

MTT RAPORTTI 169

***Listeria monocytogenes* -patogeenin tunnistusmenetelmiä elintarviketuotannossa**

Anna-Liisa Välimaa, Anu Tilsala-Timisjärvi ja Elina Virtanen



***Listeria monocytogenes*
-patogeenin tunnistusmenetelmiä
elintarviketuotannossa**

Anna-Liisa Välimaa, Anu Tilsala-Timisjärvi ja Elina Virtanen



ISBN: 978-952-487-576-9 (Verkojulkaisu)

ISSN: 1798-6419 (Verkojulkaisu)

URN: <http://urn.fi/URN:ISBN:978-952-487-576-9>

<http://www.mtt.fi/mtraportti/pdf/mtraportti169.pdf>

Copyright: MTT

Kirjoittajat: Anna-Liisa Välimaa, Anu Tilsala-Timisjärvi ja Elina Virtanen

Julkaisija ja kustantaja: MTT Jokioinen

Julkaisuvuosi: 2014

Kannen kuva: A. Dowsett, Public Health England / Science Photo Library / MVphotos

Listeria monocytogenes -patogeenin tunnistusmenetelmiä elintarviketuotannossa

Anna-Liisa Välimaa, Anu Tilsala-Timisjärvi ja Elina Virtanen

MTT, Biotekniikka- ja elintarviketutkimus, Paavo Havaksen tie 3, 90014 Oulun yliopisto, anna-liisa.valimaa@mtt.fi

Tiivistelmä

Elintarvikkeet ovat sairautta aiheuttavien mikrobien, kuten bakteerien ja virusten merkittäviä tartuntalähhteitä. Erityisesti eläinten ja ihmisten välillä tarttuvat zoonoottiset bakteerit, kuten *Campylobacter jejuni*, *Salmonella enterica*, *Listeria monocytogenes* ja *Escherichia coli* O157:H7 sekä muut shigatoksiinia tuottavat *E.coli* -kannat ja *Vibrio* spp., ovat aiheuttaneet eniten elintarvikevälitteisiä epidemioita kahdenkymmenen viime vuoden aikana. Epidemioiden uhka kasvaa, kun kansainvälinen elintarvikekauppa lisääntyy, ruokailutottumukset muuttuvat ja tuotanto keskittyy yhä suurempiin laitoksiin. Elintarviketurvallisuuden kannalta on tärkeää havaita terveystvaarat nopeasti ja reagoida niihin jo elintarvikkeiden tuotantovaiheessa.

Elintarvikepatogeenien mikrobiologiset testit ovat merkittävässä roolissa ruokaketjun turvallisuuden varmistamisessa. Perinteiset viralliset määrittämenetelmät ovat kuitenkin työläitä, ja tuloksen saamiseen voi kulua jopa viikko bakteerilajista riippuen. Siksi viljelymenetelmien rinnalle on kehitetty immunologiaan ja molekyylibiologiaan perustuvia pikamenetelmiä. Vaikka itse määrittäystulos saadaan minuuteissa tai tunneissa, tarvitaan edelleen jonkinasteisia aikaa vieviä näytteen esikäsitely- ja rikastusvaiheita.

L. monocytogenes on patogeeni, joka voi elää useissa isäntäeliöissä ja elinympäristöissä. Se voi aiheuttaa vakavan sairauden, listerioosin, joka on neljänneksi yleisin elintarvikeperäinen tauti Suomessa. *L. monocytogenes* voi esiintyä kypsentämättömissä ja prosessoituissa elintarvikkeissa, jotka ovat kontaminoituneet prosessoinnissa tai sen jälkeen. Patogeeni sietää pH- ja suolaaäriolosuhteita ja lisääntyy jääkaappilämpötilassa, hapellisissa ja hapettomissa olosuhteissa. Elintarviketuotannolle ongelmallinen bakteeri edellyttääkin valvontaa ruokaketjussa.

Tässä tarkastellaan elintarvikediagnostiikassa käytettyjä *L. monocytogenes* -bakteerin osoitusmenetelmiä, erityisesti viljelymenetelmille vaihtoehtoisia pikamenetelmiä, joiden soveltuvuutta on tutkittu kontaminoituneilla elintarvikenäytteillä. Virallisesti validoitujen kaupallisten menetelmien lisäksi esimerkkejä on koottu kirjallisuudesta. Tavoitteena on esittää yhteenveto nopeista (< 2 vrk) menetelmistä *L. monocytogenes* -bakteerien havaitsemiseksi. Lopuksi kerrotaan lyhyesti elintarviketeollisuuden käyttämistä tunnistusmenetelmistä.

Avainsanat:

elintarvikediagnostiikka, *Listeria monocytogenes*, pikamenetelmä, validoidut ja validoimattomat menetelmät

Analysis methods for the food borne pathogen *Listeria monocytogenes*

Anna-Liisa Välimaa, Anu Tilsala-Timisjärvi ja Elina Virtanen

MTT, Biotekniikka- ja elintarviketutkimus, Paavo Havaksen tie 3, 90014 Oulun yliopisto, anna-liisa.valimaa@mtt.fi

Abstract

Food is an important source of microbes, such as bacteria and viruses that causes foodborne diseases. Particularly zoonotic bacteria, such as *Campylobacter jejuni*, *Salmonella enterica*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157:H7 and other shiga-toxin producing *E. coli* –strains, and *Vibrio* spp. are the pathogens that have caused the majority of food borne diseases during the last twenty years.

Microbial pathogen tests have an important role in assuring food safety in the food chain. However, traditional official methods are laborious and time-consuming. Therefore, immunology and molecular biology based rapid methods have been developed in order to get results quickly. Although the detection result is achieved in hours or even in minutes, pre-analytical sample processing is still needed to some extend.

L. monocytogenes is a pathogen that is able to live and survive in different host animals and environments. It can cause a severe illness, called listeriosis which is among the four main food borne illnesses in Finland. *L. monocytogenes* can be found in uncooked and processed food that is contaminated during or after processing. The pathogen can tolerate a wide range of pH and salt content. Additionally, it can multiply in refrigerate temperature and in anaerobic and aerobic conditions. For these reasons, this challenging bacterium has to be monitored in the food chain.

In this article, the analysis methods for *L. monocytogenes* are reviewed. In particular, the focus is in alternative rapid methods by which the results can be obtained in < 2 days and that have been tested with contaminated food items. Both officially validated tests and selected examples described in the literature will be presented. Additionally, the analysis methods used in food industry will be discussed briefly.

Keywords:

food diagnostic, *Listeria monocytogenes*, rapid methods, validated and non-validated methods

Sisällysluettelo

1 Johdanto	6
2 <i>Listeria monocytogenes</i>	7
2.1 <i>Listeria monocytogenes</i> -bakteerin ominaispiirteitä	7
2.2 Listerioosi	8
3 <i>Listeria monocytogenes</i> -bakteerin määritysvaatimukset elintarvikelainsäädännön mukaan	9
4 Mikrobiologisia menetelmiä elintarvikkeiden <i>L. monocytogenes</i> -diagnostiikassa	10
4.1 Viljelymenetelmät	10
4.2 Vaihtoehtoisia tai pikamenetelmiä	11
4.2.1 Immunomääritysmenetelmät	11
4.2.2 Molekulaariset menetelmät / Nukleiinihappojen monistusmenetelmiä	12
4.2.3 Molekulaaristen, immunologisten ja perinteisten menetelmien vertailu	15
4.2.4 Biosensori	16
4.3 Kaupallisesti saatavilla olevia nopeita validoituja ja validoimattomia tunnistusmenetelmiä	18
5 Elintarviketeollisuuden käyttämiä tunnistusmenetelmiä	20
6 Tulevaisuuden näkymiä	21
7 Yhteenveto	22
8 Lähdeluettelo	23

1 Johdanto

Elintarvikkeet ovat merkittäviä sairautta aiheuttavien mikrobien, kuten bakteerien, virusten ja loisten, tartuntalähteitä. Taudit vaihtelevat miedosta ripulista vakaviin, jopa kuolemaan johtaviin sairauksiin. Yksinomaan ripulisairauksiin, joista huomattava osuus on elintarvikevälitteisiä, kuolee 2,2 miljoonaa ihmistä maailmassa vuosittain (WHO).

Zoonoosien - eläinten ja ihmisten välillä tarttuvien tautien - määrää on vaikea ennustaa, mutta muun muassa seuraavat seikat voivat vaikuttaa elintarvikeperäisten sairauksien esiintymiseen (Newell ym. 2010):

- nopea väestön ja sen vanhenevan osuuden kasvu
- maailmanlaajuisesti kasvava vihannesten, hedelmien, lihan, etnisen ruuan ja eläinten kauppa sekä ruuan alkuperä maista, joissa ei ole kunnollista mikrobiologisen turvallisuuden järjestelmää
- kuljetuslogistiikan ja -olosuhteiden paraneminen, mikä mahdollistaa kontaminanttien säilymisen elin-kykyisinä kuluttajalle asti
- ihmisten ja samalla heidän sisäisen mikrobistonsa lisääntyvä liikkuminen paikasta toiseen
- ruokailutottumusten muuttuessa syödään raakaa tai vähän kypsennettyjä ruokia tai halutaan eksoottisia ruokia, esimerkiksi villieläinten lihaa
- talouden kasvaessa siirtyminen yhä proteiinipitoisempiin ruokiin, mikä tarkoittaa suurempaa riippuvuutta liha- ja kalatuotteista
- yhä suurempi määrä ihmisiä, joiden vastustuskyky on alentunut, kuten vanhukset ja immuunipuutospotilaat (sairauden tai hoidon vuoksi)
- viljelykäytäntöjen muutos: siirtyminen tehotuotantoon tai luomueläintuotantoon
- ihmisen tunkeutuminen villieläinten luontaisille asuinalueille
- ilmastonmuutos, esimerkiksi uusien mikrobikantajien ilmaantuminen lauhkeille alueille.

Väestön sairastumisesta zoonooseihin seuraa yhteiskunnalle suoria ja välillisiä kustannuksia, joita aiheuttavat tartuntojen ehkäisy ja hoito, mahdollisten muiden torjuntaohjelmien kulut, sairastuneiden toimintakyvyn äkillinen tai krooninen heikkeneminen, sairauspoissaolot sekä ennenaikaiset kuolemat (MMM 2013). USA:ssa on arvioitu 13 merkittävimmän elintarvikevälitteisen taudinaiheuttajan aiheuttamiin sairastumisiin liittyvien kustannusten olevan yhteensä noin 31,2 miljardia dollaria vuodessa. Kustannuksiltaan kalleimmat taudinaiheuttajat olivat salmonella, kampilobakteeri, norovirus, toksoplasma ja listeria. (Byrd-Bredbenner ym. 2013). Suomessa ei ole tehty kattavaa terveystaloudellista arviointia minkään zoonoosin osalta (MMM 2013).

Listeria monocytogenes on yksi vaarallinen zoonoottinen bakteeri; sen esiintyvyys esimerkiksi salmonellaan verrattuna on vähäinen, mutta kuolleisuus sen aiheuttamaan listerioosiin on korkea. Esimerkiksi vuonna 2011 Euroopan Unionin (EU) alueella *L. monocytogenes* aiheutti 1 476 sairastapausta, ja kuolleisuus oli korkea, 12,7 %. (EFSA 2013).

L. monocytogenes voi esiintyä kypsentämättömissä ja prosessoituissa elintarvikkeissa, jotka ovat kontaminoituneet prosessoinnissa tai sen jälkeen. Patogeeni sietää pH- ja suolaääriolosuhteita ja lisääntyy jääkaappilämpötilassa, hapellisissa ja hapettomissa olosuhteissa. Edellä mainittujen ominaisuuksien vuoksi *L. monocytogenes* -bakteeri muodostaa elintarviketurvallisuusriskin, joten sen valvonta ruokaketjussa listerioosiepidemioiden ehkäisemiseksi on erittäin tärkeää.

L. monocytogenes -bakteerin analysoimiseksi on kehitetty lukuisia teknologioita. Tässä tarkastellaan elintarvikediagnostiikassa käytettyjä *L. monocytogenes* -bakteerin osoitusmenetelmiä, erityisesti viljelymenetelmille vaihtoehtoisia pikamenetelmiä, joiden soveltuvuutta on tutkittu kontaminoituneilla elintarvikenäytteillä. Virallisesti validoitujen kaupallisten menetelmien lisäksi esimerkkejä on koottu kirjallisuudesta. Tavoitteena on esittää yhteenveto nopeista (< 2 vrk) menetelmistä *L. monocytogenes* -bakteerien havaitsemiseksi. Lopuksi kerrotaan lyhyesti elintarviketeollisuuden käyttämistä tunnistusmenetelmistä.

Tutkimus on tuotettu Pohjois-Pohjanmaan liiton myöntämällä Euroopan aluekehitysrahoituksella [Food Safety Cluster (FSC) –projekti, A31588].

2 *Listeria monocytogenes*

2.1 *Listeria monocytogenes* -bakteerin ominaispiirteitä

Listeria-suku koostuu seuraavista lajeista: *L. monocytogenes*, *Listeria ivanovii*, *Listeria innocua*, *Listeria welshimeri*, *Listeria seeligeri*, *Listeria grayi*, *Listeria marthii* (Graves ym. 2010), *Listeria rocourtae* (Leclercq ym. 2010) ja uusimmista lajeista *Listeria fleichmannii* (Bertsch ym. 2013), *Listeria weihenstephanensis* (Halter ym. 2013) sekä *Listeria floridensis*, *Listeria aquatic*, *Listeria cornellensis*, *Listeria riparia* ja *Listeria grandensis* (den Bakker ym. 2014). Näistä *L. monocytogenes* on ihmisille patogeeninen (Graves ym. 2010).

L. monocytogenes -bakteeria esiintyy lähes kaikkialla elinympäristössämme (maassa, vedessä, kasveissa ja rehuissa) sekä myös eläinten ja ihmisten suolistoissa. *L. monocytogenes* voi selviytyä ja kasvaa laajalla lämpötila-, pH- ja vesiaktiivisuusalueella sekä hapellisissa, vähähappisissa ja hapettomissakin olosuhteissa (taulukko 1). Optimaalinen pH-alue on 6–8. *Listeria* voi kasvaa melko ”kuivissa” olosuhteissa; vesiaktiivisuusalueella (a_w) <0,92 (Hallanvuo & Johansson 2010). Bakteerit, kuten muutkin mikrobit, tarvitsevat vettä elääkseen ja lisääntyäkseen. Liuoksen vesiaktiivisuus (a_w) tarkoittaa liuoksen höyryn paineen osuutta puhtaan veden höyryn paineesta samassa lämpötilassa, ja se kuvaa mikrobin käytettävissä olevan vapaan veden määrää. Puhtaan veden a_w -arvo on 1,00 ja esimerkiksi 22 %:n NaCl-liuoksen a_w -arvo on 0,86 (Salkinoja-Salonen 2002). Lisäksi se voi kasvaa noin 20 % suolapitoisuudessa ja sietää jopa 25 % suolapitoisuuksia (Hallanvuo & Johansson 2010).

L. monocytogenes -bakteerin selviytymiskyky monenlaisissa ympäristön ääriolosuhteissa luo valmisruoka- ja elintarviketeollisuudessa yleensäkin suuria haasteita sen esiintyvyyden torjunnassa. Se voi kasvaa jopa -0,4 °C:ssa eikä siten tuhoutu jääkaappilämpötilassa. Lisäksi erityisen ongelmallista on *L. monocytogenes* -bakteerin biofilmin muodostamiskyky ja fakultatiivinen anaerobinen ominaisuus. *L. monocytogenes* nimittäin pystyy tarttumaan monenlaisiin elintarvikkeiden kanssa kosketuksissa oleviin pintoihin, kuten ruostumattomaan teräkseen, lasiin, graniittiin ja polypropyleeniin (Silva ym. 2008) muodostaen biofilmejä. Biofilmin sisällä bakteeri on suojassa mm. pesu- ja desinfektioaineiden vaikutuksilta ja voi siten tuhoutumatta kestää näiden aineiden korkeita pitoisuuksia (Hall-Stoodley ym. 2004; Carpentier & Cerf 2011) sekä muodostaa pysyviä, edelleen taudinaiheuttamiskykyisiä kantoja, jotka voivat siirtyä pinnoilta elintarvikkeeseen. Esimerkiksi kalanjalostustehtaasta löytyneen kannan on todettu säilyneen 2–6 kuukautta (Norton ym. 2001) ja jäätelön pakkauskoneesta löytyneen kannan 7 vuotta (Miettinen ym. 1999). *L. monocytogenes* -bakteeri pystyy myös kasvamaan suojakaasupakkauksissa; itse asiassa suojakaasupakkaaminen saattaa lisätä sen kasvua leikatuiissa tuoretuotteissa (Francis & O'Beirne 1997). Edellä mainittujen ominaisuuksien vuoksi *L. monocytogenes* -bakteeri muodostaa elintarviketurvallisuusriskin, joten sen valvonta elintarviketuotannossa listerioosi-epidemioiden ehkäisemiseksi on erittäin tärkeää.

Taulukko 1. *L. monocytogenes* -bakteerin kasvuvaatimukset (lämpötila, pH, veden aktiivisuus (a_w), NaCl:n sieto, hapen tarve) sekä esiintyvyys ja luonnolliset kantajat (koottu ja muotoiltu lähteestä Hallanvuo & Johansson 2010).

Lämpötila		pH	(a_w) minimi	NaCl %, estää kasvun	Hapen tarve, tuhoutuminen	Esiintyvyys, luonnolliset kantajat
Kasvu-alue °C	Optimi °C	Kasvu-alue				
-0,4–44	35–37	4,1–9,6	<0,92	>10,0 %	- kasvaa hapellisissa, vähähappisissa ja hapettomissa olosuhteissa - lisääntyy jääkaappilämpötilassa - säilyy pakastetuissa ja kuivatuissa elintarvikkeissa pitkiä aikoja, jopa vuosia - tuhoutuu pastörintilämpötilassa (72 °C)	- esiintyy maassa, vedessä, kasveissa, rehuissa sekä eläinten ja ihmisten suolistossa

2.2 Listerioosi

Ensimmäinen hyvin dokumentoitu elintarvikeperäinen listerioositapaus raportoitiin Kanadassa 1983 (Schlech ym. 1983). Sen aiheutti kaalisalaatti. Kasvisperäinen oli myös vakavin viimeaikaisista epidemi- oista, joka tapahtui USA:ssa vuonna 2011 aiheuttaen 146 vakavaa sairautta, keskenmenon ja 30 kuole- mantapausta (Laksanalamai ym. 2012). Myös Suomessa on raportoitu elintarvikevälikkeisiä listerioosi- epidemioita, viimeksi vuonna 2012. Yksittäistapauksia sen sijaan esiintyy vuosittain noin 40–70 (Tartun- tatautirekisterin tilastotietokanta). Euroopassa listerioosin keskimääräinen ilmaantuvuus on 0,3/100 000 asukasta, mutta Suomessa sitä on esiintynyt keskimääräistä enemmän, viime vuosina 0,8–1,4/100 000 (Markkula 2013). Zoonosikeskuksen mukaan listerioosi on Suomen neljänneksi yleisin elintarvikeperäi- nen tauti. Kuolleisuus on suuri, sillä sairastuneista jopa neljäsosa menehtyy (THL).

L. monocytogenes voi päätyä elintarvikeketjuun joko suoraan ympäristöstä tai tuotantoeläinten välityk- sellä (zoonoosi) (Gahan & Hill 2014). Listerioosi voi esiintyä vakavana (invasiivinen muoto) tai lievänä. Taudin ominaisuuksia on esitetty taulukossa 2. Vaarallisin listerioosi on riskiryhmille, kuten vastustusky- vyltään heikentyneille ihmisille, vanhuksille, raskaana oleville ja vastasyntyneille. Terveille henkilöille se aiheuttaa tavallisesti vatsataudin. Taudin itämisaika on 1–70 vuorokautta potilaan terveydentilasta riippu- en (Linnan ym. 1988). Lievässä muodossa itämisaika on noin 1 vuorokausi (Aureli ym. 2000).

Sairaus aiheuttaa menetettyjen ihmishenkien lisäksi merkittäviä taloudellisia tappioita, kun huomioidaan terveydenhoitokulut ja menetetty tuottavuus. Elintarviketeollisuudelle aiheutuu huomattavaa taloudellista haittaa tuotteiden takaisinvetojen ja alentuneen myynnin vuoksi.

Taulukko 2. *L. monocytogenes* -bakteerin aiheuttama listerioosi ja sen oireet, tartuntalähteet, infektiivinen annos (pmy = pesäketä muodostava yksikkö), taudin itämisaika ja riskiryhmät (koottu ja muotoiltu lähteestä Hallanvuori & Johansson 2010).

Listerioosi ja sen oireet / Taudin itämisaika	Tartuntalähteet	Infektiivinen annos, pmy	Riskiryhmät ja taudin vaarallisuus
<p>1. listerioosi vakava infektio (invasiivinen muoto):</p> <p>a) raskaana oleva: - kuume ja/tai päänsärky ja/tai lihaskivut ja/tai ripuli, ennenaikainen synnytys, keskenmeno, sikiön kuolema / ei tiedetä</p> <p>b) vastasyntyneen tartunta äidistä synnytyksessä: - verenmyrkytys, keuhkokuume / 1–2 vrk</p> <p>c) sairaalassa toisesta vastasyntyneestä: - aivokalvontulehdus, verenmyrkytys / 5–12 vrk</p> <p>d) muusta syystä heikentynyt vastustuskyky: - oireeton tai lievä sairaus, aivokalvontulehdus, verenmyrkytys / 1 vrk – useita kuukausia</p> <p>2. suolisto-oireet (ei-invasiivinen muoto): - vatsakivut ja/tai pahoinvointi ja/tai ripuli ja/tai kuume ja/tai lihaskivut ja/tai päänsärky tai vain tilapäinen suolistokantajuus / <1 vrk</p>	<p>- sellaisenaan syötävät elintarvikkeet, joilla on pitkä myyntiaika ja joissa <i>Listeria</i> pystyy lisääntymään</p> <p>- erityisesti tyhjiöpakatut, kylmäsavustetut ja graavi-suolatut kalastustuotteet ja maiti</p> <p>- pastöroimaton maito ja siitä valmistetut juustot</p> <p>- pehmeät juustot, kuten home- ja tuorejuustot</p> <p>- leikkeleet ja pateet</p>	<p>Riskiryhmät: <10–10 000 pmy/g</p> <p>Terveet henkilöt: 100 000 – 1 milj. pmy/g</p>	<p>- immuunipuutospotilaat, raskaana olevat, vastasyntyneet ja vanhukset</p> <p>- kuolleisuus 20–30 %</p> <p>- listerioosi on ilmoitettava THL:n tartuntatauti-rekisteriin</p>

3 *Listeria monocytogenes* -bakteerin määritysvaatimukset elintarvikelainsäädännön mukaan

Lainsäädäntö on elintarviketurvallisuuden keskeinen perusta, mutta sitä ei ole harmonisoitu kansainvälisesti. Euroopan unionin (EU) alueella mikrobiologista turvallisuutta koskeva lainsäädäntö on kuitenkin pitkälle yhtenäistetty. EU:ssa mikrobikriteeriasetuksen ((EY)No 2073/2005 muutoksineen elintarvikkeiden mikrobiologisista vaatimuksista) mukaan elintarvikealan toimijat ensisijaisesti vastaavat tuottamiensa tuotteiden mikrobiologisesta turvallisuudesta omavalvonnan avulla. Mikrobikriteeriasetuksessa on asetettu erikseen vaatimukset elintarvikkeiden turvallisuudelle (turvallisuusvaatimus) ja prosessin hygienialle (prosessihygieniavaatimus). Prosessihygieniavaatimusten tarkoituksena on varmistaa, että tuotantoprosessi toimii hyväksyttävästi. Turvallisuusvaatimuksissa tietyille elintarvikepatogeeneille, niiden tuottamille toksiineille tai metaboliiteille on asetettu pitoisuuksien raja-arvot. Turvallisuusvaatimuksia sovelletaan markkinoilla oleviin tuotteisiin niiden myyntiajan loppuun asti kotimaassa valmistettuihin elintarvikkeisiin, toisesta EU-jäsenvaltiosta toimitettuihin ja EU:n ulkopuolisesta maasta tuotuihin elintarvikkeisiin. (Evira 2009).

L. monocytogenes -bakteerin vaatimusten suhteen sellaisenaan syötävät elintarvikkeet jaetaan kolmeen luokkaan: 1) imeväisille ja erityisiin lääkinällisiin tarkoituksiin sellaisenaan syötävät elintarvikkeet, 2) elintarvikkeet, joissa *L. monocytogenes* voi kasvaa ja 3) elintarvikkeet, joissa *L. monocytogenes* ei kasva. Kohdassa 1) mikrobiologinen raja-arvo on: ei todettu / 25 g. Elintarvikkeissa, joissa *L. monocytogenes* voi kasvaa (lämpökäsitellyt ja tyhjiöpakatut tuotteet, joiden myyntiaika on pitkä, sekä kalajalosteet, kypsät, lämpökäsitellyt tuotteet, joita ei käsitellä ennen pakkausta), sallitaan pitoisuus 100 pmy/g, mikäli toimija pystyy luotettavasti osoittamaan, ettei kyseinen pitoisuus ylity myyntiaikana. Sellaisenaan syötäviin elintarvikkeisiin, joissa *L. monocytogenes* ei pysty kasvamaan (stabiloidut tuotteet), raja-arvo on 100 pmy/g. (Evira 2009).

Mikrobikriteeriasetuksessa on määritelty, millä menetelmillä *L. monocytogenes* -bakteerin pitoisuuksia tarkkaillaan omavalvonnassa. Vaihtoehtoina ovat vertailumenetelmä, muut analyysimenetelmät ja vaihtoehtoiset (=pikamenetelmät) menetelmät. Vertailumenetelmät ovat yleensä kansainvälisten standardisointijärjestöjen, kuten CEN- ja ISO -menetelmiä. *L. monocytogenes* -bakteerin vertailumenetelmät ovat ISO 11290-1:1996 ja muutos 1:2004 (kvalitatiivinen) ISO 11290-2:1998 ja muutos 1:2004 (kvantitatiivinen). Vertailumenetelmällä saatua tulosta pidetään oikeana. Muita analyysimenetelmiä voidaan käyttää, mikäli niillä voidaan taata vähintään yhtä hyvä elintarviketurvallisuustaso kuin vertailumenetelmiä käyttämällä. Vaihtoehtoisia menetelmiä voidaan käyttää, mikäli menetelmä on validoitu mikrobikriteeriasetuksen vertailumenetelmää vastaan EN/ISO 16140 -standardin tai muun samanlaisen, kansainvälisesti hyväksytyt protokollan mukaisesti. (Evira 2009).

4 Mikrobiologisia menetelmiä elintarvikkeiden *L. monocytogenes* -diagnoosissa

Mikrobiologisia menetelmiä on ollut käytössä yli 50 vuoden ajan elintarvikeväälitteisten bakteerien havaitsemiseksi elintarvike- ja ympäristönäytteistä. Viljelymenetelmiin perustuvia tekniikoita pidetään yhä kulta-standardina, joiden ominaisuuksien tasolle uusien analysointimenetelmien pitäisi yltää (Dwivedi & Jaykus 2011). Mikrobiologisina analyysimenetelminä voidaan käyttää kvantitatiivisia tai kvalitatiivisia menetelmiä. Kvantitatiivisissa menetelmissä saadaan mikrobien lukumäärä selville, kun taas kvalitatiivisissa menetelmissä osoitetaan niiden läsnäolo tai sen puuttuminen (Jasson ym. 2010). Analyysimenetelmien ja laitteiden kirjo on nykyisin laaja. Tässä yhteydessä keskitytään elintarvikediagnoosissa käytettyihin perinteisiin viljelymenetelmiin sekä immunologisiin ja molekulaarisiin menetelmiin. Menetelmäkuvaukset koostuvat kehitysasteella olevista (kirjallisuudesta löydetty) ja kaupallisista validoituista ja validoimattomista tunnistusmenetelmistä. Lisäksi luodaan katsaus elintarviketeollisuudessa käytössä olevista menetelmistä.

4.1 Viljelymenetelmät

Klassisia osoitusmenetelmiä, jotka nojaavat yleensä rikastus- ja maljaustekniikoihin, käytetään patogeenien läsnä- tai poissaolon testaamiseen tavallisesti 25 g:n elintarvikenäytteessä, ja niiden toteamisraja on noin 1–5 pmy (pesäkettä muodostava yksikkö)/testiannos (Jasson ym. 2010). Mikrobiologiassa toteamisraja (detection limit, LOD) on pienin mikrobipitoisuus, joka voidaan todeta luotettavasti (kvalitatiivisella) menetelmällä; yleensä se on (1-) 5 solua/näytemäärä. Määrittämissä (quantification limit, LOQ) on alhaisin mikrobipitoisuus, joka pystytään menetelmällä määrittämään kvantitatiivisesti.

Viljelymenetelmät ovat perinteisiä kvantitatiivisia menetelmiä ja ne ovat yhä hyväksytyjä virallisina määrittämissä menetelminä. Tulokset ovat luotettavia, mutta niiden saaminen voi kestää jopa (yli) viikon mikrobilajista riippuen. Viljelymenetelmät perustuvat kohdeorganismien moninkertaistamiseen kasvatusliemessä tai -agarissa siten, että lukumäärän kasvu voidaan nähdä sameutena, värinmuutoksena tai laskea pesäkkeinä mikrobikohtaisten inkubointiolosuhteiden jälkeen. (Jasson ym. 2010). Laajimmillaan viljelymenetelmät on suunniteltu havaitsemaan yksittäisiä soluja 10–375 g:n näytteistä. Yleisesti menetelmä koostuu eri vaiheiden sarjasta, jossa tehdään peräkkäin viljelyn rikastukset, valikoiva ja eriyttävä maljaus, varmistukset sekä lajityypitys. Viljelmä rikastetaan esirikastuksessa ja valikoivassa rikastuksessa. (Dwivedi & Jaykus 2011).

Esirikastuksessa elvytetään vaurioituneita soluja ja/tai lisätään kohdeorganismien määrää näytteessä. Elintarvikkeissa olevat mikrobit voivat olla vahingoittuneita erilaisten ympäristötekijöiden vuoksi (kuu-muus, jäätyminen, kuivuminen, suolat, säilöntäaineet) (Wu 2008). Lisäksi elävät bakteerikannat saattavat reagoida ympäristön aiheuttamaan stressiin menemällä tilaan, jossa solut ovat eläviä mutta eivät viljeltävissä. Kun solut elvytetään tästä tilasta, ne tulevat jälleen viljelykelpoisiksi ja infektiokykyisiksi (Oliver 2010). Näin ollen on erittäin tärkeää saada ne näkyviin viljelyn aikana. Esirikastus voi myös laimentaa määrittämissä haittaavia tekijöitä, kuten säilöntäaineita. Lisäksi kuivatuissa tai prosessoiduissa elintarvikenäytteissä olevat solut saavat nestesisältönsä takaisin. Valikoivassa rikastuksessa käytetty erityiskasvualusta lisää kohdeorganismien määrää samalla, kun se vähentää muun mikrobiston kasvumahdollisuuksia. Viljelyn rikastuksessa saadaan kohdeorganismi monistettua miljoonakertaisesti, mikä mahdollistaa sen määrittämissä. (Dwivedi & Jaykus 2011).

Rikastusvaiheiden jälkeen seuraa valikoiva ja erotteliva maljaus esimerkiksi kromogeenisilla tai fluorogeenisillä kasvatusalustoilla. Niissä valikoivana tekijänä on antibiootti tai niiden yhdistelmä, joka ehkäisee kilpailevien mikrobien kasvua. Erottelevana tekijänä käytetään tiettyjä värejä (kromogeeninen aine) tai fluoresoivaa ainetta (fluorogeeninen aine) ja entsyymiin yhdistettyä kromogeenistä tai fluorogeenistä substraattia. Mikrobin kasvaessa entsyymiin sidottu substraatti vapautuu kasvualustaan, mikä nähdään värin muutoksena, saostuskehänä tai fluoresenssina. Siten kohdeorganismi voidaan helposti erottaa muista mikrobeista. Tuloksena saadaan yksi tai useampi pesäke, joka täyttää oletetut positiiviset tuntomerkit. Tä-

hän voi mennä useampia vuorokausia. Mikäli tyypillisiä pesäkkeitä ei ole, analyysi on valmis ja tulos negatiivinen. Oletettu positiivinen tulos täytyy varmistaa morfologisilla, biokemiallisilla, fysiologisilla ja/tai serologisilla lisätesteillä, ja se voi kestää jopa noin viikon. (Dwivedi & Jaykus 2011, Jasson ym. 2010).

4.2 Vaihtoehtoisia tai pikamenetelmiä

Työläiden ja aikaavievien viljelymenetelmien rinnalle on nopeamman tuloksen saamiseksi kehitetty vaihtoehtoisia tai pikamenetelmiä, jotka ovat usein eri tekniikoiden (viljely, immunologiset testit, molekulääriset testit) yhdistelmiä. Taulukossa 4. on esitetty vertailumenetelmien sekä nopeimpien kirjallisuudesta löytyneiden *L. monocytogenes* -bakteerin havaitsemis-/tunnistusmenetelmien raja-arvoja ja rikastusaikoja. Taulukkoon on sisällytetty pikamenetelmät, joiden kokonaisanalyysiaika on alle 2 vrk.

Vertailumenetelmien herkkyytaso on saavutettu myös muilla tekniikoilla, mutta nopeammin, erityisesti lyhyemmän rikastusvaiheen ansiosta. Lisäksi on julkaistu menetelmiä, joihin ei sisälly rikastusta ollenkaan. Kaikkien menetelmien havaintorajoja ei ole mahdollista verrata suoraan toisiinsa, koska toteamisraja-arvot on esitetty eri yksikköjä ja tilavuuksia käyttäen. Näyttää kuitenkin siltä, että monistusmenetelmillä, erityisesti RT-PCR:llä, on saavutettu vastaavia herkkyytasoja kuin vertailumenetelmillä. Kaikkein nopeimmilla menetelmillä tulos on saatu 1–3,5 tunnissa, kun toteamisrajat ovat olleet 10–40 pmy/g – 10²–10³ pmy/ml (taulukko 4).

4.2.1 Immunomääritysmenetelmät

Kaikki immunomääritysmenetelmät perustuvat erityisen vasta-aineen ja sen antigeenin väliseen spesifiiseen sitoutumiseen. Antigeenimolekyylissä on rakenneosia, epitooppeja, jotka vasta-aineen tarttumisosa tunnistaa tarkasti ja joihin se sitoutuu. Vasta-aine määrää menetelmän toimivuuden. Vasta-aine voi olla monoklonaalinen tai polyklonaalinen. Monoklonaalinen vasta-aine voi tunnistaa täsmällisesti yhden epitoopin, jolloin esimerkiksi yksittäisen bakteerilajin serotyyppi, kuten *E. coli* O157:H7, saadaan tunnistettua. Polyklonaalinen vasta-aine voi tunnistaa useita saman tai monien antigeenien epitooppeja. Sillä voidaan tunnistaa tietyt bakteerilajit, esimerkiksi *Listeria*-lajit. Immunomäärityksellä saatu positiivinen tulos vaatii varmistuksen jollakin muulla menetelmällä. Toteamisraja on keskimäärin 10³–10⁷ pmy/ml riippuen vasta-ainetyypistä ja sen affiniteetista vastaavaan epitooppiin sekä immunologisen testin tyypistä. Immunomääritysmenetelmissä tarvitaan yleensä näytteen rikastus, useimmiten kaksi, ennen varsinaista mittausta. Elintarvikediagnostiikassa on käytettävissä monia erilaisia immunomääritysmenetelmiä, joista eniten käytettyjä ovat lateraalivirtaustestit (lateral flow devices, LFD) sekä ELISA- (enzyme linked immunosorbent assay) ja ELFA (enzyme linked fluorescent assays) -menetelmät. (Jasson ym. 2010). Lisäksi kohdesolujen erottamiseksi ja konsentroimiseksi voidaan käyttää immunomagneettista erottelutekniikkaa (IMS). Tässä tekniikassa paramagneettiset partikkelit on päällystetty vasta-aineilla, jotka sieppaavat kohdesolut (elintarvike)matriisista.

Lateraalivirtaustestit tai immunokromatografia

Lateraalivirtaustesti tai liuskatesti perustuu vasta-aineen ja sen kohdepatogeenin väliseen reaktioon, joka voidaan nähdä paljain silmin. Näyte kulkeutuu huokoisesta kalvosta, tavallisesti nitroselluloosasta valmistettua kiinteää alustaa pitkin kapillaarisesti. Kohdeanalyytin sieppaajavasta-aineet on kiinnitetty alustaan tietylle etäisyydelle näytteen lisäyskohdasta. Näiden lisäyskohtien lähelle on asetettu detektoiva vasta-aine, johon on yhdistetty kolloidinen kulta- tai lateksipartikkeli. Näytteessä oleva kohdemolekyylit sitoutuu detektoivaan vasta-aineeseen, ja syntynyt kompleksi siirtyy lateraalisesti kapillaarin voimalla kohti sieppaajavasta-ainetta. Tulos nähdään värillisenä viivana. Liikkuva nestevirta voi eriytyä kahdeksi eri sieppausvyöhykkeeksi: kohdeorganismille spesifiseksi ja sitoutumattomalle vasta-aineelle spesifiseksi. Kohdespesifinen reaktio antaa silmännähtävän kontrollista eroavan viivan. Tulos saadaan 5–10 minuutissa, mutta lateraalivirtausmenetelmä vaatii suhteellisen korkean kohdeorganismipitoisuuden (10⁷–10⁹), joten näyte täytyy aina rikastaa. Lisäksi saadaan virheellisiä positiivisia tuloksia enemmän kuin ELISA:ssa. (Dwivedi & Jaykus 2011).

Cho & Irudayaraj (2013) ovat osoittaneet *L. monocytogenes* -bakteerin havaitsemisen kontaminoidussa 2 % maidossa käyttäen magneettierottelua ja immunokromatografista lateraalivirtaustestiä kohdespesifisten monoklonaalisten vasta-aineiden avulla. Kahden tunnin testi havaitsi 10² pmy/ml ilman rikastusta. Shim

ym. (2008) kehittivät sekä immunokromatografisen että ELISA-testin yhdessä IMS-erottelun kanssa *L. monocytogenes* - ja *Listeria*-bakteerien havaitsemiseksi kvalitatiivisesti. Testejä käytettiin yli sadalle aidosti pilaantuneelle lihanäytteelle, ja kromatografisella testillä voitiin havaita 10^2 pmy/10 g 15 tunnissa, josta rikastuksen osuus kesti 14 tuntia.

ELISA- entsyymi-immunologinen määrittäminen

ELISA-menetelmässä yhdistyvät immunologinen ja entsyymaattinen määrittäminen. Menetelmän lähestymistapa voi olla suora tai epäsuora määrittäminen, kilpailutus- eli syrjäytymismenetelmä tai sandwich-menetelmä. Useimmissa elintarvikepatogeenien vaihtoehtoisissa määrittämissä käytetään sandwich-tyyppistä ELISA-teknologiaa, jossa kohdeantigeenin päätepistemittaus perustuu värilliseen substraattiin. Suorassa ELISA-menetelmässä tietyt sieppaajavasta-aineet sidotaan ensin esimerkiksi 96-kuoppalevyn pohjalle. Seuraavaksi lisätään näyte, ja siinä mahdollisesti olevat kohdeantigeenit sitoutuvat vasta-aineisiin, ja sitoutumaton näyte (sitoutumattomat antigeenit) pestään pois. Tämän jälkeen lisätään detektoiva vasta-aine, joka sitoutuu antigeeniin. Sitten lisätään entsyymiin liitetty (entsyymillä leimattu) vasta-aine, jonka annetaan sitoutua detektoivaan vasta-aineeseen, ja sitoutumattomat vasta-aine-entsyymikompleksit pestään pois. Viimeiseksi lisätään substraatti, jonka entsyymi muuntaa mitattavaksi, värilliseksi yhdisteeksi.

Portanti ym. (2011) validoivat *L. monocytogenes* -spesifisen ELISA-testin tutkimalla 190 luonnollisesti ja 30 keinotekoisesti kontaminoitua näytettä (lihatuotteita, mereneläviä ja meijerituotteita). Menetelmä sisälsi yhden ISO-standardin mukaisen rikastusvaiheen, ja tulokset olivat yhdenmukaiset vertailumenetelmän kanssa. Testin suhteellinen toteamisraja vertailumenetelmään nähden oli 5–10 pmy/g keinotekoisesti saastutetuissa näytteissä.

Immunofluorimetria tai fluoresoiva immunomäärittäminen, FIA

FIA-menetelmä on pääperiaatteeltaan ELISA-menetelmän kaltainen, mutta päätepisteen havaitsemisessa käytetään hyväksi herkkyyttä lisäävä fluoresenssia. Kaupallisessa VIDAS®-menetelmässä vasta-aineet on sidottu pipettiin (SPR, the Solid Phase Receptacle) ja testiliuskassa on tarvittavat analysointireagenssit näytteen laimennusta, puskurointia ja pesuja varten. Analysoinnin päätepisteessä mitataan fluoresenssin emissio.

Muitakin erityyppisiä fluoresenssia hyödyntäviä testejä on kehitetty immunologisten testien herkkyyden parantamiseksi. Wang ym. (2011) havaitsivat *L. monocytogenes* -bakteerin samanaikaisesti *E. coli*- ja *Salmonella typhimurium* -bakteereiden kanssa. He erottelivat mikrobit magneettipartikkelien avulla ja käyttivät fluoresenssin tuottamiseen quantum dot -fluoroforeja. Menetelmän toimivuus testattiin 50 keinotekoisesti kontaminoidulla näytteellä (kananruhon huuhteluneste, naudan jauheliha, parsakaali, salaatti) ja sen määrittämisrajaksi saatiin 20–50 pmy/ml. Analyysi kesti vain kaksi tuntia eikä sisältänyt rikastusta. Cho, I. ym. (2014) käyttivät hieman herkempää menetelmää, joka sisälsi IMS-erottelun lisäksi fluoroforilla leimatun vasta-aine-BSA-kompleksin. Tällä havaittiin neljässä tunnissa <5 pmy/ml maidosta, johon oli lisätty *L. monocytogenes* -bakteereja.

Bakteriofageihin pohjautuvia menetelmiä

Bakteriofageihin perustuvia sovellutuksia elintarviketurvallisuuden ja -diagnoosin yhteydessä ovat tarkastelleet mm. Lu ym. (2013), Singh ym. (2013) ja Smartt ym. (2012). Faagipohjaisen tunnistuksen etuja ovat kohdespesifisyys, herkkyys, elävien ja kuolleiden solujen erottaminen sekä ilmaisimen (faagin) helppo lisääminen.

Aiemmin mainitusta kaupallisesta VIDAS®-menetelmästä on uusi versio VIDAS UP®, jossa kohteen (*Listeria* spp. tai *L. monocytogenes*) tunnistamiseksi vasta-aineiden sijasta käytetään kohdespesifisiä rekombinantteja faagiproteiineja.

4.2.2 Molekulaariset menetelmät / Nukleiinihappojen monistusmenetelmiä

Molekulaariset menetelmät voivat perustua mm. DNA:n ja RNA:n monistamiseen tai hybridisaatioon. Tässä yhteydessä käsitellään vain menetelmiä, joissa nukleiinihappoja monistetaan perinteisellä PCR:llä tai sen uudemmilla sovelluksilla, koska suurin osa kaupallisista ja kirjallisuudessa julkaistuista molekula-

laarisista menetelmistä *L. monocytogenes* -bakteerin havaitsemiseksi elintarvikenäytteissä perustuu tähän teknologiaan.

Monistusmenetelmien herkkyyttä lisätään tavallisesti rikastamalla näyte. Useissa julkaisuissa on raportoitu toteamisraja 1–5 pmy/25 g 20–30 h viljelyn jälkeen (taulukko 4). Lyhin rikastusaika (3–6 h) (Zeng ym. 2006) oli perinteisessä moni-PCR-analyysissä *Listeria* spp.- ja *L. monocytogenes* -bakteerien havaitsemiseksi keinotekoisesti kontaminoiduissa maitonäytteissä ja maidon prosessointiympäristöstä (raakamaito, viemäriveresi, säiliöpinnat) eristetyissä, oletetuissa *L. monocytogenes* -isolaateissa. PCR- ja API-menetelmät tunnistivat samat isolaatit. PCR:n LOD-arvo oli $1,4 \times 10^2$ pmy/ml suoritettuna suoraan kontaminoidusta maidosta. Lyhyt rikastus (3–6 h) tuotti raja-arvon 1,45 pmy/ml.

PCR -menetelmä

PCR (polymerase chain reaction, polymeerasiketjureaktio) -menetelmässä tiettyä alukkein rajattua DNA-jaksoa monistetaan suuria määriä (Mullis ym. 1986). DNA:n kaksoisjuosteet irrotetaan toisistaan ja yksijuosteisia molekyyliä mallina käyttäen rinnalle valmistetaan uudet juosteet tietyillä lämpötila-aikayhdistelmillä ja entsyymeillä. Tutkittavan DNA:n määrä näytteessä kasvaa eksponentiaalisesti monistussykliä aikana. PCR-menetelmällä voidaan monistaa jopa vain yhden solun DNA miljoonakertaisesti muutamassa tunnissa. Perinteinen kvalitatiivinen tai puolikvantitatiivinen PCR nojaa monistustuotteiden päätepisteanalyysiin (elektroforeesi, fluoresenssi). Tavallisesti monistustuotteet havaitaan agarosigeelelektroforeesilla ja värjäyksellä, jossa monistunut DNA saadaan näkyviin fluoresoivina vyöhykkeinä. Lopputuloksen varmistamiseksi vyöhykkeiden sisältämä DNA voidaan identifioida sekvensoimalla DNA:n nukleinihappojärjestys.

PCR-menetelmä on herkkä, mutta sillä saadaan kvalitatiivinen tulos. Sillä ei voida myöskään erotella eläviä ja kuolleita soluja, koska DNA säilyy pitkään solun kuoleman jälkeen. Kuolleen solun DNA monistuu PCR:ssä, mikä johtaa väärin positiivisiin tuloksiin ja on siten PCR:ää rajoittava tekijä. DNA:han sitoutuvia värejä, kuten etidiumbromidimonoatsidia (EMA) ja propidiummonoatsidia (PMA), on kuitenkin käytetty elävien solujen erottamiseksi kuolleista (katsaus esimerkiksi Elizaquível ym. 2013). Niitä on testattu myös *L. monocytogenes* -solujen kanssa (Rudi ym. 2005). Nämä värit läpäisevät vain kuolleen solun solukalvon. Ne toimivat interkalatoivina yhdisteinä, jolloin ne asettuvat DNA:n kaksoisjuosteiden väliin tiettyyn kohtaan sitoen ne kovalenttisesti toisiinsa. Koska juosteet eivät pysty irtautumaan toisistaan, ne eivät myöskään monistu PCR-syklissä.

Perinteisiä PCR-menetelmiä

Kirjallisuudesta löytyy runsaasti esimerkkejä PCR:n käytöstä *L. monocytogenes* -bakteerien havaitsemiseksi elintarvikenäytteistä. Tähän katsaukseen on sisällytetty nopeimpia ja herkimpiä menetelmiä (taulukko 5). Rip ja Gouws (2009) havaitsivat perinteisellä PCR:llä 8 pmy/ml camembert-juusto- ja strutsinlihanäytteistä, joihin oli lisätty *L. monocytogenes* -bakteeria ja rikastettu 22 tuntia. Kaupallista *L. monocytogenes* -kittiä arvioidessaan Amagliani ym. (2007) havaitsivat 1 pmy/g keinotekoisesti saastutetuista porsaan raakamakkara- ja mozzarellaajuustonäytteistä, joita oli rikastettu vuorokauden ajan.

Monianalyysi-PCR

Erilaiset PCR-järjestelmät mahdollistavat useiden kohdelajien havaitsemisen saman ajan aikana tai samassa reaktiossa. *Listeria* spp. ja *L. monocytogenes* tunnistettiin kolmella alukeparilla samassa reaktiossa (Zeng ym. 2006), ks. edellä luvun alussa. Germini ym. (2009) osoittivat *L. monocytogenes* -, *Salmonella* spp.- ja *E. coli* -patogeenien havaitsemisen samassa PCR-reaktiossa nestemäisistä kananmunanäytteistä. Testillä voitiin havaita 10 solua/25 g, kun rikastusaika oli 15 tuntia. Chiang ym. (2012) puolestaan lisäsivät PCR:n herkkyyttä tuotteiden hybridisaation ja värireaktion avulla osoittaessaan useiden patogeenien, mukaan lukien *L. monocytogenes*, havaitsemisen samanaikaisesti. Kun he testasivat keinotekoisesti kontaminoituja maito- ja kananlihanäytteitä, menetelmällä havaittiin 1 pmy/ml 8 tunnin rikastusvaiheen jälkeen.

Useiden alukeparien samanaikainen käyttö saattaa kuitenkin vähentää reaktion herkkyyttä. Lisäksi eri patogeenien rikastaminen samanaikaisesti voi olla haasteellista erilaisten kasvuolosuhdevaatimusten takia (Wiedmann ym. 2014).

Kvantitatiivinen reaaliaikainen PCR

Kvantitatiivisessa reaaliaikaisessa PCR:ssä (quantitative real-time PCR; qPCR tai RT-PCR) PCR-tuote tunnustetaan fluoresoivalla leimatulla osalla. Se sitoutuu kohteeseen PCR:n aikana, ja tuloksena saadaan automaattisesti luettava fluoresoiva signaali. Näin kohdespesifinen DNA rikastetaan ja havaitaan samanaikaisesti (Dwivedi & Jaykus 2011). Reaaliaikaisesta PCR:stä on kehitetty monenlaisia versioita, jotka perustuvat joko interkalatoivan värin (SYBR Green) tai erilaisten koettimien (TaqMan, molekyyylimajakat, scorpion-alukkeet) käyttöön reaktiossa. Kvantitatiivinen PCR on nopeampi kuin perinteinen PCR ja sitä käytetään nykyään yleisesti elintarvikepatogeenien havaitsemiseksi. Katsauksia aiheesta ovat laati- neet mm. Cocolin ym. (2011) ja Postollec ym. (2011).

Rossmann ym. (2006) yhdistivät 24 tunnin rikastuksen RT-PCR -menetelmään *L. monocytogenes* -bakteerin havaitsemiseksi. Keinotekoisesti kontaminoidusta raakamaidosta havaittiin 7,5 pmy/25 ml ja lohesta, pateesta ja juustosta 1–9 pmy/15 g. Menetelmällä tutkittiin myös luonnollisesti kontaminoituneita kala-, liha- sekä lihatuote- ja maitotuotenäytteitä, jolloin standardiin ISO-menetelmään verrattuna menetelmän tarkkuus oli 96 %, spesifisyys 100 % ja herkkyys 76,9 %. Oravcová ym. (2007) käyttivät *L. monocytogenes* -bakteerin havaitsemiseksi ja kvantifioimiseksi 24+6 tunnin rikastusta ja RT-PCR:ää ja arvioivat menetelmää ISO-standardiin nähden 205 liha-, kala-, meijerituote- tai kasvisnäytteellä (joista 144 oli kontaminoitunut luonnostaan ja 61 keinotekoisesti). Menetelmällä havaittiin 1 pmy/25 g, myös kolmesta keinotekoisesti kontaminoidusta näytteestä, jotka antoivat negatiivisen tuloksen ISO-menetelmällä. Samoin O’Grady ym. (2009) kuvasivat rikastuksen (28 tuntia) ja RT-PCR:n yhdistelmän ja vertasivat sitä ISO-standardiin tutkimalla *L. monocytogenes* -bakteeria erityyppisistä elintarvikenäytteistä tai prosessilaitoksen ympäristönäytteistä (yhteensä 175 kpl). Spesifisyys oli 99,44 %, herkkyys 96,15 % ja tarkkuus 99,03 % sekä toteamisraja 1–5 pmy/25 g.

Aiemmin julkaistua RT-PCR -menetelmää (Rodríguez-Lázaro ym. 2004; Rodríguez-Lázaro ym. 2005) *L. monocytogenes* -bakteerin osoittamiseksi on hiljattain arvioitu tai validoitu eri elintarvikematriiseissa. Gianfranceschi ym. (2014) raportoivat menetelmän validointikokeista 11 eurooppalaisessa laboratoriossa, kun näytematriisina oli keinotekoisesti kontaminoitu pehmeä juusto. Tulosten perusteella menetelmän (ISO-standardin mukainen rikastus + DNA:n eristys + RT-PCR) suorituskyky oli huomattavasti parempi kuin vertailumenetelmän, sillä se antoi vähemmän vääriä negatiivisia ja vääriä positiivisia tuloksia. Toteamisraja oli 10 pmy/25 g 27 tunnin analyysissä, ja suhteellinen tarkkuus oli 82,75 %, suhteellinen spesifisyys 96,70 % ja suhteellinen herkkyys 97,62 %. Tätä RT-PCR -menetelmää on käytetty myös sianlihan, siipikarjan lihan, valmissalaatin ja lampaanmaitojuustojen tutkimiseen (Rodríguez-Lázaro ym. 2014). Paras tulos saavutettiin, kun näyte oli laimennettu 1:10, rikastettu 24 tuntia ja DNA uutettu kaupallisen sili- kapylvään avulla. Toteamisraja oli 2-4 pmy/25 g 27 tunnissa. Suorituskykyä tutkittiin 200 aidolla näyt- teellä, ja tulokset olivat samanlaisia kuin vertailumenetelmällä.

RT-PCR:ää on hyödynnetty myös elävien ja kuolleiden solujen erottamiseen. Esimerkiksi D’Urso ym. (2009) yhdistivät suodatusesikäsittelyn ja kvantitatiivisen RT-PCR:n ja havaitsivat 10 elävää *L. monocytogenes* -solua 10 g:ssa kontaminoitua jogurtia ilman näytteen rikastusta. Tulokset olivat yhdenmukaisia standardin viljelymenetelmän kanssa. Ye ym. (2012) käyttivät DNA:n sijasta RNA:ta ja käänteiskopio- entsyymiä RT-PCR-reaktiossa elävien solujen osoittamiseksi. He havaitsivat 1 pmy/ml *L. monocytogenes* -soluja keinotekoisesti kontaminoituissa jäädytetyissä porsaanlihanäytteissä. Tässäkään työssä näytteitä ei rikastettu.

Näytteen esikäsittelyllä on merkitystä RT-PCR:n suorituskykyyn. Duodu ym. (2009) arvioivat suodatuk- sen ja immunomagneettisen erottelun (IMS) yhdistämistä RT-PCR -menetelmään *L. monocytogenes* -bakteerin havaitsemiseksi. IMS vähensi huomattavasti PCR-inhibiittorien määrää reaktiossa. Menetelmäl- lä tutkittiin tahallisesti saastutettuja lämminsavulohinäytteitä, jolloin toteamisraja oli 20–40 pmy/g. Testi kesti 3,5 tuntia eikä näytteitä rikastettu.

Monianalyysi-RT-PCR

Myös RT-PCR:ää on hyödynnetty useiden kohdepatogeenien samanaikaiseen analyysiin. Omiccioli ym. (2009) kuvasivat menetelmän, jolla osoitettiin samanaikaisesti *L. monocytogenes*, *E. coli* ja *Salmonella*. Se koostui rikastuksesta (16–20 tuntia), DNA-eristyksestä ja RT-PCR:stä joko eri väreillä leimattujen ko- ettimien tai sulamiskäyräanalyysin avulla. Kasvatusliemen valinnalla oli merkitystä, sillä *L. monocyto-*

genes kasvoi parhaiten nro 17 -elatusliemessä ilman L-dekstroosia. Kunkin lajin toteamisraja oli 1 pmy 125 ml:ssa kontaminoitua maitoa, joka oli jaettu viideksi 25 ml:n osanäytteeksi. Ruiz-Rueda ym. (2011) käyttivät erillisiä kasvatusalustoja *L. monocytogenes* - ja *Salmonella* spp. -bakteerien havaitsemiseksi RT-PCR:llä. *Listeria*-bakteeria tutkittiin meijerituotteista, kasviksista, kalasta ja lihasta sekä sellaisenaan syötävistä elintarvikkeista (54 aitoa näytettä). Menetelmän LOD-arvo oli 5 pmy/25 g sekä herkkyys 94,1 % ja tehokkuus (oikein määritettyjen näytteiden osuus) 94,4 % ISO-standardiin verrattuna. Analyysiaika oli alle 30 tuntia. Köppel ym. (2013) kuvasivat yleiskasvatusalustan patogeenien *L. monocytogenes*-, *Salmonella*- ja *E. coli* -bakteerien samanaikaista kasvatusta (18 tuntia) varten. Testiin sisältyi myös kampylobakteeri, joka kasvatettiin erikseen. RT-PCR sisälsi yhdeksän kohdealukeparia sisäisine kontrolleineen. Menetelmän toteamisraja oli 2 pmy/g, kun matriisina oli juusto ja jogurtti, ja sitä käytettiin yli 200 elintarvikenäytteen (pasta, riisi, peruna, liha, kala, kasvikset, kastikkeet) testaamiseen. Tulokset olivat yhdenmukaisia ISO-menetelmän kanssa.

Isoterminen monistus

Perinteisten ja reaaliaikaisten PCR-menetelmien lisäksi on kuvattu monia muitakin nukleiinihappojen monistusmenetelmiä. Viime aikoina ovat yleistyneet erilaiset isotermiset monistustekniikat, erityisesti silmukavälitteinen isoterminen monistus (loop mediated isothermal amplification, LAMP) (Notomi ym. 2000). Useimmat *Listeria* -bakteerille kehitetyt isotermiset monistustestit perustuvat tähän tekniikkaan ja niitä on saatavissa myös kaupallisesti. Reaktio tapahtuu vakiolämpötilassa ja sisältää useita alukepareja, mikä parantaa spesifisyyttä. Erillisiä laitteita ei tarvita, vaan reaktiot voidaan monistaa lämpöhautteessa, jopa kenttäolosuhteissa. Tuotteiden muodostuminen voidaan havaita suoraan värireaktion, saostumisen tai fluoresenssin avulla. Menetelmä on erittäin nopea ja sietää paremmin näytteen epäpuhtauksia kuin PCR tai RT-PCR. Isotermisissä monistusreaktioissa lähtömateriaalina voi käyttää myös RNA:ta. LAMP-tekniikan käyttöä elintarvikepatogeenien testaamisessa ovat tarkastelleet Niessen ym. (2013).

Wang ym. (2010) arvioivat kehittämäänsä *L. monocytogenes* LAMP-testiä 125 aidolla maitonäytteellä. Toteamisraja oli 186 pmy /ml tai 8–10 solua reaktiossa ilman rikastusta. Menetelmä antoi yhdenmukaiset tulokset ISO-menetelmän kanssa, kun siihen sisältyi kuuden tunnin rikastus, muutoin yksi positiivinen näyte (yhteensä 12) jäi havaitsematta. LAMP-menetelmää on myös käytetty elävien *L. monocytogenes* -solujen havaitsemiseksi elintarvikenäytteistä (kananliha porsaanliha, nautanjauheliha sekä maitojauhe), joihin oli lisätty kyseistä patogeeniä (Wan ym. 2012). Näytteet käsiteltiin PMA:lla ennen DNA:n uuttoa ja monistusta. Testin toteamisraja ilman rikastusta oli $3,1 \times 10^3$ pmy/g testatuissa matriiseissa ja $3,1 \times 10^2$ puhdasviljelmässä. Cho A.R. ym. (2014) rikastivat maitonäytteitä 12 tai 24 tuntia ennen LAMP-reaktiota ja havaitsivat $2,22 \times 10^1$ pmy/ml ja 2,22 pmy/ml näytteisiin lisättyä *L. monocytogenes* -bakteeria. Ilman rikastusta puhdasviljelmän LOD oli $2,22 \times 10^2$ pmy/ml, jolloin analyysi kesti 20 minuuttia. Yleisesti vaihtaa, että kirjallisuuden LAMP-menetelmät eivät vielä yllä herkkyydessä PCR- tai RT-PCR -menetelmien tasolle, ainakaan ilman rikastusvaihetta. Tilanne mitä todennäköisimmin muuttuu menetelmien kehittyessä. Eräiden kaupallisten kittien herkkyydeksi on ilmoitettu 1–5 pmy/näyte noin vuorokauden rikastuksen jälkeen.

4.2.3 Molekulaaristen, immunologisten ja perinteisten menetelmien vertailu

Perinteiset viljelymenetelmät, immunologiset ja molekulaariset (PCR- ja hybridisaatio) analysointimenetelmät eroavat tietyssä määrin taulukossa 3. lueteltujen tekijöiden suhteen. Yleensä näissä kaikissa menetelmätyypeissä kuitenkin vaaditaan esirikastus, rikastus tai molemmat ennen mittausta. Viralliset määrittämissuomenetelmät nojaavat pitkälti perinteisiin määrittämissuomenetelmiin, jotka perustuvat mikrobin morfologiaan (muoto ja ulkonäkö) ja biokemiallisiin reaktioihin. Ne soveltuvat hyvin myös elintarvikenäytteiden analysointiin, ovat herkkiä ja tehokkuudeltaan luotettavia. Merkittävä rajoittava tekijä on kuitenkin analyysin pitkä kesto (Jasson ym. 2010, Yeni ym. 2014). Immunologisten testien spesifisyydessä ja herkkyydessä on parannettavaa molekyyliomenetelmiin verrattuna, mutta niiden etuja ovat nopeus ja parempi matriisista aiheutuvien häiriöiden sieto (Yeni ym. 2014). Nukleiinihappopohjaiset menetelmät ovat puolestaan kaikkein spesifisimpiä. Lisäksi ne ovat nopeita ja mahdollistavat useiden kohteiden samanaikaisen testauksen (Jasson ym. 2010). Vaikka niitä sanotaan kalliiksi, RT-PCR:n on laskettu olevan kustannustehokkaampi kuin vertailumenetelmän, erityisesti kun kaikki analyysikustannukset otetaan huomioon (Rodriguez-Lavaro ym. 2014, De Medici ym. 2014).

Taulukko 3. Molekulaaristen ja immunologisten tekniikoiden ominaisuuksia perinteisiin menetelmiin verrattuna (muokattu lähteestä Jasson ym. 2010).

Ominaisuus	Molekulaariset tekniikat	Immunologiset tekniikat	Perinteiset menetelmät
Spesifisyyden perusta	DNA- tai RNA- sekvenssit	Vasta-aineen ja antigeenin sitoutuminen, myös faagiligandit	Fenotyypiset testit (morfologia, biokemialliset reaktiot)
Herkkyys	1 genomi / PCR reaktio / 10^2 – 10^3 pmy/ml	10^4 - 10^5 pmy/ml	1 pmy/25 g
Mittaustulokseen kuluva aika	1-3 h*	10 min - 1 h*	3-7 päivää
Elintarvikenäytteestä aiheutuvat häiriötekijät	vaikuttavat	eivät vaikuta	eivät vaikuta
Monen parametrin samanaikainen testaus	kyllä		ei
Automatisointimahdollisuus	kyllä	kyllä	ei
Työläys	melko työläs	melko työläs	tosi työläs

* rikastukseen kuluvaa aikaa ei ole huomioitu

4.2.4 Biosensori

Elintarviketuotteiden nopean läpivirtauksen kannalta mikrobiologiset mittaukset pitäisi pystyä toteuttamaan mahdollisimman nopeasti, mieluummin reaaliaikaisesti tuotannon aikana. Biosensori voisi olla yksi ratkaisu reaaliaikaiseen mittaukseen. Kirjallisuudesta löytyykin lukuisia tutkimuksia biosensorien käyttöä elintarvikepatogeenien, myös *L. monocytogenes* -bakteerin, määrittämisessä. Niissä on kehitetty patogeenien mittaamiseen lähinnä optisia, sähkökemiallisia tai pietsosähköisiä biosensoreita. Lisäksi biosensoripohjaisia menetelmiä käsittelevien tutkimusten suhteellinen osuus on kasvamassa. Tuoreita katsauksia elintarvikepatogeeniin liittyen ovat laatineet esimerkiksi Velusamy ym. (2010) sekä Sharma ja Mutharasan (2013a).

Määritelmän mukaan biosensori on analyttinen laite, joka muuntaa biologisen vasteen mitattavaksi sähköiseksi signaaliksi. Se koostuu kahdesta pääkomponentista: bioreseptorista tai biotunniste-elementistä ja muuntimesta. Bioreseptori on molekyyli, joka tunnistaa kohde-analyytin biokemiallisella mekanismilla ja vastaa sen sitoutumisesta sensoriin mittausta varten. Bioreseptori voi olla esimerkiksi vasta-aine/antigeeni, yksijuosteinen DNA tai bakteriofaagit. Bioreseptori tai biotunniste-elementti määrää biosensoritekniikan spesifisyyden. (Velusamy ym. 2010, Sharma & Mutharasan 2013a).

Muuntimen (transducer) tehtävä on muuntaa tunnistus mitattavaksi sähköiseksi signaaliksi. Muunnin voi olla optinen, elektrokemiallinen, lämpökemiallinen, piezosähköinen, magneettinen, massaan perustuva tai edellä mainittujen tekniikoiden yhdistelmä. Eniten käytettyjä ovat optiset, elektrokemialliset ja piezosähköiset laitteet. Optisista tekniikoista pintaplasmaresonanssia ja fluoresenssi ovat eniten käytettyjä patogeenisten bakteerien määrittämisessä herkkyyden vuoksi (Velusamy ym. 2010, Sharma & Mutharasan 2013a).

Useimmat kirjallisuudessa esitetyt nopeat *Listeria*-biosensorit ovat vielä demonstraatiovaiheessa, kuten impedanssispektroskopiaan ja vasta-aineisiin perustuva sensori, jolle Radhakrishnan ym. (2013) laskivat LOD-arvon 4 pmy *L. monocytogenes*/ml ilman rikastusta. Näytteenä oli tomaattiuute, johon oli lisätty patogeenisoluja. Davis ym. (2013) yhdistivät ELISA-määrittäykseen kertakäyttöisiä amperometrisiä sensoreita (seripainetut hiielektrodiliuskat) ja osoittivat *L. monocytogenes* -bakteerin havaitsemisen (10^2 pmy/g) saastutetuissa mustikoissa noin tunnissa. Sähkökemiallisen sensorin sijaan Sharma ja Mutharasan (2013b) käyttivät massamuutoksia mittaavaa pietsosähköistä biosensoria ja vasta-aineita. Kun järjestelmässä käytettiin kolmea sitomisvasta-ainetta, sillä havaittiin 10^2 solua/ml yhden tunnin analyysissä.

Kuituoptinen biosensori, jossa oli sieppausmolekyylinä vasta-aine ja reportterimolekyylinä lyhyt nukleotidijakso, havaitsi 10^2 pmy/25 g *L. monocytogenes* -bakteeria sellaisenaan syötävistä lihanäytteistä (Ohk

ym. 2010). Patogeeniä oli lisätty näytteisiin, joita oli rikastettu 18 tuntia. Käytetyn kasvatusliemen tyyppi vaikutti analyysin onnistumiseen.

Vaikka osa näistä biosensorimenetelmistä on hyvin nopeita, ne eivät ole niin herkkiä kuin nukleiinihappojen monistusmenetelmät. Menetelmiä pitäisi myös testata laajemmissa tutkimuksissa käyttäen vertailukantoja ja erityyppisiä elintarvikkeita.

Taulukko 4. Standardi- ja valittujen vaihtoehtoisten *L. monocytogenes* -bakteerin tunnistusmenetelmien havaitsemisrajoja.

Menetelmä	Havaitsemisraja	Matriisi	Rikastus	Ko-konais-aika	Viite
ISO 11290	<1 pmy/25 g	kaikki elintarvikkeet	24+48+24 /48 h	4–7 vrk	ISO, 2004
Immunotestejä					
Immunokromatografia + IME	10 ² pmy/10 g	liha (K/L)	14 h	15 h	Shim ym. 2008
Lateraalivirtaus + IME	10 ² pmy/ml	maito (K)	Ei	2 h	Cho ja Irudayaraj 2013
ELISA	5-10 pmy/g	liha, äyriäiset, meijerituotteet (K/L)	24 h		Portanti ym. 2011
IME-kerros-IT	<5 pmy/ml	maito (K)	2 h RT	4 h	Cho I. ym. 2014
Kerros-IT + koetin	20-50 pmy/ml	liha, salaatti (K)	Ei	2 h	Wang ym. 2011
Nukleiinihappojen monistus					
PCR	1 pmy/g	makkara, juusto (K)	24 h	2 vrk	Amagliani ym. 2006
	8 pmy/ml	juusto, liha (K)	5+17 h		Rip ja Gouws 2009
Multiplex-PCR	1,45 pmy/ml (1,4x10 ² pmy)	maito, viemäriveresi, säiliöpinnat (K/L)	6 h (Ei)	< 30 h	Zeng ym. 2006
	10 pmy/25 g	nestemäinen kananmuna (K)	15 h		Germini ym. 2009
PCR+makroarray	1 pmy/ml	maito, liha (K)	8 h	18 h	Chiang ym. 2012
Reaaliaikainen PCR (RT-PCR)	1 pmy/15 g	juusto, pateet (K/L)	24 h		Rossmann ym. 2006
	2-4 pmy/25 g	liha, meijerituotteet, kasvikset (K)	24 h	27 h	Rodriguez-Lazaro ym. 2014
	1 pmy/25 g	liha, kala, juusto, meijerituotteet (K/L)	24+6 h	2 vrk	Oravcová ym. 2007
	1–5 pmy/25 g	liha, kala, meijerituotteet, jälkiruuat (K/L)	24+4 h	2 vrk	O'Grady ym. 2009
RT-PCR RNA:lle (käänteistranskriptaasi)	10 pmy/10 g	jogurtti (K)	Ei		D'Urso ym. 2009
	1 pmy/ml	liha (K)	Ei		Ye ym. 2012
IME+RT-PCR	10–40 pmy/g	kala (K)	Ei	3,5 h	Duodu ym. 2009
Multiplex-RT-PCR	1 pmy/5x25 ml	maito (K)	18±2 h	2 vrk	Omiccioli ym. 2009
	5 pmy/25 g	meijerituotteet, kala, kasvikset, liha (K/L)	24 h	< 2 vrk	Ruiz-Rueda ym. 2011
Isoterminen	2 pmy/g	juusto, jogurtti (K/L)	18 h	24 h	Köppel ym. 2013
	10 ³ pmy/ml	liha, maitojauhe (K)	Ei	2,5 h	Wan ym. 2012
	2 (22) pmy/ml	maito (K)	24 h (12 h)		Cho, A.R. ym. 2014
	186 pmy/ml	maito (K/L)	Ei		Wang D. ym. 2010
Biosensoreita					
Amperometrinen	10 ² pmy/g	mustikat (K)	Ei		Davis ym. 2013
Impedanssispektroskopia	4 pmy/ml	tomaattiuute (K)	Ei		Radhakrishnan ym. 2013
Pietsosähköinen	10 ² –10 ³ pmy/ml	maito (K)	Ei	1 h	Sharma ja Mutharasan, 2013
Kuituoptinen	10 ² pmy/25 g	liha (K)	18 h	24 h	Ohk ym. 2010

K = keinotekoisesti kontaminoitu, L = luonnollisesti kontaminoitunut, IME = immunomagneettinen erottelu
FIT = fluoresenssi-immunotesti, IT = immunotesti

4.3 Kaupallisesti saatavilla olevia nopeita validoituja ja validoimattomia tunnistusmenetelmiä

Yhdysvaltalainen U.S. Department of Agriculture/The Food Safety and Inspection Service (USDA-FSIS) julkaisee verkkosivuillaan pari kertaa vuodessa päivitettävää luetteloa kaupallisista elintarvikepatogeenien testikiteistä, jotka jokin riippumaton validointiorganisaatio (AOAC, AFNOR, MicroVal tai NordVal) on sertifioinut. Luettelo sisältää yli 90 menetelmää *Listeria*- tai *L. monocytogenes* -bakteereille, mutta sama kitti on usein sertifioitu useampaan kertaan, esimerkiksi eri matriiseille tai eri käyttötarkoitukseen (osoittaminen/tunnistus). Kaikkia luettelon kitemitä ei ole saatavilla ollenkaan tai ei ole Suomessa. Taulukossa 5. on kooste *L. monocytogenes* -bakteerin määrittämiseen tarkoitetuista kiteistä, joiden valmistajilla on edustus Suomessa tai Euroopassa. Kaupallisesti on saatavissa myös testikittejä, joilla ei ole (vielä) virallista sertifikaattia. Näitä internet-haun perusteella löytyneitä tuotteita on lueteltu taulukossa 6. Osalla testikiteistä on toimittaja Suomessa. Suurin osa nopeista kaupallisista menetelmistä perustuu johonkin nukleiinihappojen monistustekniikkaan, erityisesti reaaliaikaiseen PCR-monistukseen (RT-PCR).

USDA-FSIS -luettelon validoitujen menetelmien nopeimmat ilmoitetut analyysiajat ovat 20,5±2 h ADIAFOOD *Listeria*- ja *L. monocytogenes* -testeille (bioMérieux SA; ei ole saatavissa tällä hetkellä) sekä 20±2 h GeneDisc *Listeria monocytogenes* -testille raakamaitonäytteessä (Pall Corporation), jotka kaikki perustuvat nukleiinihappojen monistukseen. Vidas LMX *Listeria monocytogenes* (bioMérieux SA) on immunologinen testi, jolla tulos on saatavissa 24 tunnissa.

Taulukko 5. *L. monocytogenes* -bakteerin määrittämiseen tarkoitettuja testikittejä, joiden valmistajilla on edustus Suomessa tai Euroopassa.

<i>L. monocytogenes</i> viljelymenetelmät		<i>L. monocytogenes</i> immunologiset menetelmät		<i>L. monocytogenes</i> molekulaariset menetelmät	
Tuotteen nimi	Valmistaja/toimittaja	Tuotteen nimi	Valmistaja/toimittaja	Tuotteen nimi	Valmistaja/toimittaja
A.L. Agar	Bio-Rad Laboratories/Bio-Rad	TRANSIA® Plate <i>Listeria monocytogenes</i>	BioControl Systems/Euroopassa	Assurance GDS™ for <i>Listeria monocytogenes</i>	BioControl Systems/Euroopassa
ALOA® Count	bioMérieux/bioMérieux	VIDAS® <i>Listeria</i> DUO	bioMérieux/bioMérieux	BAX® System PCR Assay for <i>Listeria monocytogenes</i> 24E	DuPont Qualicon/Thermo Fisher Scientific
CHRO-Magar™ <i>Listeria</i>	CHROMagar /Labema	VIDAS® <i>Listeria monocytogenes</i> II	bioMérieux/bioMérieux	BAX® System PCR Assay for <i>Listeria monocytogenes</i>	DuPont Qualicon/Thermo Fisher Scientific
ChromID Lmono	bioMérieux/bioMérieux	VIDAS® <i>Listeria monocytogenes</i> Xpress	bioMérieux/bioMérieux	Foodproof® <i>Listeria monocytogenes</i>	BIOTECON Diagnostics/VWR
Compass® <i>Listeria</i> Agar	Solabia/Euroopassa			GeneDisc® Plate <i>Listeria monocytogenes</i>	Pall GeneDisc Technologies/Colly Company
<i>Listeria</i> Precis™	Oxoid/Thermo Fisher Scientific			GeneDisc® Plate <i>Listeria</i> DUO	Pall GeneDisc Technologies/Colly Company
Microgen™ <i>Listeria</i> -ID	Microgen Bioproducts/Labema			GeneQuence™ for <i>Listeria monocytogenes</i>	Neogen Corporation/Labema
Micro-ID <i>Listeria</i>	Remel/Thermo Fisher Scientific			iQ-Check™ <i>Listeria monocytogenes</i>	Bio-Rad Laboratories/Bio-Rad
RAPID'L mono	Bio-Rad Laboratories/Bio-Rad			MicroSEQ <i>Listeria monocytogenes</i>	Life Technologies/Thermo Fisher Scientific
				SureTect™ <i>Listeria monocytogenes</i> PCR Assay	Thermo Scientific/Thermo Fisher Scientific

Taulukko 6. Kaupallisia validoimattomia *L. monocytogenes* -testejä.

Testi	Valmistaja	Testityyppi
SwabSURE <i>Listeria</i> P (myös <i>L. ivanovi</i>)*	Technical Service Consultants Ltd	Viljely+Väri
<i>Listeria monocytogenes</i> Rapid Test	Creative Diagnostics/Immuno Diagnostic Oy	Immunokromatografinen
Singlepath® L'mono**	Merck Millipore	Immunokromatografinen
BactoReal <i>Listeria monocytogenes</i>	ingenetix GmbH	RT-PCR
genesig <i>Listeria monocytogenes</i>	Primerdesign/genesig	RT-PCR
Listerfast	Microbial SL	RT-PCR
<i>Listeria monocytogenes</i>	BioGX	RT-PCR
<i>Listeria monocytogenes</i> with internal Control	GEN-IAL GmbH	RT-PCR (TaqMan)
<i>Listeria monocytogenes</i> Real Time PCR Kit	Liferiver/BioSB	RT-PCR
<i>Listeria monocytogenes</i> PCR Detection Kit	NORGEN Biotek Corp./Milliot Science	PCR / RT-PCR
<i>Listeria monocytogenes</i> PCR detection Kit	Diatheva	PCR
<i>Listeria monocytogenes</i> FLUO kit	Diatheva	RT-PCR
QuickBlue (RealQuick) <i>Listeria monocytogenes</i>	Q-Bioanalytic GmbH	PCR/ RT-PCR
SureFood® PATHOGEN <i>Listeria monocytogenes</i> PLUS***	R-Biopharm AG	RT-PCR
Loopamp <i>Listeria monocytogenes</i> Detection Kit	Eiken Chemical CO. Ltd. / Mast Group Ltd.	LAMP, Reaaliaikainen
TwistAmp® exo+ <i>ListeriaM</i>	TwistDx	IAMP (Rekombinaasi) Reaaliaikainen
HybriScan <i>Listeria monocytogenes</i>	Sigma Aldrich	Kerrosybridaatio

* Toimittaja Suomessa Labema

** Toimittaja Suomessa VWR

*** Toimittaja Suomessa Mediq Suomi

5 Elintarviketeollisuuden käyttämiä tunnistusmenetelmiä

Mikrobien vaihtoehtoisten tunnistusmenetelmien määrä kasvaa ja niitä on ollut jo kauan saatavilla kaupallisesti. Tutkittua tietoa ei kuitenkaan ole paljon siitä, mitä nopeita tunnistusmenetelmiä on oikeasti käytössä elintarviketeollisuudessa. Tuorein tutkimus on suoritettu EU-projektissa MoniQA, Monitoring and Quality Assurance in the Total Food Supply Chain, jossa kerättiin tietoa analyysimenetelmien, myös nopeiden menetelmien, käytöstä ja niiden tarpeesta tulevaisuudessa 11 EU:n jäsenvaltiossa ja 6 ei-jäsenvaltiossa (Lebesi ym. 2010, Lebesi ym. 2011). Näytteistä tutkittiin tavallisimmin lopputuotteita (94 % vastaajista) ja raakamateriaaleista (90 %), ympäristönäytteistä (69 %) ja välituotteista (59 %) (Lebesi ym. 2010). Tuotteittain suurimpia yritysyhmiä olivat liha- ja kala-, juoma-, meijeri- sekä hedelmä/vihannesalan yritykset. Yhdeksän prosenttia vastaajista suoritti analyysit pelkästään yrityksen sisällä, 35 % käytti vain ulkopuolisia laboratorioita, kun taas 56 % teetti testejä sekä yrityksen sisällä että ulkopuolella. Mikrobiologisia kontaminantteja oli 90 % testatuista analyyteistä.

Itse testejä tekevistä vastanneista elintarvikeyrityksistä kaksi kolmasosaa käytti nopeita, tavallisimmin mikrobiologisia, menetelmiä rutiininomaisesti. Käytetyimmät pikatestit olivat *E. coli* (32 %), kokonaismikrobit (23 %) ja *Salmonella* (18 %). Nopeita *Listeria*-testejä käytti noin 12 % vastaajista, ja 16 % ilmaisi tarvetta sellaisille (Lebesi ym. 2011). Yleisesti ei-validoitujen nopeiden mikrobiologisten testien määräksi mainittiin noin 160 ja validoitujen menetelmien määräksi yli 50, kun elintarviketeollisuuden käytössä oli yli 40 pikamenetelmää.

Lähes kaikki vastaajat olivat kiinnostuneita käytetyn testivalikoiman laajentamisesta ja nopeat mikrobiologiset testit nimettiin ensisijaiseksi tarpeeksi tulevaisuudessa. Nopeiden menetelmien käyttöönoton nähtiin parantavan elintarviketurvallisuuden seurantaa (62 % vastaajista). Kaiken kaikkiaan uudet nopeat menetelmät olivat jo laajalti elintarviketeollisuuden käytössä tai yritykset olivat valmiita ottamaan niitä käyttöön.

Suomessa on 34 hyväksyttyä viranomais- tai omavalvontalaboratoriota, joissa tehdään akkreditoituja/arvioituja *Listeria* spp. tai *L. monocytogenes* -analyysijä elintarvikenäytteistä (www.evira.fi). Kaikissa on käytössä jokin vertailuviljelymenetelmä (ISO, NMKL), lisäksi yhdeksässä on käytössä immunologinen määrittäminen (Vidas, MiniVidas) ja kolmessa PCR-menetelmä (BAX, määrittämätön). Pelkästään viljelymenetelmää käyttää 23 laboratorioita.

Tietoa eri mikrobiologisten menetelmien käytöstä elintarviketeollisuudessa voidaan saada myös konsulttiyritysten valmistamista markkinaraporteista. Raportit paljastavat samanlaisuuksia ja eroja maantieteellisesti elintarviketurvallisuuden testauksessa. Kokonaistestimäärät ovat lisääntyneet 15 vuodessa 128 %, ja patogeenien testauksen suhteellinen osuus on kasvanut 13,7 %:sta 23,2 %:iin (Weschler 2013). Euroopassa rutiinitestien (kokonaismikrobit, koliformit/*E. coli*, hiivat/homeet, stafylokokit, muut, ATP) osuus oli 81 % ja patogeenitestien osuus 19 % (Weschler 2013). Yleisimmät patogeenitestit olivat *Listeria*/*L. monocytogenes*, *Salmonella* ja *E. coli*.

Raakamateriaalinäytteet muodostavat Euroopassa 16 % kaikista kerätyistä elintarvikenäytteistä, prosessi/ympäristönäytteet 26 % ja lopputuotteet 59 %, mutta globaalisti vaihtelu on suurta (Weschler 2013). Tämä heijastaa elintarviketurvallisuuden erilaisia trendejä ja käsityksiä. Myös käytetyt tunnistusmenetelmät vaihtelevat maantieteellisesti. EU:ssa käytetään rutiinitestaukseen perinteisiä testejä (63 %), USA:ssa sen sijaan enimmäkseen helppokäyttöisiä viljelytestejä (52 %). Myös patogeenitestauksessa Eurooppa nojaa perinteisiin tai helppokäyttöisiin viljelytesteihin (61 %), kun USA:ssa käytetään vasta-aine- ja molekyyliperusteisia menetelmiä (yhteensä 94 %). (Weschler 2012).

6 Tulevaisuuden näkymiä

Olemassa olevia elintarvikepatogeenien tunnistusmenetelmiä muokataan jatkuvasti paremmiksi ja uusia tekniikoita kehitellään. On esimerkiksi osoitettu, että *Salmonella* voidaan havaita tuoreen elintarvikkeen pinnalta reaaliaikaisesti käyttäen magnetoelastista biosensoria (Chai ym. 2013). Sen biologisena tunnistusmenenä oli bakteerin virus, joka kiinnittyy vain kyseiseen lajiin. Systeemin havaitsemisraja oli pienempi kuin $1,5 \times 10^3$ pmy/mm².

Alan kirjallisuudessa näkyy myös suuntaus useiden patogeenien havaitsemiseen samanaikaisesti yhden testin aikana tai yhdessä testireaktiossa. Useissa tutkimuksissa *L. monocytogenes* pyritään tunnistamaan muiden elintarvikepatogeenien, erityisesti *Salmonella*- ja *E. coli* -bakteerien kanssa. Validoimattomat vaihtoehtoiset menetelmät pohjautuvat enimmäkseen nukleiinihappojen monistukseen, joten voisi odottaa, että myös validoitujen vaihtoehtoisten menetelmien luettelo dominoivat lähitulevaisuudessa nukleiinihappomenetelmät. Molekyyliomenetelmistä erityisesti nukleiinihappojen isotermiseen monistukseen pohjautuvien julkaisujen määrä on lisääntynyt (Niessen ym. 2013), myös *L. monocytogenes* -bakteerin tunnistamiseksi, ja tähän tekniikkaan perustuvia tunnistuskittejä on jo markkinoilla (taulukko 6).

Konsulttiyritys Strategic Consulting, Inc. (SCI) (2014) on ennustanut raporttiansa pohjalta tiettyjä trendejä elintarviketurvallisuuden testauksessa. Ensinnäkin testaus lisääntyy yleisen huolestuneisuuden, aktiivisen median ja lisääntyvien säännösten takia, mutta nopeiden menetelmien käyttöönotto etenee eri tahtia eri alueilla. Turvallisuustestaus on myös siirtymässä yritysten ulkopuolisiin laboratorioihin, koska analyysit talon sisällä edellyttävät kasvavia resursseja akkreditointien lisäksi. Uusien säännösten takia myös ympäristönäytteiden testaus lisääntyy elintarviketeollisuudessa, etenkin patogeenien suhteen.

7 Yhteenveto

L. monocytogenes -patogeenien havaitsemiseksi löytyy laaja valikoima erilaisia menetelmiä. Sekä validoituja että muita kaupallisia menetelmiä on markkinoilla useita kymmeniä. Molekulaariset menetelmät ovat nousseet suurimmaksi ryhmäksi, joskin viljelyyn perustuvat menetelmät ovat edelleen merkittävässä asemassa. Alan kirjallisuudessa julkaistut menetelmät perustuvat useimmiten erilaisiin nukleiinihappojen monistusmenetelmiin, ja erityisesti isotermistä monistusta hyödyntävien menetelmien lukumäärä on kasvussa. Yleisesti käytetyt RT-PCR -pohjaiset menetelmät pystyvät haastamaan perinteiset viljelymenetelmät toteamisrajojen suhteen elintarvikenäytteitä analysoitaessa. Rikastusajat lyhenevät tai rikastusta ei edes sisälly menetelmiin.

Vaihtoehtoisten menetelmien käyttö elintarvikepatogeenien analysoinnissa vaihtelee maantieteellisesti. USA:ssa suurin osa testeistä tehdään jo nopeammilla molekulaarisilla ja immunologisilla testeillä. Tieto Suomessa ja muualla Euroopassa käytettävistä menetelmistä sitä vastoin ei ole yksiselitteistä; toisen tutkimuksen mukaan analysointi perustuu perinteisiin viljelymenetelmiin, kun taas toisen mukaan nopeat immunologiset ja molekulaariset menetelmät ovat valtaamassa alaa.

8 Lähdeluettelo

- Amagliani, G., Giammarini, C., Omiccioli, E., Brandi, G. & Magnani, M. 2007. Detection of *Listeria monocytogenes* using a commercial PCR kit and different DNA extraction methods. *Food Control* 18(9): 1137-1142.
- Aureli, P., Fiorucci, G.C., Caroli, D., Marchiaro, G., Novara, O., Leone, L. & Salmaso, S. 2000. An outbreak of febrile gastroenteritis associated with corn contaminated by *Listeria monocytogenes*. *The New England Journal of Medicine* 342: 1236-1241.
- Bertsch, D., Rau, J., Eugster, M.R., Haug, M.C., Lawson, P.A., Lacroix, C. & Meile, L. 2013. *Listeria fleischmannii* sp. nov., isolated from cheese. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 63(2), 526-532.
- Byrd-Bredbenner, C., Berning, J., Martin-Biggers, J. & Quick, V. 2013. Food safety in home kitchens: a synthesis of the literature. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 10: 4060-4085.
- Carpentier, B. & Cerf, P. 2011. Persistence of *Listeria monocytogenes* in food industry equipment and premises. *International Journal of Food Microbiology* 145: 1-8.
- Chai, Y., Horikawa, S., Li, S., Wikle, H.C. & Chin, B.A. 2013. A surface-scanning coil detector for real-time, *in-situ* detection of bacteria on fresh food surfaces. *Biosensors and Bioelectronics* 50: 311-317.
- Chiang, Y., Tsen, H., Chen, H., Chang, Y., Lin, C., Chen, C. & Pai, W. 2012. Multiplex PCR and a chromogenic DNA macroarray for the detection of *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Enterobacter sakazakii*, *Escherichia coli* O157:H7, *Vibrio parahaemolyticus*, *Salmonella* spp. and *Pseudomonas fluorescens* in milk and meat samples. *Journal of Microbiological Methods* 88(1): 110-116.
- Cho, A.R., Dong, H.J., Seo, K.H. & Cho, S. 2014. Development of a loop-mediated isothermal amplification assay for detecting *Listeria monocytogenes prfA* in milk. *Food Science and Biotechnology* 23(2): 467-474.
- Cho, I. & Irudayaraj, J. 2013. Lateral-flow enzyme immunoconcentration for rapid detection of *Listeria monocytogenes*. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 405(10): 3313-3319.
- Cho, I., Mauer, L. & Irudayaraj, J. 2014. *In-situ* fluorescent immunomagnetic multiplex detection of foodborne pathogens in very low numbers. *Biosensors and Bioelectronics* 57: 143-148.
- Cocolin, L., Rajkovic, A., Rantsiou, K. & Uyttendaele, M. 2011. The challenge of merging food safety diagnostic needs with quantitative PCR platforms. *Trends in Food Science and Technology* 22: S30-S38.
- Davis, D., Guo, X., Musavi, L., Lin, C.S., Chen, S.H. & Wu, V.C.H. 2013. Gold nanoparticle-modified carbon electrode biosensor for the detection of *Listeria monocytogenes*. *Industrial Biotechnology* 9(1): 31-36.
- den Bakker, H.C., Warchocki, S., Wright, E.M., Allred, A.F., Ahlstrom, C., Manuel, C.S., Stasiewicz, M.J., Burrell, A., Roof, S., Strawn, L., Fortes, E.D., Nightingale, K.K., Kephart, D. & Wiedmann, M. 2014. Five new species of *Listeria* (*L. floridensis* sp. nov., *L. aquatic* sp. nov., *L. cornellensis* sp. nov., *L. riparia* sp. nov., and *L. grandensis* sp. nov.) from agricultural and natural environments in the United States. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 64(6): 1882-1889.
- De Medici, D., Kuchta, T., Knutsson, R., Angelov, A., Auricchio, B., Barbanera, M., Diaz-Amigo, C., Fiore, A., Kudirkiene, E., Hohl, A., Horvatek Tomic, D., Gotcheva, V., Popping, B., Prukner-Radovic, E., Scaramaglia, S., Siekel P., To, K.A. & Wagner, M. 2014. Rapid methods for quality assurance of foods: the next decade with polymerase chain reaction (PCR)-based food monitoring. *Food Analytical Methods*, DOI 10.1007/s12161-014-9915-6.
- Duodu, S., Mehmeti, I., Holst-Jensen, A. & Loncarevic, S. 2009. Improved sample preparation for real-time PCR detection of *Listeria monocytogenes* in hot-smoked salmon using filtering and immunomagnetic separation techniques. *Food Analytical Methods* 2(1): 23-29.
- D'Urso, O.F., Poltronieri, P., Marsigliante, S., Storelli, C., Hernandez, M. & Rodriguez-Lazaro, D. 2009. A filtration-based real-time PCR method for the quantitative detection of viable *Salmonella enterica* and *Listeria monocytogenes* in food samples. *Food Microbiology* 26(3): 311-316.
- Dwivedi, H. P. & Jaykus, L. 2011. Detection of pathogens in foods: The current state-of-the-art and future directions. *Critical Reviews in Microbiology* 37(1): 40-63.
- EFSA, The European Food Safety Authority. 2013. The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2011. *EFSA Journal* 2013; 11(4):3129 [250 pp], doi:10.2903/j.efsa.2013.3129.
- Elizaquível, P., Aznar, R. & Sánchez, G. 2014. Recent developments in the use of viability dyes and quantitative PCR in the food microbiology field. *Journal of Applied Microbiology* 116: 1-13.
- Evira, 2009. Elintarvikkeiden mikrobiologiset vaatimukset, komission asetuksen (EY) No 2073/2005 soveltaminen. Ohje elintarvikealan toimijoille. Eviran ohje 10501/1. Saatavissa: <http://www.evira.fi/portal/fi/tietoa+evirasta/julkaisut/?a=view&productId=124>

- Francis, G.A. & O' Beirne, D. 1997. Effects of gas atmosphere, antimicrobial dip and temperature on the fate of *Listeria innocua* and *Listeria monocytogenes* on minimally processed lettuce. *International Journal of Food Science and Technology* 32: 141-151.
- FSIS, The Food Safety and Inspection Service. 2014. Foodborne pathogen test kits validated by independent organizations. Päivitetty 30.6.2014. Viitattu 17.10.2014. Saatavissa internetistä: <http://www.fsis.usda.gov/wps/wcm/connect/909c8279-6865-424d-ab7a-e1f165646c63/Validated-Test-Kit-Spreadsheet.xls?MOD=AJPERES>.
- Gahan, C.G.M. & Hill, C. 2014. *Listeria monocytogenes*: survival and adaptation in the gastrointestinal tract. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 4(9), doi: 10.3389/fcimb.2014.00009.
- Germini, A., Masola, A., Carnevali, P. & Marchelli, R. 2009. Simultaneous detection of *Escherichia coli* O175:H7, *Salmonella* spp., and *Listeria monocytogenes* by multiplex PCR. *Food Control*, 20(8): 733-738.
- Graves, L.M., Helsel, L.O., Steigerwalt, A.G., Morey, R.E., Daneshvar, M.I., Roof, S.E., Orsi, R.H., Fortes, E.D., Milillo, S.R., den Bakker, H.C., Wiedmann, M., Swaminathan, B. & Sauders, B.D. 2010. *Listeria marthii* sp. nov. isolated from the natural environment, Finger Lakes National Forest. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 60: 1280-1288.
- Hallanvuori, S. & Johansson, T. 2010. Elintarvikkeiden mikrobiologiset vaarat. *Eviran julkaisuja* 1/2010.
- Hall-Stoodley, L., Costerton, J.W. & Stoodley, P. 2004. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nature Reviews Microbiology* 2: 95-108.
- Halter, E.L., Neuhaus, K. & Scherer, S. 2013. *Listeria weihenstephanensis* sp. nov., isolated from the water plant *Lemna trisulca* taken from a freshwater pond. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 63(2): 641-647.
- ISO, International Organization for Standardization, 2004. EN ISO 11290-1:1996/A1:2004 Microbiology of Food and Animal Feeding Stuffs — Horizontal Method for the Detection and Enumeration of *Listeria monocytogenes* — Part 1 and Part 2.
- Jasson, V., Jacxsens, L., Luning, P., Rajkovic, A. & Uyttendaele, M. (2010). Alternative microbial methods: An overview and selection criteria. *Food Microbiology* 27(6): 710-730.
- Köppel, R., Kuslyte, A.R., Tolido, I., Schmid, J. & Marti, G. 2013. Nonplex real-time PCR detection of *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter*, *Salmonella* and enteropathogene *E-coli* after universal enrichment in food samples. *European Food Research and Technology* 237(3): 315-322.
- Laksanalamai, P., Joseph, L.A., Silk, B.J., Burall, L.S., Tarr, C.L., Gerner-Smidt, P. & Datta, A.R. 2012. Genomic characterization of *Listeria monocytogenes* strains involved in a multistate listeriosis outbreak associated with cantaloupe in US. *PLOS ONE* 7(7): e42448. doi:10.1371/journal.pone.0042448
- Lebesi, D., Bilbao, A., Diaz, A.I., Papadaki, I. & Oreopoulou, V. 2011. Integration of new/rapid methods and ICTs to improve food safety and quality. *International Congress on Engineering and Food (ICEF11) Proceedings*, March 22-26, 2011, Athens, Greece.
- Lebesi, D., Dimakou, C., Alldrick, A.J. & Oreopoulou, V. 2010. Rapid test methods: A versatile tool to assist food-safety management. *Quality Assurance and Safety of Crops and Foods* 2(4): 173-181.
- Leclercq, A., Clermont, D., Bizet, C., Grimont, P.A.D., Le Fleche-Mateos, A., Roche, S.M., Buchrieser, C., Cadet-Daniel, V., Le Monnier, A., Lecuit, M. & Allerberger, F. 2010. *Listeria rocourtiae* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 60(9): 2210-2214.
- Linnan, M. J., Mascola, L., Lou, X.D., Goulet, V., May, S., Salminen, C., Hird, D.W., Yonekura, M.L., Hayes, P. & Weaver, R. 1988. Epidemic listeriosis associated with Mexican-style cheese. *The New England Journal of Medicine* 319: 823-828.
- Lu, T.K., Bowers, J. & Koeris, M.S. 2013. Advancing bacteriophage-based microbial diagnostics with synthetic biology. *Trends in Biotechnology* 31(6): 325-327.
- MMM, Maa- ja metsätalousministeriö. 2013. Eläinten ja ihmisten välillä tarttuvat taudit. Suomen zoonoosistrategia 2013 - 2017. Työryhmämuistio mmm 2013:1.
- Markkula, A. 2013. *Listeria monocytogenes* elintarvikeketjussa – esiintyvyys ja bakteerin selviytymiskeinot. Viitattu 17.10.2014. Saatavissa: <http://www.evira.fi/files/attachments/fi/evira/tapahtumat/tutkimusseminaarit/markkula.pdf>
- Miettinen, M., Björkroth, K. & Korkeala, H. 1999. Characterization of *Listeria monocytogenes* from an ice cream plant by serotyping and pulsed-field gel electrophoresis. *International Journal of Food Microbiology* 46: 187-192.
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G. & Erlich, H. 1986. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 51(1): 263-73.
- Newell, D.G., Koopmans, M., Verhoef, L., Duizer, E., Aidara-Kane, A., Sprong, H., Opsteegh, M., Langelaar, M., Threlfall, J., Scheutz, F., van der Giessen, J. & Kruse, H. 2010. Food-borne diseases — the challenges of 20 years ago still persist while new ones continue to emerge. *International Journal of Food Microbiology* 139: S3–S15.

- Niessen, L., Luo, J., Denschlag, C. & Vogel, R.F. 2013. The application of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) in food testing for bacterial pathogens and fungal contaminants. *Food Microbiology* 36: 191-206.
- Norton, D.M., Scarlett, J.M., Horton, K., Sue, D., Timothe, J., Boor, K.J. & Wiedmann, M. 2001. Characterization and pathogenic potential of *Listeria monocytogenes* isolates from the smoked fish industry. *Applied Environmental Microbiology* 67: 646-653.
- Notomi, T., Okayama, H., Masubuchi, H., Yonekawa, T., Watanabe, K., Amino, N. & Hase, T. 2000. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Research* 28: e63.
- O'Grady, J., Rutledge, M., Sedano-Balbas, S., Smith, T. J., Barry, T. & Maher, M. 2009. Rapid detection of *Listeria monocytogenes* in food using culture enrichment combined with real-time PCR. *Food Microbiology* 26(1): 4-7.
- Ohk, S.H., Koo, O.K., Sen, T., Yamamoto, C.M. & Bhunia, A.K. 2010. Antibody-aptamer functionalized fibre-optic biosensor for specific detection of *Listeria monocytogenes* from food. *Journal of Applied Microbiology* 109(3): 808-817.
- Oliver, J.D. 2010. Recent findings on the viable but non-culturable state in pathogenic bacteria. *FEMS Microbiology Reviews* 34: 415-425.
- Omiccioli, E., Amagliani, G., Brandi, G. & Magnani, M. 2009. A new platform for real-time PCR detection of *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157 in milk. *Food Microbiology* 26(6): 615-622.
- Oravcová, K., Kuchta, T. & Kačliková, E. 2007. A novel real-time PCR-based method for the detection of *Listeria monocytogenes* in food. *Letters in Applied Microbiology* 45(5): 568-573.
- Portanti, O., Di Febo, T., Luciani, M., Pompili, C., Lelli, R. & Semprini, P. 2011. Development and validation of an antigen capture ELISA based on monoclonal antibodies specific for *Listeria monocytogenes* in food. *Veterinaria Italiana* 47(3): 281-290.
- Postollec, F., Falentin, H., Pavan, S., Combrisson, J. & Sohier, D. 2011. Recent advances in quantitative PCR (qPCR) applications in food microbiology. *Food Microbiology* 28(5): 848-861.
- Radhakrishnan, R., Jahne, M., Rogers, S. & Suni, I.I. 2013. Detection of *Listeria monocytogenes* by electrochemical impedance spectroscopy. *Electroanalysis* 25(9): 2231-2237.
- Rip, D. & Gouws, P.A. (2009). Development of an internal amplification control using multiplex PCR for the detection of *Listeria monocytogenes* in food products. *Food Analytical Methods* 2(3): 190-196.
- Rodríguez-Lázaro, D., Hernandez, M., Scotti, M., Esteve, T., Vázquez-Boland, J.A. & Pla, M. 2004. Quantitative detection of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* by real-time PCR: assessment of hly, iap and lin02483 targets and AmpliFluor technology. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(12): 1366-1377.
- Rodríguez-Lázaro, D., Pla, M., Scotti, M., Monzó, H.J. & Vázquez-Boland, J.A. 2005. A novel real-time PCR for *Listeria monocytogenes* that monitors analytical performance via an internal amplification control. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(12): 9008-12.
- Rodríguez-Lázaro, D., Gonzalez-García, P., Gattuso, A., Gianfranceschi, M.V. & Hernandez, M. 2014. Reducing time in the analysis of *Listeria monocytogenes* in meat, dairy and vegetable products. *International Journal of Food Microbiology*, 184: 98-105.
- Rossmann, P., Krassnig, M., Wagner, M. & Hein, I. 2006. Detection of *Listeria monocytogenes* in food using a combined enrichment/real-time PCR method targeting the prfA gene. *Research in Microbiology* 157(8): 763-771.
- Rudi, K., Naterstad, K., Dromtorp, S. & Holo, H. 2005. Detection of viable and dead *Listeria monocytogenes* on gouda-like cheese by real-time PCR. *Letters in Applied Microbiology* 40(4): 301-306.
- Ruiz-Rueda, O., Soler, M., Calvo, L. & Garcia-Gil, J.L. 2011. Multiplex real-time PCR for the simultaneous detection of *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* in food samples. *Food Analytical Methods* 4(2): 131-138.
- Salkinoja-Salonen, M. 2002. 4.1.3.4. Veden aktiivisuus ja suolapitoisuus. Mikrobiologian perusteita (toim. Salkinoja-Salonen, M.) Mikrobiologian julkaisuja 49/2001. Gummerus Kirjapaino Oy, Jyväskylä 2002.
- Schlech, W.F., Lavigne, P.M., Bortolussi, R.A., Allen, A.C., Haldane, E.V., Wort, A.J., Hightower, A.W., Johnson, S.E., King, S.H., Nicholls, E.S. & Broome, C.V. 1983. Epidemic listeriosis—evidence for transmission by food. *The New England Journal of Medicine* 308: 203-206.
- Sharma, H. & Mutharasan, R. 2013a. Review of biosensors for foodborne pathogens and toxins. *Sensors and Actuators B: Chemical* 183: 535-549.
- Sharma, H. & Mutharasan, R. 2013b. Rapid and sensitive immunodetection of *Listeria monocytogenes* in milk using a novel piezoelectric cantilever sensor. *Biosensors and Bioelectronics* 45: 158-162.
- Shim, W., Choi, J., Kim, J., Yang, Z., Lee, K., Kim, M., Ha, S., Kim, K.S., Kim, K.Y., Kim, C., Eremin, S. & Chung, D. 2008. Enhanced rapidity for qualitative detection of *Listeria monocytogenes* using an enzyme-linked immunosorbent assay and immunochromatography strip test combined with immunomagnetic bead separation. *Journal of Food Protection* 71(4): 781-789.
- Silva S., Teixeira, P., Oliveira, R. & Azeredo, J. 2008. Adhesion to and viability of *Listeria monocytogenes* on food contact surfaces. *Journal of Food Protection* 7: 1379-1385.

- Singh, A., Poshtiban, S. & Evoy, S. (2013). Recent advances in bacteriophage based biosensors for food-borne pathogen detection. *Sensors* 13(2): 1763-1786.
- Smartt, A.E., Xu, T., Jegier, P., Carswell, J.J., Blount, S.A., Sayler, G.S. & Ripp, S. 2012. Pathogen detection using engineered bacteriophages. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 402(10): 3127-3146.
- Strategic Consulting Inc., 2014. 5 Food Safety Testing Trends Expected for 2014. Viitattu 13.6.2014. Saatavissa: http://www.strategic-consult.com/2014/02/food-safety-testing-trends_2014/.
- Thomsen, M.R., Shiptsova, R. & Hamm, S.J. 2006. Sales responses to recalls for *Listeria monocytogenes*: Evidence from branded ready-to-eat meats. *Review of Agricultural Economics* 28, 482-493.
- THL, Terveyden ja hyvinvoinnin laitos. *Listeria*. Saatavissa: <http://www.thl.fi/fi/web/infektiotaudit/taudit-ja-mikrobit/bakteeritaudit/listeria>
- Velusamy, V., Arshak, K., Korostynska, O., Oliwa, K. & Adley, C. 2010. An overview of foodborne pathogen detection: In the perspective of biosensors. *Biotechnology Advances* 28(2): 232-254.
- Wan, C., Yang, Y., Xu, H., Aguilar, Z.P., Liu, C., Lai, W., Xiong, Y. & Wei, H. 2012. Development of a propidium monoazide treatment combined with loop-mediated isothermal amplification (PMA-LAMP) assay for rapid detection of viable *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Food Science and Technology* 47: 2460-2467.
- Wang, D., Huo, G., Ren, D. & Li, Y. 2010. Development and evaluation of a loop-mediated isothermal amplification (lamp) method for detecting *Listeria monocytogenes* in raw milk. *Journal of Food Safety* 30(2): 251-262.
- Wang, H., Li, Y., Wang, A. & Slavik, M. 2011. Rapid, sensitive, and simultaneous detection of three foodborne pathogens using magnetic nano-bead-based immunoseparation and quantum dot-based multiplex immunoassay *Journal of Food Protection*, 74(12): 20139-2047.
- Weschler, T. 2012. Comparison of food microbiology testing practices between the US and Europe. Julkaisematon posteresitys: 112th ASM General Meeting, June 16-19, 2012, San Francisco, California.
- Weschler, T. 2013. Comparison of microbiology testing practices. *Food Safety Magazine* June/July 2013. Viitattu 13.6.2014. Saatavissa: <http://www.foodsafetymagazine.com/magazine-archive1/junejuly-2013/comparison-of-microbiology-testing-practices/>.
- WHO. Baseline information for food safety policy and measures. Estimating the global burden of foodborne diseases. http://www.who.int/foodsafety/about/flyer_foodborne_disease.pdf
- Wu, V.C.H. 2008. A review of microbial injury and recovery methods in food. *Food Microbiology* 25: 735-744.
- Ye, K., Zhang, Q., Jiang, Y., Xu, X., Cao, J. & Zhou, G. 2012. Rapid detection of viable *Listeria monocytogenes* in chilled pork by real-time reverse-transcriptase PCR. *Food Control* 25(1): 117-124.
- Yeni, H., Acar, S., Polat, Ö.G., Soyer, Y. & Alpas, H. 2014. Rapid and standardized methods for the detection of food pathogens and mycotoxins on fresh produce. *Food Control* 40: 359-367.
- Zeng, H., Zhang, X., Sun, Z. & Fang, W. 2006. Multiplex PCR identification of *Listeria monocytogenes* isolates from milk and milk-processing environments. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 86(3): 367-371.

MTT TEKEE TIETEESTÄ ELINVOIMAA

MTT RAPORTTI 169

www.mtt.fi/julkaisut

MTT Raportti -verkkojulkaisusarjassa julkaistaan maatalous- ja elintarviketutkimusta sekä maatalouden ympäristötutkimusta käsitteleviä tutkimusraportteja. Lukijoille tarjotaan tietoa MTT:n kaikilta tutkimusaloilta eli biologiasta, teknologiasta ja taloudesta.

MTT, 31600 Jokioinen.

