

# ***Listeria monocytogenes* i vakuumförpackad lax**

**Elisabeth Mandorf**

Handledare Wilhelm Tham  
Institutionen för livsmedelshygien

Bitr. handledare Marie-Louise Danielsson-Tham  
Institutionen för livsmedelshygien

Examensarbete 2003:33  
Veterinärprogrammet  
Veterinärmedicinska fakulteten  
SLU  
ISSN 1650-7045  
Uppsala 2003

## Abstract

Listeriosis, which is caused by *Listeria monocytogenes*, is a rare food borne disease that primarily affects people whose immune system is weakened. These may be elderly people, pregnant women, new-born infants and individuals on immunosuppressive medication. The most common symptoms are meningitis, septicemia and abortion. The mortality is high, on average 20-30 %.

In recent years the number of cases in Sweden has increased. This increase is especially pronounced in south of Sweden, in the province of Skåne. In 1997 there was an outbreak of listeriosis in Värmland in Sweden, due to consumption of vacuum-packaged cold-smoked and gravad rainbow trout. Thus, such products were analysed for *Listeria monocytogenes*.

The starting point for the present study was the hypothesis that the increase of listeriosis in Skåne may be due to the consumption of vacuum-packaged salmon and rainbow trout.

Raw fish is not thought to be an important source of contamination, but the fish is contaminated with *L. monocytogenes* in the production plant. Contamination most likely occurs during the preparation, principally during the brining process, in the factory. Since the gravad and cold smoked fish is not supposed to be heated before eating there is no step in which the bacteria will be eliminated. The National Food Administration conducted a large investigation on *L. monocytogenes* in ready-to-eat products in Sweden during 2001. They found, for example, that 7% of the samples of vacuum-packaged smoked and gravad fish were positive for these bacteria.

In the present study 39 samples of vacuum-packaged cold smoked and gravad salmon and rainbow trout are included. Of those, 35 were bought in Skåne. Ten of the samples were positive for *L. monocytogenes*. The quantitative analysis showed that the number of *L. monocytogenes* in two of the samples (2000 and 4000 CFU/gram, respectively) by far exceeded the limit of 100 CFU/gram set up by the National Food Administration. Isolates from the positive samples were cleaved with restriction enzymes (REA) and analysed with Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE). All of the clonal types found in the samples have previously been isolated from humans suffering from listeriosis. The only serogroup found in the fish was 1/2. It is concluded that vacuum-packaged ready-to-eat fish products may be an important source of listeriosis in human.

## Förord

Listerios är en allvarlig men ovanlig livsmedelsburen sjukdom, som orsakas av bakterien *Listeria monocytogenes*. Det är framförallt personer med nedsatt immunförsvar som drabbas. Dit hör till exempel äldre människor, gravida kvinnor, nyfödda barn och individer med någon form av grundsjukdom, till exempel diabetes, cancer eller kronisk alkoholism. De vanligaste symptomen är meningit och septikemi. Gravida kvinnor kan abortera. Den generella mortaliteten för listerios ligger på 20-30%, både i Sverige och utomlands.

Man har på senare år sett en ökning av antalet listeriosfall i Sverige. I Skåne låg antalet fall under åren 1999-2001 dessutom högt över riksgenomsnittet. År 1997 inträffade ett utbrott av listerios i Värmland, då nio personer drabbades. Utbrottet ansågs vara orsakat av vakuumpförpackad lax. Utgångspunkten för föreliggande examensarbete är hypotesen att konsumtion av denna livsmedelsprodukt är en av orsakerna till det höga antalet fall av listerios i Skåne.

För att fastställa om vakuumpförpackad kallrökt och gravad lax kan utgöra en källa till listerios, undersöktes laxprover inköpta i Skåne på förekomst av *L. monocytogenes*. De isolerade *L. monocytogenes*-stammarna karakteriserades med en molekylärbiologisk metod (PFGE). De så uppenbarade typerna jämfördes med de typer som isolerats från insjuknade människor i Skåne och resten av Sverige. Om man vet att vakuumpförpackad lax är en av de viktigaste smittkällorna för *L. monocytogenes* till människa, kan man med mer konkreta åtgärder förhindra att känsliga människor utsätts för smitta och därigenom få ner antalet fall av listerios.

## Innehållsförteckning

Abstract .....	2
Förord.....	3
Innehållsförteckning.....	4
Inledning .....	5
Listeria.....	5
Listeria monocytogenes.....	5
Listerios hos människa .....	6
Bakgrund till examensarbetet .....	7
Syfte .....	8
Litteraturstudier .....	8
Listeriosutbrott i Värmland 1994-1995 .....	8
Tillverkning av kallrökt och gravad lax .....	9
<i>Listeria monocytogenes</i> i fiskfabriken.....	10
Gränsvärden och kontroll av listeria i konsumtionsfärdig mat.....	10
Livsmedelsverkets Riksprojekt 2001 .....	11
Material och metoder.....	12
Inköp av laxar.....	12
Kvalitativ analys.....	13
Kvantifiering .....	14
Konfirmering.....	14
Restriktionsenzymanalys (REA) och Pulsfälts-gelelektrofores (PFGE) .....	15
Resultat.....	20
Kvantifieringen.....	20
Typningen.....	20
Diskussion .....	20
Slutsats och rekommendationer.....	22
Tillkännagivande.....	22
Referenser.....	23

# Inledning

## Listeria

Listeria är små rörliga, grampositiva, stavformiga bakterier. De är katalaspositiva, oxidasnegativa och fakultativt anaeroba. Arterna inom genus *Listeria* delas upp i två distinkta grupper, beroende på genom.

Den första gruppen består endast av *L. grayi*. Bakterien är ickepatogen och förekommer naturligt i jord och växtlighet.

I den andra gruppen ingår *L. monocytogenes*, *L. ivanovii*, *L. innocua*, *L. welshimeri* och *L. seeligeri*. *L. monocytogenes* är den viktigaste. Den orsakar sjukdom både hos människa och djur och den kan också av och till finnas i tarmkanalen utan att ge några symptom. *L. ivanovii* är framförallt patogen för djur, men kan även orsaka sjukdom hos människa. *L. innocua* har isolerats från jord och växtlighet samt från både humanfaeces och djurfaeces. Från djurfaeces har även *L. seeligeri* isolerats, men för övrigt förekommer den, liksom *L. welshimeri*, enbart i jord och växtlighet. De tre sistnämnda anses inte vara patogena för varken djur eller människa (Carter *et al.*, 1995).

## Listeria monocytogenes

### *Resistens*

*Listeria monocytogenes* är en motståndskraftig bakterie. Bakterien tillväxer i pH 6 till 9, men kan överleva pH-värden mellan 5,5 och 9,6 (Seeliger *et al.*, 1986). Den kan föröka sig i temperaturer mellan 0,5 och 45°C (Junttila *et al.*, 1988). Tillväxt kan ske i lösningar med upp till 10% NaCl och bakterien kan överleva i lösningar med upp till 16% koksalt (Seeliger *et al.*, 1986). Pastörisering (62°C i 30 minuter; 71,6°C i 15 till 30 sekunder) dödar *L. monocytogenes*. Den är mycket motståndskraftig mot uttorkning, kan överleva i månader i livsmedel, hö och halm, jord och sågspån. Den är känslig för vanliga desinfektionsmedel (Carter *et al.*, 1995).

### *Antigena egenskaper och serologi*

Utifrån värmestabila somatiska antigen (O) och värmelabila flagellantigen (H), har fyra serogrupper och 11 serotyper identifierats. Man har inte lyckats påvisa något samband mellan värdjurets art, kliniska symptom och serotyp. De flesta infektioner orsakas av tre serotyper, nämligen 1/2a, 1/2b och 4b. Siffrorna indikerar O-antigen och bokstäverna H-antigen. Serologiska tester har inte visat sig vara till någon hjälp vid diagnostisering och kontroll av listerios (Carter *et al.*, 1995).

## Listerios hos människa

Listerios är en ovanlig livsmedelsburen sjukdom, som framförallt drabbar gravida kvinnor, nyfödda barn och andra personer med nedsatt immunförsvar (Rocourt *et al.*, 2000). Sjukdomen kan ge meningitit och/eller septikemi och abort hos gravida. Dödligheten för listerios ligger på 20–30% (Rocourt *et al.*, 1997; Jones *et al.*, 1994), men högre mortalitet har rapporterats. Bland fallen som rapporterades i England mellan 1967 och 1985 låg mortaliteten på 44% (Mc Lauchlin, 1989b). Dödligheten hos immunosupprimerade, inklusive äldre människor, är högre än för genomsnittet.

Även om den vanligaste spridningsvägen för *L. monocytogenes* till människa är via livsmedel, kan bakterien också smitta på annat sätt, till exempel via hudlesioner. Det kan resultera i kutan listerios (Mc Lauchlin, 1989b). Kutan listerios drabbar ibland veterinärer och lantbrukare som assisterat vid kalvningar. Det ger pustler, t ex på armarna samt lätt feber. *L. monocytogenes* kan också ge upphov till en kraftig konjunktivit om bakterien infekterar ögonen.

### *Antal rapporterade fall av listerios i Sverige*

I Sverige rapporteras i medeltal 37 fall av listerios varje år. Dessutom inträffar troligen ett okänt antal mildare fall som aldrig inrapporteras (Lindqvist *et al.*, 2000). Under senare år har antalet listeriosfall i Sverige dock ökat. Totalt anmäldes 67 fall av invasiv listerios under 2001. Det är den högsta siffran någonsin enligt Smittskyddsinstitutet. Av de insjuknade var 34% under 65 år. Fem fall inträffade i samband med graviditet och av de övriga insjuknade var det endast en som inte hade någon känd grundsjukdom. En kvinna hade smittats av opastöriserad ost från en fäbod, men i alla övriga fall var smittkällan okänd (SLV, 2002). Under 2002 (till och med mitten av december) har 40 fall inträffat.

### *Gravida kvinnor*

Gravida kvinnor drabbas oftast av listerios under tredje trimestern. Infektion under första och andra trimestern förekommer också. Symptomen på infektion hos kvinnan är influensaliknande med feber, muskelvärk och huvudvärk, samt minskade fosterrörelser (Jones *et al.*, 1994). I vissa fall är infektionen symptomlös hos kvinnan. Fostret kan dö intrauterint med eller utan åtföljande spontanabort. Det kan också drabbas av septikemi eller meningit (Mc Lauchlin, 1989a).

### *Listerios hos icke-gravida*

Listerios hos icke-gravida vuxna ger framförallt meningit, ibland i kombination med gastrointestinala symptom. En annan vanlig form av listerios är septikemi. Det är huvudsakligen immunosupprimerade människor som drabbas av septikemi medan individer utan underliggande sjukdom infekteras i centrala nervsystemet (Mc Lauchlin, 1989b). Med immunosupprimerad menas människor med sämre immunförsvar än normalt, till exempel alkoholister, HIV-positiva och patienter

som står under behandling med kortikosteroider. Fokala infektioner som endocardit, septisk artrit, osteomyelit och peritonit är ovanliga och förekommer oftast som en följd av septikemi (Mc Lauchlin, 1989b). Konsumtion av livsmedel kontaminerat med *L. monocytogenes* kan ibland även resultera i gastrointestinala symptom (Miettinen *et al.*, 1999).

### *Infektionsdosen*

Infektionsdosen är, som vid alla infektioner, beroende av både bakteriens virulens och individens motståndskraft. Vid livsmedelsburna infektioner påverkas dessutom infektionsdosen av typen och mängden konsumerat livsmedel samt bakteriekoncentrationen i livsmedlet. Hur stor infektionsdosen för *L. monocytogenes* är, vet ingen idag (Rocourt *et al.*, 2000). På grund av den vanligtvis långa inkubationstiden är det ofta svårt att återfinna livsmedlet som orsakat sjukdom. Patienten har ofta hunnit slänga eller äta upp resterna av maten. Om man hittar livsmedlet som orsakade infektionen är det svårt att beräkna hur många bakterier som fanns per gram när det konsumerades, eftersom mängden bakterier kan ha förändrats under lagringen.

Vissa data tyder på att så små doser som 100 bakterier per gram livsmedel kan räcka för att ge infektion (Rocourt *et al.*, 2000). Immunokompetenta, det vill säga helt friska människor, tål dock högre doser. Livsmedelverkets gräns för acceptabel mängd *L. monocytogenes* i livsmedel går vid 100 bakterier per gram (SLV, 2000).

### *Inkubationstiden*

Inkubationstiden för listerios är normalt mellan fyra dygn och tre veckor, men kan variera från 20 timmar till 90 dagar. (Linnan *et al.*, 1988).

## **Bakgrund till examensarbetet**

Efter världens första rapporterade utbrott av laxburen listerios hos människa (Värmland 1994/95), har Institutionen för livsmedelshygien fokuserat sin listeriaforskning mot detta livsmedel. Det finns starka misstankar om att vakuumpförpackad kallrökt och gravad lax är den viktigaste smittkällan för *L. monocytogenes* i Sverige och kanske i resten av Norden

Listeriosfallen i Skåne har de senaste åren varit fler än i övriga landet, framför allt skedde en kraftig ökning under åren 1999-2001. Under dessa tre år rapporterades 32 fall av invasiv listerios i Skåne. Mortaliteten låg på 30,3%. (Tham *et al.*, manuskript). De laxfabrikat som finns att köpa i Skåne är i stort sett de samma som i övriga landet. Varför Skåne har fler listeriosfall vet man inte. Kanske är det så att skåningar äter mer lax än man gör i övriga Sverige, eller också är det sämre kvalitet på laxen som säljs i skånska affärer.

I det här arbetet har vakuumpförpackad lax som inhandlats i Skåne analyserats med avseende på förekomst av *L. monocytogenes*. Avsikten är att komma fram till om

sådan lax kan vara en viktig orsak till humana listeriosfall. Eftersom *L. monocytogenes* är en fakultativt anaerob bakterie kan den leva och tillväxa även i en vakuumpförpackning. Som tidigare nämnts kan den dessutom växa i låga temperaturer, varför det inte räcker med vanlig kylförvaring för att hämma bakterietillväxten tillräckligt. De laxar som undersöktes, hade en genomsnittlig rekommenderad hållbarhetstid på tre till fyra veckor. För vissa märken uppgick dock hållbarhetstiden till över fem veckor. Om laxen kontamineras med listeriabakterier, antingen under tillverkningsprocessen eller vid paketeringen, kommer dessa att kunna tillväxa allt mer i förpackningen i väntan på konsumtion. Man måste räkna med att kylförvaringen hos konsumenten inte alltid fungerar optimalt, samt att det finns risk att vissa konsumenter äter av laxen även efter att ”bäst-före-dagen” passerat.

För att ytterligare utreda huruvida vakuumpförpackad lax utgör en viktig smittkälla för *L. monocytogenes* till människa ville vi jämföra de kloner som isolerats från människor som insjuknat i listerios med de kloner som vi isolerade från laxproverna. Vi har använt Skåne som modell för hela landet. De vanligaste klonerna från de 32 skånska humanfallen mellan 1999 och 2001 var 1/2:2, 1/2:3 och 1/2:4 (Tham *et al.*, manuskript). Beteckningen 1/2 visar vilken serogrupp det rör sig om, siffran efter kolontecknet anger PFGE-profil. Under 90-talet rapporterades i Sverige ungefär lika många humanisolat av serogrupp 1/2 som av serogrupp 4 (Rörvik *et al.*, 2000).

## Syfte

Syftet med det här arbetet är att undersöka smittvägar för *L. monocytogenes* för att man i förlängningen ska kunna minska antalet listeriosfall hos människa. Genom att provta ett antal vakuumpförpackade laxprodukter med avseende på listeria och jämföra de kloner som hittas med kloner som isolerats från listeriospatienter, kan man avgöra om det är troligt att lax har utgjort den huvudsakliga smittkällan. Eftersom Skåne haft en förhöjd andel listeriosfall jämfört med övriga landet, åtminstone år 1999-2001, utfördes den här analysen på laxar inköpta i Skåne.

## Litteraturstudier

### Listeriosutbrott i Värmland 1994-1995

Under perioden augusti 1994 till juni 1995 insjuknade nio personer i listerios i Värmland. Normalt för regionen är i medeltal ett listeriosfall per år (Ericsson *et al.*, 1997). Av de nio som insjuknade avled en person och en gravid kvinna aborterade. Ytterligare två gravida kvinnor som insjuknade drabbades av prematur förlossning med feber respektive septikemi hos barnen som dock överlevde. Fem av de nio patienterna var över 70 år och tre av de fem hade dessutom någon form av predisponerande sjukdom. Bland personerna som var under 70 år fanns, som redan nämnts, tre gravida kvinnor och en person som led av Non-Hodgkins syndrom.



Alla listeriospatienterna, utom den avlidne, fick besvara ett frågeformulär bland annat om sina matvanor. Gemensamt för de drabbade var att de ätit någon form av vakuumpförpackad lax. Prover togs på matrester, bland annat lax, som fanns kvar i tre av patienternas kylskåp. Lax av samma märke som fanns hos en av patienterna köptes dessutom in direkt hos den lokale producenten samt i en lokal livsmedelsaffär och analyserades. Detta sistnämnda laxfabrikat var positivt för *L. monocytogenes* i såväl provet från patientens kylskåp som i prover från producent och affär. Isolat från dessa prover och från blod eller cerebrospinalvätska från patienterna karakteriserades med hjälp av serotypning, fagtypning och restriktionsenzymanalys (REA) med pulsfälts-gelelektroforés (PFGE). *L. monocytogenes*-isolaten från sex av patienterna och laxen uppvisade identisk serovar (4b), fagovar och REA-typ.

Isolaten från lax och patienter kunde efter karakterisering delas in i fem olika kloner, A-E. Den dominerande klonen var typ B som isolerades hos sex av patienterna. Klonerna A, C och D orsakade vardera ett humanfall. Ett laxmärke bidrog med tre kloner - B, C och D - men B dominerade även här. En av förpackningarna av detta märke, som inköptes i den lokala butiken, innehöll samtidigt klonerna B och D. Det är inte känt hur ofta mer än en klon isoleras från samma livsmedelsprov. Det värmländska utbrottet visar dock att det är viktigt att isolera och typa mer än en presumtiv *L. monocytogenes*-koloni från ett prov, för att därigenom öka chansen att hitta alla i provet förekommande kloner (Ericsson *et al.*, 1997).

Därmed kan man starkt misstänka att åtminstone åtta av de nio fallen av listerios orsakades av gravad eller kallrökt lax från samma producent. Utbrottet i Värmland är det första dokumenterade utbrottet i världen som orsakats av vakuumpförpackad regnbågslax (Ericsson *et al.*, 1997).

Ytterligare två patienter hade rester av lax av andra fabrikat i sitt kylskåp. Ena patientens laxprov var negativt medan den andres var positivt. Den senare laxen innehöll *L. monocytogenes* av en annan klon än de som hittats hos patienterna. Detta var klon E, eller ”den gula klonen” som den också kallas. Klon E är tidigare isolerats i samband med livsmedelsburna listeriosutbrott i bland annat Schweiz och Danmark (Tham *et al.*, 2000). Klontyp E tillhör serovar 4b och var under 90-talet en av de vanligast förekommande klonerna vid listeriosfall hos människa i Sverige. Den hade aldrig före utbrottet i Värmland isolerats och identifierats i livsmedel producerade i Sverige (Tham *et al.*, 2000).

### **Tillverkning av kallrökt och gravad lax**

Tillverkningen av kallrökt och gravad lax kräver mycket manuell hantering. Dessutom används tekniskt komplexa maskiner och utrustning som kan vara svåra att rengöra (Rörvik, 2000). Gravd lax tillverkas genom att råa fiskfiléer gnids in med en blandning av socker, salt och peppar och täcks med dill. Laxen placeras sedan i en plastpåse och läggs i en kyl. Efter två dygn öppnas plastpåsen och laxen

vakuumförpackas, antingen skivad eller i hel bit. När man tillverkar kallrökt lax utgår man också från råa laxfiléer. Filéerna saltas antingen genom att saltet gnids in på utsidan eller genom att det sprutas in i fiskköttet med ett antal nålar. Efter saltningen röks laxen vid 25 till 30 °C i två till tre timmar och därefter vakuumförpackas laxen hel eller i skivor. NaCl-koncentrationen i laxen efter saltning och rökning ligger ungefär på mellan 2,5 och 3,5% (Ericsson *et al.*, 1997).

### ***Listeria monocytogenes* i fiskfabriken**

Rå fisk verkar inte vara den viktigaste källan till listeriakontamination av den slutgiltiga produkten (Autio *et al.*, 1998; Huss *et al.*, 2000; Rörvik *et al.*, 2000). Istället kontamineras laxen under tillverkningsprocessen. Vid provtagning, som utfördes av Autio *et al.*, var frekvensen *L. monocytogenes* i rå fisk låg. Dessutom hittades den typ av *L. monocytogenes* som isolerats från den råa fisken varken längs produktionskedjan i fabriken eller i den färdiga produkten.

När Autio *et al.* (1998) gjorde provtagningar i en fabrik, befanns mängden *L. monocytogenes* öka i laxen ju längre fram i tillverkningsprocessen provet togs. Framförallt vid saltningen och framåt, ökade mängden *L. monocytogenes* i fisken. Saltningsområdet och påföljande områden i tillverkningskedjan var dessutom de mest kontaminerade. Även saltningsvätskan (kranvatten, salt och socker) innehöll listeria, dock inte när vätskan var färsk utan endast efter en tids användning. Fiskfiléerna saltades med en kommersiell injektionsmaskin. I maskinen recirkulerade saltningsvätskan och troligen fastnade laxrester på insidan av maskinen, vilken sedan var svår att rengöra. Saltningsvätskan, som innehåller fett och protein från de saltade filéerna, utgör ett bra odlingsmedium för *L. monocytogenes* (Autio *et al.*, 1998).

Autio *et al.* provtog även handskar och förkläden som användes i fabriken. De kunde konstatera att det var mer sannolikt att handskarna kontaminerades av fisken än tvärt om. Förklädena däremot var kontaminerade med *L. monocytogenes* redan innan arbetet börjat, vilket tyder på otillräcklig rengöring och desinfektion. De anställdas roll när det gäller spridning av listeria bör inte underskattas. Framförallt anses arbetsrotation inom fabriken vara en riskfaktor (Autio *et al.*, 1998).

Det har visats vid provtagning av fisk och skaldjur samt av processmiljöer för sådana produkter att de *L. monocytogenes*-stammar som finns i olika fabriker sinsemellan uppvisar en stor genetisk variation. Det är alltså inte troligt att sådana livsmedel eller miljöer är särskilt gynnsamma för specifika stammar. Å andra sidan är stammar som isolerats från en speciell fabrik genetiskt mer homogena, vilket indikerar att en fabrik koloniserats av specifika ”subkloner” av *L. monocytogenes* (Rörvik *et al.*, 2000).

### **Gränsvärden och kontroll av listeria i konsumtionsfärdig mat**

Problemen med listeria i mat, färdig att äta utan vidare tillagning, ökar både i Sverige och utomlands. Det har förekommit larm om att bakterien hittats, inte bara

i rökt och gravad fisk och i dessertostar, utan även i charkvaror och kylda färdigrätter.

Redan 1994 insåg Statens livsmedelsverk riskerna med gravad och kallrökt fisk i vakuumpförpackning. Vid undersökning visade det sig att de angivna hållbarhetstiderna ofta var mellan sex och åtta veckor. Dessutom var temperaturen i kyldiskarna ibland >8 °C. Mot slutet av hållbarhetstiden var fisken både smakmässigt och hygieniskt undermålig. Man införde därför en rekommendation om max tre veckors förvaring i temperatur på högst 4°C.

Dessutom infördes ett inofficiellt gränsvärde för listeria i rökt och gravad fisk. Av fem analyserade prover gällde att provet skulle bedömas som otjänligt och beläggas med saluförbud om 100 eller fler *L. monocytogenes* per gram påträffades i ett prov, eller om två eller fler prov innehöll mer än tio sådana bakterier per gram. Denna riktlinje gäller nu för alla ätfärdiga livsmedel, även sushi.

Inom köttbranschen har man bestämt sig för en hårdare linje och har i sitt handlingsprogram från 1994 en 0-gräns för *L. monocytogenes* i färdigprodukter. Handlingsprogrammet tar upp tre kritiska moment, nämligen återkontaminering (kontamination efter tillräcklig upphettning), överlevnad på grund av otillräcklig värmebehandling och kontamination via råvaran. Med tillräcklig upphettning menas upphettning till 70°C i minst två minuter.

Även inom EU håller gränsvärden på att utarbetas. Det förväntas bli en gräns vid 100 *L. monocytogenes* per gram i ätfärdiga produkter. Gränsvärdet ska gälla under varans hela rekommenderade hållbarhetstid och när produkter med för högt värde påträffas ska de återkallas av tillverkaren (Alsén-Eklöf, 2000).

## **Livsmedelsverkets Riksprojekt 2001**

Livsmedelsverket initierade under 2001 en riksomfattande undersökning av förekomsten av *L. monocytogenes* i kylda, konsumtionsfärdiga varor inklusive delikatesser, skaldjur och sallader. Proverna togs i butiker, storhushåll och restauranger samt i mejeri-, fisk- och charkanläggningar. De livsmedel som inte kunde kallas kyld konsumtionsfärdig mat utslöts ur provtagningen. Detta gäller till exempel råa livsmedel (som rimmat sidfläsk), konserverade och varmhållna produkter och andra mejerivaror än färska, halvmjuka och mjuka ostar. De undantagna produkterna räknas inte heller som risklivsmedel när det gäller *L. monocytogenes*. Som risklivsmedel räknas till exempel dessertostar och vakuumpförpackad lax. Listeriaförekomst i produktionslokalerna granskades inte vid undersökningarna. Provtagningarna avslutades vid årsskiftet 2001/2002 men eftersom proverna analyserades på ”bäst-före-dag” pågick arbetet ytterligare några månader.

### *Analysresultat*

I undersökningen deltog 180 kommuner från hela Sverige. Totalt skickades 3437 resultat från prover på kyld konsumtionsfärdig mat in från olika analyslaboratorier i landet. Proverna delades in i sex olika grupper, nämligen ätfärdigt kallt, rätter som avses att värmas, ost, rökt och gravad fisk, delikatesser och chark.

Av de 3437 inkomna provresultaten var 74 stycken, det vill säga två procent, positiva för *L. monocytogenes*. Nästan hälften av de positiva proverna (35 stycken) var från produktgruppen rökt och gravad fisk. I den gruppen var totalt sju procent av proverna positiva, i övriga grupper var andelen positiva en till två procent.

Vid kvantifiering av de positiva proverna visade det sig att antalet listeriabakterier i allmänhet var lågt. I två tredjedelar av proverna var halten lägre än 10 CFU (Colony Forming Units) per gram. I ett prov på kokt medvurst hittades 15000 CFU per gram, vilket var den högsta uppmätta halten.

### *Rökt och gravad fisk*

Rekommenderad förvaringstemperatur för 90 % av fiskprodukterna som ingick i analysen var 4°C eller lägre. Övriga hade en rekommenderad temperatur på mellan 5 och 8°C. Varken rekommenderad förvaringstemperatur, förpackningssätt eller om fisken var skivad eller i bit verkade ha någon betydelse för förekomsten av listeria. Däremot konstaterade man att förekomst av *L. monocytogenes* var vanligast i gravad fisk, kallrökt kom på andra plats och därefter varmrökt. Man upptäckte en viss årsvariation vad gäller förekomst av *L. monocytogenes* i rökt och gravad fisk. Andelen positiva prover under hösten var dubbelt så hög som under vintern och fyra gånger så hög som under våren och sommaren. (SLV, 2002)

## **Material och metoder**

### **Inköp av laxar**

Under augusti och september 2002, inhandlades 35 vakuumpförpackningar med kallrökt och gravad lax av olika fabrikat i ett antal affärer i Malmö och Lund (tabell 1). Dessutom köptes en varmrökt makrill (nummer 12). Vid varje affärsbesök togs en kallrökt och en gravad lax från vart och ett av de fabrikat som fanns i affären. Detta för att man skulle få fler laxar av de vanligast förekommande fabrikaten och färre av ovanligare fabrikat, och därigenom få en bra bild av vad genomsnittskonsumenten äter. Först inhandlades en omgång laxar i Malmö och en omgång i Lund och inom en månad gjordes ett nytt svep i samma affärer i Malmö och Lund.

Utöver de skånska laxarna analyserades två stycken (nummer 7 och 8) inköpta i Stockholm under augusti och två (nummer 39 och 40) köpta i Uppsala i september. Totalt ingick alltså 39 vakuumpförpackningar med lax och en med varmrökt makrill

i analysen. Av de 39 laxar som analyserades var 18, det vill säga 46%, gravade och resten var kallrökta.

### **Kvalitativ analys**

Alla laxar analyserades på ”bäst-före-dag”, utom en (nr 9) som hade utgången datum när den inhandlades. Den analyserades fem dagar efter ”bäst före dag”. Anrikningsprocessen baserades på en metod enligt Nordiska kommittén för Livsmedelsanalyser (NMKL,1999).

På analysens första dag vägdes 25 gram av den lax som skulle analyseras upp i en stomacherpåse. 225 ml Listeria enrichment broth (LEB) tillsattes. LEB är en blandning av tryptonsoyabuljong, jästextrakt och sterilt vatten. Detta kompletterades med 1,25 ml acriflavin och 1,25 ml nalidixinsyra. Laxprovet och buljongen blandades i en Colworth Stomacher 400 (A.J. Seward & Company limited, London, Storbritannien) och inkuberades sedan i 18-24 h i 30 °C.

Dag två fördes 0,1 ml av ovanstående blandning (LEB I) över till ett provrör med 10 ml LEB samt en tillsats av 0,1 ml acriflavin och 0,05 ml nalidixinsyra. Detta (LEB II) inkuberades sedan ytterligare 18-24 h i 30 °C. Från LEB I ströks dessutom 0,1 ml ut på en oxfordagarplatta och 0,1 ml på en palcamagarplatta. Båda plattorna inkuberades 48 h i 37 °C.

Oxfordagarplattorna består av ”Listeria selective medium (Oxford formulation. Oxoid, Oxoid Ltd, Basingstoke, Storbritannien)” och används för detektion av listeria i kliniska prover och livsmedel. Mediet innehåller de selektivt hämmande komponenterna litiumklorid, acriflavin, kolistinsulfat, cefotetan, cykloheximid och fosfomycin. Dessutom finns ett indikatorsystem som bygger på eskulin och järn. *L. monocytogenes* hydrolyserar eskulin vilket ger svarta zoner runt kolonierna, beroende på bildning av svarta järnkomponenter. Gramnegativa bakterier hämmas fullständigt och de flesta grampositiva bakterier undertrycks också. En del enterokocker växer med svag eskulinreaktion, vanligtvis efter 40 h inkubation. Stafylokocker kan i vissa fall växa som eskulinnegativa kolonier. De flesta *L. monocytogenes*-kolonier är synliga efter 24 h i 37 °C men plattorna inkuberas ytterligare 24 h för att man ska upptäcka långsamväxande stammar (Bridson, 1998).

Palcamagarplattor (Oxoid, Oxoid Ltd, Basingstoke, Storbritannien) består också av en selektiv agar och används för isolering av *L. monocytogenes* från livsmedel. Selektiviteten beror på innehållet av litiumklorid, ceftazimid, polymixin B och acriflavinhydroklorid. Det finns ett dubbelt indikatorsystem som bygger på eskulin och mannitol. Eskulinreaktionen är densamma som beskrivits för oxfordagarplattor (se ovan). Mannitol är till för att skilja *L. monocytogenes*, som inte fermenterar mannitol, från till exempel enterokocker och stafylokocker. Dessa fermenterar mannitol vilket ger färgomslag från rött till gult av den tillsatta pH-indikatorn fenolrött.

Dag tre, det vill säga när LEB II inkuberats 24 h i 30 °C, ströks 0,1 ml av LEB II ut på en ny oxford- respektive palcamagarplatta och dessa inkuberades 48 h i 37 °C. *L. monocytogenes* bildar svarta (eskulinpositiva) kolonier med navel på oxford- och palcamagar. Det är dock inte bara *L. monocytogenes*, utan även andra listeriaarter, som är eskulinpositiva. Man renstryker därför alltid misstänkta kolonier på blodagarplatta för hemolyskontroll. Blodagarplattorna inkuberades 24 h i 37 °C. *L. monocytogenes*-kolonier är cirka 2 mm i diameter, runda, blanka och har jämn kant. De är blågrå vid genomlysning och är omringade av en smal, klar hemolyszon. Kolonier med typiskt utseende konfirmerades sedan vidare enligt nedan.

### **Kvantifiering**

Två olika metoder för kvantifiering har använts. För lax nummer 2, 4, 6, 9, 24, 25 och 26 påbörjades kvantifieringen först när provet visat sig vara positivt på *Listeria monocytogenes*. Laxen förvarades under tiden i kyl, 4 °C. Tio gram av laxen blandades med 90 ml peptonvatten i en Colworth Stomacher 400 (spädning 1:1). Därefter gjordes en spädningsserie med ytterligare två spädningar (1:2 och 1:3). Av spädning 1:1 ströks 0,25 ml på var och en av fyra palcamagarplattor och fyra blodagarplattor. Från övriga spädningar ströks 0,1 ml ut på en blodagarplatta och en palcamagarplatta. Alla plattorna inkuberades i 37 °C, blodagarplattorna i 24 h och palcamagarplattorna i 48 h.

För övriga prover användes en annan metod där kvantifieringen utförs på ”bäst-före- dag”. Av den ursprungliga blandningen av 25 gram lax och LEB I togs 1,0 ml som fördelades lika på fyra oxfordagarplattor. Plattorna inkuberades 48 h i 37 °C.

Växt av *L. monocytogenes* bekräftades genom biokemiska tester (som beskrivs nedan) och påvisad hemolyszon runt renstrukna kolonier på blod.

Från den kvalitativa analysen och från kvantifieringen konfirmerades och typades mellan fem och 13 isolat per prov.

### **Konfirmering**

För att ett prov skulle räknas som positivt för *L. monocytogenes* krävdes fynd av mörka, eskulinpositiva kolonier med konkavt centrum på oxford- och palcamagar samt kolonier med klar hemolyszon på blodagar. Eftersom *L. monocytogenes* fermenterar L-ramnos under syraproduktion och xylos utan syraproduktion, är positiv på katalastest samt uppvisar ”tumbling motility” vid rörlighetstest, krävdes att även dessa kriterier skulle vara uppfyllda. För att ytterligare bekräfta resultaten gjordes gramfärgning.

### *Tester som användes vid konfirmeringen*

#### Rörlighetstest

Odling i buljong vid 20°C ger en karaktäristisk rörlighet, så kallad ”tumbling motility”, som ses i mikroskop (1000 gångers förstoring).

#### Katalastest

*L. monocytogenes* är katalaspositiva, det vill säga bildar syrgas när H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> droppas på en koloni. Testet utförs lämpligen på ett objektsglas.

#### Fermentering av rannos och xylos

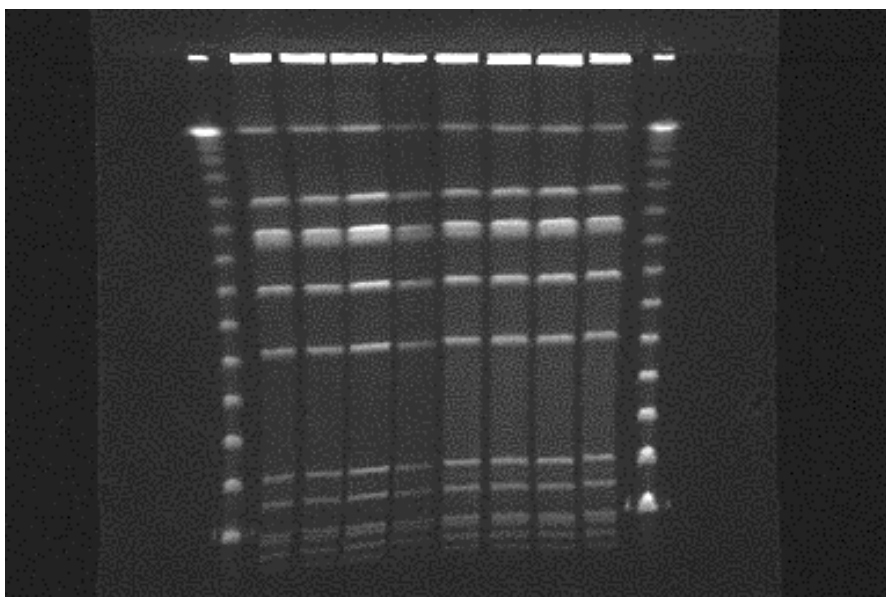
*L. monocytogenes* spjälkar rannos under syrabildning. En koloni deponeras i ett rannosrör och inkuberas i 24 h vid 37°C. Syrabildningen avläses sedan som ett färgomslag från blått till gult av den tillsatta pH-indikatorn. Xylosröret inkuberas på samma sätt men eftersom xylos spjälkas utan syrabildning sker här inget färgomslag.

## **Restriktionsenzymanalys (REA) och Pulsfälts-gelelektrofores (PFGE)**

Olika molekylärbioologiska metoder används idag för att utreda samband mellan ett visst livsmedel och personer som misstänks ha insjuknat efter att ha ätit av livsmedlet. Tidigare kunde man bara artbestämma bakterier som isolerats från patienten och livsmedlet, men med de nya metoderna kan man även typa smittämnet. Att typa ett smittämne innebär i princip att man tar dess fingeravtryck. Därmed kan man på ett mycket säkrare sätt fastställa samband mellan livsmedel och sjukdom, även om man aldrig kan bevisa något.

Vid typning av *L. monocytogenes* behandlas en bakteriekultur med ett lysozym som bryter ner bakteriernas cellväggar. Därefter gjuts lösningen in i en agarosplugg. För att sådana proteiner som kan verka störande i den fortsatta processen ska försvinna, behandlas pluggarna med pronas som bryter ner proteinerna. Pronaset inaktiveras sedan med pronashämmare. Listeriakromosomen klyvs därefter med ett eller flera restriktionsenzym medan den fortfarande ligger inbäddad i agarospluggen. Under inverkan av olika elektriska fält får sedan kromosomfragmenten vandra ut i en agarosgel. De minsta och lättaste fragmenten vandrar längst. Slutligen färgas fragmenten i gelen och gelen fotograferas.

Det bandmönster som framkommer är specifikt för varje listeriastam och kallas för stammens profil. Man kan nu jämföra profilen från den stam som isolerats från en listeriospatient med profilen från den som isolerats från ett misstänkt livsmedel. Om profilerna överensstämmer är det troligt att man har hittat livsmedlet som orsakat sjukdomen. Detta under förutsättning att det finns en anamnestic koppling mellan patient och aktuellt livsmedel.



**Bild 1:** PFGE-profil hos sex isolat av *Listeria monocytogenes* typ 1/2:9.

#### *Typning av laxisolaten*

Vi PFGE-typade isolat både från anrikning och kvantifiering. I de fall antalet *L. monocytogenes* per gram understeg 10, gav kvantifieringen inget utslag och endast kolonier från anrikningen kunde då typas.

De isolat som skulle klyvas ströks på en blodagarplatta och inkuberades i 37 °C i 24 timmar. En koloni från varje platta fördes sedan över till ett rör med 5 ml Brain Heart Infusion broth (Merck 1.10493, dest. vatten) och inkuberades i skakinkubator i 37 °C i 18-26 timmar. Rören kylades sedan av i vattenbad och centrifugerades fem minuter i en Wifug-centrifug (5500 varv/min, 20 °C). Efter en centrifugering byttes BHI-lösningen ut mot 5 ml TN-buffert (1 M Tris HCl, pH 8, 5 M NaCl) och centrifugeringen upprepades.

Inför lysozymsteget byttes TN-bufferten ut mot lysozymlösning (1 mg lysozym [Boeringer Mannheim GmbH, Mannheim, Tyskland] / ml TN-buffert) och röret inkuberades 30 minuter i 37 °C. 1,2% agaroslösning (Sea Kem Gold FMC BioProducts, Rockland, USA) blandades med 0,5M EDTA (pH8), 1% N-lauroylsarcosin (Merck) och 2 mg/ml pronas (Roche 1459643) och detta tillsattes rören med bakterier och lysozym. Rören värmdes sedan i 55 °C vattenbad.

För gjutning av pluggar fördes sedan lösningen över till små brunnar, tre stycken per prov. Brunnarna placerades 10 minuter i 4 °C så att pluggarna skulle stelna. De tre färdiga pluggarna från varje prov placerades i ett rör och pronaslösning tillsattes. Rören inkuberades 60 minuter i 55 °C. Därefter byttes lösningen och rören inkuberades på nytt i 55 °C över natten. Morgonen därpå byttes lösningen



ytterligare en gång och sedan kunde pluggarna förvaras i 4 °C tills det blev dags för klyvning.

När det var dags för klyvning inaktiverades pronaset i pluggarna med en lösning av 3,5 mg Pefabloc® (Roche 1429868) per 10 ml TE-buffert (1 M Tris HCl, 0.5 M EDTA, pH 8.0, dest.vatten) vid 37 °C. Efter 40 minuter byttes lösningen ut och rören inkuberades på nytt i 37 °C i 40 minuter. Därefter tvättades pluggarna två gånger under 40 minuter med TE-buffert och under tiden förvarades de i 55 °C vattenbad.

För klyvning av DNA användes restriktionsenzymet *Asc* 1 (10 u/μl, New England BioLabs, Beverly, MA, USA). En lösning blandades med *Asc* 1, acetylerat bovint serumalbumin (BSA; Promega), NE 4-buffert (New England BioLabs) och destillerat vatten. Lösningen tillsattes rören med pluggarna och de inkuberades över natten i 55°C.

Nästa dag sögs restriktionsenzym-lösningen bort och 0,5xTBE (Trisbas 0.45 M, Amersham Biosciences; Borsyra 0.45 M, Merck; 0.5 EDTA, pH 8; dest. vatten) tillsattes rören, som sedan inkuberades i rumstemperatur i minst 30 minuter.

För gelgjutningen tillverkades en gel baserad på SKG (SeaKem Gold agarose). Pluggarna och två markörer, som användes för att underlätta avläsningen, göts in i gelen och sedan placerades den i en Pharmacia Gene Navigator alternativt BioRad-Chef Mapper. Processen utfördes vid 200V i en lösning av cirkulerande 0.5xTBE, under 24 timmar.

Gelen färgades slutligen med etidiumbromidlösning i 20-30 minuter och sköljdes i 0.5xTBE under 60-90 minuter. Både färgning och sköljning gjordes i skakinkubator. Den färgade gelen fotograferades sedan över en illuminator med UV-ljus (våglängd 312nm).

**Tabell 1.** a. Isolerade vid anrikningsförfarandet, b: isolerade vid kvantifieringen

Lax nr	Rökeri	Packdag	Bäst före	Hållbarhet	Sort	Inköpsställe	Pos/neg	PFGE-typ	Typade isolat	Kvantifiering
1	A	20020729	20020819	22 d	gravad	O, Malmö	neg			
2	A	20020731	20020821	22 d	kallrökt	O, Malmö	pos	1/2:9 <sup>a</sup>	sex	<10/g
3	B	20020722	20020821	31 d	gravad	P, Malmö	neg			
4	B	20020718	20020822	36 d	kallrökt	Q, Malmö	pos	1/2:17 <sup>a</sup>	fem	<10/g
5	A	20020802	20020823	22 d	kallrökt	O, Malmö	neg			
6	B	20020722	20020826	36 d	kallrökt	R, Malmö	pos	1/2:4 <sup>a</sup>	fem	<10/g
7	G	20020729	20020826	29 d	kallrökt	S, Stockholm	neg			
8	H	20020729	20020828	31 d	kallrökt	S, Stockholm	neg			
9	D	20020801	20020825	25 d	gravad	T, Lund	pos	1/2:22 <sup>a,b</sup>	tretton	80/g
10	F	20020809	20020830	22 d	kallrökt	U, Lund	neg			
11	I	20020806	20020905	31 d	kallrökt	V, Lund	neg			
12	A	20020819	20020909	22d	varmrökt	X, Lund	neg			
13	A	20020819	20020909	22 d	gravad	X, Lund	neg			
14	C	20020811	20020910	31d	gravad	U, Lund	neg			
15	C	20020819	20020910	22 d	kallrökt	U, Lund	neg			
16	B	20020812	20020911	31 d	gravad	U, Lund	neg			
17	F	20020821	20020911	21 d	gravad	U, Lund	neg			
18	A	20020823	20020913	22 d	gravad	X, Lund	neg			
19	B	20020812	20020916	36 d	kallrökt	U, Lund	neg			
20	A	20020827	20020917	22 d	kallrökt	U, Lund	neg			
21	A	20020827	20020917	22 d	gravad	U, Lund	neg			
22	D	20020822	20020921	31d	kallrökt	T, Lund	neg			
23	B	20020823	20020928	37 d	gravad	U, Lund	neg			
24	A	20020909	20020930	22 d	gravad	X, Lund	pos	1/2:9 <sup>a,b</sup>	tio	2000/g
25	A	20020909	20020930	22 d	gravad	O, Malmö	pos	1/2:9 <sup>a,b</sup>	elva	4000/g
26	A	20020909	20020930	22 d	kallrökt	O, Malmö	pos	1/2:9 <sup>a,b</sup>	sju	20/g
27	A	20020910	20021001	22 d	kallrökt	U, Lund	neg			
28	A	20020910	20021001	22 d	gravad	U, Lund	neg			
29	A	20020911	20021002	22 d	gravad	Y, Malmö	neg			
30	A	20020911	20021002	22 d	kallrökt	Y, Malmö	pos	1/2:9 <sup>a,b</sup>	åtta	30/g
31	B	20020905	20021005	31 d	gravad	P, Malmö	neg			
32	D	20020911	20021006	26 d	gravad	T, Lund	neg			
33	A	20020916	20021007	22 d	kallrökt	X, Lund	pos	1/2:9, 1/2:12 <sup>a</sup>	fem	<10/g
34	B	20020905	20021010	36 d	kallrökt	P, Malmö	neg			
35	D	20020911	20021011	31 d	kallrökt	T, Lund	neg			
36	B	20020909	20021014	36 d	kallrökt	U, Lund	neg			18
37	B	20020912	20021017	36 d	kallrökt	R, Malmö	neg			
38	C	20020912	20021019	31 d	gravad	R, Malmö	neg			
39	E	20020913	20021004	21 d	kallrökt	Z, Uppsala	neg			
40	E	20020913	20021004	21 d	gravad	Z, Uppsala	pos	1/2:13, LyX <sub>1</sub> , LyX <sub>1b</sub> <sup>a</sup>	fem	<10/g



## Resultat

Se Tabell 1, sidan 17.

Tio laxar av 39 analyserade, det vill säga 26%, var positiva på *Listeria monocytogenes*. Av de 35 laxar som köptes in i Skåne var 9 positiva, alltså också 26%. De två laxarna som var inköpta i Stockholm var negativa och av de två som var köpta i Uppsala var en positiv och en negativ. Den varmrökta makrillen var negativ.

Av de analyserade laxarna var 18 gravade och av dem var fyra, det vill säga 22%, positiva. Av de 21 kallrökta laxarna var alltså sex stycken, 29%, positiva på *L. monocytogenes*.

Alla laxarna analyserades på ”bäst-före-dag” utom nummer 9, som analyserades fem dagar efter ”bäst-före”. Kvantifiering utfördes enligt beskrivning på sidan 13. I de fall det inte växte något vid kvantifieringen angavs antalet *L. monocytogenes* till <10/gram (lax nummer 2, 4, 6, 33, 40).

### Kvantifieringen

Den gräns som Livsmedelsverket fastställt för hur mycket *L. monocytogenes* det får finnas i ett tjänligt livsmedel, ligger på 100 CFU (Colony Forming Units) per gram. Gränsen överskreds i två av de undersökta laxarna, nummer 24 och 25. Båda laxarna var av samma märke men inköpta i olika butiker, de var tillverkade samma dag och båda var gravade. För en lax, nummer 9, låg antalet *L. monocytogenes* på 80 per gram. Två av de positiva proverna låg på 20 (Lax 26) respektive 30 (Lax 30) *L. monocytogenes* per gram medan övriga positiva prover hade under 10 listeria per gram (se Tabell 1).

### Typningen

Den enda funna serogruppen i laxproverna var 1/2. I de flesta proverna hittades bara en *L. monocytogenes*-typ. Lax nummer 33 innehöll dock två olika typer och lax nummer 40 innehöll tre olika. Ju fler isolat som karakteriseras desto större är chansen att alla, i provet förekommande, typer identifieras. I våra analyser har i genomsnitt 7,5 isolat från varje prov typats (se Tabell 1).

## Diskussion

Under åren 1999-2001 låg antalet listeriosfall i Skåne högt över riksgenomsnittet. Sammanlagt 32 fall av invasiv listerios rapporterades i Skåne under den här tiden och i nio av fallen, det vill säga 28%, rörde det sig om *L. monocytogenes* typ 1/2:4. Typ 1/2:4 isolerades också i en av de skånska laxarna som ingick i vår analys. Man

kan alltså misstänka att åtminstone nio av listeriosfallen mellan 1999 och 2001 kan ha orsakats av vakuumpförpackad lax. Föreliggande arbete påbörjades efter perioden 1999-2001 och man kan därför inte veta exakt vilka typer som förkom i laxprodukterna vid den tiden. Numera har antalet fall i Skåne minskat till normal nivå.

Samtliga av typerna som isolerades i de skånska laxproverna har tidigare isolerats från olika patienter som insjuknat i listerios i Sverige från millennieskiftet till och med november 2002. Institutionen för livsmedelshygien fick under den här perioden in 121 humanisolat från hela landet. I 14 av de svenska fallen isolerades *L. monocytogenes* typ 1/2:4, i fem fall isolerades 1/2:9, i tre fall 1/2:17 och i ett fall 1/2:22. De typer som isoleras från vakuumpförpackad lax inköpt i Skåne vid den här undersökningen, har alltså tidigare totalt isolerats vid 23 fall av human listerios i Sverige. Om man inkluderar de typer som hittades i den positiva laxen som köpts in i Uppsala, blir det totalt 26 humanfall.

När Livsmedelsverket genomförde sitt riksomfattande listeriaprojekt 2001, kom de fram till att 7% av proverna på rökt och gravad fisk var positiva (SLV, 2002). I våra analyser på laxar inköpta enbart i Skåne har vi kommit fram till att 26% av proverna var positiva. Varför är skillnaden så stor? Kanske beror det till viss del på att Livsmedelsverket i sin undersökning inkluderade varmrökt fisk. Den innehåller mer sällan *L. monocytogenes* än kallrökt och gravad. Dessutom ingick, förutom lax, även andra sorters fisk i Livsmedelsverkets undersökning. Man får dock, vid jämförelse av resultaten, intryck av att vakuumpförpackad fisk inköpt i Skåne oftare innehåller *L. monocytogenes* än fisk från övriga landet.

I tidigare undersökningar har det visats att gravad lax oftare innehåller listeria än kallrökt (Loncarevic, 1996; SLV, 2002). I min undersökning innehöll 22% av de gravade och 29% av de kallrökta laxarna *L. monocytogenes*. Dock ingår så få laxar i undersökningen att man inte här generellt kan uttala sig om vilken av produkterna som oftast är positiv. De två laxarna som innehöll mest *L. monocytogenes* var gravade och av samma märke. Lax nummer 24 innehöll 2000 CFU/gram och lax nummer 25 innehöll 4000 CFU/gram. Det är en så hög halt att det skulle kunna ge sjukdom hos en känslig individ.

Lax nummer 9 innehöll 80 *L. monocytogenes* per gram. Detta var dock den lax som analyserades fem dagar efter ”bäst-före-dag” och antalet bakterier på ”bäst-före-dagen” har antagligen varit lägre. Laxen köptes i affär fyra dagar efter ”bäst-före-dag”. En ouppmärksam konsument skulle alltså ha kunnat köpa och äta av laxen. Dock var konsistensen sådan att det inte verkar troligt att någon skulle ha ätit av den.

## **Slutsats och rekommendationer**

Att flera av *L. monocytogenes*-klonerna som hittats i de analyserade laxarna också isolerats från människor, tyder på att kallrökt och gravad lax kan ha varit smittkällan vid flera av de humana listeriosfallen. Människor, framför allt de som tillhör riskgrupperna, bör informeras om riskerna med att äta vakuumpförpackad kallrökt och gravad lax. Affärsinnehavare bör kontrollera ”bäst-före-märkningen” och plocka bort för gamla varor från hyllorna så att de inte kommer ut till konsumenter.

Det är svårt att helt eliminera *L. monocytogenes* från mat utan att använda värmebehandling. Eftersom gravad och kallrökt lax är så kallad ”ätfärdig” mat, som inte ska värmebehandlas, är det viktigt att laxen från början är fri från listeria. Kontamination under tillverkningsprocessen måste undvikas eftersom det inte finns något senare steg som eliminerar bakterien. Man bör kunna kräva att alla producenter av kallrökt och gravad lax har kunskaper om listeria och att adekvata åtgärder sätts in när problem uppstår. Till exempel bör man känna att *L. monocytogenes* kan kolonisera golvbrunnar och saltningsmaskiner i en produktionsanläggning och att det då kan krävas en omfattande sanering för att få bort bakterien. Kanske behövs det hjälp från utomstående rådgivare och kontrollanter för att komma till rätta med problemen som finns i vissa anläggningar. Mer forskning behövs kring på vilket sätt listeria kommer in i fabriken. Detta för att man ska kunna få ner förekomsten i fabriksmiljön och därmed mängden bakterier i produkten.

## **Tillkännagivande**

Jag vill tacka min handledare Wilhelm Tham för han bidragit med så mycket hjälp och entusiasm!

Dessutom vill jag tacka Seved Helmersson, Lise-Lotte Fernström och alla andra på Institutionen för livsmedelshygien för hjälp och trevligt samarbete.

## Referenser

- Alsén-Eklöf, E. 2000. EG-reglering på gång, *Listeria* allt vanligare i färdigmat. *Livsmedelsteknik*, (11/00): 12-13.
- Autio, T., Hielm S., Miettinen M., Sjöberg A.-M., Aarnisalo K., Björkroth J., Mattila-Sandholm T. och Korkeala H. 1998. Sources of *Listeria monocytogenes* Contamination in a Cold-Smoked Rainbow Trout Processing Plant Detected by Pulsed-Field Gel Electrophoresis Typing. *Applied and Environmental Microbiology*, **65**:150-155.
- Bridson, E.Y., 1998. *Oxoid – The Manual*. 8:e upplagan. Oxoid Ltd. Basingstoke, Hampshire, England. 2-127 – 2-128, 2-132 – 2-133.
- Carter, G.R., Chengappa, M.M och Roberts, A.W. 1995. *Essentials of Veterinary Microbiology*. 5:e upplagan. Williams & Wilkins. USA. 127-130.
- Ericsson, H., Eklöw A., Danielsson-Tham, M.-L., Loncarevic, S., Mentzig, L.-O., Persson, I., Unnerstad, H., och Tham, W. 1997. An Outbreak of Listeriosis Suspected To Have Been Caused By Rainbow Trout. *Journal Of Clinical Microbiology*, 1997, **35**, (11): 2904-2907.
- Huss, H.H., Vigel Jörgensen, L. och Fønnesbech Vogel, B. 2000. Control options for *Listeria monocytogenes* in seafoods. *International Journal of Food Microbiology* **62**, 2000: 267-274.
- Jones, E.M., McCulloch, S.Y., Reeves, S.D. och MacGowan, A.P. 1994. A 10 year survey of the epidemiology and clinical aspects of listeriosis in a provincial English city. *Journal of Infection*, 1994, **29**, 91-103.
- Junttila, J.R., Niemelä, S.I. och Hirn, J. 1988. Minimum growth temperatures of *Listeria monocytogenes* and non-haemolytic listeria. *Journal of Applied Bacteriology* 1988, **65**: 321-327.
- Lindqvist, R. och Westöö, A. 2000. Quantitative risk assessment for *Listeria monocytogenes* in smoked or gravad salmon and rainbow trout in Sweden. *International Journal of Food Microbiology* **58**, 2000: 181-196.
- Linnan, M.J., Mascola, L., Dong Lou, X., Goulet, V., May, S., Salminen, R.N., Hird, D.W., Yonekura, M.L., Hayes, P., Weaver, R., Audurier, A., Plikaytis, B.D., Fannin, S.L., Kleks, A. och Broome, C.V. 1988. Epidemic listeriosis associated with Mexican-style cheese. *New England Journal Of Medicine*, 1988, **319**, (13): 823-828.
- Loncarevic, S., Tham, W. och Danielsson-Tham, M.-L. 1996. Prevalence of *Listeria monocytogenes* and other *Listeria* spp in smoked and "gravad" fish. *Swedish University of Agricultural Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Food Hygiene. Acta vet. scand.* **37**, (1): 13-18.
- McLauchlin, J. 1989a. Human listeriosis in Britain, 1967-85, a summary of 722 cases. 1. Listeriosis during pregnancy and in the newborn. *Epidemiol. Infect.* 1990, **104**: 181-189.
- McLauchlin, J. 1989b. Human listeriosis in Britain, 1967-85, a summary of 722 cases. 2. Listeriosis in non-pregnant individuals, a changing pattern of infection and seasonal incidence. *Epidemiol. Infect.* 1990, **104**: 191-201.
- Miettinen, M.K., Siitonen, A., Heiskanen, P., Haajanen, H., Björkroth, K.J. och Korkeala, H.J. 1999. Molecular Epidemiology of an Outbreak of Febrile Gastroenteritis Caused by *Listeria monocytogenes* in Cold-Smoked Rainbow Trout. *Journal of Clinical Microbiology*. 1999, **37**, (7): 2358-2360.
- NMKL. 1999. Nordiska kommittén för Livsmedelsanalyser. No 136, 9 sidor.
- Rocourt, J. och Cossart, P. 1997. *Listeria monocytogenes. Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers*. Doyle, M.P., Beauchat, L.R. och Montville, T.J. (Ed.) American Society for Microbiology. Washington DC, USA. 337-352.
- Rocourt, J., Jacquet, Ch. och Reilly, A. 2000. Epidemiology of human listeriosis and seafoods. *International Journal of Food Microbiology*, **62**, 2000: 197-209.
- Rörvik, L.M. 2000. *Listeria monocytogenes* in the smoked salmon industry. *International Journal of Food Microbiology* **62**, 2000: 183-190.
- Rörvik, L.M., Aase, B., Alvestad, T. och Caugant, D.A. 2000. Molecular Epidemiology Survey of *Listeria monocytogenes* in Seafoods and Seafood-Processing Plants. *Applied and Environmental Microbiology*. 2000, **66**, (11): 4779-4784.

- Seeliger, H.P.R. och Jones, D. (Ed) 1986. *Bergey's manual of systematic bacteriology*, vol 2. Williams & Wilkins. Baltimore, USA. 1235-1245.
- SLV. 2002. Nyhetsbrev nr 4 från Riksprojektet Listeria, juli 2002.
- Tham, W., Ericsson, H., Loncarevic, S., Unnerstad, H. och Danielsson-Tham, M.-L. 2000. Lessons from an outbreak of listeriosis related to vacuum-packed gravad and cold-smoked fish. *International Journal of Food Microbiology*, 62, 2000: 173-175.
- Tham, W., Detmer, A., Ericsson, H., Forsberg, P., Helmersson, S., Mandorf, E., Netterby, T., Tjernberg, I. och Danielsson-Tham, M.-L. 2002. Increased number of listeriosis cases in southern Sweden associated with consumption of vacuum-packaged cold-smoked and/or gravad rainbow trout. Manuskript.



