



# Årsrapport 2023

## Metodiske problemstillinger indenfor mikrobiologi

Birgit Groth Storgaard

18. marts 2024

Proj.nr. 2010424

Version: 1

Init. BGS/mt

### Formål med rapporten

Formålet med nærværende rapport er at afrapportere mikrobiologiske aktiviteter udført i SAF-projektet "Metodiske problemstillinger indenfor mikrobiologi og sensorik" i 2023. Desuden formidles udviklingsarbejdet med mikrobiomanalyser, som er udført i projekterne "Resultatkontrakt B1 Bæredygtige Fødevarer" og "DNAPROKON" (finansieret af [GUDP](#) 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 2022:

Danmark 2022 (DTU rapport 26.06.23)	Europa 2022 (EFSA-rapport 12.12.23)
1) <i>Campylobacter</i> (17,5%),	1. <i>Campylobacter</i>
2) <i>Salmonella</i> serotyper (17,5%),	2. <i>Salmonella</i>
3) <i>L. monocytogenes</i> (9,5%),	3. <i>Yersinia</i>
4) <i>Clostridium perfringens</i> (3,2%)	4. <i>Escherichia coli</i> (STEC)
5) <i>Yersinia enterocolitica</i> (3,2%)	5. <i>Listeria monocytogenes</i>
6) <i>Cryptosporidium parvum</i> (3,2%)	

#### Ressourcebesparelser i laboratorier

Der er i 2023 fokuseret på, hvordan der kan spares ressourcer i laboratorier. Tre leverandører og to laboratorier er blevet interviewet og har givet deres gode råd til ressourcebesparelser. Desuden er to laboratoriemetoder undersøgt som cases for at vurdere, om optimering/ændring af de pågældende metoder giver mulighed for besparelser fx i form af tid og materialer.

#### Mikrobiomanalyser

I 2023 er der fokuseret på, hvordan sekventering kan bruges til proceskontrol og fejlsøgning ude hos fødevarer virksomheder. Der har desuden været fokus på at teste og implementere en metode til kvantificering af bakterier vha. DNA-sekventering. Metoden er udviklet af Københavns Universitet i projektsamarbejdet DNAPROKON.

#### Opdaterede metoder og certifikater, NMKL og NordVal

I nærværende rapport er listet opdaterede NMKL-metoder og procedurer samt nye certifikater fra NordVal. Link til [NMKL](#).

## Formål og mål

Formålet med projektet "Metodiske problemstillinger indenfor mikrobiologi og sensorik" 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 litteraturen og konferencer.

## 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.

### *Ressourcebesparelser i laboratorier*

Ønsket om at mindske ressourceforbruget i laboratorier er allestedsnærværende; hvad enten det gælder om at mindske spild, nedsætte det materielle ressourceforbrug eller mindske og/eller frigive menneskelige ressourcer til andre aktiviteter i laboratoriet. Der har i 2023 været fokus på at undersøge tilgængelige muligheder, hvorpå de industrielle laboratorier kan vurdere muligheder for ressourcebesparelser.

Specifikt er der indsamlet gode råd fra leverandører og laboratorier til reduktion af mikrobiologiske laboratoriers ressourceforbrug. De gode råd er indsamlet via interviews og er beskrevet nedenfor. Ligeledes er der nedenfor beskrevet to cases, som giver inspiration til, hvordan laboratorier kan vurdere muligheder for optimering af metoder i laboratoriet. Case 1 og case 2 er begge udført af det mikrobiologiske laboratorium på DMRI.

- Case 1 sammenligner en klassisk, men ressourcetung MPN-metode med en mere simpel LAB Petrifilm til bestemmelse af luftproducerende mælkesyrebakterier i fødevarer.
- Case 2 giver et forslag til design af test til vurdering af, om holdbarheden af anvendte substrater med rimelighed kan forlænges for at mindske spild.

*Gode råd fra leverandører og laboratorier via interviews*

Tre leverandører og to laboratorier blev udvalgt (blandt eksisterende samarbejdspartnere) og interviewet. De har givet deres 3 gode råd og forslag til, hvordan man som mikrobiologisk laboratorium kan mindske sit ressourceforbrug. Det mikrobiologiske laboratorium på DMRI har hverken testet og/eller vurderet korrektheden i de nedenfor beskrevne gode råd og forslag fra leverandører og laboratorier, men de kan bruges som inspiration til optimering i egne laboratorier.

Nedenfor er angivet Fooddes', Food Diagnostics' og Avantors 3 gode råd og anbefalinger.

*3 gode råd fra Fooddes*

Fooddes har 3 gode råd til, hvordan man kan mindske ressource-spild i et mikrobiologisk laboratorie:

1. Skifte petriskåle ud med Petrifilm
2. Molekylær detektionssystem (3M MDS)
3. Desinfektionsmidlet 2-i-1 sæbe

*Petrifilm i stedet for petriskåle*

Første gode råd fra Fooddes er at skifte petriskåle ud med Petrifilm. Petriskåle tager meget plads i fx varmeskabet, og der skal bruges mere tid, vand og plastik på at fremstille dem. Petrifilm, som er på størrelse med en stor post-it, tager ikke lige så meget plads i varmeskabet, da der er mulighed for at stable 20 stk. Petrifilm ovenpå hinanden. Derudover er der mulighed for at spare tid, vand, energi og affald. Fooddes henviser til deres hjemmeside, hvor de har en 3M Petrifilm-beregner, som viser laboratoriets bæredygtighedsbesparelser ved at skifte til 3M Petrifilm.

*MDS fra 3M*

Den anden anbefaling til at reducere ressource-spild og optimere laboranternes tid er det molekulære detektionssystem MDS fra 3M/Neogen. Systemet bruges til detektion af patogener, og der er mulighed for at få resultater med det samme eller næste dag. Dette er altså med til at reducere laboranternes tid på den enkelte analyse.

*2-i-1 sæbe*

Det tredje råd fra Fooddes er, at man kigger på sine desinfektionsmidler, da der findes midler med mindre kemi, og som er mere bæredygtige. Et eksempel er, at Fooddes sælger en fødevarer-godkendt 2-i-1 sæbe, som indeholder både sæbe og desinfektion. Ved anvendelse af denne sæbe bruges der markant mindre vand, da der kun skal efterskylles.

*For mere information*

Links til ovennævnte materialer og udstyr fra Fooddes' hjemmeside:

- [Petrifilm](#)
- [Desinfektionsmidlet 2-i-1 sæbe](#)

*Interview og kontakt-oplysninger* Alle ovennævnte informationer er baseret på interview (november 2023) med Pavia Winther, salgskonsulent (Tlf.: 25 74 07 04, E-mail: pw@fooddes.dk)

Kontaktoplysninger

[Fooddes A/S](#)

Tlf.: +45 70 20 75 60

E-mail: info@fooddes.dk

*3 gode råd fra Food Diagnostics* Food Diagnostics' 3 gode anbefalinger til at optimere sit laboratorie og dermed mindske sit ressourcetilbud er:

1. Køb allerede færdigstøbte plader (Compact Dry)
2. Automatisk afvejning (DiluFlow)
3. Automatisk aflæsning (Scan® 1200)

*Mediefremstilling* Første anbefaling fra Food Diagnostics er, at man kan spare tid og ressourcer ved at købe allerede færdigstøbte plader. Her tænkes der bl.a. på Compact Dry eller færdigstøbte 9 cm petriskåle med agar i. Herved spares både tid og udgifter til bl.a. fremstilling og autoklavering af substrater. Compact Dry findes til forskellige patogener, gær og skimmel.

*Automatiseret afvejning (DiluFlow)* Anden anbefaling er automatisering af afvejning med maskinen DiluFlow. Denne maskine er en hjælp i forhold til fortynding. Maskinen er koblet til poser med fx saltvand og dispenserer derfor den passende mængde til prøven alt efter vægt, og hvilken fortynding man ønsker. På den måde kan laboranter spare tid ved fortyndingen, hvilket frigiver tid til andre opgaver.

*Automatiseret kolonitælling (Scan® 1200)* Tredje anbefaling er automatisk tælling af bakteriekolonier på plader med Scan® 1200, som giver et hurtigt resultat med dokumentation og sporbarhed.

Scan® 1200 er en højopløselig, automatisk farvekolonitæller, der muliggør aflæsning af alle plader (petriskåle, Petrifilm™, Compact Dry™, RidaCount™ og Spiralplader) automatisk.

Systemet er brugervenligt med høj nøjagtighed og reproducerbarhed, der automatisk gemmer både billeder og resultatet af pladeaflæsningen.

*For mere information* Links til ovennævnte materialer og udstyr fra Food Diagnostics' hjemmeside:

- [Compact Dry](#)
- [DiluFlow](#)
- [Scan® 1200](#)

*Interview og kontakt-oplysninger* Alle ovennævnte informationer er baseret på interview (december 2023) med Ehsan Mirsharghi, productspecialist i mikrobiologi.

Kontaktoplysninger

[Food Diagnostics A/S](#)

Tlf.: 87 59 16 66

E-mail: info@fooddiagnostics.dk

### *3 gode råd fra Avantor*

Avantors anbefalinger til at optimere sit laboratorie, og dermed spare tid og mindske ergonomiske bevægelser, er:

1. Automatisering af workflow
2. Spar tid på mediefremstilling
3. Alternative metoder (PCR og ATP-måler)

### *Automatisering af processer i analyse flow*

Første anbefaling fra Avantor er at automatisere prøveforberedelsen, analysen, spredningen og aflæsningen. Prøveforberedelsen kan optimeres ved at bruge en dilumat, fx DiluFlow eller Gravimetric Dilutor. Den afvejer og fortynder automatisk prøven og er derfor med til at spare tid og mindske ergonomiske tunge bevægelser for laboranten.

For spredning er der også automatiserede metoder, som kan være med til at spare tid og mindske ergonomiske tunge bevægelser. Her er der bl.a. en spiral plater (easySpiral), som udfører en fortyndingsrække og derefter spreder prøven ud på en plade ved hjælp af en cirkulær spredning. Den kan give op til en 6x fortynding. Ved brug af denne undgår man at fortynde ved hjælp af fortyndingsrør. Den har også mulighed for at udføre lineær og ufortyndet udsæd.

En anden metode til automatiseret spredning er en petri dish turner. Den bruges til at sprede ufortyndet prøve på en petriplade og giver en meget ensartet udsæd. Dermed sparer man at dreje pladen med en drigalskispattel.

Til aflæsning kan der spares tid ved en automatisk kolonitæller. Der er flere forskellige modeller – helt fra den simple kolonitæller (fx Scan 50) til en større model med indbygget inkubator (fx ScanStation 100).

### *Mediefremstilling*

Anden anbefaling handler om at spare tid på mediefremstilling med klar-til-brug plader, flasker og rør. Avantor anbefaler bl.a. chromogene medier, som giver vækst med farvede kolonier ved specifikke mikroorganismer. Disse medier kan være med til at spare tid ved verificering. Avantor har deres egen produktion af chromogene medier.

Petrifilm og Compact dry er også to gode løsninger, som bl.a. er med til at spare plads ved inkubering og har en lang holdbarhed.

Desuden er medieposer en tidsbesparende løsning. De fås på flere forskellige måder fx som pulver, hvor der tilsættes demineraliseret vand eller med diverse fortyndingsbuffer. Medieposen kan kobles til dilumaten.

### *Brug alternative metoder (ATP, PCR)*

Tredje anbefaling er at gøre brug af andre metoder som PCR-test og ATP-måler.

PCR-test bruges til at analysere prøver, men kræver lidt mere plads i form af et rent område (PCR-workstation), PCR-maskinen og testkittet.

ATP-måler er en metode til at lave hygiejnekontrol i produktionsområder samt til renrumskontrol. Der findes bl.a. produkterne Clean-Trace og Lumitester smart.

*For mere information*

Links til ovennævnte materialer og udstyr fra Avantors hjemmeside:

- [DiluFlow og Gravimetric Dilutor](#)
- [easySpiral](#)
- [Kolonitæller](#)
- [Chromogene medier](#)
- [Petrifilm](#)
- [Compact dry](#)
- [Medieposer](#)
- [PCR-testkit](#)
- [PCR-maskiner og cyclers](#)
- [PCR workstation](#)
- [Andre PCR-produkter](#)
- [ATP-måler Clean-Trace](#)
- [ATP-måler Lumitester smart](#)

*Interview og kontaktoplysninger*

Alle ovennævnte informationer er baseret på interview (december 2023) med Helle Pedersen (Field Sales Specialist, Microbiology, Tlf.: 43 86 87 30, E-mail: helle.pedersen@avantorsciences.com)

Kontaktoplysninger

[Avantor](#)

Tlf.: 43 86 87 88

E-mail: mikrobiologi.dk@avantorsciences.com

*Interview af laboratorier*

To laboratorier er blevet interviewet (i december 2023) og har givet input til, hvordan de sparer tid og penge på analyser, substrater og materialer i laboratoriet, samt om de har et par gode anbefalinger til, hvordan man mindsker resourcespild.

*Laboratorium 1, Danish Crown, Horsens*

Når laboratoriet hos Danish Crown i Horsens undersøger, hvordan de kan spare tid og penge på analyser og udstyr, er laboranterne selv meget opmærksomme og opsøgende, men de har også en indkøber, som tit får spændende nye tilbud hjem fra leverandører. I laboratoriet følger de med, hvis der kommer nyt udstyr på markedet.

Den nyeste optimering i laboratoriet er udskiftning af Dilucup til et dispenseringssystem (Serial Diluter). Laboratoriet var tilfredse med Dilucup, men har nu fundet en ny løsning, som både er billigere og mindsker affald.

Når laboratoriet vil undersøge, hvordan de kan optimere metoder og arbejdsgange i laboratoriet, vil laboratoriets kvalitetsansvarlige teste nye ting og vurdere, hvor og hvordan der kan optimeres. Der kigges bl.a. på:

- Er det en analyse, vi kan lave selv?
- Er der et behov for den her analyse?
- Hvad siger vores kunder?

Danish Crowns laboratorie har et par anbefalinger til at spare tid, som de er rigtig glade for:

- Deltaget i en ringtest for en ny listeriaanalyse: *Listeria Velox*. Denne metode er fordelagtig for laboratoriet, da den er hurtigere, billigere og resourcebesparende.
- Laboratoriet kører næsten heller ingen analyser på standardplader mere og kun en smule på Petrifilm. I stedet bruger de MPN-metoden TEMPO til mikrobiologiske analyser fx total kimtal og *E. coli*, hvor der er en god besparelse. I kølvandet på implementering af TEMPO har laboratoriet haft en artikel i fagbladet Laboranten.

*For mere information*

Links til ovennævnte materialer og udstyr fra leverandørers hjemmeside:

- [Serial Diluter dispenseringssystem](#)
- [Listeria Velox](#)
- [TEMPO](#)

*Laboratorium 2 (ønsker at være anonym)*

Et laboratorie har undersøgt, hvordan de kan spare tid og penge ved at skifte til nye metoder:

- Klassisk pladespredning er udskiftet med Petrifilm, og laboratoriet har fået installeret robotter til automatisering af dele af laboranternes arbejde; fx fortynding, pladespredning og påhældning af substrat.
- Implementering af metoden TEMPO (til analyse af alle hygiejneparametre), som er en hurtigere metode og derved tidsbesparende.

Selvom om nogle af de implementerede metoder og udstyr er dyrere end en traditionel pladespredning, så sparer laboratoriet en del tid, som kan frigives til andre opgaver i laboratoriet.

Laboratoriets gode råd til andre laboratorier, der ønsker at mindske ressourcspild er, at man laver en opgørelse over antallet af prøver, samt hvilke ressourcer man har til rådighed. Desuden kan man tænke over:

- Har man et lille eller et stort laboratorie?
- Hvilke muligheder har man til rådighed?
- Findes der alternative måder at gøre tingene på?
- Kan det betale sig økonomisk og på længere sigt?

De synes også, at det er vigtigt, at man tager 'plejerne' væk, da de ofte forhindrer os i at komme videre.

*For mere information*

Links til ovennævnte materialer og udstyr fra leverandørers hjemmeside:

- [TEMPO](#)

*Case 1:  
Screening af sammenlignelighed af tidskrævende standardmetode mod Petrifilm og verificering ved brug af DNA-sekventering*

Et laboratorium anvender en ressourcetung standardmetode til at undersøge fødevarer for forekomst og bestemmelse af antallet af luftproducerende mælkesyrebakterier (baseret på MPN (Most Probable Number)).

For at undersøge muligheder for optimering og ressourcebesparelser blev laboratoriets standardmetode sammenlignet med bestemmelse af antallet af luftproducerende mælkesyrebakterier ved brug af Petrifilm. Identifikation af luftproducerende mælkesyrebakterier blev verificeret ved 16S amplikon sekventering. Testen blev udført af det mikrobiologiske laboratorium ved DMRI.

18 prøver fra 3 forskellige produktkategorier (med varierende grader af luftdannelse) blev analyseret for mælkesyrebakterier (LAB) ved følgende metoder:

- Totale antal mælkesyrebakterier og luftproducerende mælkesyrebakterier v. [LAB Petrifilm](#) (20°C/5 dg)
- Most Probable Number (MPN) i MRS-bouillon m. durhamrør (20°C/7 dg og 30°C/7 dg (data ikke vist) efter modificeret intern protokol mht. inkubationstid og -temperatur
- Verificering foretaget ved 16S amplikon sekventering på Illumina på udvalgte kolonier

*Standardmetode  
MPN-baseret*

Laboratoriets standardmetode MPN har sine fordele ved dels at være en velkendt klassisk metode, dels at være meget visuel i forbindelse med aflæsning, hvor der sjældent er tvivl om gasdannelse (figur 1). Ulemperne er, at metoden er arbejdskrævende og kræver en betydelig manuel håndtering ved fremstilling af substrater, inkubering og aflæsning.



**Figur 1.** Fotos af det samlede antal MPN-rør anvendt ved sammenligningstesten samt eksempler på positive rør med luftudvikling.

*LAB Petrifilm (20°C/5 dage)*

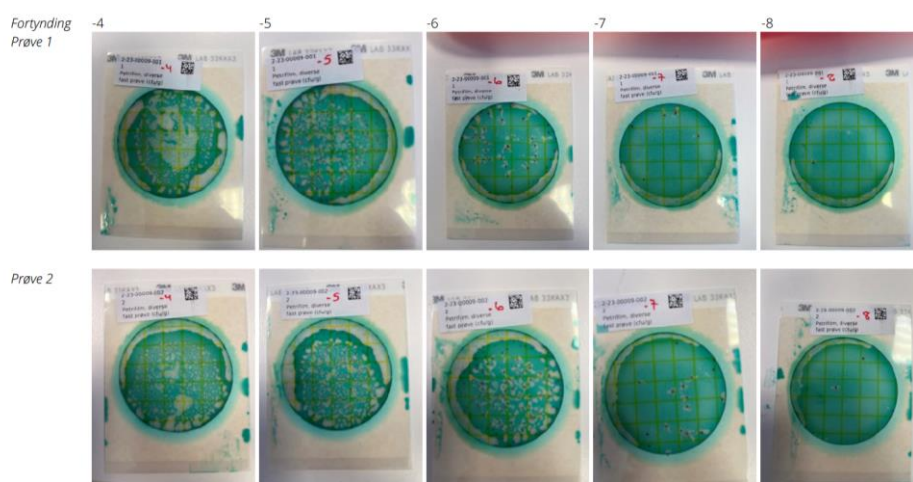
Der er flere fordele ved at bruge Petrifilm fremfor den ressourcetunge MPN-metode, da arbejdsbyrden ved at bestemme luftproducerende mælkesyrebakterier ved LAB Petrifilm er minimal sammenlignet med MPN-metoden (ingen substratfremstilling samt pladsbesparende ved inkubering). Det viste sig



desuden muligt at differentiere mellem luftproducerende mælkesyrebakterier og mælkesyrebakterier, som ikke producerer luft på LAB Petrifilm (figur 2).

Der er dog ingen tvivl om vigtigheden af at ramme de rette fortyndingsniveauer, da de mindst fortyndede prøver (fortynding -4, -5 og -6) er svært læselige og/eller ulæselige pga. den megen luftudvikling. I sådanne tilfælde med kraftig luftproduktion kan luftbobler omkring de enkelte kolonier flyde sammen og endda løfte filmen.

Anvendeligheden af Petrifilm begrænses desuden, når kimtallet af luftproducerende LAB er væsentligt lavere end det totale LAB kimtal. Herved kan luftproducerende kolonier 'forsvinde' på overvoksede plader.



**Figur 2.** Fotos af udvalgte LAB Petrifilm (20°C/5 dage) med luftproducerende kolonier.

*Sammenligning af kimtal bestemt ved LAB Petrifilm og MPN-metoden*

Rent analyse-mæssigt er antallet af luftproducerende mælkesyrebakterier bestemt efter MPN og LAB Petrifilm inkuberet ved 20°C i hhv. 7 og 5 dage sammenlignelige (se tabel 1).

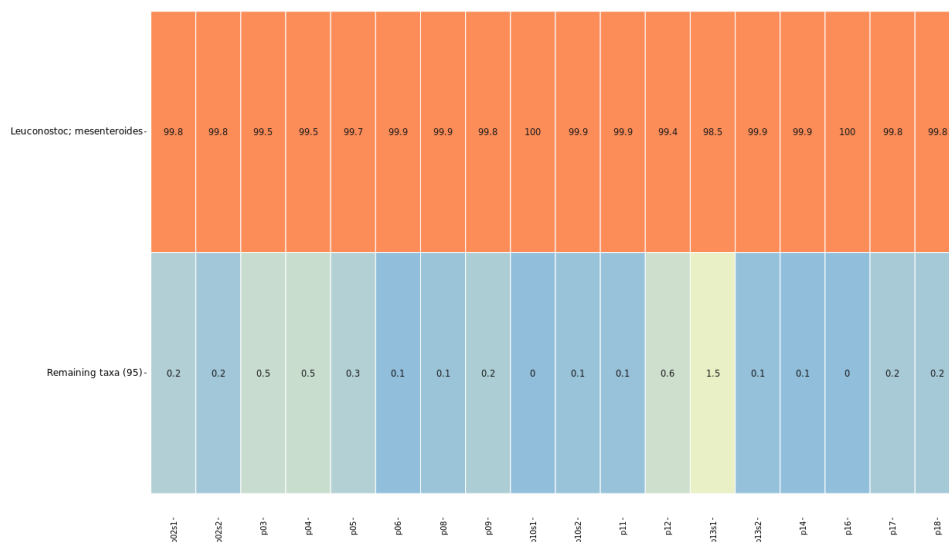
**Tabel 1.** Luftproducerende mælkesyrebakterier bestemt ved LAB Petrifilm og MPN-metode i 18 prøver fordelt på 3 produktkategorier.

	LAB Petrifilm, 20°C/5 dage	MPN-metode, 20°C/7 dage		LAB Petrifilm, 20°C/5 dage	MPN-metode, 20°C/7 dage
Prøve	log (cfu/g)	log (MPN/g)	Prøve	log (cfu/g)	log (MPN/g)
1	7,4	> 8,0	10	Ca. 7,6	8,0
2	Ca. 8,1	6,6	11	Ca. 8,0	7,7
3	7,6	7,7	12	7,4	> 6,0
4	Ca. 7,9	8,0	13	Ca. 7,8	7,7
5	7,7	7,7	14	8,2	> 8,0
6	7,3	> 6,0	15	7,4	7,7
7	> 10,0	> 8,0	16	Ca. 7,9	8,0
8	Ca. 8,0	7,7	17	7,8	> 8,0
9	Ca. 8,1	8,0	18	3,5	4,0

Verificering af luftproducerende mælkesyrebakterier ved 16S sekventering

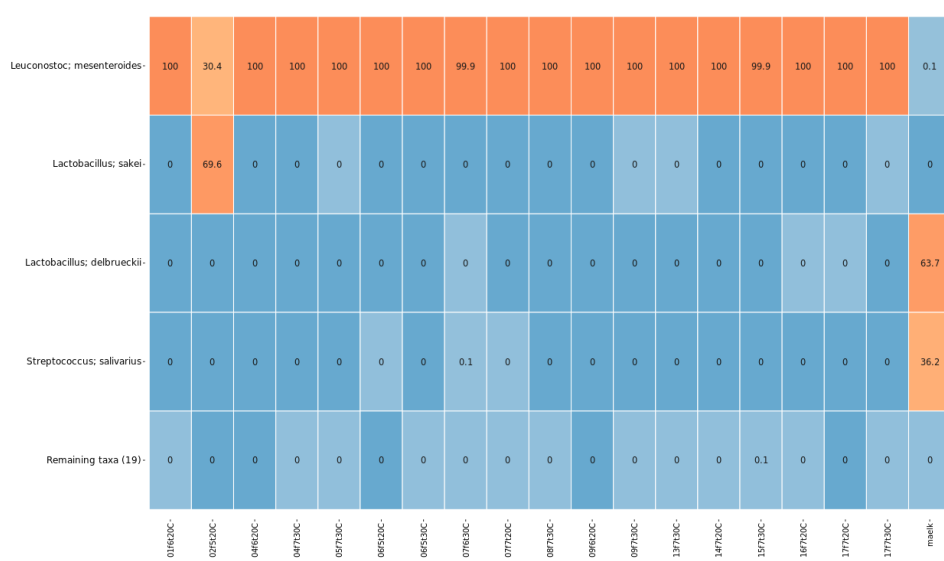
Overordnet viser 16S-sekventeringen, at både de luftproducerende kolonier isoleret fra LAB Petrifilm og de luftproducerende MPN-rør identificeres som *Leuconostoc (mesenteroides)*.

18 kolonier med tydelig luftproduktion blev isoleret fra Petrifilm og 16S-sekventeret. Af figur 3 ses, at alle pustende kolonier isoleret fra Petrifilm identificeres som *Leuconostoc (mesenteroides)*.



Figur 3. Heatmap af dominerende art i 18 pustende kolonier isoleret fra Petrifilm.

Prøvemateriale fra 18 MPN-rør identificeres ligeledes hovedsageligt som *Leuconostoc (mesenteroides)*, dog med en enkelt undtagelse (prøve 02f5t20C), hvor der foruden *Leuconostoc* også identificeres *Lactobacillus* (figur 4).



Figur 4. Heatmap af dominerende arter i MPN-rør med luftudvikling ved 20°C og 30°C.

Anvendelse af LAB Petrifilm til bestemmelse af kimtal for luftproducerende mælkesyrebakterier

LAB Petrifilm vurderes egnet til brug for detektion af luftproducerende mælkesyrebakterier fra den testede fødevare-case samt kimtalsbestemmelse af både luftproducerende og ikke-luftproducerende mælkesyrebakterier.

Arbejdsbyrden ved at bestemme luftproducerende mælkesyrebakterier ved LAB Petrifilm er minimal sammenlignet med MPN-metoden.

Aflæsning af luftproducerende mælkesyrebakterier på LAB Petrifilm er simpel, men vil kræve en smule oplæring i laboratoriet i form af ensretning af laboranters vurdering af kolonivækst og luftdannelse på LAB Petrifilm. Et fotokatalog vil her være en god hjælp. En kraftig luftproduktion kan løfte filmen og/eller luftbobler kan flyde sammen, hvilket besværliggør aflæsningen.

LAB Petrifilm er AOAC godkendt (certifikat nr. 041701) til brugsområdet 28-37°C, men i denne case afprøvet ved hhv. 20°C og 30°C (data for 30°C ikke vist).

Der bør udføres en egentlig validering af LAB Petrifilm i det ønskede brugsområde, fx 20°C, op mod egen standardmetode.

3M beregningsværktøj til vurdering af besparelser ved skift til Petrifilm

Overvejer man at udskifte traditionelle agarplader med Petrifilm, er der hjælp at hente fra 3M i form af et beregningsværktøj til illustration af, hvilken positiv indvirkning et sådant skifte kan have for laboratoriet i form af bæredygtighedsbetragtninger.

[3M™ Petrifilm™ Plate Sustainability Challenge](#) ligger online og beregner ud fra et ugentligt forbrug af agarplader, hvor meget vand, affald, CO<sub>2</sub> og strøm laboratoriet i så fald kan spare ved at skifte til Petrifilm.

Eksempel:

Har laboratoriet normalvis et forbrug på 500 agarplader om ugen, viser 3M-beregneren, at der ved skift til Petrifilm i gennemsnit spares 27.300 liter vand, reduceres affald med 780 kg, elimineres CO<sub>2</sub>-udslip, som svarer til 21.060 kørte km for en typisk personbil, samt at der spares energi svarende til at kunne drive 403.520 60W lyskilder i en time.

The image shows the landing page for the 3M Petrifilm Sustainability Challenge. It features the 3M logo and the tagline "Science. Applied to Life." The main heading is "Take the 3M™ Petrifilm™ Plate Sustainability Challenge". Below this, there is a paragraph explaining the challenge and its benefits. A large green tree is shown on a grassy field. To the right of the tree, there are four icons representing environmental benefits: Water (79% reduction), Waste (66% reduction), CO<sub>2</sub> emissions (75% reduction), and Energy (76% reduction). At the bottom, there is a section titled "How many agar method tests do you perform per week?" with a text input field and a "CALCULATE" button.

The image shows the "Results" page of the 3M Petrifilm Sustainability Challenge. It features a blue header with the word "Results" and a sub-header: "Based on the number of indicator tests you entered, these numbers show the positive impact you can have on the environment as an animal bank by using 3M™ Petrifilm™ Plates instead of agar plates." Below this, there are four horizontal bars representing different environmental benefits: 1. "Saving 27,300.0 liters of water" (blue bar with water splash background). 2. "Reducing solid waste by 780.0 kg" (green bar with trash can background). 3. "Eliminating the CO<sub>2</sub> emissions from one typical passenger vehicle driving 21,060.0 kilometers" (blue bar with clouds background). 4. "Conserving enough energy to power 403,520.0 60W light bulbs for one hour" (red bar with light bulb background). At the bottom, there is a small text box: "Learn more about improving your lab's sustainability at 3M.com/Sustainability".

Case 2  
Undersøgelse af mulighed for holdbarhedsforlængelse af substrat med uhen-sigtsmæssig kort holdbarhed (BBCA)

Holdbarheden af specifikke substrater kan ofte være ganske kort pga. substraternes indholdsstoffer, som selekterer for specifikke mikroorganismer og forhindrer vækst af andre. En kort holdbarhed er i mange laboratorier uhensigtsmæssig ift. laboratoriers normale arbejdsflow, ligesom det risikeres, at ubrugt substrat kasseres pga. overskredet holdbarhed. En forlængelse af holdbarheden af substrater efter fremstilling kan derfor reducere både ressourceforbrug i laboratoriet og substratspild, hvilket er særligt interessant, fordi kostprisen for disse specifikke og selektive substrater ofte er i den dyre ende.

Som case er valgt Brilliance *Bacillus cereus* agar (BBCA, Oxoid CM1036, tidligere chromogen *Bacillus cereus* Agar), som er et chromogent substrat til isolering og differentiering af *Bacillus cereus* fra fødevarer. På BBCA vokser *B. cereus* med blågrønne kolonier.

Producenten anbefaler 14 dages holdbarhed efter fremstilling af substratet. Det mikrobiologiske laboratorium hos DMRI tillader en holdbarhed på køl på 14 dage for grundsubstrat på flaske og herefter 14 dage ophældt på plader (efter tilsætning af supplement).

Denne holdbarhed på 14 dage forsøges udfordret, og formålet er således at afdække:

- i) om holdbarheden af BBCA kan forlænges ift. holdbarheden fastsat af producenten
- ii) på hvilken måde substratets funktionalitet (farve og/eller fremvækst) ændres for ældede batches af BBCA.

Princip, BBCA

BBCA benytter sig af det chromogene substrat 5-brom-4-chlor-3-indolyl- $\beta$ -glucopyranosid, som spaltes af enzymet  $\beta$ -glucosidase, hvorved der dannes blå/grønne kolonier.

Hvide kolonier bør evalueres med forsigtighed, da  $\beta$ -glucopyranosid-negative *B. cereus* stammer kan vise sig som hvide kolonier på BBCA pga. dårlig eller ingen udnyttelse af det chromogene stof.

En kombination af to antibiotika polymyxin B og trimethoprim har tilsammen vist sig mere effektivt end brugen af polymyxin B alene. Polymyxin B hæmmer de fleste gramnegative organismer og nogle grampositive organismer, herunder nogle andre *Bacillus* arter end *Bacillus cereus*. Trimethoprim blokerer folinsyntese, der er nødvendig for DNA-produktion og er aktiv mod mange grampositive bakterier, herunder *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus* spp. og nogle andre *Bacillus* arter end *Bacillus cereus*.

Design af forsøg

Der blev løbende indsamlet forældede batches af BBCA for at sikre en god variation i alder og produktionsdatoer på de fremstillede batches.

Der blev gennemført to forsøg. For begge forsøg gælder, at der blev testet to referencebatches (A og B) og 2-3 forældede batches (C, D, E).

Reference A repræsenterer et standardbatch, som er fremstillet, hældt på flaske og opbevaret på køl i 14 dage. Efter 14 dage på køl på flaske, smeltes substratet, og der tilsættes supplement, inden plader støbes og opbevares på køl i 14 dage.


























Reference B repræsenterer et best case batch, som fremstilles frisk på anvendelsesdagen, køles og tilsættes supplement, inden plader støbes.

Batch C, D, og E har efter fremstilling (på flaske) været opbevaret på køl i op til 9 mdr. (se tabel 2 og 3 nedenfor), inden tilsætning af supplement og støbning af plader.

I forsøg 1 er de 5 batch BBKA undersøgt løbende i op til 35 dage, mens de 4 batch BBKA i forsøg 2 er analyseret én gang efter 14 dage.

Forsøg 1 er en indledende screening af 3 forældede batches funktionalitet ved løbende udstregning af 4 morfologisk forskellige *Bacillus cereus* stammer samt sammenligning af kimtal fra et mix af de 4 stammer mod to referencebatches af BBKA samt et referencekimtal på BHI-Agar i op til 35 dage efter støbning af BBKA-plader (se tabel 2).









**Tabel 2.** Oversigt over design af forsøg 1 (screening af 3 forældede batches)

	Ældede substrater <sup>A</sup>			Referencer <sup>B</sup>		Mikrobiologiske test <sup>C</sup>			
Batch	7	5	2	14	0	1	14	28	35
C									
D									
E									
A									
B									

<sup>A</sup> Ældede batches af BBKA (mdr). Opbevaret på køl på flaske uden supplement tilsat i hhv. 2, 5 og 7 måneder, <sup>B</sup> Referencebatches af BBKA (dage), opbevaret på køl uden supplement tilsat i hhv. 0 og 14 dage, <sup>C</sup> Mikrobiologiske undersøgelser af substrat (udstregning af renkulturer + kimtal af mix), undersøgelser udført hhv. 1, 14, 28 og 35 dage efter tilsætning af antimikrobielt supplement og støbning af plader.

Forsøg 2 er en verificering af funktionalitet ved test af 3 forskellige fødevarer med en naturlig baggrundsflora og samtidig podet med *Bacillus cereus*. Ved dette forsøg blev der undersøgt 14 dage gamle plader fremstillet af to forældede batches BBKA mod to reference batches af BBKA (se tabel 3).

**Table 3.** Oversigt over design af forsøg 2 (funktionalitet af 2 forældede batches)

	Ældede substrater <sup>A</sup>		Referencer <sup>B</sup>		Test <sup>B</sup>
Batch	9	5	14	0	14
C					
D					
A					
B					

<sup>A</sup> Ældede batches af BBCA (mdr). Opbevaret på køl på flaske uden supplement tilsat i hhv. 5 og 9 måneder, <sup>B</sup> Referencebatches af BBCA (dage) opbevaret på køl uden supplement tilsat i hhv. 0 og 14 dage, <sup>C</sup> Mikrobiologiske undersøgelser af substrat (udstregning af renkulturer + kintal af podede fødevarer) udført 14 dage efter tilsætning af antimikrobielt supplement og støbning af plader.

*Inspiration fra NMKL procedure no. 32*

NMKL procedure 32 beskriver verifikation af både kvalitative og kvantitative mikrobiologiske metoder og giver vejledning til bestemmelse af metoders detektionsgrænse, præcision, robusthed, selektivitet, sensitivitet, specificitet og akkurate.

Procedure 32 har givet inspiration til design af forsøg 2, hvor fødevarer undersøges for at vurdere funktionaliteten af ældede batches af BBCA ved bestemmelse af *B. cereus*, når fødevarer med en forstyrrende baggrundsflora analyseres.

Der er undersøgt 2 testmatricer (kød og grønt) med hhv. 2 (rullepølse og hakket kød) og 1 (frisk krydderurt) matrix-grupper samt 3 podeniveauer iht. afsnit 5.2.3 i NMKL procedure 32 (tabel 4). De fordærvede kødmatricer var opbevaret ved 15-20°C i 2-3 uger forud for forsøget for sikre en høj baggrundsflora.

**Table 4.** Design af verifikationsforsøg med podede fødevarer.

Testmatrice	Produkt	Podeniveau	Antal prøver	Testbatches
Kød	Fordærvet rullepølse	Upodet	2	A, B, C, D
		Højt	2	A, B, C, D
		Lavt	2	A, B, C, D
	Fordærvet hakket svinekød	Upodet	2	A, B, C, D
		Højt	2	A, B, C, D
		Lavt	2	A, B, C, D
Grøntsager	Frisk skåret timian	Upodet	2	A, B, C, D
		Højt	2	A, B, C, D
		Lavt	2	A, B, C, D

## Resultater

### Forsøg 1. Indledende screening af funktionalitet.

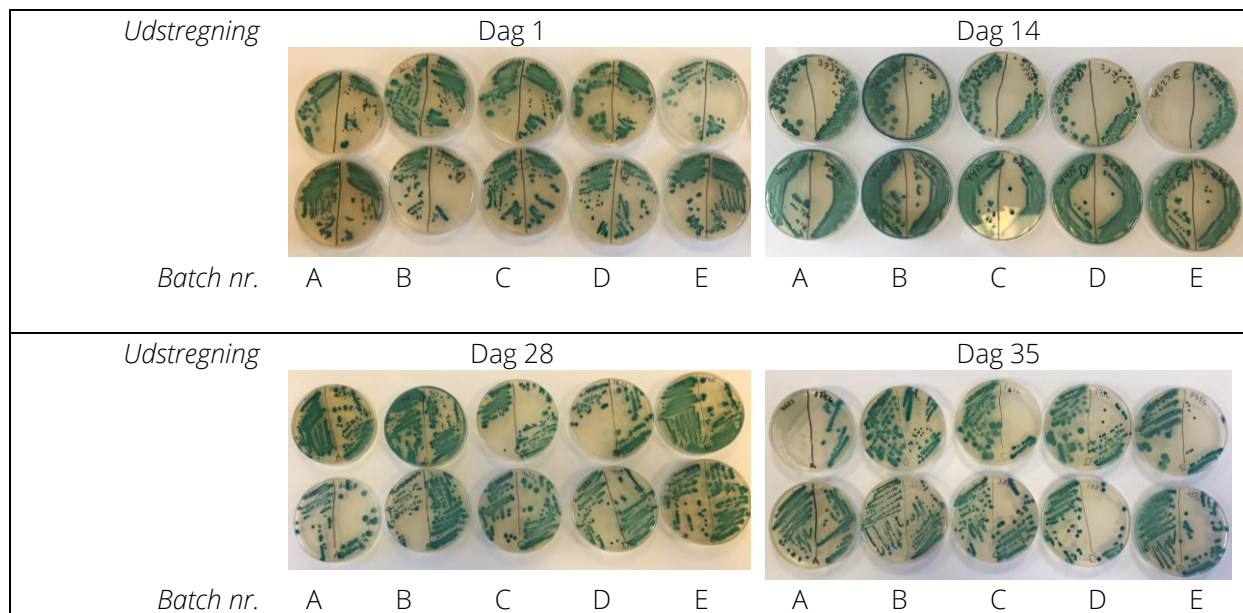
Farve og kolonimorfologi

Funktionaliteten af de 5 batches blev vurderet ved udstregning på BBCA og sammenligning af kolonimorfologi og farve. Der ses ingen forskelle mellem de forskellige BBCA batches.

Dog udviser én af de 4 stammer (stamme 4623) svag farve på enkelte undersøgselsdage og på enkelte batches af BBCA (se tabel 5 og figur 5). Der er dog ingen sammenhæng mellem svag farvedannelse og alder på BBCA batch.

**Tabel 5.** Funktionaliteten af de 5 batches vurderet ved udstregning på BBCA og sammenligning af kolonimorfologi og farve.

Batch	Dag 1	Dag 14	Dag 28	Dag 35
A	OK farve/morfologi	OK farve/morfologi	OK farve/morfologi	OK farve/morfologi. Stamme 4623 har svag farve
B	OK farve/morfologi	OK farve/morfologi	OK farve/morfologi	OK farve/morfologi
C	OK farve/morfologi	OK farve/morfologi	OK farve/morfologi	OK farve/morfologi
D	OK farve/morfologi	OK farve/morfologi	OK farve/morfologi	OK farve/morfologi
E	OK farve/morfologi	Stamme 4623 har ingen farve	OK farve/morfologi	OK farve/morfologi



**Figur 5.** Udstregning af 4 renkulturer af *Bacillus cereus* på BBCA batch A, B, C, D og E efter hhv. 1, 14, 28 og 35 dage.

Kimtalsbestemmelser af mix af 4 stammer af *B. cereus*

BBCA batches blev også vurderet for forskelle i fremvækst af bakterier ved at bestemme kimtal af et mix af 4 stammer af *B. cereus* og sammenligne med et referencekimtal ved brug af et andet substrat (BHI) (tabel 6).

Laboratoriets usikkerhed ved kimtalsbestemmelser på specifikke substrater er på 0,44 log cfu/ml, og der ses derfor ingen forskelle mellem kimalt bestemt på referencebatches (batch A, B og BHI) og ældede batches (batch C, D og E).

**Tabel 6.** Kimtalsbestemmelser af mix af 4 stammer af *B. cereus*.

	log cfu/ml ( $\pm 0,44$ )		
Dag	1	28	35
A	5,2	5,4	4,8
B	5,5	5,4	5,2
C	5,2	5,5	5,4
D	5,4	5,5	4,9
E	5,3	5,5	5,4
BHI - kimalt	5,7	5,4	5,1

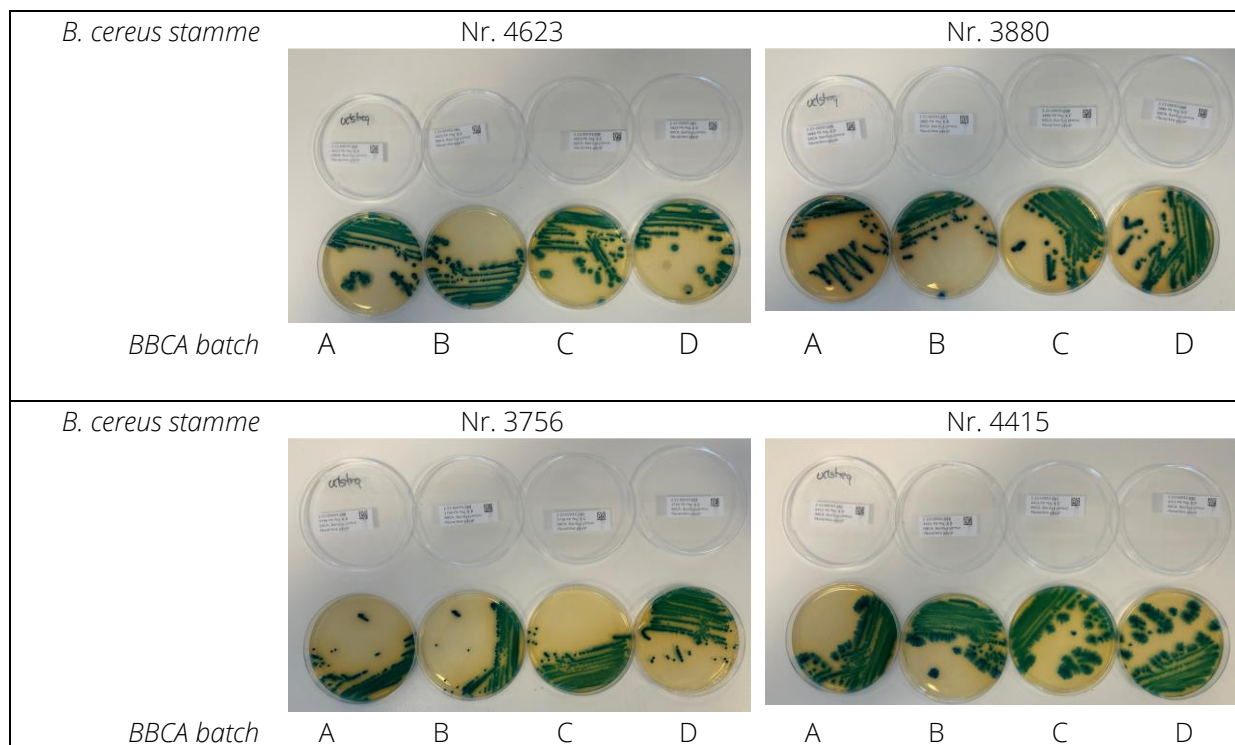
*Indledende vurdering af funktionalitet*

Baseret på screening med 4 renkulturer af *B. cereus* vurderes det indledningsvist, at forlængelse af holdbarhed er mulig, hvilket bør testes i et verificeringsstudie.

**Forsøg 2. Verificering af funktionalitet ved test af fordærvede fødevarer podet med *Bacillus cereus***

*Farve og koloni-morfologi af renkulturer*

Ved udstregning af hver af de 4 stammer i renkultur på hvert af de 4 testede batches af BBKA ses ingen morfologiske forskelle mellem batcherne (figur 6). Dog ses som i forsøg 1, at stamme 4623 kan optræde med farveløse kolonier.

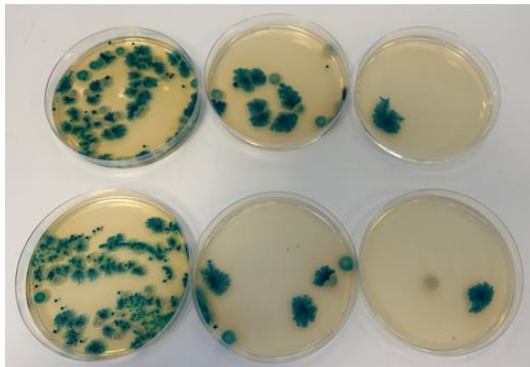


**Figur 6.** Udstregning af 4 renkulturer af *Bacillus cereus* på BBKA batch A, B, C og D på 14 dage gamle plader.



### Morfologi af podemix

Morfologisk optræder podcocktail (figur 7) med både store ujævne og typiske blågrønne kolonier (stamme 4415, 3880, 4623), farvesvage kolonier (stamme 4623, som også set tidligere i forsøg 1) samt en lille rund blågrøn koloni (stamme 3756).



**Figur 7.** Morfologi af podemix (4 *B. cereus* stammer) på BCCA batch B (14 dage gl. plader).

### Kimtalsbestemmelse af podcocktails

Der blev fremstillet to podcocktails (tabel 7), hvorfra produkter blev podet med 1%. Produkterne blev således podet med hhv. 1 og 4 log cfu/ml for hhv. lavt og højt niveau, idet der ved podning er lavet 100x fortynding af podcocktail 1 og 2.

**Tabel 7.** Kimtalsbestemmelse af podemix (bestemt på BCCA batch B)

	Podeniveau	log cfu/ml <sup>A</sup>
Podcocktail 1	Højt niveau	6,1 ± 0,3
Podcocktail 2	Lavt niveau	3,2 ± 0,1

<sup>A</sup> Baseret på dobbeltbestemmelse

### Kimtalsbestemmelse af podede produkter

Fødevarernes niveau af baggrundsflora (total kim) var højt, samtidig med at fødevarernes naturlige indhold af *Bacillus cereus* var højere end forventet og mere end 4 log cfu/g for alle produkter/podeniveauer (tabel 8). Det er derfor ikke muligt at se et kimtalsbidrag fra podningen med *B. cereus*, som blev podet i lavere niveau (1-4 log cfu/g) end baggrundsfloraens indhold af *B. cereus* (4-7 log cfu/g).

Ved sammenligning af kimtalsbestemmelser for *B. cereus* på BCCA-batch A, B, C og D ses der ingen tydelige sammenhænge i kimtallet for de enkelte produkter/podeniveauer, som kan tilskrives alderen på BCCA-batch (tabel 8). Fx varierer kimtallene for højt podet timian mellem 5,6 ± 0,1 og 6,0 ± 0,4, mens kimtallene for højt podet grisekød varierer mellem 6,6 ± 0,0 og 6,8 ± 0,1.

**Tabel 8.** Kimtalsbestemmelse af *B. cereus* i upodede/podede fødevarer ved anvendelse af 4 batch BBKA og totalkimtalsbestemmelse på BHI.

	Podeni- veau	Log cfu/g ( $\pm 0,44$ )				Totalkim BHI <sup>B</sup>
		<i>B. cereus</i>				
		A-batch <sup>A</sup>	B-batch <sup>A</sup>	C-batch <sup>A</sup>	D-batch <sup>A</sup>	
Rullepølse	Upodet	6,1 $\pm$ 0,2	5,1 $\pm$ 0,2	5,5 $\pm$ 0,1	6,1 $\pm$ 0,2	8,0
	Højt	6,0 $\pm$ 0,3	5,4 $\pm$ 0,2	5,3 $\pm$ 0,2	5,8 $\pm$ 0,2	-
	Lavt	5,7 $\pm$ 0,0	4,7 $\pm$ 0,0	5,4 $\pm$ 0,3	5,7 $\pm$ 0,2	-
Grisekød	Upodet	6,7 $\pm$ 0,1	6,7 $\pm$ 0,2	6,7 $\pm$ 0,1	6,7 $\pm$ 0,1	9,3
	Højt	6,7 $\pm$ 0,0	6,8 $\pm$ 0,1	6,6 $\pm$ 0,0	6,8 $\pm$ 0,1	-
	Lavt	6,4 $\pm$ 0,0	6,5 $\pm$ 0,0	6,5 $\pm$ 0,0	6,7 $\pm$ 0,0	-
Timian	Upodet	4,5 $\pm$ 0,3	4,0 $\pm$ 0,0	4,6 $\pm$ 0,2	4,9 $\pm$ 0,3	7,1
	Højt	5,9 $\pm$ 0,1	5,6 $\pm$ 0,1	6,0 $\pm$ 0,4	5,9 $\pm$ 0,1	-
	Lavt	4,7 $\pm$ 0,1	4,6 $\pm$ 0,1	4,6 $\pm$ 0,0	4,7 $\pm$ 0,1	-

<sup>A</sup> Baseret på dobbeltbestemmelse, <sup>B</sup> Baseret på enkeltbestemmelse

*Fremvækst af typiske og atypiske kolonier på BBKA*

Af fotos i figur 8 fremgår det, at fremvækst af både typiske og atypiske kolonier er sammenlignelige uafhængigt af alder på de forskellige BBKA batches. Udvalgte fotos er vist for batch B og D (figur 8), og for batch A og C tegner sig samme billede (fotos ikke vist).

*Sekventering*

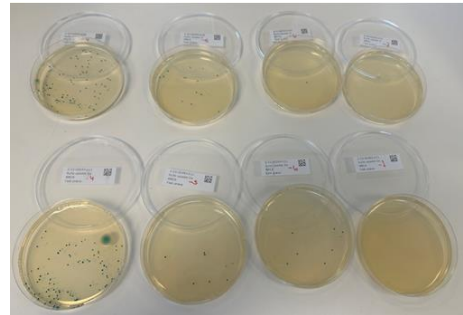
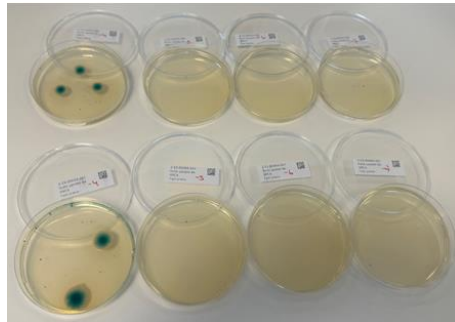
Udvalgte typiske og atypiske kolonier er isoleret og identificeret ved 16S sekventering. Her viser det sig overraskende, at små blågrønne kolonier, som er vurderet typiske *B. cereus*, rent faktisk er *Bacillus subtilis*. Selvom disse kolonier er små, er de talt med, da den ene af 4 referencestammer ser ligedan ud (lille og blågrøn), se figur 7.

Øvrige atypiske kolonier (hvide, beige, orange, blå, flaskegrønne) identificeres som fx *Pseudomonas*, *Lactococcus*, *Microbacterium* m.v.

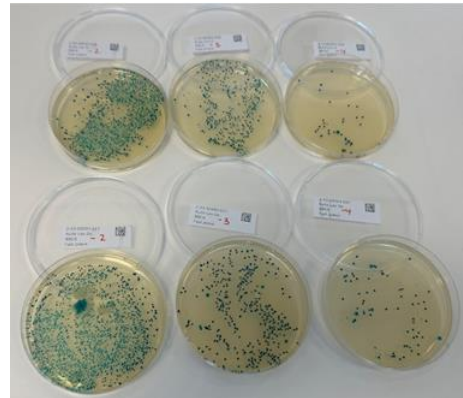
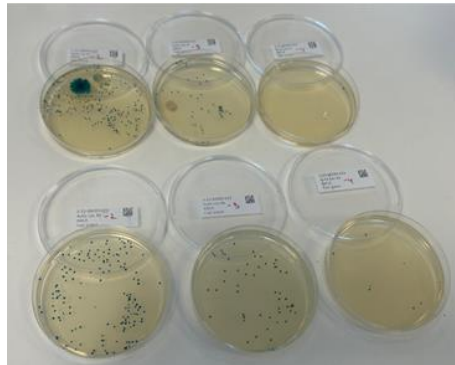
BBCA batch B (best case)

BBCA batch D (5 mdr.)

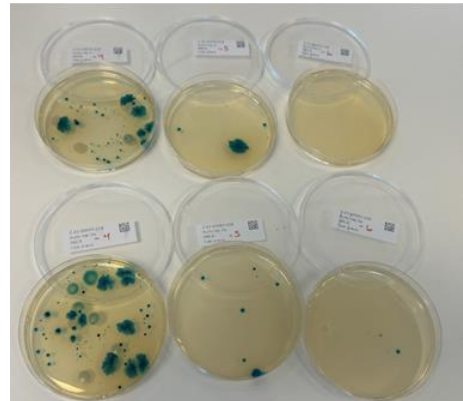
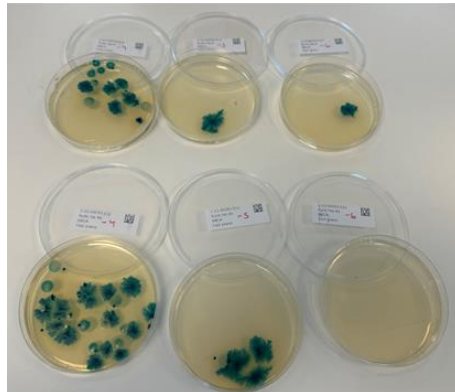
*Upodet rullepølse*



*Lavt podet rullepølse*



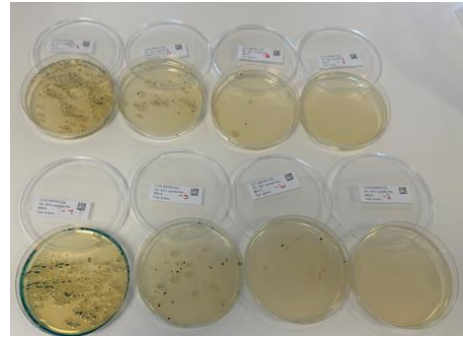
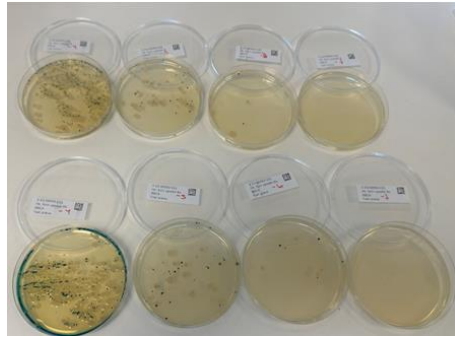
*Højt podet rullepølse*



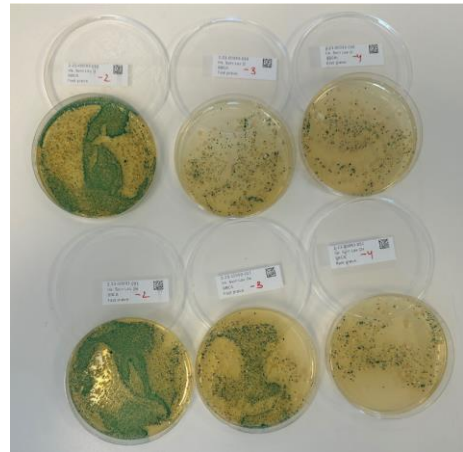
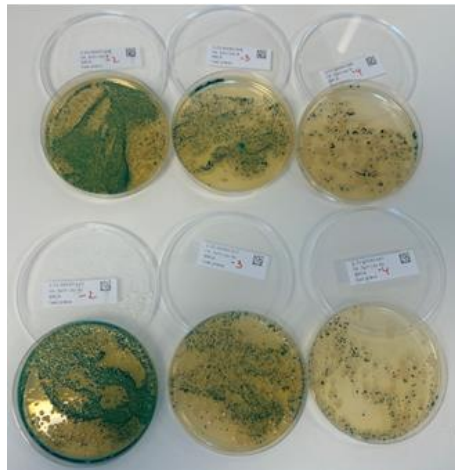
BBCA batch B (best case)

BBCA batch D (5 mdr.)

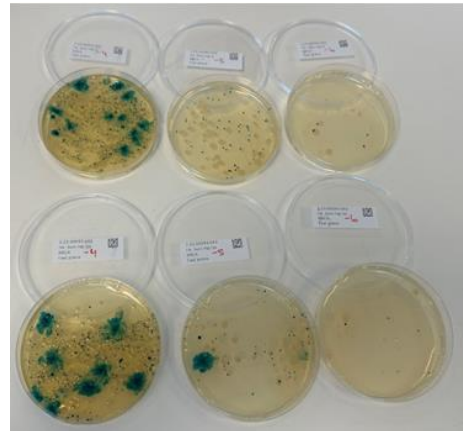
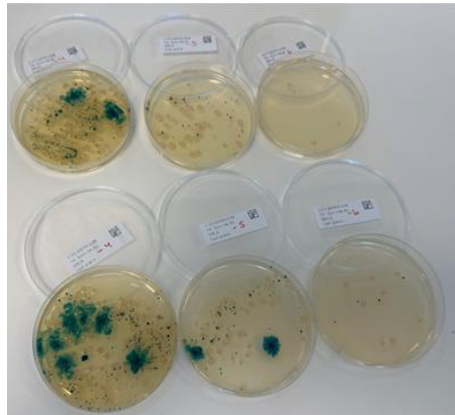
*Upodet grisekød*

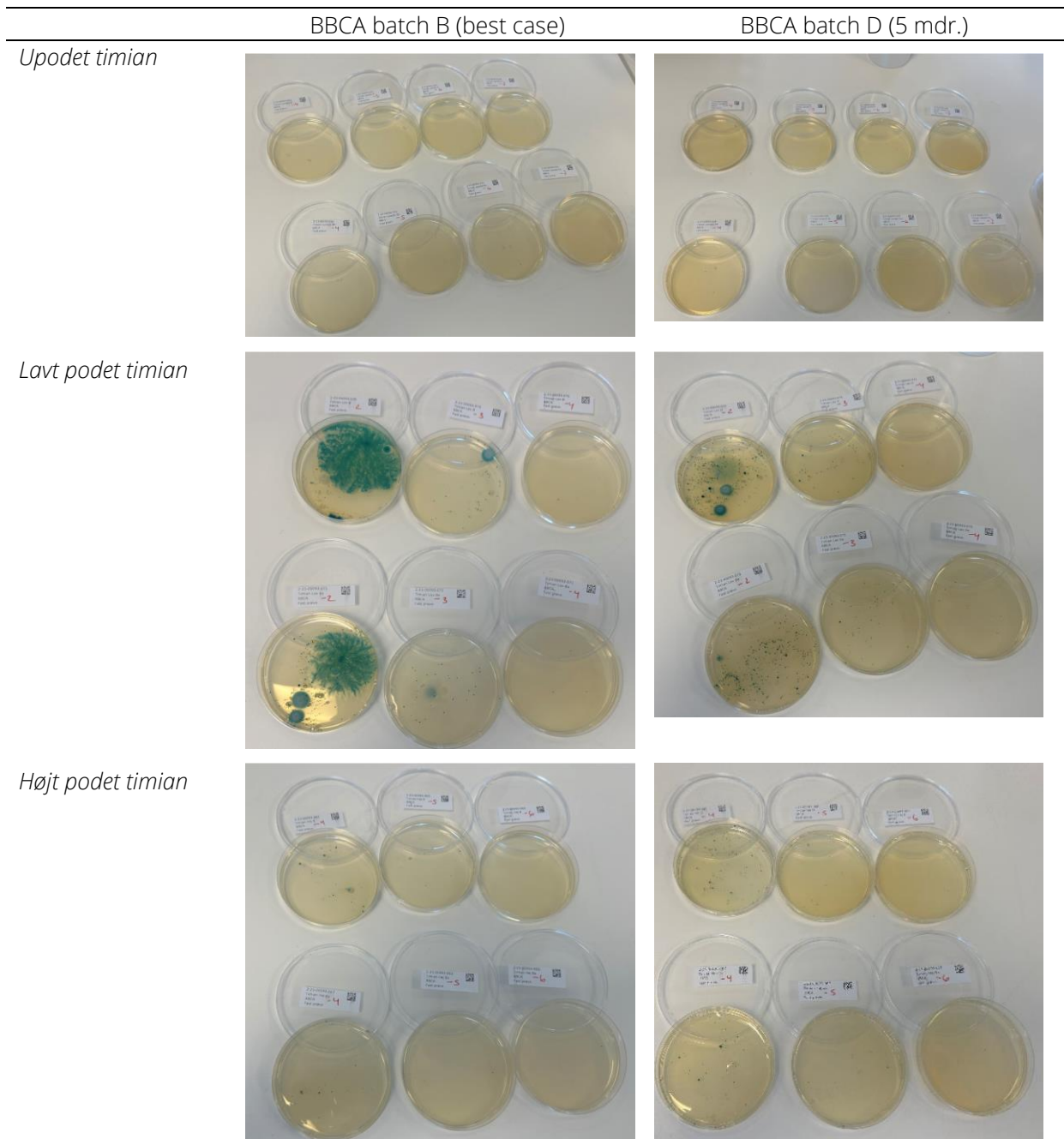


*Løvt podet grisekød*



*Højt podet grisekød*





**Figur 8.** Udvalgte fotos af BBCA batch B (best case) og batch D (opbevaret 5 mdr. på flaske på køl) for de 3 produkttyper for 3 podeniveauer.

### Vurdering

På baggrund af de to udførte forsøg observeres ingen forskelle i funktionaliteten mellem forældede batches af BBCA samt referencebatch A (eksisterende holdbarhed) og batch B (best case).

Den observerede fremvækst af atypiske kolonier uden typisk blågrøn farve og/eller kolonimorfologi fremkommer uafhængigt af alder på BBCA-batch.

Funktionaliteten af den chromogene ingrediens vurderes uændret, selvom substrat fremstilles, autoklaveres og opbevares op til 9 mdr. på flaske på køl

(uden tilsætning af supplement). Laboratoriet vurderer derfor, at holdbarheden af BBKA fremstillet på flaske uden tilsætning af antimikrobielt supplement kan forlænges, såfremt substratet opbevares mørkt og på køl. Laboratoriet vil fremover anvende en holdbarhed af BBKA (på flaske og køl) på 6 måneder, hvilket matcher mange af laboratoriets øvrige substraters holdbarhed. Denne forlængelse af holdbarhed vil dels reducere spild, da forældede batches ikke kasseres, dels reducere laborantressourcer i form af planlægning og substratfremstilling.

Holdbarheden af støbte plader, hvor der er tilsat antibiotiske komponenter for at forhindre vækst af uønskede mikroorganismer, fastholdes til 14 dage iht. producentens anbefalinger.

Derudover blev der observeret udfordringer med fremvækst af *B. subtilis* på BBKA uafhængigt af substratets alder, hvilket bør udforskes nærmere, da det kan give udfordringer ved bestemmelse af antallet af *B. cereus*.

### Videreudvikling og optimering af mikrobiomanalyser

#### *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 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 2023 er der fokuseret på, hvordan sekventeringen kan bruges til proceskontrol og fejlsøgning ude hos fødevarer virksomheder. Der har desuden været fokus på at teste og implementere en metode til kvantificering af bakterier vha. DNA-sekventering. Metoden er udviklet af Københavns Universitet i projektsamarbejdet DNAPROKON (finansieret af GUDP).

Ud over dette er der i 2023 blevet afprøvet protokoller og gennemført analyser til identifikation af gær, skimmel og arkæa med tilfredsstillende resultat.

#### *Bioanalytisk pipeline (sampling og DNA-analyse)*

Der er testet forskellige protokoller både i laboratoriet hos Fødevarer sikkerhed på Teknologisk Institut og ude hos virksomhederne. Der er udarbejdet forskellige versioner, som kan tages i brug, hvis fokus fx er et hurtigt svar frem for et mere detaljeret svar, som også indeholder kvantificering.

#### *Behandling af sekventeringsdata*

I projektsamarbejdet DNAPROKON med bl.a. Københavns Universitet er der udviklet et program til live-databehandling af sekventeringsdata fra Oxford Nanopores instrumenter. Dette kan bruges til løbende at monitorere bakterier fundet i prøven, således at prøvens sammensætning allerede kan bestemmes efter få timers sekventering. Dette program er blevet demonstreret for forskellige fødevarer virksomheder og interesserede fra mikrobiologiske laboratorier.

I projektsamarbejdet DNAPROKON er der desuden udviklet en prototype på en metode til kvantificering af mængden af DNA i prøver, hvor DNA-mængden omregnes til cfu pr. g/ml. Metoden anvender en kunstig standard, som tilsættes under prøveforberedelsen, inden sekventering starter. Der arbejdes fortsat på at optimere metoden.

Desuden er brugerfladen af software CelerSeq til visualisering af DNA sekventeringsdata videreudviklet, primært med fokus på design og funktionalitet.

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

EFSA 2022,  
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 deltog 38 lande: 27 lande fra EU og 11 ikke-medlemslande inkl. Storbritannien. [Rapporten for 2022](#) udkom 12. december 2023.

Rapporten konkluderer i hovedtræk, at der i Europa i 2022 blev rapporteret 5.763 fødevarerbårne udbrud blandt medlemslande (27 lande inkl. Storbritannien). Disse udbrud forårsagede 48.605 tilfælde af sygdom, 186 hospitalsindlæggelser og 64 dødsfald.

Blandt ikke-medlemslande (7 lande) blev der rapporteret 108 udbrud. Disse forårsagede 2.166 tilfælde af sygdom, 186 hospitalsindlæggelser og ét dødsfald.

Antallet af fødevarerrelaterede sygdomsudbrud er steget med 43,9% i 2022 sammenlignet med 2021 (4.005 udbrud i 2021).

Antallet af dødsfald observeret i fødevarerbårne udbrud i 2022 var et af de højeste antal, der er rapporteret til EFSA i de seneste 10 år. De fleste dødsfald var forårsaget af *Listeria monocytogenes* (N=28, 43,8% af de samlede dødsfald), hvilket bekræfter den alvorlige sundhedsmæssige indvirkning forbundet med *L. monocytogenes*, især i sårbare befolkningsgrupper som ældre.

Følgende top fem patogener var årsag til fødevarerrelaterede sygdomstilfælde i 2022 (for alle fem gælder, at antal tilfælde er stabile ift. 2018-2022-trend):

1. *Campylobacter* (137.107 bekræftede tilfælde)
2. *Salmonella* (65.208 bekræftede tilfælde)
3. *Yersinia* (7.919 bekræftede tilfælde)
4. *Escherichia coli* (STEC) (7.117 bekræftede tilfælde)
5. *Listeria monocytogenes* (2.738 bekræftede tilfælde)

Af disse var *L. monocytogenes* (sammen West Nile virus) infektioner den mest alvorlige zoonotiske sygdom, som resulterede i flest hospitalsindlæggelser og højeste antal dødsfald.

I Danmark blev der i 2022 registreret 63 fødevarebårne sygdomsudbrud med i alt 1.284 sygdomstilfælde. Dette er en omtrent samme antal som i 2021, hvor ligeledes 63 fødevarebårne sygdomsudbrud blev registreret med i alt 1.257 patienter involveret.

De mikroorganismer, der hyppigst var årsag til fødevare- og vandrelaterede sygdomsudbrud i 2022, var:

- 1) *Campylobakter* (17,5%)
- 2) *Salmonella* serotyper (17,5%)
- 3) *L. monocytogenes* (9,5%)
- 4) *Clostridium perfringens* (3,2%)
- 5) *Yersinia enterocolitica* (3,2%)
- 6) *Cryptosporidium parvum* (3,2%)

Listeria var årsagen til 86 sygdomstilfælde i 2022, og det er det højeste antal listeriainfektioner siden 2014, hvor der var 92 tilfælde. Det er en markant stigning i forhold til sidste år med 62 registrerede tilfælde og til 2020 med 43 tilfælde.

### National og international vidensudveksling

Dansk netværk:  
Eurolab Danmark

Der har i 2023 ikke været afholdt særskilte møder i mikrobiologisk netværk/Eurolab Danmark.

Eurolab Danmark har afholdt medlemsmøde den 14. november 2023, hvor de overordnede temaer var bæredygtighed i laboratoriet, praktisk emballagehåndtering og CO<sub>2</sub>-regnskab.

Referater af afholdte møder kan findes på [Eurolab Danmarks hjemmeside](#) under kundeportalen.

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 5 online-møder i den mikrobiologiske komité foruden årsmødet afholdt i september 2023.

Specifikt har DMRI deltaget i arbejdet med at udvikle en procedure for god laboratoriepraksis ved udførelse af PCR-arbejde. Proceduren blev publiceret i december 2023 (se nedenfor). DMRI har desuden givet input til en opdateret metode 140 til mælkesyrebakterier, idet der ønskes fokus på detektion af mælkesyrebakterier, der normalt ikke vokser på substratet MRS. Metoden er publiceret.



I samarbejde med NMKL-repræsentanter fra de nordiske og baltiske lande har det mikrobiologiske laboratorium givet input til udvikling af et kursus i praktisk mikrobiologi. Kurset forventes at vare en dag og at være klar til afholdelse bl.a. i Danmark i efteråret 2024.

Uddrag fra NMKL-årsrapport:

1. NMKL havde i 2023 ni igangværende mikrobiologiske projekter.
2. NMKL har afholdt en fælles workshop om de to projekter MALDI-TOF og *Vibrio* spp. som et fysisk/digitalt arrangement i Bergen i august 2023.
3. NMKL's 77. årsmøde blev afholdt 3.-6. september 2023 i Stockholm, og i alt 50 deltog fysisk eller digitalt på Teams.
4. NMKL-sekretariatet har siden november 2020 været placeret hos Havforskningsinstituttet (org. nr. 971 349 077) i Bergen, Norge. Eystein Oveland er administrerende direktør støttet af Veslemøy Villanger som administrativ assistent. NMKL har i dag 78 medlemmer fra de nordiske og baltiske lande og strækker sig til interessenter over hele verden gennem internationale netværk.

#### [Den fulde NMKL-årsrapport.](#)

*Nyt om NMKL-metoder/-procedurer*

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

- [Ny procedure \(No. 33\)](#), quality assurance of PCR in food and feed microbiology.
- [NMKL 140 Lactic acid bacteria](#). Determination in food in association with food spoilage.
- [NMKL 150 Mesophilic \*Aeromonas\* species](#). Quantification in foods and feeds.

Følgende mikrobiologiske NMKL-metoder/-procedurer er blevet revurderet og konkluderet til stadig at være gyldige i uændret form:

- [Procedure 32](#), Verification of microbiological methods.
- [Metode 177](#), *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus*. Determination in food and feed.
- [Metode 47](#), Canned foods. Method for the examination of keeping quality.

*Nyt om certifikater*

Nye/fornyede certifikater:

- [Nordval 055](#), Foodproof ® Salmonella genus plus enteritidis and typhimurium detection LyoKit
- [Nordval 033](#), CompactDry TC method for aerobic microorganisms
- [Nordval 025 og 054](#), Foodproof Listeria methods
- [Nordval 046](#), salmonella Velox spp. and Salmonella Velox SE + ST
- [Nordval 057](#), VETPOD Salmonella method
- [Nordval 043](#), Compact Dry Yeast and Mold
- [Nordval 042](#), Compact Dry Staphylococcus
- [Nordval 047](#), Compact Dry ETC for Enterococci
- [Nordval 058](#), *Listeria* Velox

- [Nordval 018](#), Hygicult TPC from Aidian (total aerobic microorganisms)

Tilbagetrukne certifikater:

- [Nordval 041](#), Salmonella detection method by realtime PCR

*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.