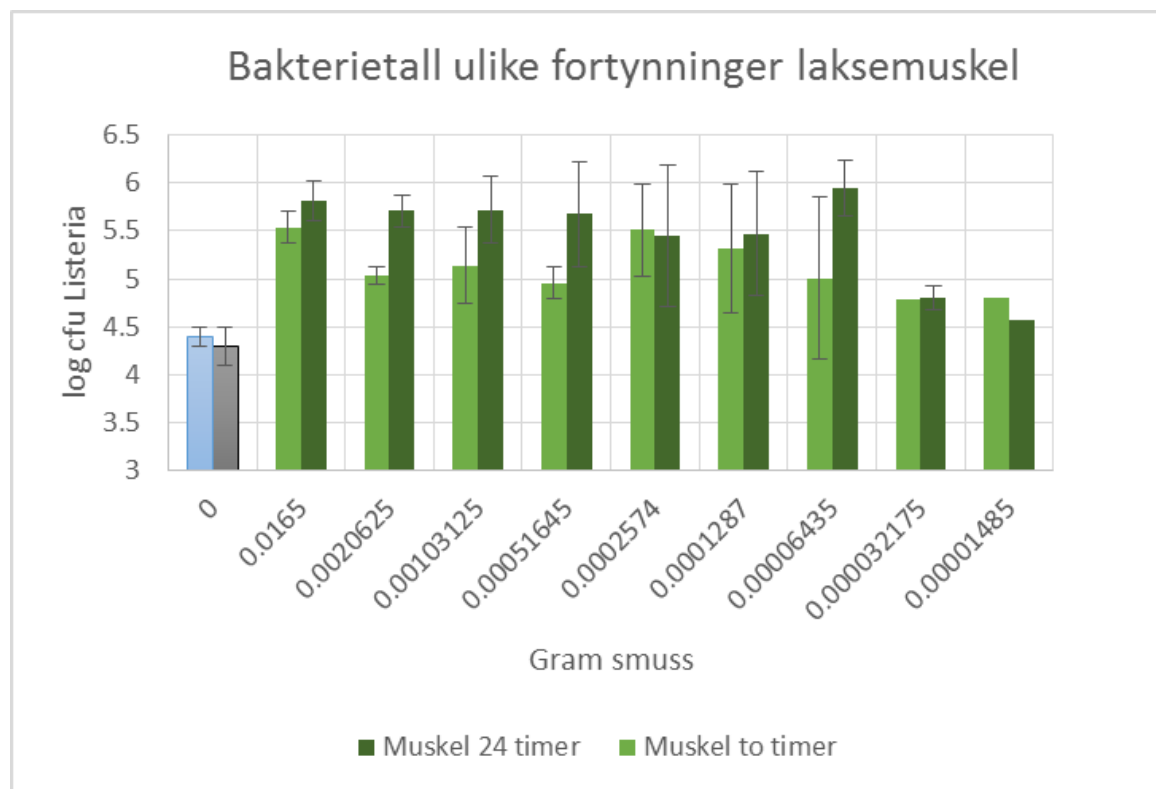


- I tidligere forsøk: 0.025 gram fettriakt smuss
- 0.0015 gram fett gir ikke mer feste og vekst enn vann
- **0.003 gram fett: Økt vekst av Listeria, men kun utslag på 8 på Cleantrace**



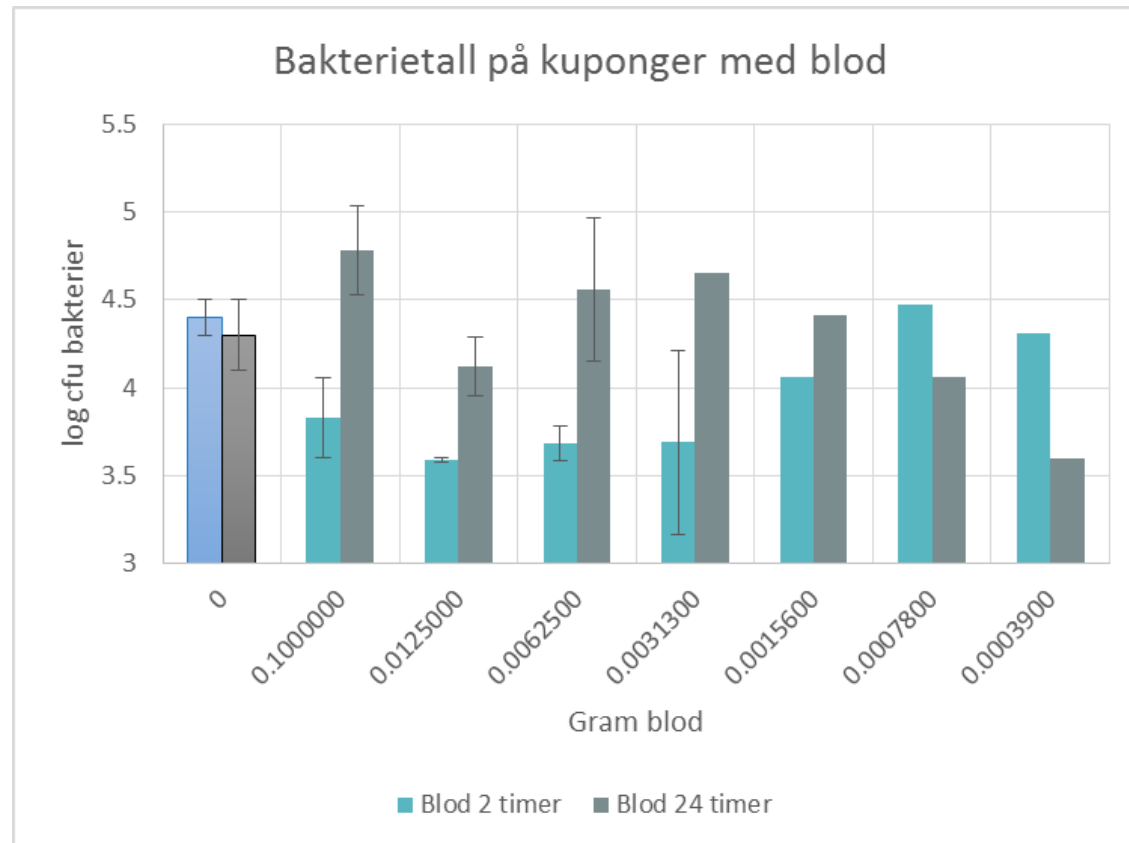
- ATP-metoden er ikke sensitiv nok

Listeria fester seg ved meget lave nivåer protein



- Kun 1-2 gjentak for de seks laveste konsentrasjonene, store variasjoner
- Indikasjon: Bedre feste av Listeria, selv ned i meget konsentrasjoner (0.0005 gram)
- Dette vil si et ATP-utslag på 200 (Cleantrace)

Små mengder blod gir høye utslag, men ikke nødvendigvis Listeriaproblemer



- I tidligere forsøk: 0.1 gram blod. Dette ga max-utslag på ATP
- 0.001 gram blod gir samme listeriatall som vann
- **0.003 gram blod: Vekst av Listeria, utslag på >10 000 på Cleantrace**



- Cleantrace er meget sensitiv, falske positive? (>10 000 utslag på 0.001 gram blod)

Oppsummering – kriterier for ATP-metoden opp mot resultater

Kriterium	Resultater
Høye nivåer Listeria gir høy ATP	Nei, ved lite næring har Listeria lite ATP
Høy ATP betyr at dette er en mulig nisje – her vil Listeria feste seg og vokse	Nei, ikke nødvendigvis. Mulig falske positive blodrike miljøer
Lav ATP betyr at dette ikke er en nisje – her vil Listeria sannsynligvis ikke etablere seg	Nei, ikke nødvendigvis. Mulig falske negative for fettrike miljøer og miljøer med salt eller røyksyre

Videre arbeid

Uttesting i bedrifter

- Sammenheng ulike kimtallsanalyser, Listeria og ATP i forskjellige avdelinger



Grenseverdier for ulike deler av prosessen

Oppsummering og anbefalinger

- Vitenskapelig artikkel om ATP-metoden
- Artikler i norske bransjeblader
- Anbefaling om metoder for overvåking

Hva betyr resultatene i praksis?

- ATP-metoden gir et raskt svar på smussnivå og man får raskt et bilde av om renholdet har fungert. (Videre undersøkelser for å se på samsvar med andre metoder)
- Bruk av metoden må tilpasses hver avdeling
 - Områder med fettsmuss høyere grenseverdier enn de med blodsmuss
 - Rester av salt og røksyre vil gi falske negative
- Metoden kan fange opp bakterier i tillegg til smuss
 - Lave utslag for Listeria
- ATP-metoden sier noe om renholdet, men ikke nødvendigvis om et punkt er en nisje for Listeria
- Foreløpig er beste strategi seek-and-destroy for å overvåke listeria-situasjonen

Det er behov for raskere og mer treffsikre metoder for å overvåke hygienisk tilstand til produksjonsmiljø