


CIR nr 159 af 22/08/1994 Historisk  
Offentliggørelsesdato: 01-09-1994  
Fødevareministeriet

 [Vis mere...](#)

Senere ændringer til forskriften

CIR nr 90 af 16/09/2002

Yderligere dokumenter:

[Afgørelser truffet i henhold til denne retsforskrift](#)  
[Beretninger fra ombudsmanden, der anvender denne retsforskrift](#)

### Den fulde tekst

# Cirkulære om mikrobiologiske undersøgelser af levnedsmidler

Cirkulære om mikrobiologiske undersøgelser af levnedsmidler.

(Til samtlige kommunalbestyrelser)

I medfør af § 12, stk. 4 og 5, i bekendtgørelse nr 368 af 27. juni 1974 om autorisation af virksomheder, der tilvirker levnedsmidler eller tilsætningsstoffer som ændret ved bekendtgørelse nr. 886 af 22. november 1993, § 8, stk. 3, og § 11. stk. 1, i bekendtgørelse nr. 367 af 27. juni 1974 om salg m.v. en gros af levnedsmidler som ændret ved bekendtgørelse nr. 887 af 22. november 1993 og § 55 i bekendtgørelse nr. 121 af 28. marts 1980 om detailforhandling af levnedsmidler som ændret ved bekendtgørelse nr. 888 af 22. november 1993 fastsættes:

**§ 1.** Dette cirkulære omfatter mikrobiologiske undersøgelser i forbindelse med tilsyn og kontrol med virksomheder, der er autoriseret i henhold til levnedsmiddellovens § 31, samt virksomheder der er godkendt eller registreret i henhold til levnedsmiddellovens § 34.

**§ 2.** Ved mikrobiologiske undersøgelser af råvarer, halvfabrikata og færdigvarer og ved rengøringskontrolundersøgelser og screeningsprojekter skal fremgangsmåden i bilag 1 og bestemmelserne i §§ 3-7 iagttages.

**§ 3.** Som obligatoriske parametre ved mikrobiologiske undersøgelser af råvarer, halvfabrikata og færdigvarer skal de parametre, som er anført i bilag 2 anvendes.

**§ 4.** Ved indikationsbaserede mikrobiologiske undersøgelser af råvarer, halvfabrikata og færdigvarer anbefales en eller flere af de parametre, som er anført i bilag 3.

**§ 5.** Ved indikationsbaserede mikrobiologiske undersøgelser i forbindelse med holdbarhedsundersøgelser og rengøringskontrolundersøgelser anbefales fremgangsmåden i bilag 3.

**§ 6.** Ved udtagning, opbevaring og mærkning af prøver til mikrobiologiske undersøgelser skal reglerne i bilag 5 følges.

**§ 7.** Ved mikrobiologiske undersøgelser skal de metoder, som er beskrevet i bilag 6 anvendes.

*Stk. 2.* Efter drøftelse med levnedsmiddelstyrelsen i hvert enkelt tilfælde kan andre ligeværdige metoder dog anvendes.

**§ 8.** Dette cirkulære skal anvendes fra 1. januar 1995.

*Stk. 2.* Veterinærdirektoratets cirkulære af 1. november 1984 om mikrobiologiske undersøgelser af levnedsmidler ophæves for så vidt angår undersøgelser på virksomheder, der er autoriseret i henhold til levnedsmiddellovens § 31 eller godkendt i henhold til levnedsmiddellovens § 34.

Levnedsmiddelstyrelsen, den 22. august 1994

Ole Kopp Christensen

/ Henrik G. Jensen

## INDHOLDSFORTEGNELSE

BILAG 1. FREMGANGSMÅDE VED MIKROBIOLOGISKE UNDERSØGELSER AF

## LEVNEDSMIDLER

- 1.1 Kontrolundersøgelser
  - 1.1.1 Obligatoriske parametre
  - 1.1.2 Indikationsbaserede parametre
- 1.2 Screeningsprojekter initieret af Levnedsmiddelstyrelsen
- 1.3 Meddelelse af resultat
- 1.4 Område

## BILAG 2. OBLIGATORISKE PARAMETRE

- 2.1 Kød og kødvarer
  - 2.1.1 Kød og kødprodukter, ikke varmebehandlede
  - 2.1.2 Kød og kødprodukter, varmebehandlede
  - 2.1.3 Saltede, ikke varmebehandlede kødprodukter med en vandaktivitet over 0,94
  - 2.1.4 Saltede, ikke varmebehandlede kødprodukter med en vandaktivitet under 0,94
- 2.2 Fisk og fiskevarer
  - 2.2.1 Ferske fisk, herunder udskæringer og fiskefars
  - 2.2.2 Varmebehandlede fiskevarer
  - 2.2.3 Røgede samt gravade fiskevarer
- 2.3 Frugt, grøntsager og produkter heraf
  - 2.3.1 Ubehandlet frugt og grønt, tørrede frugter marmelade, oliven m.m.
  - 2.3.2 Snittede og/eller emballerede rå grøntsager
  - 2.3.3 Varmebehandlede grøntsagsprodukter
- 2.4 Vin, øl og carboniseret mineralvand
- 2.5 Saft og saftprodukter
- 2.6 Kage-, dessert- og konsumisprodukter
- 2.7 Mayonnaise, mayonnaisesalater og dressing

2.8 Krydderier, ikke afkimede

2.9 Mælk og mælkeprodukter

2.9.1 Ost og osteprodukter

2.9.2 Mælk og øvrige mælkeprodukter

2.10 Ammemælk, pasteuriseret

### BILAG 3. INDIKATIONSBASEREDE PARAMETRE

3.1 Levnedsmiddelgrupper

3.1.1 Kød og kødvarer

3.1.2 Fisk og fiskevarer

3.1.3 Frugt, grøntsager og produkter heraf

3.2.4 Vin, øl og carboniseret mineralvand

3.1.5 Saft og saftprodukter

3.1.6 Kage-, dessert- og konsumisprodukter

3.1.7 Mayonnaise, mayonnaisesalater og dressing

3.1.8 Krydderier, ikke afkimede

3.1.9 Mælk og mælkeprodukter

3.1.10 Ammemælk, pasteuriseret

3.2. Holdbarhedsundersøgelser

3.3 Rengøringskontrolundersøgelser

### BILAG 4. SYGDOMSFREMKALDENDE MIKROORGANISMER

4.1 Salmonella

4.2 Yersinia enterocolitica

4.3 Listeria monocytogenes

4.4 Campylobacter

4.5 Staphylococcus aureus

4.6 Bacillus cereus

### BILAG 5. PRØVEUDTAGNING

5.1 Udtagning af prøver

5.2 Prøveudtagningsteknik

5.3 Prøveudtagningsrapport

## BILAG 6. METODER

6.1 Forbehandling af prøver

6.1.1 Metodik

6.1.2 Prøvemængde

6.1.3 Forbehandling af dybfrosne levnedsmidler

6.2 Organoleptisk undersøgelse

6.2.1 Subjektiv organoleptisk undersøgelse

6.2.2 Objektiv organoleptisk undersøgelse

6.3 Metoder for mikrobiologiske analyser

6.3.1 *Bacillus cereus*

6.3.2 Bakteriesporetal

6.3.3 *Brochothrix thermosphacta*

6.3.4 Termofile *Campylobacter*

6.3.5 *Clostridium perfringens*

6.3.6 Coliforme bakterier

6.3.7 Enterobacteriaceae

6.3.8 Enterococcer («Fækale streptokokker»)

6.3.9 Gærsvampe

6.3.10 Kim på blod agar

6.3.11 Kimtalsbestemmelse

6.3.12 Lactobaciller

6.3.13 *Listeria monocytogenes*

6.3.14 Mælkesyrebakterier

6.3.15 Proteolytiske bakterier

6.3.16 Reduktaseprøve

6.3.17 *Salmonella*

6.3.18 Skimmelsvampe

- 6.3.19 Specifikke fordærvelsesbakterier i fisk
- 6.3.20 Staphylococcus aureus
- 6.3.21 Sulfitreducerende clostrider
- 6.3.22 Termotolerante coliforme bakterier
- 6.3.23 Vibrio parahaemolyticus
- 6.3.24 Yersinia enterocolitica
- 6.4 Tælling og angivelse af kimal
- 6.4.1 Tælling af mikroorganismer
- 6.4.2 Beregning af kimal
- 6.4.3 Angivelse af kimal
- 6.5 Øvrige metoder
- 6.5.1. pH
- 6.5.2 Aw
- 6.5.3 Histamin

## BILAG 1. FREMGANGSMÅDE VED MIKROBIOLOGISKE UNDERSØGELSER AF LEVNEDSMIDLER

Mikrobiologiske undersøgelser af levnedsmidler inden for levnedsmiddelovens område er enten kontrolundersøgelser eller overvågningsundersøgelser (screeningsundersøgelser).

### **1.1 Kontrolundersøgelser**

Når der gennemføres en mikrobiologisk kontrolundersøgelse på en prøve, gøres dette med to sæt parametre: Obligatoriske parametre og indikationsbaserede parametre. Disse to parametersæt bruges på følgende måde:

#### **1.1.1 Obligatoriske parametre**

De obligatoriske parametre - der fremgår af bilag 2 - skal som minimum medtages ved mikrobiologisk analyse af de prøver, der ligger inden for rammen af minimumsprøveudtagningen jf. Levnedsmiddelstyrelsens cirkulære nr. 229 af 23. december 1993 om tilsyn og kontrol med levnedsmiddelvirksomheder m.m. - herefter benævnt kontrolcirkulæret. Når tilsynsmyndigheden skønner det relevant for kontrollens udførelse, medtages relevante indikationsbaserede parametre sammen med de obligatoriske parametre.

Er der i tilsynsmyndighedens kontrolaktivitetsplan fastsat en større prøveudtagningsfrekvens end den mindste prøveudtagningsfrekvens jf. kontrolcirkulæret, kan tilsynsmyndigheden ved disse prøveudtagninger vælge at se bort fra de obligatoriske parametre i analyseprogrammet og sammensætte et analyseprogram efter bilag 3 - indikationsbaserede parametre.

De obligatoriske parametre revurderes årligt på grundlag af tilgængelige oplysninger om forekomsten af levnedsmiddelrelaterede sygdomsfremkaldende mikroorganismer i alle led af produktion, omsætning og indtagelse.

Tilsynsvejledningerne for de autoriserede virksomheder kan omfatte undersøgelser, som ikke fremgår af bilagene.

#### **1.1.2 Indikationsbaserede parametre**

De indikationsbaserede parametre - som fremgår af bilag 3 - omfatter både kimal og patogene mikroorganismer. De indikationsbaserede undersøgelser tænkes anvendt, når tilsynsmyndigheden finder konkrete forhold der kræver denne kontrol, eller erfaringen med den enkelte virksomhed specielt tilsiger denne særlige kontrol iværksat med det formål at kontrollere specifikke problemstillinger ved virksomhedens produktion og håndtering af levnedsmidler. Det er således ikke hensigten med de indikationsbaserede undersøgelser, at tilsynsmyndigheden forud fastsætter et generelt rutinevalg af indikationsbaserede parametre.

Ved prøveudtagninger inden for minimumsprøveudtagningsfrekvensen, kan de indikationsbaserede parametre anvendes som et supplement til de obligatoriske parametre, når dette skønnes relevant.

Ved prøveudtagninger, som ligger over minimumsprøveudtagningsfrekvensen, kan de indikationsbaserede parametre anvendes som et supplement til eller helt erstatte de obligatoriske parametre.

Ved kontrolundersøgelserne vælger tilsynsmyndigheden frit i disse parametre, så der fastsættes et analyseprogram, der er relevant for den udtagne prøve.

Til de indikationsbaserede undersøgelser hører både undersøgelser for hygiejneparametre og undersøgelser for sygdomsfremkaldende mikroorganismer. Opmærksomheden henledes på, at kontrollen af patogener ønskes intensiveret - og at kontrollen derfor i videst muligt omfang ønskes baseret på disse parametre.

For de sygdomsfremkaldende mikroorganismer gives en kort beskrivelse af forskellige indikationsforhold i bilag 3 og bilag 4.

### **1.2 Screeningsprojekter initieret af Levnedsmiddelstyrelsen**

Screeningsprojekter (overvågningsundersøgelser) anvendes både til at kortlægge mikrobiologiske problemstillinger og til over tid at følge udviklingen i forekomsten af patogene mikroorganismer.

Screeningsundersøgelser gennemføres flere gange om året som hovedregel efter forud fastlagt plan.

Screeningerne kan være lokale eller landsdækkende og inddrage nogle eller alle levnedsmiddelkontrolenheder.

Screeningsundersøgelserne har til formål at belyse relevante mikrobiologiske problemstillinger eller følge udviklingen over tid af relevante levnedsmidlers mikrobiologiske status. Undersøgelserne søges tilrettelagt på en sådan måde, at det enkelte laboratorium vil kunne opretholde en rutine på flest mulige parametre.

Levnedsmiddelstyrelsen udarbejder - efter drøftelse med tilsynsmyndighederne - hvert år inden den 1. oktober en samlet plan over det næste års screeningsprojekter. Der kan herudover i løbet af året forekomme screeningsprojekter, som det - efter drøftelse med tilsynsmyndighederne - skønnes nødvendigt at gennemføre. Det tænkes her på projekter nødvendiggjort af akut opståede problemer, hvor en afklaring her og nu er påkrævet. Levnedsmiddelstyrelsen udarbejder projektbeskrivelse for den enkelte screeningsundersøgelse og orienterer de deltagende laboratorier om undersøgelsens indhold og om den praktiske gennemførelse.

Levnedsmiddelstyrelsen udarbejder efter hver undersøgelse en rapport, som indeholder en resultatvurdering.

Resultatet af gennemførte screeningsundersøgelser vil indgå i vurderingen ved revision af obligatoriske og indikationsbaserede parametre.

Også data fra kontrolundersøgelserne vil via et indberetningssystem blive nyttiggjort til landsdækkende overvågning af levnedsmidlernes mikrobiologiske kvalitet.

### **1.3 Meddelelse af resultat**

Resultatet af laboratorieanalyserne samt tilsynsmyndighedens bemærkninger meddeles den virksomhed, hvor prøven er udtaget. Såfremt levnedsmidlet er tilvirket i en anden virksomhed end den, hvor prøven er udtaget, og undersøgelsen giver anledning til bemærkninger af sundhedsmæssig betydning, der kan henføres til produktionsvirksomheden, meddeles resultatet endvidere til den myndighed, der fører tilsyn med den pågældende virksomhed.

Tilsynsmyndigheden skal efter anmodning fra Levnedsmiddelstyrelsen indberette oplysninger om de foretagne undersøgelser samt resultaterne heraf.

### **1.4 Område**

Bilag 1-4 henvender sig specielt til levnedsmiddeltilsynet og bilag 5 og 6 til det mikrobiologiske laboratorium.

## **BILAG 2. OBLIGATORISKE PARAMETRE**

I dette bilag angives de parametre, som det er obligatorisk at undersøge for ved kontrol i forbindelse med prøveudtagninger, der ligger inden for minimumsprøveudtagningsfrekvensen jf. kontrolcirkulæret. Efter tilsynsmyndighedens faglige vurdering kan der på samme prøve på indikation gennemføres analyser for yderligere mikrobiologiske parametre. For sådanne indikationsbaserede parametre henvises til bilag 3.

Bilaget er opdelt i relevante levnedsmiddelgrupper og undergrupper. For hver gruppe angives de parametre, som en undersøgelse af produkter inden for gruppen skal omfatte.

Visse produkter kan ikke indplaceres i de anførte levnedsmiddelgrupper. For sådanne produkttyper må tilsynsmyndigheden selv sammensætte et relevant program.

For at sikre en løbende vurdering af forekomsten af patogener skal de obligatoriske undersøgelser inden for de forskellige virksomhedskategorier spredes så jævnt som muligt over hele året.

## 2.1 Kød og kødvarer

### 2.1.1 Kød og kødprodukter, ikke varmebehandlede

Produkteksempler: Hakket kød, hele kødstykker, indmad, marineret kød.

Organoleptisk undersøgelse

Salmonella

Aerobt kimal, 25 grader C.

### 2.1.2 Kød og kødprodukter, varmebehandlede

Produkteksempler: Færdigretter indeholdende kød, wienerpølser, kogt skinke, rullepølse og andre pålægsvarer.

Organoleptisk undersøgelse

Salmonella

Aerobt kimal, 25 grader C.

### 2.1.3 Saltede, ikke varmebehandlede kødprodukter med en

vandaktivitet over 0,94

Produkteksempler: Spegepølse, bacon, rå hamburgerryg, spegeskinke, filet.

Organoleptisk undersøgelse

Salmonella

Staphylococcus aureus.

### 2.1.4 Saltede, ikke varmebehandlede kødprodukter med en

vandaktivitet under 0,94

Produkteksempler: Spegepølse.

Organoleptisk undersøgelse

Staphylococcus aureus.

## 2.2 Fisk og fiskevarer

### 2.2.1 Ferske fisk, herunder udskæringer og fiskefars

Ingen obligatoriske undersøgelser.

### 2.2.2 Varmebehandlede fiskevarer

Produkteksempler: Stegte fiskefileter, fiskepate, rejer.

Organoleptisk undersøgelse

Kimtal 21 grader C i Jern agar (specifikke fordærvelses-  
kterier).

2.3 Frugt, grøntsager og produkter heraf

2.3.1 Ubehandlet frugt og grønt, tørrede frugter, marmelade,  
oliven m.m.

Ingen obligatoriske undersøgelser.

2.3.2 Snittede og/eller emballerede rå grøntsager

Produkteksempler: Snittede blandede salater i detailemballage,  
bønnespirer.

Organoleptisk undersøgelse

Listeria monocytogenes.

2.3.3 Varmebehandlede grøntsagsprodukter

Produkteksempler: Vegetabiliske færdigretter, grøntsagspate.

Organoleptisk undersøgelse

Listeria monocytogenes

Aerobt kimtal 25 grader C.

2.4. Vin, øl og carboniseret mineralvand

Ingen obligatoriske undersøgelser.

2.5 Saft og saftprodukter

Ingen obligatoriske undersøgelser.

2.6 Kage-, dessert- og konsumisprodukter

Produkteksempler: kagecreme, flødeskum, fromage, budding og soft-ice.

Organoleptisk undersøgelse

Bacillus cereus

Staphylococcus aureus

Aerobt kimtal 25 grader C.

2.7 Mayonnaise, mayonnaisesalater og dressing



Organoleptisk undersøgelse

pH

Produkter, som er fremstillet i detailvirksomheder, undersøges

tillige for

Salmonella

Bacillus cereus.

Listeria monocytogenes.

Aerobt kimal 25 grader C

2.8 Krydderier, ikke afkåmede

Produkteksempler: sort peber, carry mv.

Organoleptisk undersøgelse

2.9 Mælk og mælkeprodukter

2.9.1 Oste og osteprodukter

Organoleptisk undersøgelse

Listeria monocytogenes

Staphylococcus aureus.

2.9.2 Mælk og øvrige mælkeprodukter

Ingen obligatoriske undersøgelser.

2.10 Ammemælk, pasteuriseret

Ingen obligatoriske undersøgelser.

### **BILAG 3. INDIKATIONSBASEREDE PARAMETRE**

I dette bilag gives der forslag til parametre, som kan medtages ved den indikationsbaserede undersøgelse. Sådanne undersøgelser kan danne grundlag for en mere detaljeret vurdering af produkternes mikrobiologiske status.

Bilaget er opdelt i levnedsmiddelgrupper og undergrupper, som stort set svarer til opdelingen i bilag 2. I bilaget gives endvidere anvisninger på gennemførelse af holdbarhedsundersøgelser og rengørings-kontrolundersøgelser.

De indikationsbaserede parametre kan anvendes på samme prøve som et supplement til de obligatoriske undersøgelser eller selvstændigt i forbindelse med analyse af prøver udtaget ud over frekvensen for minimumsprøvdtagninger jf. kontrolcirkulæret.

Forhold, som kan give anledning til anvendelse af indikationsbaserede undersøgelser, er f.eks. mistanke om uhensigtsmæssig behandling eller håndtering af levnedsmidler, som ikke kan afsløres ved tilsynet. Endvidere kan der være behov for opfølgende eller dokumenterende undersøgelser ved mistanke om, at sygdom er opstået på

grund af levnedsmidler, ved klager og i forbindelse med driftskontrol m.m. Ved de indikationsbaserede undersøgelser kan tilsynsmyndigheden frit sammensætte et undersøgelsesprogram, der belyser den aktuelle problemstilling.

Tilsynsmyndigheden kan iværksætte andre undersøgelser end de i bilaget foreslåede, hvis der er behov for det.

Kontrollen med patogener ønskes opprioriteret. Derfor bør der medtages analyser direkte for patogener, hvor det er mistanken om denne type forurening, der ønskes kontrolleret.

### 3.1 Levnedsmiddelgrupper

#### 3.1.1 Kød og kødvarer

##### 3.1.1.1 Kød og kødprodukter, ikke varmebehandlede

Hygiejneparametre

Sygdomsfremkaldende mikroorganismer.

##### 3.1.1.2 Kød og kødprodukter, varmebehandlede

Hygiejneparametre

Sygdomsfremkaldende mikroorganismer.

##### 3.1.1.3 Saltede, ikke varmebehandlede kødprodukter

Hygiejneparametre

aW/saltprocent

pH (fermenterede produkter)

Sygdomsfremkaldende mikroorganismer.

## **Hygiejneparametre**

Ved hygiejneparametre forstås undersøgelse for indikatororganismer eller andet, der er relevant for den pågældende produkttype og for analysens formål. Eksempler er aerobt kimental, mælkesyre-dannende bakterier, coliforme bakterier, termotolerante coliforme bakterier, enterococcer, *Brochothrix thermosphacta* og gær- og skimmelsvampe.

## **Sygdomsfremkaldende mikroorganismer**

I ikke varmebehandlede kødvarer kan det afhængigt af kødets oprindelse og risiko for krydskontaminering være relevant ud over undersøgelse for *Salmonella* at undersøge for andre sygdomsfremkaldende mikroorganismer som f.eks. *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica* og *Campylobacter*.

I situationer, hvor der er risiko for krydskontaminering af varmebehandlede produkter fra alle typer råvarer kan det være relevant at undersøge for *Listeria monocytogenes*. I situationer, hvor der er særlig risiko for krydskontaminering fra rå kød, især fjerkræ, kan det endvidere være relevant at analysere for *Campylobacter*. Ved mistanke om, at personer med hudlæsioner har håndteret varmebehandlede produkter, er det relevant at analysere for *Staphylococcus aureus*. Ved mistanke om afkølingsfejl eller opbevaring ved for høj temperatur af sammenkogte kød- og grøntsagsretter eller produkter med ikke afkølede krydderier er det relevant at analysere

for *Clostridium perfringens* og *Bacillus cereus*. Det samme gælder varmebehandlede produkter, der opbevares varmeholdte ved for lav temperatur.

Det er relevant at undersøge for *Listeria monocytogenes* og *Yersinia enterocolitica* i fersk kød og behandlede kødvarer, som er pakket med en teknik, der har til hensigt at forlænge produkternes holdbarhed, f.eks. modificeret atmosfære pakning og vakuum pakning.

### **3.1.2 Fisk og fiskevarer**

Organoleptisk undersøgelse

Hygiejneparametre

Sygdomsfremkaldende mikroorganismer.

#### **Hygiejneparametre**

Ved bestemmelse af kimtal benyttes Jern agar ved 21 grader C (specifikke fordævelsesbakterier). I øvrigt benyttes hygiejneparametre som beskrevet under 3.1.1.

#### **Sygdomsfremkaldende mikroorganismer**

I fisk kan der, hvor det skønnes at være relevant, analyseres for *Salmonella*, *Listeria monocytogenes* og *Vibrio* spp.

#### 3.1.3 Frugt, grøntsager og produkter heraf

Organoleptisk undersøgelse

aW (tørrede produkter)

pH (syrnede produkter).

#### 3.1.4 Vin, øl og carboniseret mineralvand

Organoleptisk undersøgelse

pH

Hygiejneparametre: For frisktappede produkter kimtal.

Der henvises i øvrigt til bekendtgørelse om naturligt mineralvand (nr. 463 af 5. september 1984).

### **3.1.5 Saft og saftprodukter**

Organoleptisk undersøgelse

pH.

### 3.1.6 Kage-, dessert- og konsumisprodukter

Hygiejneparametre

Sygdomsfremkaldende mikroorganismer.

#### **Hygiejneparametre**

Som beskrevet under 3.1.1.

#### **Sygdomsfremkaldende mikroorganismer**

Som supplement til de obligatoriske undersøgelser for *Bacillus cereus* og *Staphylococcus aureus*, kan det ved mistanke om risiko for krydssmitte fra rå æg være relevant at undersøge for *Salmonella*.

### 3.1.7 Mayonnaise, mayonnaisesalater og dressing

Hygiejneparametre

Sygdomsfremkaldende mikroorganismer.

#### **Hygiejneparametre**

Som beskrevet under 3.1.1.

#### **Sygdomsfremkaldende mikroorganismer**

I mayonnaise og mayonnaisesalater vil de obligatoriske undersøgelser for *Salmonella*, *Bacillus cereus* og *Listeria monocytogenes* på produkter fremstillet i detailvirksomheder som regel være dækkende med hensyn til sygdomsfremkaldende mikroorganismer.

### **3.1.8 Krydderier, ikke afkmede**

### **3.1.9 Mælk og mælkeprodukter**

Der henvises til Veterinærdirektoratets regler og undersøgelser af disse levnedsmidler.

#### 3.1.10 Ammemælk, pasteuriseret

Organoleptisk undersøgelse

Hygiejneparametre

Sygdomsfremkaldende mikroorganismer.

#### **Hygiejneparametre**

Som beskrevet under 3.1.1.

### **Sygdomsfremkaldende mikroorganismer**

Ved mistanke om utilstrækkelig varmebehandling af ammemælk vil det være relevant at undersøge for *Staphylococcus aureus* samt for hæmolytiske streptokokker.

### **3.2 Holdbarhedsundersøgelser**

Holdbarhedsundersøgelse foretages på færdigpakkede levnedsmidler forsynet med datoen for mindste holdbarhed, »Mindst holdbar til« eller »Sidste anvendelsesdato« med det formål at vurdere den hygiejniske og sundhedsmæssige kvalitet af levnedsmidlet ved holdbarhedstidens udløb.

Oplysningen »Mindst holdbar til« eller »Sidste anvendelsesdato« angiver den dato til og med hvilken produktet efter korrekt opbevaring har bevaret sine specifikke egenskaber.

Prøver til holdbarhedsundersøgelse udtages som hovedregel på den virksomhed, hvor levnedsmidlet er færdigpakket, og transporten til laboratoriet skal ske under iagttagelse af den forskrevne opbevaringstemperatur. Hvis der er indikation herfor, kan der også udtages prøver, som ikke er færdigpakkede i den pågældende virksomhed. Prøver opbevares på laboratoriet i ubrudt forbrugerpakning ved den opbevaringstemperatur, som er anført på pakningen indtil holdbarhedstidens udløb.

Undersøgelsen består i en bedømmelse af den organoleptiske tilstand, og ved vurderingen heraf er det vigtigt at skelne mellem kvalitetsfaktorer og sådanne forhold, som kan tilskrives holdbarhedsmæssige forandringer. En vare kan eksempelvis tilsigtet have en syrlig smag, hvilket ikke må bedømmes som en fejl med holdbarhedsmæssig årsag. Holdbarhedsundersøgelsens resultat kan derfor med fordel altid sammenlignes med bedømmelse af en initialprøve samt videre, når dette skønnes nødvendigt, suppleres med en bedømmelse af prøver opbevaret i en del af holdbarhedsperioden.

Organoleptiske forandringer er begrundet i enzymatisk aktivitet af oftest mikrobiel oprindelse, og i tilfælde af væsentlige afvigelser i forhold til initialprøven bør supplerende mikrobiologiske parametre indgå i undersøgelsen af holdbarhedsprøverne. Supplerende undersøgelser kan omfatte mikroorganismer med høj biologisk aktivitet f.eks. *Brochothrix thermosphacta*, gær, proteolytiske bakterier, *Shewanella putrevaciens* o.a., afhængig af den organoleptiske tilstand og levnedsmidlets art.

Den organoleptiske vurdering af holdbarhedsundersøgelsen bør mindst omfatte bedømmelse af udseende, lugt og evt. smag.

Holdbarhedsundersøgelsen omfatter evt. også undersøgelse for forekomst af sygdomsfremkaldende mikroorganismer. Man skal være opmærksom på, at f.eks. *Listeria monocytogenes* i visse levnedsmidler vil kunne opformerer til et uacceptabelt niveau uden at medføre erkendelige organoleptiske forandringer.

### **3.3 Rengøringskontrolundersøgelser**

Som angivet i NMKL nr. 5, 4. udg., 1987, idet det dog i visse tilfælde kan være en fordel at anvende kommercielt fremstillede rengøringskontrollsystemer.

## **BILAG 4. SYGDOMSFREMKALDENDE MIKROORGANISMER**

I dette bilag redegøres der kort for forekomsten af syv udvalgte sygdomsfremkaldende mikroorganismer og deres muligheder for overførsel til levnedsmidler.

Det er kendskabet til de situationer, hvor overførsel af mikroorganismer til levnedsmidler eller opformering i levnedsmidler er mulig, som delvist har dannet grundlag for det valg af sygdomsfremkaldende mikroorganismer, der er angivet som obligatoriske parametre i bilag 2. Det er ligeledes dette kendskab, der kan danne baggrund for tilsynsmyndighedens vurdering af hvilke supplerende indikationsbaserede undersøgelser for sygdomsfremkaldende mikroorganismer efter bilag 3 der er indicerede i de konkrete situationer.

#### **4.1 Salmonella**

Salmonella forekommer med varierende hyppighed i tarmkanalen hos vore almindelige slagtedy. Produkter, der har været udsat for fækal forurening under slagtingen, kan være forurenet med Salmonella. For tiden er fjerkræ, indmad fra svin og svinekød relativt hyppigt forurenet, mens dette i mindre omfang gælder oksekød.

Det er relevant at undersøge sådanne produkter, samt levnedsmidler der udsættes for krydskontaminering fra disse produkter, for forekomst af Salmonella.

#### **4.2 Yersinia enterocolitica**

Yersinia enterocolitica er vidt udbredt blandt sunde svin. Især svælgregionen, men også tarmkanalen kan være inficeret. Hovedkød, især tunger, samt hjerter, lever og mellemgulvskød vil hyppigt være forurenet. De dele af slagtedyret, der er udsat for fækal forurening, vil ligeledes ofte være forurenede.

Det er relevant at undersøge sådanne produkter, samt produkter der er udsat for krydskontaminering fra disse produkter for tilstedeværelse af Yersinia enterocolitica.

#### **4.3 Listeria monocytogenes**

Listeria monocytogenes er en bakterie, som forekommer overalt, og som derfor er tilstede i de fleste råvarer af såvel vegetabilsk som animalsk oprindelse. Denne kendsgerning, samt bakteriens evne til at opformere sig ved lav temperatur, kan danne grundlag for indikationsvurdering ved undersøgelse for denne bakterie.

Levnedsmidler, der er behandlede og/eller pakkede, så de har opnået en lang holdbarhed på køl, vil være relevante at undersøge for Listeria monocytogenes. Et eksempel herpå er varmebehandlede, modificeret atmosfære-pakkede eller vakuumpakkede varer, der har været udsat for forurening fra råvarer af vegetabilsk eller animalsk oprindelse. Produkter som wienerpølser, røget filet, rullepølse samt let saltede og røgede fiskeprodukter har ofte vist sig at indeholde Listeria monocytogenes.

#### **4.4 Campylobacter**

Campylobacter er hyppigt forekommende i tarmkanalen af vore slagtedy, hvorfor bakterien hyppigt vil forekomme ved fækal forurening. Især rått fjerkræ er ofte kontamineret.

Det er relevant at undersøge levnedsmidler med risiko for krydskontamination fra fjerkræ for Campylobacter.

#### **4.5 Staphylococcus aureus**

Staphylococcus aureus forekommer naturligt på hud og slimhinder af dyr og mennesker. Sår vil ofte være inficerede med denne bakterie og derved udgøre særlig risiko for, at levnedsmidler kontamineres ved berøring.

Levnedsmidler, der udsættes for en baktiedræbende behandling (oftest varmebehandling) samt en efterfølgende kontamination med denne bakterie, er i fare for at kunne medføre levnedsmiddelforgiftning, såfremt de belastes temperaturmæssigt. Ved mistanke om noget sådant, bør undersøgelse for Staphylococcus aureus iværksættes.

#### **4.6 Bacillus cereus**

Bacillus cereus er almindeligt forekommende i jord og støv og er en hyppig kontaminant i mange levnedsmidler, især vegetabilske (f.eks. mel, ris og krydderier), men også animalske (f.eks. mælk).

Varmebehandlede levnedsmidler, der udsættes for en temperaturmæssig belastning, f.eks. langsom afkøling eller varmholdning ved for lav temperatur, må mistænkes for at kunne medføre forgiftning. Sådanne levnedsmidler vil det være relevant at undersøge for Bacillus cereus.

#### **4.7 Clostridium perfringens**

Clostridium perfringens forekommer almindeligt i jord og fæces og må regnes for at være almindeligt forekommende i krydderier samt kød og kødvarer i lavt niveau. Råt fjerkræ er ofte kontamineret i relativt højt niveau.

Varmebehandlede levnedsmidler, der udsættes for en temperaturmæssig belastning, f.eks. langsom afkøling eller varmholdning ved lav temperatur, må mistænkes for at kunne medføre forgiftning. Det er derfor relevant at undersøge sådanne levnedsmidler for Clostridium perfringens.

## **BILAG 5. PRØVEUDTAGNING**

### **5.1 Udtagning af prøver**

Prøver til laboratorieundersøgelse udtages som led i tilsynsmyndighedens tilsyn og kontrol med levnedsmiddelvirksomhederne.

Prøverne skal udtages af personale ansat ved levnedsmiddelkontrolenhederne. Prøveudtageren skal være instrueret om, hvorledes prøverne skal udtages. Der bør være en repræsentant fra virksomheden til stede under prøveudtagningen.

Hvis virksomheden ønsker det, skal der tages en kontraprøve, som virksomheden kan anvende til at efterprøve tilsynsmyndighedens analyseresultat. Kontraprøven skal opbevares, analyseres m.v. efter anvisning af tilsynsmyndigheden.

Prøveudtagning kan omfatte prøver af færdigvarer, halvfabrikata, råvarer, emballage samt prøver til undersøgelse af inventar og redskaber.

Prøvens størrelse skal være sådan, at de undersøgelser, der foreskrives i nærværende cirkulære, kan gennemføres. Af ikke færdigpakkede levnedsmidler udtages normalt 200 g. Prøven udtages, således, at den så vidt muligt er repræsentativ for hele levnedsmidlet.

Ved vurdering af et parti, kan det være nødvendigt at lade prøven bestå af flere stikprøveenheder. Der henvises til NMKL rapport nr. 2, 1983, vedr. udtagning af stikprøveenheder og delprøver af levnedsmidler til mikrobiologiske undersøgelser samt til kapitlerne 11-26 i »Microorganisms in Foods 2, Sampling for microbiological analysis: Principles and specific applications«. ICMSF 1986, der omhandler prøveudtagningsplaner for forskellige levnedsmiddeltyper.

### **5.2 Prøveudtagningsteknik**

Vedr. den anvendte prøveudtagningsteknik henvises til principperne angivet i kapitel 9, »Collecting and handling sample and analytical units« i »Microorganisms in Food 2, Sampling for microbiological analysis: Principles and specific applications«, ICMSF 1986, idet følgende præciseres:

Personale, der foretager prøveudtagning, skal være orienteret om principperne for korrekt udtagning af prøver.

Beholdere og udstyr, der anvendes ved prøveudtagning, skal være rene, tørre og sterile. Sterilisering skal foretages ved autoklavering ved 121 grader C i 15 minutter, tørsterilisering ved 170 grader C i minimum 1 time eller tilsvarende. Kommercielt tilgængelige sterile prøvebeholder, spatler, skeer og andet udstyr kan anvendes.

Prøvebeholderen skal umiddelbart før eller efter prøveudtagningen mærkes på en holdbar måde, således at den pågældende prøve kan identificeres entydigt.

Prøver skal transporteres til laboratoriet så hurtigt som muligt. Under transporten skal prøverne opbevares, så de ikke udsættes for forurening fra omgivelserne. Prøverne skal under transporten opbevares ved en temperatur på 0-5 grader C, og prøver af frosne produkter skal opbevares nedfrosset indtil analyse.

### **5.3 Prøveudtagningsrapport**

Der skal ved hver prøveudtagning udarbejdes en prøveudtagningsrapport, som skal indeholde mindst følgende oplysninger:

- a) Entydig nummerering
- b) Virksomheden, hvor prøven er udtaget
- c) Virksomheden, hvor produktet er fremstillet.
- d) Årsagen til prøveudtagningen.
- e) Prøvetype / tilstrækkelige oplysninger til entydig identifikation.
- f) Fremstillingstidspunktet hvis muligt og angivet holdbarhed.
- g) Opbevaringsforhold i virksomheden - herunder temperatur for køle- og frostvarer.
- h) Hvor i produktionsforløbet prøven er udtaget, hvis det er relevant for vurdering af prøven.
- i) Dato og klokkeslet for prøvetagningen.
- j) Dato og klokkeslet for modtagelsen af prøven på laboratoriet.
- k) Evt. identifikation af levnedsmiddelparti
- l) Prøveudtagerens navn.

## **BILAG 6. METODER**

Dette bilag indeholder metoder for undersøgelse af de parametre, som er angivet i bilag 2 og 3.

Mange af metoderne henviser til metoder publiceret af Nordisk metodik-Komite for Levnedsmidler, NMKL, med eventuelle præciseringer og tilføjelser.

Metoderne er angivet i alfabetisk rækkefølge.

### **6.1 Forbehandling af prøver**

#### **6.1.1 Metodik**

Som anført i NMKL nr. 91, 2. udg. 1988, med følgende præciseringer.

#### **Udførelse**

Den anvendte fremgangsmåde afhænger dels af levnedsmidlets tilstandsform (fast, flydende, dybfrosen), dels af undersøgelsens formål (overfladeflora, dybdeflora, gennemsnitsflora), dels af levnedsmidlets art, idet der ved valg af fortyndingsvæske må tages særlig hensyn til:

- saltholdige levnedsmidler
- sukkerholdige levnedsmidler
- hårde oste.

#### **6.1.2 Prøvemængde**

Det må tilstræbes at tage minimalt 5-10 g prøve i arbejde ved undersøgelse. Ved undersøgelse for specifikke patogene mikroorganismer kan det være foreskrevet at tage andre prøvemængder i arbejde.

#### **6.1.3 Forbehandling af dybfrosne levnedsmidler**

Dybfrosne levnedsmidler optøes i køleskab ved højst 5 grader C. Prøven tages i arbejde så hurtigt, at en repræsentativ delprøve kan udtages. Optøningsproceduren skal være tilendebragt inden for højst 18 timer. Mindre prøver og levnedsmidler, der let optøes, kan anbringes i varmlufttermostat ved højst 37 grader C i maksimalt 15



minutter. Løs-frosne prøver, hvor optøning ikke er nødvendig, kan direkte tages i arbejde. Forbehandling foretages efter de i forskrifterne angivne metoder, afhængig af levnedsmidlets tilstandsform i optøet stand samt undersøgelsens formål.

## **6.2 Organoleptisk undersøgelse**

En organoleptisk undersøgelse og vurdering udgør et vigtigt led ved gennemførelse af en laboratoriemæssig undersøgelse af et levnedsmiddel. Objektive analyser, som omfatter mikrobiologiske, kemiske og fysiske undersøgelser, er ofte ikke tilstrækkelige for en vurdering af levnedsmidlets sundhedsmæssige og hygiejniske kvalitet, men må suppleres med en organoleptisk bedømmelse.

For visse levnedsmidler er en organoleptisk analyse ofte tilstrækkelig for kontrolmyndighedens vurdering af et levnedsmiddel. Dette gælder f.eks. ved undersøgelse af friske frugter og visse produkter heraf.

Såfremt der ved en indledende organoleptiske bedømmelse af et levnedsmiddel er konstateret en abnorm tilstand, f.eks. abnorm lugt, kan objektive analyser medvirke til en nærmere opklaring af årsagsforholdene og som dokumentation, men er egentlig ikke pårævet for vurderingen af levnedsmidlets hygiejnisk/sundhedsmæssige kvalitet.

### **6.2.1 Subjektiv organoleptisk undersøgelse**

#### **6.2.1.1 Forhold af betydning for undersøgelsen**

Den organoleptiske bedømmelse udføres ved indledningen til den laboratoriemæssige analyse og skal indeholde en bedømmelse af levnedsmidlets udseende, farve, konsistens, lugt og eventuelt smag. Vurderingen foretages i relation til en »normaltilstand«, hvorfor det er vigtigt, at der til brug for bedømmelse er erhvervet et grundigt kendskab til produkternes normale karakteristika.

En organoleptisk bedømmelse er behæftet med usikkerhed på grund af, at den indeholder et subjektivt skøn, og forskelle i ydre vilkår kan endvidere øge denne usikkerhed.

Det kan være vanskeligt at foretage en afgrænsning mellem sådanne afvigelser i organoleptisk tilstand, som alene har en kvalitetsmæssig årsag, og sådanne forandringer i levnedsmidlet, som er begrundet i hygiejnisk/sundhedsmæssige forhold.

For at reducere en uheldig virkning af de ydre vilkårs indflydelse på bedømmelsen bør laboratoriet indføre en række praktiske regler for bedømmelsens udførelse. Af sådanne regler kan nævnes:

- Bedømmelsen bør optimalt foretages af flere personer, som gennem erfaring og optræning har opnået et kendskab til levnedsmidlets normale organoleptiske karakteristika.

- Bedømmelsen bør fra gang til gang foretages under de samme lokalemæssige forhold, herunder lys og temperaturforhold, og uden at der i lokalet er forstyrrende fremmede lugte og i øvrigt under rolige betingelser. Mindst 1 time før analysens gennemførelse bør der ikke indtages nydelsesmidler, mad eller lignende, der kan påvirke (bedøve) smagsevnen, ligesom også håndvask med sæbe lige før undersøgelsen forstyrrer denne.

- Lugtbedømmelsen bør normalt foretages ved stuetemperatur, og det er en fordel, at prøverne i forvejen er varmet op til denne temperatur. Ofte kan man dog med fordel lugtbedømme den samme vare både i kold tilstand (frossen eller kølet), og efter at denne har antaget stuetemperatur. Lugtbedømmelsen foretages bedst på friske brud- eller snitflader. Mange af de kemiske forbindelser, der er ansvarlige for dårlig luft, er luftarter med lavt damptryk, der kan erkendes allerede på frosne eller kølede levnedsmidler. Ved undersøgelse af vakuumpakkede kødvarer kan der ofte ved pakkens åbning konstateres en karakteristisk »poselugt«, som kan forsvinde, efter at pakken har været åbnet 10-15 minutter. »Poselugt« behøver ikke at betyde, at varen er mikrobielt fordærvet.

#### **6.2.1.2 Undersøgelsens gennemførelse**

##### **Prøvens udseende**

Undersøgelsen omfatter en bedømmelse af prøvens farve, konsistens, forekomst af eventuelle defekter m.v. Det bemærkes, om levnedsmidlets overflade er fugtig, eventuelt slimet, indtørret, smudskontamineret, belagt med udfældninger (f.eks. saltudslag), eventuelt mugpletter eller lignende. For visse levnedsmidler bør der foretages en vurdering af såvel overflade som dybde.

Bedømmelse af konsistens og tekstur kan være særlig værdifuld for vurdering af den organoleptiske kvalitet af f.eks. kød, fersk fisk, pølser samt visse frugter og grøntsager.

### **Lugt**

Afvigende lugt skyldes ofte dannelse af flygtige nedbrydningsprodukter, hvorved levnedsmidlet kan få en lugt, der, afhængig af udviklingsgraden, kan være sur, stikkende, frugtagtig, blomsteragtig, acetoneagtig, kemikalieagtig, ammoniakagtig eller putrid m.m.

Afvigende lugtforekomst kan imidlertid også skyldes f.eks. medikamentel behandling, restforekomst af kemikalier, kønslugt hos slagtedyr.

I tilfælde, hvor mistanke om afvigende (abnorm) lugt foreligger i kød- og fedtprøver, bør den umiddelbare undersøgelse suppleres med en koge- og/eller stegeprøve.

### **Kogeprøve**

Udføres bedst ved at anbringe terninger af prøven i kogekolbe (f.eks. 300 ml erlenmeyerkolbe). Der tilsættes så meget vand, at prøvematerialet netop dækkes, og kolben pålægges et urglas, hvorefter kolben opvarmes til svag kogning.

Man lugter til dampene i kolbens hals efter opvarmningens afslutning og efter delvis afsvaling.

### **Stegeprøve**

Udføres ved stegning på omhyggelig rengjort pande eller i øvrigt efter producentens anvisning og uden anvendelse af fedtstof.

## **6.2.2 Objektiv organoleptisk undersøgelse**

Sensoriske målinger kan suppleres med objektive kvalitetsmålinger, hvoraf kan nævnes:

Bestemmelse af peroxidtal og Kreis reaktion: Anvendes ved mistanke om harskning af fedtstoffer.

Bestemmelse af trimethylamin (TMA) anvendes ved undersøgelse af saltvandsfisk.

Bestemmelse af total flygtig nitrogen (TVN) kan anvendes ved undersøgelse af alle fisk, herunder fisk som ikke indeholder trimethylaminoxid (TMAO), ligesom den er mere velegnet til bedømmelse af fiskearter, der ved forråelse udvikler flere flygtige komponenter end blot TMA (rejer, blæksprutter, bruskfisk m.v.).

Bestemmelse af »thiobarbitursyre-tallet«: Kan anvendes til verifikation af »fiskelugt« ved svinespæk.

Viskositetsmålinger: kan anvendes ved undersøgelse af f.eks. rå æg.

Konsistensmålinger: Kan anvendes ved undersøgelse af kød, grøntsager m.m.

Spektrofotometriske farvemålinger: Kan anvendes ved undersøgelse af kød og kødvarer samt frugter og grøntsager.

Vedr. anvendelse af objektive målinger af friskhed og kvalitet henvises til speciallitteratur.

### **6.3 Metoder for mikrobiologiske analyser**

#### **6.3.1 Bacillus cereus**

##### **Metodik**

Som anført i NMKL nr. 67, 3. udgave, 1993.

Ved undersøgelse af levnedsmidler, som formodes at have højt indhold af gramnegative bakterier, kan Blod agar tilsættes 25 i.e. Polymyxin B-sulfat eller 75 i.e. Kolistin sulfat pr. ml.

#### **6.3.2 Bakteriesporetal**

##### **Metodik**

Den forbehandlede delprøve (10-1 fortynding) varmebehandles i vandbad ved 80 grader C i 10 minutter.

Videre 10 folds fortyndinger fremstilles ud fra denne jfr. 6.1.

Aerobe sporedannende bakterier: Der udsås 1 ml af passende fortyndinger som dybdesæd i Plate Count agar jfr. 6.3.11.

Dyrkning: 30 grader C indtil 8 døgn.

Anaerobe sporedannere (sulfitreducerende clostridier): Der udsås 1 ml af passende fortyndinger i Jern-sulfit høj agar (se NMKL nr. 56, 2. udgave, 1980).

Dyrkning: 37 grader C i indtil 8 døgn.

#### **6.3.3 Bronchothrix thermosphacta**

##### **Metodik**

Som anført i NMKL nr. 141, 1991.

##### **Metodik**

Som anført i NMKL nr. 119, 2. udgave, 1990, med følgende præciseringer:

Pkt. 1

Det korrekte navn er *Campylobacter jejuni* spp. *jejuni*.

Pkt. 2

Under danske forhold udgør vand ikke en væsentlig kilde til campylobakteriose.

Pkt. 3

*C. Laridis* hedder nu *C. lari*.

Pkt. 5.1

Substraternes pH skal være 7,4 +/- 0,2, og alternativt til hesteblood kan kalveblood anvendes. Citratstabilisering af bloodet kan anvendes som alternativ til defibrinerung.

#### Pkt. 5.2.3

Et CBFS lignende medium, Midified CCDA-Preston medium Oxoid (CM739) (herefter kaldet modificeret CCDA) indeholder ikke natrium metabisulfit, og har vist sig bedre end NMKL formuleringerne af Preston agar og CBFS agar. Modificeret CCDA agar eller tilsvarende erstatter brugen af Preston agar og CBFS agar.

Ved laboratoriefremstilling skal bemærkes, at det anses for væsentligt, at agaren er af god kvalitet herunder har et lavt indhold af salte.

#### Pkt. 5.3.3

Til modificeret CCDA skal tilsættes cephooperazone 32 mg/l og amphotericin 10 mg/l (Oxoid SR 155 eller tilsvarende).

#### Pkt. 5.4

I stedet for de i punkt 5.4 nævnte agarer anvendes veltørrede Blood Agar Base 2 (Oxoid) CM271 eller tilsvarende tilsat 5% citratstabiliseret kalveblood pålagt nalidixin tabletter, 30 microg/tabl.

#### Pkt. .1. og pkr. 9.3

Man må ved anvendelse af kommercielle systemer til etablering af mikroaerofil atmosfære være opmærksom på de anvendte beholderes rumfang, og hvorvidt systemet kræver anvendelse af katalysatorer.

#### Pkt. 8

Den udtagne prøvemængde må ikke være mindre end 75 g.

#### Pkt. 9.1

Inkuber 25 g prøve i 225 ml Preston Bouillon.

#### Pkt. 9.2

Der stryges ud på modificeret CCDA se 5.2.3.

#### Pkt. 9.3

Bortset fra rendyrkede stammer i aktiv vækst ses sjældent vækst efter 18-24 timers inkubering. Plader med manglende vækst efter 42-48 timers inkubering bør inkuberes yderligere 1 døgn.

Undgå at kondensvand flyder på pladerne.

Da H2 har vist sig vækstfremmende, erstatter dette N2 gasblandingen.

#### Pkt. 9.4

Kolonimorfologien afhænger meget af pladernes fugtighedsgrad, idet den beskrevne konfluerende vækst kun iagttages på plader, der ikke er for tørre.

Blodplader uden nalidixin, som anvendes ved isolation og rendyrkning af suspekter Campylobacter, tørres således efter ophældning 10 min. i tørreskab eller i inkubator ved 37 grader C 15-20 min., hvorefter agaren må sikres mod yderligere udtørring samt beskyttes mod lys.

Suspekter kolonier af termofile campylobacter er karakteristiske ved at have en blank overflade i påfaldende lys. I ældre kulturer med tæt vækst kan overfladen blive mat med metalskær. Kolonierne viser tendens til spredning og konfluerende vækst langs udsædsstregen.

Farven veksler fra beige, rosa, over transparente til dugdråbeligende kolonier. Størrelsen varierer meget på grund af tendensen til konfluerende vækst.

Inden rendyrkning undersøges suspekter kolonier ved mikroskopi for iagttagelse af typiske celleformer, komma-, S- og mågeformer til længere spiralsnoede stave. Ofte vil der ikke være enkeltkolonier på grund af sværmning, og udsæd på et veltørret medium f.eks. blod agar (Blood Agar Base 2 med 5% kalveblod) kan være nødvendigt. I ældre kulturer kan ofte ses større kokkoide celler. Mikroskopering foretages bedst ved fasekontrastmikroskopi, hvor også den for termofile campylobacter typiske bevægelighed med pludselige retningskift kan iagttages. Mange termofile campylobacter mister ved opslemning i fysiologisk saltvand momentant bevægeligheden, og det er derfor vigtigt at undersøgelse for bevægelighed sker ved opslemning i en næringsrig bouillon. Ved undersøgelse af bakteriemorfologi bør opslømmes i fysiologisk saltvand eller vand. Alternativt til fasekontrastmikroskopering kan cellemorfologien undersøges efter farvning i 5 min. med 2% karbolfuksin, idet gramfarvning ofte giver dårligt resultat.

Pkt. 9.6.2

Test for nalidixinsyre resistens:

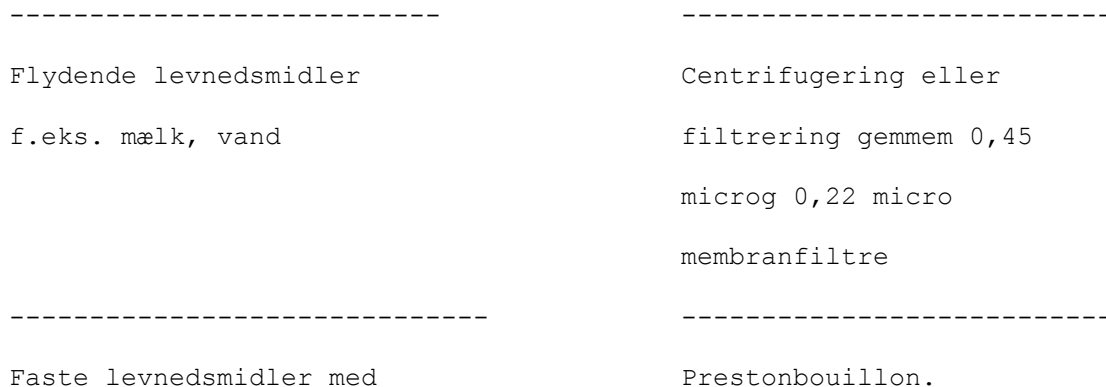
Der benyttes 5% blod agar plader som beskrevet i kommentarerne til punkt 5.4. De benyttede agar plader skal være tørret natten over ved 37 grader C.

Fra en 1 døgn gammel kultur på modificeret CCDA eller blod agar fremstilles en tæt bakterieopslemning (ca. 10exp8 pr. ml) i 0,1% peptonvand evt. almindelig saltvandspepton), som med vatpodepind streges på blod agar. Midt på udsædsstregen anbringes aseptisk en 30 microg nalidixinsyre-tablet, hvorefter pladen inkuberes 2 døgn ved 41,5 grader C i mikroaerofil atmosfære. Som alternativ til opslemning, kan foretages streginokkulering direkte fra bakteriekoloni. Udsæden må ikke være for kraftig.

Hæmning > 5 mm: Nalidixin-følsom

Hæmning <= 5 mm: Nalidixin-resistent.

#### **FLOW DIAGRAM FOR PÅVISNING AF TERMOFILE CAMPYLOBACTER**



lavt indhold af Campylobacter	41,5 grader C 24 timer.
	Aerobt/microaerofil atm.
-----	
Kliniske prøver o.l. med højt indhold af Campylobacter	Modificeret CCDA agar. Kraftig udsæd. 41,5 grader C i 48 t. Microaerofil atm.
-----	

-----

Fasekontrast-mikroskopi af suspekterte kolonier.  
 Eller farvning med 2% karbol-fuksin i 5 minutter.

-----

-----

Blodagar/mod. CCDA

Rendyrkning 41,5 grader C 20-24 t.  
 Mikroaerofil atm.

-----

Katalase +

Verifikation Cytochromoxidase +

-----

		hippurat	nalidixin
		hydrolyse	følsomhed
Biokemisk	C. jejuni	+	+
differen-	C. coli	-	+
tiering	C. lari	-	-

-----

### 6.3.5 Clostridium perfringens

## Metodik

Som anført i NMKL nr. 95, 2. udgave, 1985. Metoden er ekstraheret fra AOAC metodiken (1984) og vedrører isolation af organismen.

Pkt. 3 og 7.4

Kolonier på blod agar er mellemstore, hvælvede, regelmæssigt cirkulære og omgivet af en karakteristisk dobbeltzone hæmolyse bestående af en indre komplet forårsaget af thetatoxin og en ydre inkomplet forårsaget af alfatoxin.

Pkt. 4.1.6

Blod agar:

Tryptose Blood Agar base eller tilsvarende	33	g
Destilleret vand	ad 1000	ml
Kalveblod, defribineret eller citratstabiliseret	50	ml

Opløs ingredienserne af basis mediet under langsom opvarmning til kogning. autoklaver ved 121 grader C i 15 minutter. Nedkøl til 45-50 grader C. Efter autoklavering justeres pH ved 45 grader C til 7.0 +/- 0.2 og tilsæt rumtempereret blod. Bland grundigt og ophæld 10 ml pr. plade. Et tyndt agarlag er vigtigt for at hæmolyse skal fremtræde tydeligt. Opbevar pladerne i plastposer ved 4 grader C.

Pkt. 6

Vegative celler dør relativt hurtigt ved kold opbevaring. Ved længere tids opbevaring eller transport kan drab af vegetative celler minimeres, ved at levnedsmiddelpøven opblandes med 20% glycol (1:1 w/v) i steril container og opbevares på tøris (ca. -60 grader C).

### 6.3.6 Coliforme bakterier

#### Metodik

Som anført i NMKL nr. 44, 3. udgave, 1990, med følgende præciseringer:

Ved undersøgelse af levnedsmidler, hvor bakteriefloraen må anses for at være »stresset« som følge af f.eks. varmebehandling, frysning, tørring, fermentering eller kemisk konservering, anvendes metode, som angivet i forslag til NMKL nr. 105, 1984.

#### Verifikation

Som anført i NMKL nr. 105, 1984 (metodeforslag). I stedet for Brilliantgrøntgalde-laktose bouillon kan der anvendes MacConkey bouillon.

### 6.3.7 Enterobacteriaceae

#### Metodik

Som anført i NMKL nr. 144, 1992.

I levnedsmidler, hvor Enterbacteriaceae må forventes at forekomme ubeskadiget og i større tal, anvendes direkte udsæd i Rødviolet-galde agar med glukose.

I levnedsmidler, hvor enterobacteriaceae må forventes at forekomme i ringe mængde eller være »stresset« som følge af levnedsmidlets behandling under fremstilling og opbevaring, kan en opformering være nødvendig.

Der afvejes 1-5 g af levnedsmiddelprøven, der opformeres i en passende mængde opformeringsbouillon (forhold ca. 1:10).

Opformering kan foretages direkte i Brilliantgrøntgalde-glukose bouillon (jfr. NMKL nr. 105 (metodeforslag), som nævnt i pkt. 4.3.7., hvor laktose i den angivne Brilliantgrønt-galde-laktose bouillon erstattes med glukose), eller i Enterobacteriaceae Enrichment bouillon (E.E. bouillon), eller der kan foretages præinkubering i Trypticase-soya bouillon (TSB) med efterfølgende opformering i E.E. bouillon.

Opformeringsmedierne har følgende sammensætning:

E.E. bouillon:

Pepton	10,0	g
Glukose	5,0	g
Dinatriumhydrogenfosfat	8,0	g
Kaliumdihydrogenfosfat	2,0	g
Oksegalde, dehydreret	20,0	g
Brilliantgrønt	0,015	g
Destilleret vand	1.000	ml
pH 7,3 +/- 0,1		

Opløs bestanddelene i destilleret vand, ophæld bouillon i passende glasbeholdere og autoklaver ved 121 grader C i 5 minutter eller ved 100 grader C i 30 minutter.

Trypticase-soya bouillon:

Trypton	17,0	g
Soya pepton	3,0	g
Natriumklorid	5,0	g
Glukose	2,5	g
Dikaliumhydrogenfosfat	2,5	g
Destilleret vand	1.000	ml



pH 7,3 +/- 0,1

Opløs bestanddelene i destilleret vand, ophæld bouillon i passende glasbeholdere og autoklaver ved 121 grader C i 15 minutter.

### **Dyrkning**

Samtlige substrater ved 37 grader C i 24 timer.

### **Aflæsning**

Som anført i NMKL forskriften.

### **Identifikation**

Såfremt undersøgelsens formål kræver en nærmere identifikation, foregår dette ved at overføre kolonier til kødvands agar eller blod agar. Herefter udføres en oxidasetest med kolonimateriale fra kødvands- eller blod agar. Oxidase negative bakterier undersøges for glukoseforgæring. Er denne positiv, kan endelig identifikation gennemføres. Der henvises i denne forbindelse til speciallitteratur.

### **6.3.8 Enterococcer (»Fækale streptokokker«)**

#### **Metodik**

Som anført i NMKL nr. 68, 2. udgave, 1992.

### **6.3.9 Gærsvampe (skimmelsvampe se 6.3.18)**

#### **Metodik**

Som anført i NMKL nr. 149, 1993. (Der arbejdes i øjeblikket med en NMKL procedure, der kan dække både gær og skimmelsvampe under et).

### **6.3.10 Kim på blod agar**

#### **Metodik**

Der anvendes dybde- eller overfladeudsæd i blod agar (BA) med følgende sammensætning:

Kødekstrakt	10,0	g
Pepton	10,0	g
Gærekstrakt	2,0	g
Natriumklorid	5,0	g
Agar	15,0	g
Destilleret vand	ad 1.000	ml

pH 6,8 +/- 0,1

Bestanddelene opløses under opvarmning. Når alle ingredienser er opløst, overføres substratet til mindre flasker, der autoklaveres ved 121 grader C i 15 minutter.

Til det smeltede og til 45 grader C afkølede substrat tilsættes 5-8% sterilt, stabiliseret eller defibrineret kalveblod samt evt. 25 i.e. Polymyxin B-sulfat eller 75 i.e. Kolistin sulfat pr. ml.

Såfremt blodpladerne skal anvendes specielt til at påvise grampositive hæmolytiske bakterier, kan de gram-negative stavbakterier hæmmes ved tilsætning af Polymyxin B-sulfat som oven for anført. Hvis blodpladerne derimod skal anvendes til en generel vurdering af mikrofloraen i et levnedsmiddel, bør der ikke tilsættes hæmmende stoffer.

### **Dyrkning**

37 grader i 24-48 timer.

### **Aflæsning**

Aflæsning af hæmolytiske bakterier foretages efter 24 og 48 timer. Kimtallet aflæses efter 48 timer.

Hovedgrupperne af den fremvoksende mikroflora vurderes og sammenholdes med øvrige kimal. Såfremt hæmmende stoffer ikke er anvendt, kan samtlige kolonier tælles, og resultatet anvendes som et 37 grader C kimal. Hæmolytiske bakterier kan tælles, og arten af de dominerende typer evt. angives efter fornøden identifikation.

#### **6.3.11 Kimtalsbestemmelse**

Kimtalsbestemmelse kan omfatte:

- Aerobt kimal.
- Antal psykotrofe bakterier.
- Fremmede kim ved 30 grader C

##### **6.3.11.1 Aerobt kimal**

#### **Metodik**

Som anført i NMKL nr. 86, 2. udgave, 1986. Bestemmelse af total kimal udføres ved anvendelse af Plate Count agar, inkuberet ved 25 grader C i 3-5 døgn afhængig af floraens sammensætning i det aktuelle levnedsmiddel. Dyrkningstemperatur og inkubationstid skal angives ved meddelelse af resultatet. Ved aflæsning foretages, udover tælling af antallet af kolonier, en vurdering af floraens sammensætning.

Ved undersøgelse af saltede og røgede kødvarer tilsættes fortyndingsvæsken og substratet NaCl i passende koncentration, d.v.s. for modnede, saltede kødvarer 4% NaCl og stærkt saltede kødvarer 10% NaCl.

#### **Aerobt kimal i fisk og fiskevarer**

Ved bestemmelse af kimaltallet i ferske fisk og fiskevarer anvendes Jern agar, der inkuberes ved 21 grader C i 3 døgn (jfr. 6.3.19).

##### **6.3.11.2 Psykrotrofe bakterier**

## Metodik

Som anført i NMKL nr. 74, 2. udgave, 1989.

### 6.3.11.3 Fremmed kim

## Metodik

Der anvendes dybdeudsæd i Sukkerfri-pepton agar med følgende sammensætning:

Pepton (kulhydratfri)	7,5	g
Trypton (kulhydratfri)	7,5	g
Natriumklorid	5,0	g
Agar	15,0	g
Destilleret vand	1.000	ml
pH 7,6 +/- 0,1		

Bestanddelene opløses evt. under opvarmning. Når alle ingredienser er opløst, omhældes substratet på mindre flasker, der autoklaveres ved 115 grader C i 15 minutter.

## Dyrkning

30 grader C i 72 timer.

## Aflæsning

Ved undersøgelse af levnedsmidler, til hvilke der er anvendt starterkultur, er kendskab til sammensætningen af denne nødvendig for at kunne udelukke disse kolonier ved tællingen.

### 6.3.11.4 Direkte Epifluorescens Filter Teknik (DEFT)

## Metodik

Som anført i NMKL nr. 137, 1990.

### 6.3.12 Lactobaciller

Der findes i dag ikke metoder til undersøgelse for lactobaciller specifikt. Der henvises til afsnit 6.3.14 Mælkesyrebakterier.

### 6.3.13 Listeria monocytogenes

## Metodik

Som anført i NMKL nr. 136, 1990 med følgende præciseringer.

#### Pkt. 9.4

Fra hver plade udvælges mindst 10 typiske kolonier, der re dyrkes på blod agar ved 37 grader C i 24-48 timer. L. monocytogenes-kolonier er efter 24 timer 1-2 mm i diameter, gennemsigtige og med en smal beta-hæmolytisk zone. Svagt hæmolytiske stammer viser evt. kun hæmolyse under selve kolonien.

#### Pkt. 9.4.1.

Differentiering mellem L. monocytogenes og L. innocua sker bl.a. på grundlag af hæmolyse, idet sidstnævnte er an-hæmolytisk. Hæmolyse hos L. monocytogenes kan være meget svag og kan evt. kun ses under selve kolonien, hvorfor denne bør fjernes på et repræsentativt antal kolonier for at bedre vurderingen.

#### Pkt. 9.4.6

Stammer, som ved screeningen har vist de typiske reaktioner, og som endvidere er grampositive, katalasepositive og oxidase-negative, identificeres ved test for syredannelse fra rhamnose og xylose og methylmannosid. L. monocytogenes er generelt (> 90%) rhamnose og methylmannosid positive og xylose negativ

#### Pkt. 9.4.7

Kan undlades.

### **Kvantitativ bestemmelse**

Er der tale om kvantitativ bestemmelse af L. monocytogenes i relation til kontrol af fastlagte grænseværdier, kan direkte udsæd på det stærkt selektive substrat, Oxford agar, ikke anbefales, da et mere eller mindre betydende og uforudsigeligt drab af Listeria vil forekomme. Et negativt fund ved en sådan metode må derfor ikke tillægges nogen betydning.

Ved kvantitativ undersøgelse for L. monocytogenes, i sammenhænge hvor der er fastlagte grænseværdier, skal følgende semikvantitative metode derfor benyttes.

10 gram levnedsmiddel stomacheres med 90 ml fysiologisk kogsalt med pepton, hvorefter en 10-folds fortyndingsrække fremstilles. 1.0 ml fra hver fortynding overføres til 9 ml LB I til undersøgelse for indhold af L. monocytogenes efter NMKL forskrift nr. 136 med modifikationer. Fravær af L. monocytogenes ved udsæd fra  $10^1$  fortyndingen (den stormarcherede prøve) svarer til, at bakterien ikke påvises i 0.1 gram og dermed har en forekomst på  $< 10$ /gram. Påvises L. monocytogenes ikke ved udsæd fra  $10^2$  fortyndingen har bakterien tilsvarende en forekomst på  $< 100$ /gram.

### **FLOW DIAGRAM FOR PÅVISNING AF LISTERIA MONOCYTOGENES**

Selektiv opformering:

-----  
10 eller 25 g prøve fortyndes 1:9 i LB I.

Inkubering 30 grader C i 24 +/- 2 t.  
-----  
-----

0,1 ml LB-I podes i 10 ml LB-II

30 grader C i 24 +/- 2 t.



Rhamnose positive

Xylose negativ

37 grader C 1-7 dage

De fleste reagerer inden for 24-48 t.

-----

### 6.3.14 Mælkesyrebakterier

Gruppen af mælkesyrebakterier er ikke helt veldefineret. Den omfatter lactobaciller, carnobakterier, pediococcer, lactococcer og Leuconostoc, hvorimod tilhørsforholdene for bl.a. enterococcer, aerococcer og bifidobakterier diskuteres. Mælkesyrebakterier er grampositive, oftest katalasenegative, ubevægelige, ikke sporedannende og fermenterer kulhydrater med mælkesyre som hovedprodukt.

For alle medier anbefalet til selektiv dyrkning af mælkesyrebakteriegruppen eller dele deraf, kan der være problemer i form af for kraftig eller for svag selektivitet, som angivet nedenfor.

Fortolkningen af høje mælkesyrebakteriekimtal bør således støttes af andre kimtal som f.eks. enterococcer og Brochothrix samt eventuelt periodevis basal identifikation af den fremvoksende flora.

#### Metodik

Een af følgende metoder kan anvendes:

- Dyrkning på de Man, Rogosa og Sharpe agar tilsat sorbinsyre og pH-modificeret (MRS-S agar).
- Dyrkning på Nitrit-actidion-polymyxin agar (NAP agar).

Fælles for begge substrater er, at en vis interferens fra beslægtede bakteriegrupper som f.eks. enterococcer, Brochothrix og Listeria ikke kan undgås, da vækstbetingelserne for grupperne er ensartede.

#### 6.3.14.1 Dyrkning på MRS-S agar

MRS agar er et elektivt substrat til dyrkning af mælkesyrebakterier, d.v.s. det fremmer væksten af mælkesyrebakterier specielt uden specifikt at hæmme andre bakteriegrupper, hverken Gramnegative eller Grampositive. Ved tilsætning af 0,14% sorbinsyre og en sænkning af pH fra 6,2 til 5,7 er substratet imidlertid gjort selektivt.

#### Metodik

Der anvendes MRS agar som basissubstrat med efterfølgende pH-sænkning og tilsætning af sorbinsyre.

Basissubstrat - MRS agar:

Pepton	10,0	g
Kødekstrakt	8,0	g
Gærekstrakt	4,0	g

Glukose	20,0	g
Tween 80	1,0	g
di-kaliumhydrogenfosfat (K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	2,0	g
Natriumacetat 3 h <sub>2</sub> O	5,0	g
tri-Ammoniumcitrat	2,0	g
Magnesiumsulfat, 7 H <sub>2</sub> O (MgSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O)	0,2	g
Mangansulfat, 4 H <sub>2</sub> O (MnSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O)	0,05	g
Agar	13,5	g
Destilleret vand	1000	ml

Bestanddelene kvælder i vandet i mindst 10 min. og opløses derefter fuldstændigt under opvarmning ved 100 grader C i 1 time. Derefter tilsættes 15 ml sterilfiltreret sorbinsyreopløsning (1,4 g sorbinsyre eller 2,0 g kaliumsorbat i 15 ml 1 N NaOH) og pH indstilles til 5,8 med 10% HCl. pH i det brugsklare substrat (25 grader C) skal være 5,7 +/- 0,1. Giv substratet et kort opkog og fordel sterilt på mindre flasker.

MRS forhandles færdigblandet som både agar og bouillon. Såfremt bouillon anvendes tilsættes 13,5 g agar/liter. Substraterne fremstilles i overensstemmelse med angivelserne fra forhandleren. Efter autoklaving eller smeltning samt afkøling til 50 grader C tilsættes 15 ml sterilfiltreret sorbinsyreopløsning (1,4 g sorbinsyre eller 2,0 g kaliumsorbat i 15 ml 1 N NaOH) og pH indstilles sterilt til 5,8 med 10% HCl. pH i det brugsklare substrat (25 grader C) skal være 5,7 +/- 0,1.

Der skal gøres opmærksom på, at for kraftig varmebehandling efter pH-sænkning resulterer i utilstrækkelig størkningsevne.

Såfremt agaren skal anvendes til at undersøge diverse drikkevarer, kan der tilsættes yderligere 1% fructose for at tilpasse substratets sammensætning til produktets.

Der anvendes dybdeudsæd med dæklag eller inkubering af pladerne, der i så fald kan være overfladeudsæt, i 5-10% CO<sub>2</sub>-atmosfære. Eventuelt ophældte plader har en holdbarhed på 7 dage på køl.

### **Dyrkning**

25 grader-30 grader C i 3 døgn.

### **Aflæsning**

Der tælles på plader af passende fortyndinger. På MRS-S agar tælles samtlige veludvoksede kolonier som mælkesyrebakterier. Man må dog være opmærksom på eventuel ledsageflora i forskellige produkter og lade aflæsningen basere på en vurdering af kolonimorfologi eventuelt kombineret med basal identifikation.

### 6.3.14.2 Dyrkning på NAP agar

NAP agar er et selektivt substrat, der hæmmer en væsentlig del af den eventuelt ledsagende flora. Det neden for angivne substrat er dog modificeret i forhold til den originale opskrift ved en ændring i pH fra 5,5 til 6,7. Denne ændring er ikke baseret på laboratorieundersøgelser, men sandsynligvis oprindeligt indført i de danske anbefalinger på baggrund af basissubstratets pH (APT agar). Ændringen i pH giver mulighed for vækst af mælkesyrebakterier, der bliver hæmmet på det oprindelige substrat, men nedsætter selektiviteten i forhold til øvrige bakteriegrupper. Dog er de inhiberende stoffer i NAP agar væsentligt mere selektive end sorbinsyren i MRS-S agar.

#### Metodik

Der anvendes APT agar som basissubstrat og efterfølgende tilsætning af de inhiberende stoffer.

Basissubstrat - APT agar:

Pepton	12,5	g
Gærekstrakt	7,5	g
Glukose	10,0	g
NaCl	5,0	g
tri-natriumcitrat	5,0	g
di-Kaliumhydrogenfosfat (K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	5,0	g
Tween 80	0,2	g
Magnesiumsulfat	0,8	g
Manganklorid	0,14	g
Jern(II)-sulfat	0,04	g
Thiamindiklorid	0,001	g
Agar	13,5	g
Destilleret vand	1000	ml

pH 6,7 +/- 0,1 i det brugsklare substrat (25 grader C).

Bestanddelene kvælder i vandet i mindst 10 min. og opløses derefter fuldstændigt i det destillerede vand under opvarmning. Substratet overføres til flasker med 200 ml agar, der autoklaveres ved 121 grader C i 15 min.

ATP forhandles færdigblandet som både agar og bouillon. Såfremt bouillonene anvendes, tilsættes 13,5 g agar/liter. Substraterne fremstilles i overensstemmelse med angivelserne fra forhandleren.

Såfremt agaren skal anvendes til at undersøge diverse drikkevarer, kan der tilsættes yderligere 1% fructose for at tilpasse substratets sammensætning til produktet.



Inden brug tilsættes pr. 200 ml smeltet og til 50 grader C afkølet substrat:

- 1) 1 ml sterilfiltreret 12% (w/v) natriumnitritopløsning (12 g natriumnitrit + destilleret vand ad 100 ml), hvilket giver en koncentration i substratet på 0,6 g/liter.
- 2) 1 ml sterilfiltreret 0,2% (w/v) actidionopløsning (= cycloheximid) (200 mg cycloheximid + destilleret vand ad 100 ml), hvilket giver en koncentration i substratet på 10 mg/liter.
- 3) 1 ml sterilfiltreret polymyxin-B-opløsning med 5000 IU/ml (fremstilling afhængig af den deklarerede aktivitet af polymyxin-B), hvilket giver en koncentration i substratet på 25.000 IU/liter.

Opløsning 1) og 2) kan opbevares 3 uger på køl. Opløsning 3) kan opbevares i 1 uge på køl.

Der anvendes dybdeudsæd med dæklag eller inkubering af pladerne, der i så fald kan være overfladeudsået i 5-10% CO<sub>2</sub>-atmosfære.

### Dyrkning

25 grader-30 grader i 3 døgn.

### Aflæsning

Der tælles på plader af passende fortyndinger.

På NAP agar tælles samtlige kolonier, dog undtaget typiske kolonier af Bacillus-arter og gær, der kan vokse på substratet. Brochothrix kan i visse tilfælde vokse på substratet uden at kunne skelnes kolonimorfologisk, men der er ikke påvist en entydig sammenhæng mellem forekomst af Brochothrix i produktet og på NAP-pladerne. Brochthrix kan skelnes fra mælkesyrebakterier ved rendyrkning på APT-plader, katalasetest (20% v/v H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) og mikroskopi. Brochothrix er katalasepositiv på APT-agar, ubevægelig og stavformet (polymorf).

### 6.3.15 proteolytiske bakterier

#### Metodik

Der anvendes dybdeudsæd i Gelatine agar med følgende sammensætning:

Neopepton	4,0	g
Gærekstrakt	1,0	g
Gelatine	10,0	g
Agar	10,0	g
Destilleret vand	1.000	ml
pH 7,2 +/- 0,1		

Bestanddelene opløses under opvarmning, og substratet ophældes på mindre flasker, der autoklaveres ved 121 grader C i 15 minutter.

Sulfosalicylsyre reagens:

Sulfosalicylsyre	20,0	g
Destilleret vand ad	100	ml

Sulfosalicylsyre reagens kan opbevares i 1 måned ved max. 5 grader C.

### **Dyrkning**

30 grader C i 48 timer.

### **Aflæsning**

Efter endt inkubation overhældes pladen med 3-4 ml sulfosalicylsyre reagens og henstår ca. 5 minutter. Samtlige kolonier, der er omgivet af en klar zone, tælles som proteolytiske.

### **6.3.16 Reduktaseprøve**

Undersøgelsen anvendes på hakket fiskekød og fiskefars men kan ikke anvendes på produkter, i hvilke rå løg indgår.

I sterilt reductaseglas (22 x 165 mm) afpipetteres 10 ml steril fysiologisk kogsaltopløsning (0,9% NaCl opløsning). Med steril ske overføres fiskefars til reductaseglasset indtil 20 ml-mærket. Derefter afpipetteres 2 ml methylenblåt opløsning. Glasset lukkes med steril prop og rustes til sammenblanding.

Glasset hensættes derefter i vandtermostat ved 37 grader C.

### **Aflæsning**

Aflæses for affarvning efter inkubation i 10 og 30 minutter samt derefter hver halve time indtil i alt 4 1/2 time. Affarvningstiden angives i timer og minutter.

Som referenceprøve kan anvendes prøve uden tilsætning af methylenblåt opløsning.

### **6.3.17 Salmonella**

Som anført i NMKL nr. 71, 4. udgave, 1991, med følgende præciseringer:

Pkt. 4.2.4

Kommercielle præparationer af RV-medier skal indeholde 29 g magnesiumklorid, 6H<sub>2</sub>O/liter, svarende til 13.58 g vandfrit magnesiumklorid / liter.

Pkt. 7.4

Som fast selektivt substrat/indikativt substrat benyttes enten Rambach agar plade (MERCK 7500/0002 eller tilsvarende) eller brilliantgrønt-fenolrødt agarplader (Ocoïd CMP 329 eller tilsvarende). Inkubation ved 37 grader C +/- 1 grad C i 18-24 timer. Ved mistanke om S. dublin (prøver indeholdende oksekød) bør der ikke benyttes Rambach agar, da denne serotype her udviser ukarakteristisk vækst.

Pkt. 7.5

Rambach agarpladen: Røde, svagt røde og rosa kolonier bedømmes som Salmonella suspekter.

Pkt. 7.6

Fra BLSF/Rambach agarpladen udtages suspekter kolonier og stikkes i TSJ og Lysin jern agar. Typisk reaktion rød/gul/luft/sværtning i TSJ og purpur/purpur/luft/sværtning i Lysin jern agar.

Pkt. 7.6

Lysin jern agar:

En formulering svarende til Oxoid CM381 anvendes.

Lysin jern agar er et indikativt medium for Salmonella incl. laktoseforgærende Salmonella arizona og den karakteristiske reaktion er purpur/purpur/luft/sværtning. Proteus og Providentia giver karakteristisk en reaktion rød/gul/luft. S. Paratyphi A er lysindecaboxylase negativ og reaktionen er purpur/gul/luft.

Pkt. 7.6

Biokemisk karakterisering kan alternativt foretages med API 20E systemet.

### **Objektglasagglutination**

Såfremt kolonierne på grundlag af disse biokemiske undersøgelser stadig må anses for Salmonella-suspekter, foretages agglutinationsprøve med polyvalent Salmonella-O-antiserum. Såfremt agglutinationsprøven giver positiv reaktion, skal det sikres, at den pågældende stamme ikke er spontan agglutinabel ved afprøvning af reaktionen i fysiologisk kogsaltopløsning.

Det bemærkes, at en negativ agglutinationsprøve kan forekomme for Salmonella som følge af, at antigengenkendelsen hos det polyvalente Salmonella-O-antiserum er begrænset til de almindeligst forekommende typer.

Den isolerede bakteriestamme indsendes til serotypning på Statens Veterinære Serumlaboratorium. Til indsendelse benyttes en egnet plastemballage, f.eks. med skrån agar tilsæt såvel i dybden som på overfladen.

### **FLOW DIAGRAM OVER ISOLATION AF SALMONELLA**

Præopformering

-----  
Peptonvands buffer

1 del prøve + 9 dele buffer

mindst 25 g prøve

37 grader C i 18-24 t.  
-----  
-----

Selektiv opformering

Rappaport-vassiliadis bouillon (RV).

0,1 ml præopformeringsbouillon podes

i 10 ml RV.

41,5 grader C +/- 0,5 grader C

	(luftinkubator)
	42,0 +/- 0,2 grader C (vandbad)
	-----
	-----
Selektiv indikativ dyrkning på fast substrat	BLSF (BG agar) evt. tilsat teepol og/ eller Rambach agar.  37 grader C i 18-24 t.
	-----
	-----
Rendyrkning	Udsød på PCA eller anden grundsubstrat agar af 2-4 suspekter kolonier.  Inkubering 37 grader C i 18-24 t.
	-----
	-----
Verifikation	Alle inkuberes ved 37 grader C TSJ agar 24-48 t.  Lysin jern agar.  Alternativ karakterisering kan foretages med API 20E.  Polyvalent Salmonella O antiserum.
	-----

### **Vedr. Weekends**

Præopformeringen i peptonbuffer og den selektive opformering i Rappaport-Vassiliadis er kritiske trin. Derfor må Salmonellaundersøgelsen påbegyndes mandag-onsdag, så inkuberede Rambach/BLSF agarplader kan flyttes fra 37 grader C termostat til køleskab lørdag. I tilfælde, hvor der udføres laboratoriearbejde om lørdagen, kan undersøgelsen også påbegyndes torsdag.

### **6.3.18 Skimmelsvampe (gær se 6.3.9)**

#### **Metodik**

Som anført i NMKL nr. 98, 2. udgave, 1987.

### 6.3.19 Specifikke fordærvelsesbakterier i fisk

#### Metodik

Der anvendes dybdeudsæd i jern agar med et tyndt dæklag af samme agar.

Pepton	20,0	g
Kødekstrakt	3,0	g
Gærekstrakt	3,0	g
Natriumklorid (NaCl)	5,0	g
Ferricitrat (FeC <sub>6</sub> H <sub>5</sub> O <sub>7</sub> )	0,3	g
Natriumthiosulfat (Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> )	0,3	g
Agar	12,0	g
Destilleret vand	1.000	ml
pH 7,4 +/-		

Ferricitrat og natriumthiosulfat opløses i ca. 50 ml vand under magnetomrøring og tilsættes de øvrige ingredienser, som opløses under opvarmning. Autoklaveres ved 121 grader C i 15 min.

Det smeltede substrat afkøles til 45 grader C og tilsættes pr. 200 ml: 2 ml af en 4% sterilfiltreret L-cysteinopløsning, svarende til 400 mg L-cystein pr. liter substrat.

#### Dyrkning

21 grader C i 3 døgn.

#### Aflæsning

Som udtryk for totaltallet tælles samtlige kolonier uanset kolonifarve.

Antallet af sorte kolonier er et udtryk for indholdet af specifikke fordærvelsesbakterier, der ofte domineres af *Shewanella putrefaciens* (tidligere *Alteromonas putrefaciens*), men også kan omfatte medlemmer af familierne Enterobacteriaceae og Vibrionaceae.

### 6.3.20 *Staphylococcus aureus*

#### Metodik

Som anført i NMKL nr. 66, 2. udgave, 1992.

### 6.3.21 Sulfitreducerende clostridier

#### Metodik

Som anført i NMKL nr. 56, 2. udgave, 1980 med følgende præciseringer:

### **Aflæsning**

Prøven aflæses efter 24 timers inkubation og derefter hver dag i indtil 4 døgn.

### **6.3.22 Termotollerante coliforme bakterier**

#### **Metodik**

Som anført i NMKL nr. 125, 1987, idet det bemærkes, at den i pkt. 5.2.4. anførte MacConkey-bouillon, blandt andet med hensyn til pH, adskiller sig fra andre almindeligt anvendte og ligeværdige MacConkey-opskrifter.

Såfremt der ved undersøgelse af fisk og fiskevarer kræves en lavere detektionsgrænse, kan NMKL nr. 96, 1980, (MPN-teknik med lauryl-sulfat bouillon) anvendes.

### **6.3.23 Vibrio prahaemolyticus**

#### **Metodik**

Som anført i NMKL nr. 97, 1982 (preliminær metode) med følgende præciseringer:

### **Aflæsning**

Ved kvantitative undersøgelser opgives resultatet efter reglerne i pkt. 3.4. efter fornøden identifikation. Ved kvalitative undersøgelser angives resultatet som påvist/ikke påvist i den undersøgte prøvemængde efter fornøden identifikation.

### **6.3.24 Yersinia enterocolitica**

Som anført i NMKL nr. 117, 2. udgave 1987, med følgende bemærkninger:

Metoden har vist sig at fungere med svingende følsomhed efter undersøgelsesmaterialets art, idet især prøver med et højt niveau af følgeflore har vist sig at medføre en forringelse af følsomheden. Problemet kan i nogen grad afhjælpes ved at modificere metoden efter de aktuelle forhold ved det levnedsmiddel, der ønskes undersøgt. Således kan det ved undersøgelse af højt kontaminerede prøver være en fordel at nedsætte inokulum fra 1:10 til 1:100. Følsomheden er desuden søgt forbedret gennem en tilsætning af carbenicillin til opformeringssubstratet. Modificeret Rappaport Bouillon (MRB).

#### **Pkt. 4.1.1**

Det anvendte galdesalt skal være af en styrke og kvalitet svarende Oxoid's »Bile salts nr 3« (Oxoid L56).

#### **Pkt. 4.1.2**

Der tilsættes Carbenicillin til MRB, svarende til 0,0025g/l.

#### **Pkt. 4.2.2**

SSD-agar hedder nu SSDC-agar (gælder alle steder hvor SSD-agar nævnes).

Den anvendte oksegalde skal være »Tørret oksegalde«.

#### **Pkt. 4.3.1**

I opskriften på Urea-indol-bouillon skal tilføjes:

»K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,1'g. »Destilleret vand til 1000ml« skal rettes til »Destilleret vand til 100ml«. Det skal iøvrigt bemærkes at anvendelse af Urea-bouillon og Indol-bouillon hver for sig er fuldt ud anvendeligt.

Pkt. 4.3.2

Kommercielt tilgængelige TSJ agar er fuldt anvendelige.

Pkt. 4.3.3

Det skal bemærkes, at halvflydende agar udmærket kan anvendes i stedet for Mannitol-bevægeligheds agar. Indikatoromslag på CIN agar er ensbetydende med, at kolonien har dannet syre fra mannitol, hvorfor yderligere test for mannitolfermentering er overflødig.

Pkt. 4.2

Det fremgår, at der kan vælges mellem to forskellige faste selektive medier, CIN-agar og SSDC agar. Det anbefales at anvende CIN agar.

Pkt. 5.7

+29 grader C rettes til + 30+/- 0,5 grader C

Pkt. 5.8

Udgår.

Pkt. 7.2, pkt. 7.3, pkt. 7.4 og pkt. 7.5

CIN agar inkuberes ved 30 grader C i 18-24 timer, afhængigt af størrelse og morfologi af kolonierne. SSDC agar inkuberes ved 30 grader C i 48 timer.

Ved udsæd på CIN og SSDC kan det afhængigt af prøvematerialet være en fordel at foretage udstrykning med et øsken rummende ca 10 microl.

Pkt. 7.4

Det vil ofte være en fordel at pøde 0,1 ml af 3 ugers kuldeopformeringen videre i 10 ml MRB, og inkubere som beskrevet inden udstrykningen på CIN agar som beskrevet i punkt 7.3.

Pkt. 7.5

BS agar inkuberes ved 30 grader C.

Pkt. 7.6

Vedrørende aflæsning af TSJ agar skal bemærkes, at der som regel ses en anelse luft men ingen egentlig sprængning af agarsøjlen.

### **Verifikation**

*Y. enterocolitica* skelnes fra andre *Yersinia*-arter ved følgende kriterier (Inkubation ved 30 grader C):

Saccharose	+
Rhamnose	-
Melibiose	-
VP (22 grader C)	+
Ornithin	+

Pkt. 7.7. Biotyping

Biotyping af *Y. enterocolitica* bør omfatte følgende:

---

Biotype	1A	1B	2	3	4	5
Lipase (Tween 80) eller lecitinase *	+	+	-	-	-	-
Pyrazinamidase **	+	-	-	-	-	-
Indol	+	+	(+)	+	-	-
Xylose	+	+	+	+	+	-
Thehalose	+	+	+	+	+	- (+)

---

Der inkuberes ved 30 grader C.

\* Lecitinase inkuberes ved stuetemperatur.

Pyrazinamidasetesten som er foreslået af Kandolo og Wauters (1985) er det hidtil mest sikre fænotypiske kriterium til at skelne mellem potentielt patogene og apatogene stammer.

**FLOW DIAGRAM OVER ISOLATION AF YERSINIA ENTEROCOLITICA FRA LEVNEDSMIDLER:**

---

25-50 g levnedsmiddel homogeniseres i stormacher og	Trin
tilsættes PBS i forholdet 1:9. I visse levnedsmidler 1:99	1
Præopformering ved stuetemperatur (22-25 grader C)	



i 3 timer

---

---

1. subkultur: Præopformeringskulturen Trin  
Udsæd på CIN agar kuldeopformers ved 4 2  
Inkubering ved 30 grader C i grader C i 3 uger  
20-24 t.

---

---

Selektiv opformering: Efter 8 dages Trin  
opformering overføres efter grundig blanding 3  
0,1 ml til 10 ml MRB. Inkubering ved  
22-25 grader C i 4 døgn

---

---

2. subkultur: Udsæd på CIN agar fra MRB. Trin  
Inkubering ved 30 grader C i 20-24 t. 4

---

---

3. subkultur: Efter 3 ugers kuldeopformering Trin  
udsås på CIN. 5  
Inkubering 30 grader C i 20-24 timer. Det  
anbefales at pøde i MRB (som trin 3-4) forinden  
udsæd på CIN.

---

---

---

Fra 1., 2. og 3. subkultur overføres 4-5 typiske kolonier til Trin  
BS agar. 6  
Inkubering ved 30 grader C i 12-24 t.

-----  
-----  
Indledende biokemisk karakterisering: Gule, sakkarose pos. Trin

kolonier testes i: 7

Urinstof. TSJ (37 grader C 18-24 t.), halvflydende agar ved  
37 grader C i 18-24 t.

-----  
-----  
Endelig biokemisk og serologisk identifikation: Trin

Cytochromoxidase neg., gramnegative stave 0:3 / 0:9 serologi. 8

Verifikation og biotyping, se tilføjelse til pkt. 7.6 og 7.7.

-----  
-----  
Pyrazinamidasetesten udføres på et medium bestående af: 30g Trypic Soy agar (Difco), 3g Yeast extract (Difco), 1g pyrazincarboxamid (Merck) i 1 liter Tris-maleate (0,2M, pH 6). Mediet fordeles med ca 5 ml i rør, der autoklaveres og afkøles på skrå, så der dannes en skråflade. Skråfladen inokuleres og inkuberes 48 timer ved 25-30 grader C. 1 ml af en frisk fremstillet vandig opløsning af ammonium-ferrisulfat hældes over skråfladen. Efter 15 minutter aflæses reaktionen. Rødfarvning indikerer dannelse af pyrazinsyre, og noteres som positiv pyrazinamidase reaktion.

I det omfang de nævnte kriterier dækkes af kommercielle identifikationssystemer kan disse anvendes som alternativ.

## **6.4 Tælling og angivelse af kimal**

### **6.4.1 Tælling af mikroorganismer**

De kvantitative mikrobiologiske analysemetoder foreskriver normalt det mindste og det største antal kolonier, som skal være vokset frem på petriskåle eller i glas, for at disse kan anvendes ved tælling og beregning af kimal. Dette antal vil normalt være mellem 30 og 300 kolonier pr. plade eller glas, for visse indikative substrater dog ofte væsentligt færre.

### **6.4.2 Beregning af kimal**

Ved enkeltundersøgelser tælles kolonier på den plade, som er egnet til tælling. Kimtallet udtrykkes som antallet af kolonier divideret med prøvemængden spredt på pladen (se 6.4.2.2).

Det er en almindeligt accepteret forudsætning for statistiske beregninger på kimal, at kolonitallet følger en Poisson-fordeling. Det følger heraf, at sikkerheden på det angivne kimal blive sikrere, jo flere kolonier der er talt, idet der her udelukkende tænkes på den statistiske sikkerhed ved beregning af kimal ud fra et givet antal talte kolonier.

Det kan således være en fordel at tælle kolonier fra flere fortyndinger, eller måske ligefrem fra parallelle fortyndinger, når en højere grad af sikkerhed ønskes.

Kimtallet beregnes ved:

$$\text{Kimtallet} = \frac{C_1 + C_2 + \dots + C_n}{V_1 + V_2 + \dots + V_n}$$

hvor  $C_1, C_2, \dots, C_n$  er antallet af kolonier talt i fortyndingerne  $V_1, V_2, \dots, V_n$ .

Standardafvigelsen findes ved:

$$s = \frac{\text{kvadratroden af } C_1 + C_2 + \dots + C_n}{V_1 + V_2 + \dots + V_n}$$

Ønskes kimtallet angivet med 95% sikkerhedsgrænser, kan dette gøres ved:

$$\text{Kimtall} \pm 2s$$

Eksempel

Ved dygdeudsæd er der i 1 ml fra henholdsvis  $10 \exp(-3)$  og  $10 \exp(-4)$

fortynding talt 128 og 20 kolonier i PCA ved 25 grader i 3 døgn.

$$\begin{aligned} \text{Total kimtal} &= \frac{128 + 20}{10 \exp(-3) + 10 \exp(-4)} = 135.000/\text{g} \quad 140.000 \text{ g} \\ &= \frac{\text{kvadratroden af } 128 + 20}{10 \exp(-3) + 10 \exp(-4)} = 11.000 \end{aligned}$$

Total kimtal med 95% sikkerhedsgrænser =  $140.000 \pm 22.000/\text{g}$ .

#### 6.4.3 Angivelse af kimtal

Indholdet af mikroorganismer i en prøve angives som antal pr. ml eller gram, idet antallet angives med 2 betydende cifre.

Hvis antallet af kolonier på en plade eller i et glas ikke har været inden for det foreskrevne minimum eller maksimum, skal det fundne antal mikroorganismer i en prøve angives som en cirkaværdi.

## **6.5 Øvrige metoder**

### **6.5.1 pH**

#### **Metodik**

pH-bestemmelser foretages elektrokemisk med glaselektrode/referenceelektrode direkte på prøven eller eventuelt i opslæmning/opløsning (10 g prøve til 25 ml kuldioxidfrit vand).

Der henvises iøvrigt til A.O.A.C. 15th Ed, 1990 Official Methods of Analysis of the Association of Official analytical Chemists 15 th edition 1990, pkt. 964.24 vedrørende referencebufferne samt til det pågældende apparaturs brugervejledning.

Bestemmelse af pH i kød og kødprodukter, som angivet i Slagteriernes forskningsinstituts laboratoriebog, blad nr. 48, 7. november 1974.

### **6.5.2 Aw**

#### **Metodik**

Vandaktiviteten bestemmes som angivet i NMKL nr. 104.

### **6.5.3 Histamin**

#### **Metodik**

Histamin bestemmes semikvantitativt som angivet i NMKL nr. 118, 1988.

Histamin bestemmes kvantitativt som angivet i NMKL nr. 99, 1981.

## **Officielle noter**

Ingen