



Årsrapport 2022

Kvalitetsanalyser til dokumentation af mikrobiologiske ændringer i fødevarer (tidl. "Nye mikrobiologiske metoder")

Birgit Groth Storgaard

30. marts 2023
Proj.nr. 2008769
Version: 1
Init. BGS/LME/MT

Formål med rapporten

Formålet med nærværende rapport er at afrapportere aktiviteter udført i SAF-projektet "Kvalitetsanalyser til dokumentation af mikrobiologiske ændringer i fødevarer" i 2022. Desuden formidles udviklingsarbejde med mikrobiomanalyser, som er udført i projekterne "Resultatkontrakt B1 Bæredygtige Fødevarer" og "DNAPROKON" (finansieret af GUDP <https://gudp.lbst.dk/nyheder/nyhed/nyhed/dna-test-skal-afsloere-bakterier-i-madvarer> og Uddannelses- og Forskningsstyrelsen under Uddannelses- og Forskningsministeriet).

Sammendrag

Zoonoserapporter

I Europa og i Danmark har følgende mikroorganismer forårsaget flest fødevarer- og vandrelaterede sygdomsudbrud i 2021:

Danmark 2021 (DTU rapport 29.06.22)	Europa 2021 (EFSA rapport 13.12.22)
1) Norovirus (22,2%)	1. <i>Salmonella</i>
2) <i>Salmonella</i> serotypes (19,0 %)	2. <i>Campylobacter</i>
3) <i>L. monocytogenes</i> (7,9 %)	3. <i>Yersinia</i>
4) <i>Campylobacter</i> (4,8 %)	4. <i>Escherichia coli</i> (STEC)
5) <i>Clostridium perfringens</i> (4,8%)	5. <i>Listeria</i>

Test af nye mikrobiologiske metoder

Der er testet en ny hurtigmetode til kimtalsbestemmelse, CytoQuant®-testudstyr, som er et håndholdt system, der bygger på flowcytometri, og som på 30 sekunder leverer analysesvar i form af antal intakte bakterieceller og antal øvrige partikler i en svaberprøve.

Vurdering af CytoQuant®-testudstyr

Udstyret er let at bruge og kræver ingen særlig træning før brug. Aflæsning af resultat direkte på udstyret er entydigt, og udlæsning af data til Excel fungerer, som det skal. Prismæssigt og ressourcemæssigt er CytoQuant kimtællinger konkurrencedygtige med standard kimtællinger.

CytoQuant blev vurderet i forhold til rengøringskontrol i DMRI pilot plant. Egenkontrolprogrammet i DMRI pilot plant foreskriver en øget opmærksomhed ved 10-100 CFU/cm². På nuværende tidspunkt vurderes CytoQuant ikke velegnet til rengøringskontrol i DMRI pilot plants produktionslokaler grundet hygiejnekravene. CytoQuant har en nedre detektionsgrænse på 150 intakte celler/cm². CytoQuant vil sandsynligvis kunne anvendes i produktioner, som opererer med aktionskrav på over 150 cfu/cm². Hvis følsomheden kan nedsættes yderligere, og der kan produceres overbevisende sammenligningsdata, kan CytoQuant få stort

potentiale som testmetode til vurdering af hygiejnestandarden i produktionslokalder.

Teoretisk vurdering af nye produkter Der holdes løbende øje med nye produkter til det mikrobiologiske laboratorium. I rapporten er følgende produkter vurderet på teoretisk plan: Pulsifier II® til prøvforberedelse, DuoClick kulturrør til dyrkning af kulturer, Oxyrase til opnåelse af anaerobe flydende kulturer.

Mikrobiomanalyser Der er i 2022 fokuseret på, hvordan sekventeringen kan udføres ude på virksomhederne. Mobilt sekventeringsudstyr er blevet afprøvet, og der er gennemført sekventering på en fødevarevirksomhed uden eget laboratorium. Der er udviklet en protokol til Oxford Nanopore minION til identifikation af fødevareforædvende skimmelsvampe vha. sekventering af ITS-regionen.

Opdaterede metoder og certifikater I nærværende rapport er de opdaterede NMKL metoder listet samt nye certifikater fra NordVal.

Formål og mål

Formålet med projektet "Kvalitetsanalyser til dokumentation af mikrobiologiske ændringer i fødevarer" er at sikre slagteri- og forædlingsvirksomhederne i grisekødsbranchen adgang til og et overblik over den nyeste viden om mikrobiologiske problemstillinger og analysemetoder.

Målet er, at viden om og overblik over de nyeste mikrobiologiske analysemetoder gør det muligt at vælge de bedste og mest omkostningseffektive løsninger og være på forkant med kunde- og myndighedskrav. Derved sikres den danske kødindustri mulighed for at bevare sit forspring i forhold til konkurrenterne. Nye, relevante analysemetoder afprøves for at give bedst mulig sparring til kødindustrien og for at sikre de bedst egnede metoder til brug i projektarbejdet i DMRI's udviklingsprojekter.

Baggrund

Baggrunden for projektet er, at nye mikrobiologiske analysemetoder ofte er billigere samt mere effektive og tidsbesparende end traditionelle analysemetoder, både hvad angår samlet analysetid og tidsforbrug til håndtering. Et hurtigere analysesvar kan give mulighed for at agere, inden viderediskonering eller afsendelse af produktet, og dermed forhindre tilbagekald. Når mikrobiologiske metoder udvikles til at være hurtigere og billigere end traditionelle analysemetoder, kan analysemetoderne nogle gange være udfordret på mindre følsomhed og/eller mindre nøjagtighed. Der kommer hele tiden nye produkter på markedet, og målet i nærværende projekt er at overvåge markedet, teste udvalgte produkter og videregive opnået viden til den danske kødindustri. Det er ligeledes målet at følge udviklingen inden for sygdomsfremkaldende bakterier bl.a. via konferencer og litteraturen.

Afprøvning og perspektivering af nye mikrobiologiske metoder

Nyheder indenfor mikrobiologiske analysemetoder overvåges systematisk, bl.a. ved direkte kontakt til leverandører, gennem netværk og hjemmesider samt

abonnement på relevante nyhedsmedier. I nedenstående beskrives de metoder, der er afprøvet og vurderet.

Hurtigmetoder til hygiejnemålinger

I fødevarerindustrien bruges visuel inspektion som den primære metode til at evaluere udstyrs renhed. Produktrester på udstyr eller svært tilgængelige områder kan være svære at opdage, når store produktionssteder skal vurderes efter den daglige rengøring. Både synlige og usynlige produktrester på udstyr udgør en risiko for dannelse af bakteriel biofilm. Et værktøj til hurtig visualisering af produktrester og/eller bakteriel biofilm på overflader og udstyr kunne være interessant for fødevarerindustrien, da store områder hurtigt vil kunne inspiceres.

Der findes værktøjer til hurtig visualisering, som DMRI tidligere har testet, fx Bactiscan og UltraSnap™ ATP-måling (se årsrapport 2021).

Mikrobiologiske analyser af totalkim og/eller specifikke kim (bakterier) anvendes ofte, når en grundig inspektion af produktionsområder ønskes og/eller for at imødekomme lovkrav. Disse typer af analyser er dog langsommelige og leverer først et svar efter en eller flere dage.

Et værktøj til hurtig måling af hygiejneniveau og detektion af bakterier på overflader og udstyr kunne være interessant for fødevarerindustrien, da store områder nemt vil kunne inspiceres. Ved fund af bakterier kan korrigerende handlinger hurtigt sættes i gang.

DMRI har testet CytoQuant®-testudstyr, som er et nyt håndholdt system, der bygger på flow-cytometri, og som på 30 sekunder leverer analysesvar i form af antal intakte bakterieceller og antal øvrige partikler i en svaberprøve.

Generelt om CytoQuant®

CytoQuant® er udviklet af danske SBT Instruments i samarbejde med Romer Labs og forhandles i Europa af Romer Labs (se figur 1).



Figur 1. Foto af CytoQuant (kilde: <https://www.romerlabs.com/en/products/cytoquant-mobile-flow-cytometer/>).

CytoQuant® er et håndholdt system, der bygger på elektrisk detektionsteknologi i form af impedans flow cytometri. CytoQuant® er beregnet til rengøringskontrol i fødevarer- og foderindustrien. Systemet detekterer og måler alle bakterier i en svaberprøve fra overflader i typiske produktionsmiljøer. Der måles både intakte bakterieceller og øvrige partikler i svaberprøven.

Indbygget i CytoQuant® sidder en CountCell™, som måler impedansen af det elektriske signal hen over flowcellen, hvorved der kan angives et tal for antallet af intakte bakterier og øvrige partikler. Levetiden for CountCell™ er 800 målinger. CytoQuant® er operativt i temperaturområdet +5 til +30°C, og har følgende måleområde:

Udstyrets måleområde (pr. cm²) er:
150-300.000 intakte celler/cm²
1.500-150.000 partikler /cm²

CytoQuant® skal bruges sammen med CytoQuant-swab kit, og der medfølger desuden særlige rør med væsker til rengøring af udstyrets flowsystem efter/under brug samt rør med væsker, når CytoQuant® skal opbevares i kortere eller længere tid.

Den opsamlede svaberprøve blandes med væske i prøverøret ved at omryste røret i 10 sek. Herefter sættes prøverøret i CytoQuant, og prøven analyseres for indholdet af intakte celler og for øvrige partikler. Denne analyse tager 30 sek. En udvidet analyse, hvor detektionsgrænsen sænkes, tager 130 sek. og forbruger 3 x standardmålinger i CountCell levetid. Resultatet aflæses direkte fra skærmen, og data kan på et senere tidspunkt eksporteres fra CytoQuant til Excel.

Pris (2023)

Prisen for CytoQuant er ca. 25.000 DKK og ca. 25 DKK pr. prøve.

Test i produktionslokaler

CytoQuant® er undersøgt i fødevarereproduktionslokaler i forbindelse med den daglige visuelle rengøringskontrol i DMRI's pilot plant. CytoQuant® er testet på visuelt rengjorte og tørrede overflader (dagen efter rengøring), på utilstrækkeligt rengjorte områder med synligt snavs samt på områder med bevidst påført bakterieholdigt kødsaft (fortyndet) for at danne sammenligningsgrundlag med snavsede overflader.

CytoQuant® resultatet er sammenlignet med direkte kimtællinger på CytoQuant svaberprøver samt almindelige svaberprøver taget på overflader ved siden af CytoQuant svabringen (se kimtalsdata i Tabel 1).

Sammenligning af kimtals data

På rene overflader (ved lavt kimtal) er der sammenhæng mellem kimtal bestemt ved en standard svaber-analyse(cfu/cm²) og kimtal direkte på CQ-rør (se tabel 1).

Der er dog ingen tydelig sammenhæng mellem kimtal af CytoQuant-rør og CytoQuant cell count (se tabel 1). Dette kan skyldes, at det anvendte traditionelle kimtal kun finder psykrotrofe bakterier (kimtal bestemt ved 6,5°C), og at CytoQuant cell count måler alle intakte bakterier. Det højere antal celler, som CytoQuant cell count finder, kunne være mesofile bakterier samt biofilmdannende bakterier, der optræder i et "viable-but-non-culturable" (VBNC) stadie.

Detektionsgrænse

CytoQuant cell count har ved hurtigmetode (30 sekunders analysetid) en detektionsgrænse på 450 cfu/cm². I forhold til egenkontrol i DMRI's pilot plant er denne detektionsgrænse ikke tilstrækkelig.

Ved forlænget måling (130 sekunders analysetid) kan detektionsgrænsen komme ned på 150 cfu/cm². Ved forlænget måling bruges 3 x CountCells 800 målinger. Dette betyder, at ved fx 25 daglige prøver skal Count Cell udskiftes ca. 1 gang ugentligt.

Også følsomheden med forlænget måling er utilstrækkelig i forhold til egenkontrolprogrammet i DMRI's pilot plant, hvor der skal være øget opmærksomhed, hvis kimtallet for psykrotrofe bakterier efter rengøring er 10-100 CFU/cm², og hvor der skal foretages ny rengøring, hvis kimtallet er højere.

Til sammenligning er detektionsgrænsen for traditionelle kimtællinger på 0,5 cfu/cm², mens detektionsgrænsen for CytoQuant måling, som nævnt er hhv. 450 cfu/cm² og 150 cfu/cm² for standard og udvidet måling.

Tabel 1. Sammenligning af data opnået ved standard svaber kimtal, kimtal målt direkte i CytoQuant rør og kimtal bestemt ved CytoQuant count.

Acceptkrav ^A Kimtall (cfu/cm ²)	Cfu/cm ² , std svaber	Cfu/cm ² , direkte i CytoQuant-rør	Cfu/cm ² , CytoQuant count	Partikler/cm ² , CytoQuant count	Antal prøver under CytoQuant detektionsgrænse (<450 cfu/cm ²)	Antal sammenligninger	Typer af udstyr/overflader
<10	≤0,5 - 9	<0,5 - 10	<450 - 30.000	<1500 - >150.000	18	91	Rengjort udstyr m/u sæbere- ster, kalkrester, støv, olierester
10-100	10,5 - 93,5	<0,5 - 535	<450 - 23.700	13.500 - >150.000	1	15	Tilsmudsede overflader
100- 1000	100,5 - 790	<0,5 - 2200	480 - 3600	19.800 - >150.000	0	19	Tilsmudsede overflader
>1000	1350- 14.000	<0,5 - 2450	660 - 11.400	24.000 - >150.000	0	11	Tilsmudsede overflader

^A Generelle acceptkrav til hygiejnestandard i DMRI's produktionslokaler baseret på kimtælling, jf. Tabel 2.

Tabel 2. Generelle acceptkrav til hygiejnestandard i DMRI's produktionslokaler baseret på kimtælling (cfu/cm²).

Kimtal < 10	OK
10 < Kimtal < 100	Kan være bedre
100 < Kimtal < 1000	Skal være bedre
1000 < Kimtal < 10.000	Skal være meget bedre
Kimtal > 10.000	Helt uacceptabelt - må ikke forekomme

Vurdering af CytoQuant®-testudstyr

CytoQuant blev vurderet i forhold til rengøringskontrol i DMRI pilot plant. Egenkontrolprogrammet i DMRI pilot plant foreskriver en øget opmærksomhed ved 10-100 CFU/cm². På nuværende tidspunkt vurderes CytoQuant ikke velegnet til rengøringskontrol i DMRI pilot plants produktionslokaler grundet hygiejnekravene. CytoQuant har en nedre detektionsgrænse på 150 intakte celler/cm². CytoQuant vil sandsynligvis kunne anvendes i produktioner, som opererer med aktionskrav på over 150 cfu/cm².

Hvis følsomheden kan nedsættes yderligere, og der kan produceres overbevisende sammenligningsdata, kan CytoQuant få stort potentiale som testmetode til vurdering af hygiejnestandarden i produktionslokaler.

Udstyret er let at bruge og kræver ingen særlig træning før brug. Der ikke skal bruges tid på at registrere prøvelD og sted m.v. på CytoQuant-udstyret, og analysen er derfor hurtig at udføre i produktionsområdet. Det er dog nødvendigt at føre en sideløbende logbog for at kunne koble CytoQuant ID med prøvested. Aflæsning af resultat direkte på udstyret er entydigt, og udlæsning af data til Excel fungerer, som det skal.

Prismæssigt og ressourcemæssigt er CytoQuant kimtællinger konkurrencedygtige med standard kimtællinger.

Interessant nyt fra leverandører – produktet er ikke afprøvet af Teknologisk Institut DMRI

Pulsifier II® – Alternativ til stomachering

Microgen Bioproducts har udviklet en alternativ metode (Pulsifier II®) til fødevarereprøveforbehandling ifm. mikrobiologiske analyser. Typisk anvendes en standard stomachering af fødevareprøver i stomacheringsposer.

Pulsifier II® behandler ydersiden af plastikposen med høj frekvens, hvilket producerer en kombination af chokbølger og intens omrøring, der driver mikroberne i suspension. Denne pulsering er mindre ødelæggende for prøven, hvorved der produceres en lavere koncentration af bundfald i posen, hvilket kan have de nedenfor beskrevne fordele.

Ifølge producenten er der bl.a. følgende fordele ved pulsering fremfor stomachering:

1. reduceret risiko for brud på posen pga. skånsom behandling
2. lettere pipettering pga. mindre fødevaremateriale i opløsning
3. renere prøve (mindre fødevaremateriale i opløsning) gør pladeaflæsning lettere og mere præcis
4. effektiv proces – bakteriegenfinding svarer til eller er bedre end alternative metoder
5. hurtigere prøveforberedelsestid på 15 sekunder for de fleste fødevarer
6. hurtigere filtrering som følge af renere prøve (mindre fødevaremateriale i opløsning)
7. reduceret ødelæggelse af fødevarematrix minimerer hæmning/interferens med PCR, flowcytometriteknikker m.v.

Pulsifier® er inkluderet i ISO:7218:2007(E); Mikrobiologi af fødevarer og foderstoffer.

<https://microgenbioproducts.com/pulsifier-a-revolution-in-microbiological-test-sample-preparation/>

DuoClick kulturrør til aerobe eller anaerobe kulturer fra MTC Bio

DuoClick kulturrør kan bruges til dyrkning af kulturer og til de fleste rutinemæssige laboratorieprocedurer. DuoClick kulturrør har et skruelåg med klikssystem, som kan sættes i to positioner: løs position til aerobt arbejde eller forseget til anaerobe kulturer. Lågets klikssystem gør det nemt at vurdere, hvilken position hættten sidder i. Når hættten drejes en kvart omgang til første klik, er i den aerobe position. Når hættten drejes yderligere en halv omgang forbi det andet klik, er røret sikret lufttæt forsegling til anaerob dyrkning.

Kulturrørene er gammasteriliserede og kan centrifugeres ved op til 1.400 g. Kulturrørene fås i 5 og 14 ml og kan bruges i temperaturområdet fra 0°C til 70°C. Rørene er desuden certificeret fri for nuklease-, endotoksin- og ATP-forurening.

<https://dacos.dk/vare/duoclick-kulturrør-5-og-14-ml/>

Anaerobt system til flydende kulturer – Oxyrase

Oxyrase til bouillon er en steril enzymformulering, der bruger Oxyrase Enzyme System til at producere anaerobe forhold i forskellige mikrobiologiske bouillonmedier. Oxyrase-bouillon støtter vækst af anaerobe organismer og genoplivning af frysetørrede kulturer. Oxyrase er klart til brug og tilsættes det valgte substrat (bouillon) i forholdet 0,1 ml pr. 1 ml substrat. Bouillonnen bliver herefter anaerob på mindre end 30 minutter, og Oxyrase fortsætter med at fjerne ilt fra beholdrens headspace under den efterfølgende inkubering.

Oxyrase-bouillon kan fx bruges i clostridiale® substrater, hvor et anaerobt miljø ønskes. Det er også set brugt som komponent i medier til mikroskopi- og billeddannelse, som skal foregå i iltfrie miljøer. Oxyrase®-bouillon er set egnet til anaerob dyrkning af fx *Shigella sonnei*, *Shewanella oneidensis*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* og *Pseudomonas aeruginosa*.

OBS! Oxyrase indeholder et penicillinbindende protein, der kan forstyrre penicillin og nogle relaterede antibiotika.

<https://www.sigmaaldrich.com/DK/en/product/sigma/sae0013>

MinION all-in-one sekventeringsmaskine

Specifikt arbejdes der med mikrobiomanalyse (bakterieidentifikation og -sammensætning vha. DNA-sekventering) på Illumina MiSeq.

Nanopore Technologies sekventeringsprodukter er interessante, og særligt Oxford Nanopore MinION testes løbende hos DMRI mhp. bakterieidentifikation og undersøgelse af bakteriesammensætninger i fødevarer vha. DNA-sekventering.

Nanopore Technologies har videreudviklet MinION og fremstillet en all-in-one sekventeringsmaskine med indbygget touch-screen skærm.

<https://nanoporetech.com/products/minion>.

Mikrobiomanalyser

Videreudvikling og optimering af mikrobiomanalyser

Der arbejdes fortsat med DNA-baserede analysemetoder til identifikation af mikroorganismer fra fødevarer og produktionssystemer.

Specifikt arbejdes der med mikrobiomanalyse (bakterieidentifikation og -sammensætning vha. DNA-sekventering) på Illumina MiSeq og Oxford Nanopore Minion. Der arbejdes med udvikling og optimering af både den bioanalytiske pipeline (sampling og DNA-analyse) og prototype af IT-værktøj til behandling af sekventeringsdata.

I 2022 er der fokuseret på, hvordan sekventeringen kan udføres ude på virksomhederne. Der er indkøbt forskelligt mobilt udstyr, som er blevet testet, og der er gennemført sekventering på en fødevarevirksomhed uden eget laboratorium. Det lykkedes at gennemføre testen på én dag, men der var nogle udfordringer med dataanalysen. Disse problemer arbejder Københavns Universitet på at løse.

Et kit til 16S sekventering (identifikation af bakterier) fra Oxford Nanopore er afprøvet. Der er et meget simpelt workflow i kittet, og det kunne være udgangspunkt for en simpel og hurtig protokol. Desværre var resultaterne ikke tilfredsstillende, da PCR'en (opformering af relevant DNA) ikke virkede på alle prøvematerialer.

Der er også udviklet en protokol til Oxford Nanopore minION, så svampe kan identificeres vha. sekventering af ITS-regionen. Tidligere har der kun været en protokol til identifikation af bakterier, men skimmel og gær er også hyppigt årsag til fordærv. Disse vil kunne bestemmes med den nye protokol.

Overvågning af fødevarerelaterede patogener (og analysemetoder) via litteratur, netværk og konferencer

EFSA 2021,
Zoonoserapport

Hvert år udgiver EFSA & ECDC en zoonoserapport (The European Union One Health Zoonoses Report), der indeholder resultater fra det foregående års overvågning af forskellige zoonoser. I overvågningen deltager 37 lande: 27 lande fra EU og 10 ikke-medlemslande inkl. Storbritannien. Rapporten for 2021 udkom 13. december 2022:
<https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/european-union-one-health-2021-zoonoses-report>.

Rapporten konkluderer i hovedtræk, at der i Europa i 2021 blev rapporteret 4.005 fødevarerelaterede udbrud i medlemslande (inkl. Storbritannien) samt 83 udbrud i ikke-medlemslande, hvilket er en stigning på i alt 29,8% i forhold til 2020. Antallet af fødevarerelaterede sygdomsudbrud er dog generelt lavere ved sammenligning med præ-pandemiudbrud (2017-2019).

Følgende top fem patogener var årsag til fødevarerelaterede sygdomsudbrud i 2021:

1. *Salmonella*
2. *Campylobacter*
3. *Yersinia*
4. *Escherichia coli* (STEC)
5. *Listeria*.

DTU 2021,
Zoonoserapport

Den årlige zoonoserapport (2021) fra DTU Fødevareinstituttet udkom 29. juni 2022.

I Danmark blev der i 2021 registreret 63 fødevarebårne sygdomsudbrud med i alt 1.257 sygdomstilfælde. Dette er en stigning ift. 2020, hvor kun 35 fødevarebårne sygdomsudbrud blev registreret. Stigningen skyldes, at år 2020 var et helt særligt covid-19-pandemisk år med et lavere antal regionale/lokale udbrud end sædvanligt. Til sammenligning blev der i 2019 registreret 51 fødevarebårne sygdomsudbrud.

De mikroorganismer, der hyppigst var årsag til fødevare- og vandrelaterede sygdomsudbrud i 2021, var:

- 1) Norovirus (22,2%),
- 2) *Salmonella* serotyper (19,0 %),
- 3) *L. monocytogenes* (7,9 %),
- 4) *Campylobacter* (4,8 %),
- 5) *Clostridium perfringens* (4,8%).

[Annual report on Zoonoses in Denmark 2021](#)

International konference:
Rapid Methods Europe 2022

National og international vidensudveksling

DMRI deltog i konferencen Rapid Methods Europe 2022 (03.10.-05.10.22) med en poster og 20 min oplæg om brug af at-line sekventering.

Generelle trends

Konferencen havde stort fokus på, hvordan at-line/in-line analyser kan øge kvaliteten eller mindske madspild i fødevarebranchen. Fokus var dog primært i forhold til food fraud/authentication og ganske lidt om mikrobiologisk anvendelse.

Teknisk var det meget om forskellige typer spektroskopi og lab-on-a-chip. Der var generelt en erkendelse af, at det var en stor udfordring at tage repræsentative prøver med en acceptabel detektionsgrænse og simpel prøveforberedelse, men der var sjældent forslag til løsninger på problemet.

International konference:
International Association for Food Protection (IAFP) 2022

DMRI deltog i den årlige konference for International Association for Food Protection (IAFP) (30.07-03.08.22), hvor der bl.a. blev fokuseret på aspekter af rengøring/hygiejne, bedre udnyttelse af datasæt (inkl. prædiktiv mikrobiologi), animalsk fødevarer sikkerhed, metodevalidering og holdbarhedstestning samt på udbydere af mikrobiologiske metoder (gerne DNA-baserede).

Praktisk anvendelse af mikrobiomanalyser

Flere (amerikanske) virksomheder anvender DNA-baserede mikrobiologiske teknikker (16S-analyse) til at monitorere sammensætningen af mikroorganismer i produktionsområder og helt ned på prøveudtagningssted i de enkelte rum.

Ligeledes anvendes 16S-analyser til at undersøge årsager til unormale total-kimsanalyser i produktionsmiljøer ved fx at sammenligne svaberprøver fra forskellige produktionszoner. Herved kan virksomheden få bekræftet, om igangsatte

rengøringsprocedurer og hurdles har haft den ønskede effekt ved at sammenligne sammensætningen af mikroorganismer i prøver fra de forskellige zoner.

International konference:

Food Micro 2022

DMRI deltog i Food Micro 2022 med undertitlen "Next generation challenges in food microbiology"

Generelle trends

I flere foredrag var der fokus på, at fx 16 S rRNA sekventering ikke giver tilstrækkelig information til at forstå forskellige biotopers mikrobiologi. Selvom navnet på bakterierne kan være det samme på 2 biotoper, kan bakteriernes fysiologi være forskellig, da det er forskellige stammer af bakterierne, der findes på de 2 biotoper. Der var flere foredrag, hvor der var benyttet shotgun sekventering eller fuldgenomsekventering, og samtidig er der kommet meget mere fokus på mikroorganismernes fysiologiske egenskaber.

Blandt posterpræsentationer var der stort fokus på antibiotikaresistens i bakterier fra alle typer fødevarer.

Biokonservering er fortsat et indsatsområde (havde sin store periode i 90'erne, hvor også Teknologisk Institut DMRI deltog og patenterede en *L. carnosum* stamme).

*Dansk netværk:
Eurolab Danmark*

Der har været afholdt et møde i mikrobiologisk netværk den 6. april 2022, hvor bl.a. covid-19-analyser af prøver/spildevand, automatiseringsprocesser i laboratorier og lagerstyring samt systemer til temperaturovervågning blev drøftet.

Det planlagte møde den 26. oktober 2022 hos Danish Crown i Ringsted er blevet udskudt til 2023.

Referater af afholdte møder kan findes på Eurolab Danmarks hjemmeside under kundeportalen: <https://eurolabdanmark.dk/memberportal/frontpage>

*Nordisk netværk:
NMKL. Nordisk Metodikkomité for
Levnedsmidler*

Der deltages løbende i NMKL-møder. DMRI deltager med en repræsentant i den mikrobiologiske komité. I arbejdsgruppen revideres eksisterende metoder, og der besluttet, hvilke nye NMKL-metoder der skal udarbejdes. Der har været afholdt 3 online-møder i den mikrobiologiske komité foruden årsmødet afholdt i august 2022.

Specifikt deltager DMRI i arbejdet med at udvikle en beskrivelse af PCR-arbejde samt i arbejdet med at udvikle en opdateret metode til mælkesyrebakterier, idet der ønskes fokus på detektion af mælkesyrebakterier, der normalt ikke vokser på substratet MRS.

Uddrag fra NMKL-årsrapport:

1. En fornyelse af NMKL har fundet sted i løbet af 2021 og 2022, hvilket har resulteret i effektiviserede interne arbejdsprocesser i NMKL, udvidelse af

- NMKL til at omfatte de baltiske lande og styrkelse af online-formidling via nyt website.
2. Der er etableret et nyt nordisk/baltisk NMKL med effekt fra august 2022, hvorved de baltiske lande Estland, Letland og Litauen deltager i NMKL arbejdet.
 3. Nyt NMKL-website er offentliggjort pr. maj 2022 bl.a. med links til opdaterede certifikater, nyhedsbreve, årsrapporter m.v. <https://www.nmkl.org>.
 4. Tilmelding til NMKL nyhedsbreve kan ske fra hjemmesiden eller dette link <https://www.nmkl.org/newsletter-signup/>.
 5. Arbejdssproget (inkl. kommende metoder/procedurer) i NMKL-regi udgøres nu primært af engelsk.
 6. NMKL har aktive samarbejder med andre organisationer, herunder ISO, AOAC Europe, og MicroVal.

Find den fulde NMKL-årsrapport her: <https://www.nmkl.org/category/reports/>.

Nyt om NMKL-metoder/-procedurer

Følgende mikrobiologiske NMKL-metoder/-procedurer er blevet opdaterede og publicerede:

- [Procedure 17 - NMKL](#) Guidelines for Requirement Specifications for Food Analysis. 2nd edition. Publiceret oktober 2022.
- [Method 117 - NMKL](#) Pathogenic *Yersinia enterocolitica*. Detection in food, animal feed and environmental samples. 4th edition. Publiceret december 2022.
- [Method 184 - NMKL](#) "Aerobic count and specific spoilage organisms in fish and fish products" er blevet opdateret og publiceret i juni 2022 med uddybende tekst tilføjet til afsnit 8.4.1 Jern agar: "The plates should be read immediately after the incubation is finished as the colour of the colonies can fade if stored in the fridge for a prolonged period of time (e.g. over the weekend)."
- [NordVal International Protocol No. 1](#) er opdateret i januar 2022 efter harmonisering med ISO 16140-2:2016. Krav om brug af Kappa, en statistisk til afprøvning af sammenlignelighed mellem to kvalitative metoder, er blevet fjernet. Beregninger af følsomhed er blevet tydeliggjort.

Følgende mikrobiologiske NMKL-metoder/-procedurer er blevet trukket tilbage:

- NMKL [Method 137](#) "Bacterial count. Determination by direct epifluorescent filter technique (DEFT) in raw minced meat" blev trukket tilbage den 2. november 2022. Metoden bliver ikke længere vedligeholdt, men er tilgængelig via <https://www.nmkl.org> i yderligere 5 år.

Nyt om certifikater

Nye certifikater:

- [NordVal 056](#). "Microbiologique *Salmonella* IEH Test Kit" fra "Microbiologique" er blevet certificeret af NordVal International den 17.10.22. Metoden kan anvendes til detektion af *Salmonella* spp. i råmælk og mejeriprodukter, rå og ready-to-eat kødprodukter, æg og æggeprodukter, fisk og fiskeprodukter, multicomponent foods og miljøprøver. Metoden inkluderer en opformeringskultur efterfulgt af PCR assay(s).

Fornyede certifikater:

- NordVal 032 RAPID'*Salmonella* method, short protocol, RAPID'*Salmonella* method, double enrichment protocol
- NordVal 034 Compact Dry ETB, for the enumeration of Enterobacteriaceae in a broad range of foods
- NordVal 035 Compact Dry CF, for the enumeration of total coliforms in a broad range of foods
- NordVal 036 Compact Dry EC, for enumeration of *E. coli* and coliforms in a broad range of foods
- NordVal certificate 037 "iQ-Check® *Listeria monocytogenes* II" issued by Bio-Rad Laboratories blev fornyet fra 01.1022 indtil 2024. Metoden beskriver detektion af *Listeria monocytogenes* ved brug af 1 af 5 mulige prøveforberedelsesprotokoller efterfulgt af real-time PCR ved brug af fluorescerende prober.
- NordVal 050 'Compact Dry YM RAPID' (Nissui Pharmaceutical Co. Ltd) til kvantificering af levedygtige gær og skimmel i en bred vifte af fødevarer. Udløber: 15.06.2024.
- NordVal 022 RAPID' *L. mono*, Bio-Rad Laboratories, Expires: 01.05.24 er fornyet 01.052022. Metoder kan anvendes til detektion og kvantificering af *Listeria monocytogenes* og til detektion af andre *Listeria* arter i en bred vifte af fødevarer og miljøprøver.
- NordVal 049 RAPID'*Staph*, Bio-Rad Laboratories. Expires: 20.05.24 Metoden kan anvendes til kvantificering af koagulase-positive *staphylococci* (*Staphylococcus aureus* og andre arter) i en bred vifte af fødevarer.
- NordVal 030 BAX® System PCR Assay for *Salmonella* (Classic + Q7 instruments), Qualicon Diagnostics fra Thermo Fisher Scientific (OXOID Limited). Udløber 01.05.24. Metoden kan anvendes til detektion af *Salmonella* spp. i en bred vifte af fødevarer, dyrefoder og miljøprøver.

Udvidede certifikater:

- NordVal 054 "foodproof® *Listeria plus L. monocytogenes* Detection LyoKit – 5'Nuclease" (BIOTECON Diagnostics GmbH) er udvidet i januar 2022 til at inkludere LOD50 til forskellige matricer.
- NordVal 038 "iQ-Check *Salmonella* II kit" (Bio-Rad) er udvidet og opdateret i januar 2022.
Et metodesammenligningsstudie er udført på fødevarer, foder, miljøprøver og primærproduktionsprøver. Metoden er udvidet til at omfatte analyse af rå kød, rå mejeriprodukter, modernælkserstatning og kornprodukter til spædbørn med eller uden probiotika, herunder ingredienser. Udvidelsen omfatter også brugen af iQ-Check Free DNA Removal Solution til kategorien Infant Formula Matrix. For alle matricer blev en kortere PCR (fra 110 minutter ned til 72 minutter) med "Salmo Fast" APF (Assay Protocol File) valideret.

*DANAK, akkredite-
ring*

Det mikrobiologiske laboratorium ved Teknologisk Institut DMRI har opretholdt DANAK-akkrediteringen.

Laboratoriet har gennemført de planlagte præstationsprøvninger med tilfredsstillende resultat, og DMRI's kvalitetsstyringssystem er blevet ajourført.

Foruden de akkrediterede analysemetoder har laboratoriet et beredskab af specialanalyser, som ikke er akkrediterede.