



Forekomster, koncentrationer og mulige effektkriterier af *Listeria monocytogenes* i spiseklare salater

Hansen, Tina Beck; Hansen, Lisbeth Truelstrup

Publication date:
2024

Document Version
Publisher's PDF, also known as Version of record

[Link back to DTU Orbit](#)

Citation (APA):
Hansen, T. B., & Hansen, L. T., (2024). *Forekomster, koncentrationer og mulige effektkriterier af Listeria monocytogenes i spiseklare salater*, 11 p.

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

NOTAT

Forekomster, koncentrationer og mulige effektkriterier af *Listeria monocytogenes* i spiseklare salater

Tina Beck Hansen og Lisbeth Truelstrup Hansen

DTU Fødevarerinstitutionen

September 2024

Notatet gennemgår resultaterne for 600 prøver af spiseklare salater med henblik på at bestemme forventede forekomster og koncentrationer af *Listeria monocytogenes* ved start på køleopbevaring af denne produktgruppe. På baggrund af estimerede koncentrationsfordelinger simuleres derefter, hvor mange prøver af 100.000 spiseklare salater, der kan forventes at overskride et kritisk niveau på 100 cfu/g for *L. monocytogenes*, hvis forskellige niveauer af vækst accepteres under køleopbevaringen. *L. monocytogenes* blev påvist i 37 prøver à 25 g, svarende til gennemsnitlig 6,2% (95%-CI, 4,4 – 8,4%) af de spiseklare salater. I fem af prøverne, svarende til 0,83% (95%-CI, 0,27 – 1,9%), blev mellem 10 og 40 cfu/g af *L. monocytogenes* fundet. Fire af disse prøver var salater med grønkål og kylling som dele af ingredienserne. Den statistiske analyse pegede på, at der var en generel øget risiko for forekomst af *L. monocytogenes* i salater, som indeholdt både kål og kylling, i særdeleshed når grønkål var sammen med kylling. Det kunne dog ikke udelukkes, at disse salater var produceret samme sted, så årsagen lå i håndteringen og ikke var et resultat af kombinationen af disse to ingredienser. Der bør dog være øget opmærksomhed på leverandørstyring, temperaturstyring og hygiejne ved anvendelsen af kål og kylling i den samme salat, indtil vi har mere viden om problemstillingen. *L. monocytogenes* blev ikke detekteret i 170 salater udelukkende bestående af friske grøntsager, frugter og nødder, men blev påvist i 8,9% (95%-CI, 6,4 – 12%) af 415 25-grams prøver af salater med kendt fyld af animalske fødevarer, varmebehandlede grøntsager eller kornstivelseser. Der var ikke forskel på om fyldet var af animalsk oprindelse eller ej. Dette gennemsnit dækkede dog over forskelle mellem animalske ingredienser. *L. monocytogenes* blev påvist ca. 3 gange oftere i salater med fyld af kylling eller ost end i resten af salaterne, mens påvisningen i salater med fyld af rødt kød, fisk eller æg kun forekom ca. hver femte gang sammenlignet med de øvrige salater. Simuleringerne viste, at uanset typen af fyld, ville flere salater med fyld overskride 100 cfu/g af *L. monocytogenes* allerede ved starten af køleopbevaring end salater udelukkende bestående af friske grøntsager, frugter og nødder. I princippet betyder dette, at vækst af *L. monocytogenes* i spiseklare salater med diverse fyld ikke kan accepteres, hvis det gældende risikomål for snittede grøntsager, hvor 9 ud af 100.000 prøver må overskride 100 cfu/g på sidste anvendelsesdag, skal kunne overholdes. En alternativ tilgang til fastlæggelse af et effektkriterium for vækst af *L. monocytogenes* i spiseklare salater med fyld kunne være at se på, hvornår man med sikkerhed kan registrere, at der har været vækst af *L. monocytogenes* i en fødevarer. Det anvender man også i Listeriavejledningen, hvor det er beskrevet, at en tilvækst på maks. 0,5 log₁₀-enhed er foreneligt med et stabiliseret produkt. En anden tilgang kan være at sætte holdbarheden lig med nølefasens længde, hvilket jo ville betyde, at der ikke er mulighed for en yderligere stigning i antallet af *L. monocytogenes* inden for holdbarheden. Vil man angive et effektkriterium som en log₁₀-stigning, kan et alternativ til nølefasens længde være at bruge 0,3 log₁₀-stigning, da det svarer til en fordobling, som jo er den mindste enhed, der kan indikere, at en bakterie er kommet ud af nølefasen.

Indledning

I det tidligere notat fra oktober 2019, "Udpegning af holdbarhedsbegrænsende mikrobiologiske risikofaktorer i køleopbevarede spiseklare og ready-to-cook fødevarer" (Hansen, Birk & Hansen, oktober 2019), er *Listeria monocytogenes* udpeget som en af de risikofaktorer, der er væsentlige at styre under køleopbevaring af spiseklare salater.

I forbindelse med fastlæggelse af effektkriterier for den acceptable vækst af *L. monocytogenes* under disse forhold, skal man kende det forventede niveau ved start på køleopbevaringen. Derfor bestemmer nærværende notat de forventede forekomster og koncentrationer af *L. monocytogenes* i spiseklare salater og simulerer, hvor mange salater der potentielt vil overskride det fastlagte kritiske niveau på 100 cfu/g (Kommissionens Forordning nr. 2073/2005) ved brug af de fundne fordelinger.

Gennemgangen tager udgangspunkt i resultaterne af kontrolprojekt 5216, hvor 600 prøver af spiseklare salater blev analyseret for *L. monocytogenes*. Projektet blev gennemført i 2020-2021, og den anvendte analysemetode havde tre trin; 1) kvalitativ påvisning i 25 g af alle prøver med Rapid L'mono, 2) kvantitativ bestemmelse af de positive prøver ved NMKL nr. 136, 5. udgave fra 2010 med en detektionsgrænse på 10 cfu/g og 3) sekventering af isolater ved brug af en intern metode. På basis af data fra trin 1) og 2) foreslås forekomst- og koncentrationsfordelinger for forskellige grupperinger af de undersøgte salater. Resultater fra trin 3) er ikke anvendt i dette notat.

Formål

Målet er at anvende disse oplysninger til simuleringer af, hvor mange salater der må forventes at overskride en koncentration på 100 cfu/g for *L. monocytogenes*, hvis forskellige grader af vækst accepteres i spiseklare salater. Disse beregninger kan bidrage til fastlæggelsen af effektkriterier for væksten af *L. monocytogenes* i køleopbevarede spiseklare salater.

Metode

Den metodiske tilgang, som er brugt til at beskrive risikoen for, at det kritiske niveau for *Listeria monocytogenes* overskrides i spiseklare, køleopbevarede salater, er den samme, som er anvendt i "NOTAT. Forekomster og koncentrationer af *Listeria monocytogenes* i straksprøver af spiseklare produkter" (Hansen & Hansen, marts 2021).

Forekomst og koncentration

L. monocytogenes blev påvist i 25 g i 37 ud af 600 prøver, svarende til gennemsnitlig 6,2% (95%-CI, 4,4 – 8,4%) af de spiseklare salater, der blev analyseret i kontrolprojekt 5216. Denne forekomst er sammenlignelig med de 4,8% (95%-CI, 4,1 – 5,7%), der er rapporteret i et lignende studie fra Storbritannien lavet i 2005 (Little et al. 2007), men er væsentligt lavere end de 15% (95%-CI, 8,2 – 28%) fundet i belgiske prøver af måltidssalater i 2014 (Van Paeppegem et al. 2024). Ingen af de 51 belgiske prøver havde koncentrationer på ≥ 10 cfu/g af *L. monocytogenes*. I det britiske studie havde fire prøver, svarende til 0,15% (95%-CI, 0,04 – 0,38%), koncentrationer på ≥ 10 cfu/g af *L. monocytogenes*, hvoraf halvdelen var over 100 cfu/g. Som Tabel 1 viser, blev der fundet 10 cfu/g eller derover af *L. monocytogenes* i fem af prøverne i kontrolprojekt 5216, hvilket svarer til 0,83% (95%-CI, 0,27 – 1,9%), dvs. en højere andel af de danske salater indeholdt ≥ 10 cfu/g end de britiske salater. Det britiske studie peger på, at de højeste koncentrationer af *L. monocytogenes* blev fundet

i salater, der var tæt på deres udløbsdato (Little et al. 2007), hvilket antyder at der kan have været vækst i salaterne, inden prøverne blev udtaget og analyseret. I kontrolprojekt 5216 er prøverne ikke analyseret på produktionsdagen. Dette giver anledning til at undersøge om noget tilsvarende gælder for de danske salater. Her kan vi udnytte det faktum, at prøverne af spiseklare salater er indsamlet op til to dage efter produktion, samt at analyserne af prøverne er foretaget efter mellem 2 til 8 dage efter produktionsdagen. Tabel 1 giver et overblik over kombinationen af de to faktorer ved at vise, hvor mange prøver der er blevet analyseret efter 2 og op til 8 dage i forhold til prøvens alder på indsamlingsdagen. Hovedparten af prøverne, dvs. 450 (315+115+20) ud af 600, er analyseret 2 dage efter, de er indsamlet, hvilket er det hurtigste prøveudtagningslogistikken tillader. Da *L. monocytogenes* forventes at have en nølefase på 4-5 dage ved opbevaring ved maks. 5 °C under optimale pH og vandaktivitets betingelser (FSSP), vil risikoen for, at *L. monocytogenes* har vokset i prøven inden, den er blevet analyseret, øges, når en samlet prøvealder på 5 dage overskrides. Af de resterende 150 prøver er 40 analyseret, inden prøven har overskredet en alder på 5 dage, mens 110 prøver er mere end 5 dage gamle på analysetidspunktet. Hvis der er fundet flere prøver med *L. monocytogenes*, eller flere prøver havde en højere koncentration af *L. monocytogenes*, i disse 110 prøver sammenlignet med de øvrige prøver, kan det ikke udelukkes, at der har været vækst i prøverne, mens de har været opbevaret hos Fødevarestyrelsen. Er dette tilfældet, vil det give indtryk af en for høj koncentration i prøverne fra start af holdbarheden end der reelt har været.

Tabel 1. Antal prøver af spiseklare, køleopbevarede salater fordelt på prøvens alder, dels ved indsamling, og dels ved analysetidspunkt.

Prøvens alder ved indsamling (dage)	Prøvens alder på analysetidspunktet (dage)									
	2	3	4	5	6	7	8	2-5	6-8	2-8
0	315	5	5	15	40	5	0	340	45	385
1	0	115	15	0	0	50	10	130	60	190
2	0	0	20	0	5	0	0	20	5	25
0-2	315	120	40	15	45	55	10	490	110	600

Vækst i salaten inden prøven er indsamlet?

Som Tabel 1 viser, er der indsamlet 340 prøver af salater, der er udtaget på produktionsdagen og analyseret inden prøvens alder overskrider 5 dage. Tilsvarende er 130 og 20 prøver udtaget hhv. 1 og 2 dage efter produktion og analyseret uden at overskride en alder på 5 dage. Ved brug af CHI²-test er det undersøgt om, prøver, der er udtaget senere end produktionsdagen, havde højere forekomst eller koncentration end prøver, der er udtaget på selve produktionsdagen (Tabel 2). Det vil give et indtryk af om, der har været vækst af *L. monocytogenes* inden, prøven er indsamlet fx som følge af temperaturbelastning.

Tabel 2. Observerede forekomster (antal prøver med ≥1 cfu i 25 g) og koncentrationer af *Listeria monocytogenes* i spiseklare, køleopbevarede salater på produktionsdagen samt 1 og 2 dage efter produktion, når analysetidspunktet ikke overskrider en prøvealder på 5 dage.

Prøvens alder ved indsamling (dage)	Antal prøver	≥1 cfu i 25 g			≥10 cfu/g		
		Antal prøver med <1 cfu i 25 g	Antal prøver med ≥1 cfu i 25 g	P-værdi ved CHI ² -test* mod resten af prøverne	Antal prøver med <10 cfu/g	Antal prøver med ≥10 cfu/g	P-værdi ved CHI ² -test* mod resten af prøverne
0	340	317	23	0,15	336	4	0,32
1	130	125	5	0,38	130	0	0,58
2	20	20	0	0,62	20	0	1
0, 1, 2	490	462	28	-	486	4	-

*Ved mindre end 10 positive prøver er Fisher's exact test anvendt

Opdelingen af de 490 prøver efter alder, viser ingen sammenhæng mellem alder, forekomst og koncentration, da ingen CHI²-test er signifikante, dvs. alle P-værdier er større end 0,05. Resultaterne i Tabel

2 giver altså ikke anledning til at mistænke, at der har været vækst af *L. monocytogenes* i nogle salater inden prøverne er taget.

Vækst i salaten inden prøven er analyseret?

Opdelingen af de 600 prøver efter analysetidspunkt i Tabel 3, viser ikke en entydig sammenhæng mellem alder ved analysen, forekomst og koncentration. For eksempel tenderer prøverne, der er analyseret på 7. dagen efter produktion, til at have lavere forekomst end prøver analyseret såvel på 6. dagen som på 8. dagen efter produktion ($P=0,10$). Og, prøverne analyseret på 6. dagen har den højeste påvisning i 25 g af alle analysetidspunkter, også højere end dem analyseret på 8. dagen. Der ud over kan der ikke påvises statistisk signifikant højere forekomster eller koncentrationer af *L. monocytogenes*, når analysetidspunkterne 6-8 dage sammenlignes med 2-5 dage (Tabel 3).

Tabel 3. Observerede forekomster (antal prøver med ≥ 1 cfu i 25 g) og koncentrationer af *Listeria monocytogenes* i spiseklare, køleopbevarede salater med forskellige analysetidspunkter.

Prøvens alder ved analyse (dage)	Antal prøver	≥ 1 cfu i 25 g				≥ 10 cfu/g			
		Antal prøver med < 1 cfu i 25 g	Antal prøver med ≥ 1 cfu i 25 g	P-værdi ved CHI ² -test* mod prøverne 2 – 5 dage	Relativ risiko (RR)	Antal prøver med < 10 cfu/g	Antal prøver med ≥ 10 cfu/g	P-værdi ved CHI ² -test* mod prøverne 2 – 5 dage	Relativ risiko (RR)
2 – 5	490	462	28	-	-	486	4	-	-
6	45	37	8	$< 0,01$	3,1	45	0	1	IM
7	55	55	0	0,10	IM	55	0	1	IM
8	10	9	1	0,45	1,8	9	1	0,09	12
6 – 8	110	101	9	0,38	1,5	109	1	1	1,1
2 – 8	600	563	37	-	-	595	5	-	-

*Ved mindre end 10 positive prøver er Fisher's exact test anvendt

** IM: Beregningen er ikke meningsfuld, når 0 prøver er positive i en af grupperne, der sammenlignes

Resultaterne i Tabel 3 giver altså ikke anledning til at mistænke, at der har været vækst af *L. monocytogenes* i nogle salater inden prøven er analyseret. De højeste koncentrationer på 20 og 40 cfu/g af *L. monocytogenes*, der blev observeret i kontrolprojekt 5216, blev da også fundet i en salat udtaget på produktionsdagen og analyseret på 2. dagen.

Resultaterne i Tabellerne 2 og 3 giver derfor ikke umiddelbar grund til at udelade prøver fra datasættet pga. alder på analysetidspunktet. Ud fra disse test kan det dog ikke udelukkes, at der er en sammenhæng mellem forekomst eller koncentration af *L. monocytogenes* og prøvens alder på analysetidspunktet for specifikke ingredienser i salaterne. Næste trin er derfor at se nærmere på om forekomst og koncentration af *L. monocytogenes* er afhængig af de specifikke ingredienser, som salaterne er sammensat af. Især er det interessant at vide om, visse ingredienser giver anledning til højere forekomster eller højere koncentrationer, da dette vil påvirke de mulige effektkriterier for væksten af *L. monocytogenes*, som ligger til grund for beregning af sikker holdbarhed.

Højere forekomster eller koncentrationer i specifikke ingredienser?

Tabel 4 viser forekomsten af *L. monocytogenes* i 25 grams prøver af salater, når de 600 prøver deles op i 170 bestående alene af friske grøntsager, frugt og nødder, 415 bestående salater med diverse fyld ud over friske grøntsager, frugt og nødder og 15 med ukendte ingredienser. Opdelingen af datasættet i salater med og uden diverse fyld, ud over friske grøntsager, frugt og nødder, viser en signifikant (Fisher's exact test, $P < 0,001$) lavere forekomst for salaterne uden fyld. For denne type af spiseklare salater blev der ikke fundet *L. monocytogenes* i 170 prøver, hvilket svarer til en forventet forekomst mellem 0 og 2,2%. For salaterne med

diverse fyld var den tilsvarende forventede forekomst væsentlig højere, dvs. mellem 6,4 og 12% med et gennemsnit på 8,9% (Tabel 2). Dette peger på, at der kan være brug for forskellige effektkriterier afhængig af salatens ingredienser.

Tabel 4. Observerede forekomster (% positive prøver) af *Listeria monocytogenes* i spiseklare, køleopbevarede salater med og uden diverse fyld ud over friske grøntsager, frugt og nødder.

Salat	Antal prøver	Antal prøver med <1 cfu i 25 g	Antal prøver med ≥1 cfu i 25 g	Forventet % positive prøver
				Gen. (95%-CI)
Udelukkende friske grøntsager, frugter og nødder	170	170	0	0 (0 – 2,2)
Med diverse fyld	415	378	37	8,9 (6,4 – 12)
Med ukendte ingredienser	15	15	0	0 (0 – 21)
Med animalsk fyld*	290	265	25	8,6 (5,7 – 12)
Uden animalsk fyld*, med varmebehandlet vegetabilsk fyld**	125	113	12	9,6 (5,1 – 16)

*Rødt kød, fjerkræ, fisk, ost og/eller æg

**Bælgfrugter, kornstivelses og/eller kartofler

En yderligere opdeling af salaterne med diverse fyld i 290 prøver af salater, der har en eller andet form for animalsk fyld, og 125 prøver af salater uden animalsk fyld, men med fyld af varmebehandlede vegetabilier, giver ikke mere information om, hvilken slags fyld, der evt. er mest risikofyldt (Tabel 2). Med udgangspunkt i beskrivelsen af de undersøgte salater er hver salat derfor blevet karakteriseret efter indholdet af bestemte ingredienser ud over friske grøntsager, frugt og nødder. Dette er gjort for at undersøge om, der bør tages hensyn til specifikke slags fyld i forhold til fastlæggelsen af effektkriterium for væksten af *L. monocytogenes* i spiseklare, køleopbevarede salater.

Følgende ingredienser, som ekstra fyld i salaterne, er inddraget;

- Rødt kød (repræsenteret af bacon, skinke, svinekæber)
- Fisk (repræsenteret af laks, tun, rejer)
- Fjerkræ (kylling)
- Kornstivelses (repræsenteret af pasta, spelt, perlebyg, couscous, hvedekerner, nudler, bulgur)
- Ost (repræsenteret af salatost, feta, parmesan)
- Bælgfrugter (repræsenteret af bønner, kikærter inkl. hummus og falafler, edamame bønner, flækærter, linser)
- Æg (kogte)
- Kartoffler (kogte)

Der ud over er diverse kåltyper inddraget som ingredienskategori i denne analyse. Kål er en ingrediens, der går på tværs af salater med og uden fyld, og derfor ikke kan klassificeres som ekstra fyld til salater bestående af friske grøntsager, frugt og nødder. Kål som ingrediens er repræsenteret ved grønkål, rødkål, hvidkål, spidskål, broccoli, blomkål, palmekål og glaskål.

Hver salat er således blevet tilskrevet et 'ja' eller 'nej' alt efter om, de indeholdt disse ingredienser. Salaterne kan altså godt indeholde flere af disse ingredienser samtidigt. Summen af antal prøver er derfor højere end det totale antal prøver på 600, som er udtaget i kontrolprojekt 5216.

Tabel 5 udpeger tre kategorier af salatingredienser, fjerkræ, kål og ost, hvor andelen af prøver enten med ≥1 cfu i 25 g eller med ≥10 cfu/g af *L. monocytogenes* er signifikant højere end resten (CHI²-test, P<0,05 og RR>1). Også salater med fisk har RR et stykke over 1, nemlig 1,63, men denne er ikke i nærheden af at være signifikant (P=0,51). For såvel fjerkræ som kål og ost er RR>1 for påvisning af *L. monocytogenes* i 25 g (Tabel

5). Disse resultater peger på, at salater med fjerkræ, kål eller ost har større risiko for at indeholde *L. monocytogenes* ved start på køleopbevaringen end salater med andre ingredienser. Og, for fjerkræ og kål, som tilmed har $RR > 1$ for fund af ≥ 10 cfu/g af *L. monocytogenes* (Tabel 5), tyder det desuden på, at man også skal forvente en højere koncentration af *L. monocytogenes* ved start på køleopbevaringen, når disse er en del af fyldet i salaterne. Begge dele spiller ind, når mulige effektkriterier for væksten af *L. monocytogenes* i spiseklare køleopbevarede salater skal belyses.

Tabel 5. Observerede forekomster (antal prøver med ≥ 1 cfu i 25 g) og koncentrationer af *Listeria monocytogenes* i spiseklare, køleopbevarede salater med forskellig slags fyld.

Ingrediens	Antal prøver	≥ 1 cfu i 25 g				≥ 10 cfu/g			
		Antal prøver med <1 cfu i 25 g	Antal prøver med ≥ 1 cfu i 25 g	P-værdi ved CHI ² -test* mod resten der ikke indeholder ingrediensen	Relativ risiko (RR)	Antal prøver med <10 cfu/g	Antal prøver med ≥ 10 cfu/g	P-værdi ved CHI ² -test* mod resten der ikke indeholder ingrediensen	Relativ risiko (RR)
Alle salater	600	563	37	-	-	595	5	-	-
Kun grønt, frugt, nødder	170	170	0	<0,001	IM**	170	0	0,33	IM
+Rødt kød	60	60	0	0,041	IM	60	0	1	IM
+Fisk	80	79	1	0,047	0,18	79	1	0,51	1,63
+Fjerkræ	100	87	13	<0,001	2,71	96	4	0,003	20
+Kornstivelser	155	144	11	0,43	1,21	155	0	0,33	IM
+Ost	70	59	11	<0,001	3,20	70	0	1	IM
+Bælgfrugter	135	127	8	1	0,95	134	1	1	0,86
+Æg	15	15	0	0,62	IM	15	0	1	IM
+Kartofler	10	10	0	1	IM	10	0	1	IM
Ukendte	15	15	0	0,62	IM	15	0	1	IM
Kål	245	223	22	0,017	2,13	219	4	0,066	6,76

*Ved mindre end 10 positive prøver er Fisher's exact test anvendt

**IM: Beregningen er ikke meningsfuld, når 0 prøver er positive i en af grupperne, der sammenlignes

Resultaterne i Tabel 5 giver derfor grund til at overveje om, effektkriterierne skal være lavere for salater med fjerkræ, kål eller ost som en af ingredienserne. Tabel 5 ser dog kun på én specifik ingrediens ad gangen, og siger ikke noget om, hvorvidt kombinationer af bestemte ingredienser evt. kræver øget opmærksomhed. Næste trin er derfor at se om, der er tendenser i sammensætningen af ingredienser i de 37 prøver af salater, hvor *L. monocytogenes* er blevet påvist.

Højere forekomster eller koncentrationer i specifikke kombinationer af ingredienser?

Tabel 6 viser sammensætningen af ingredienser i 25 grams prøver af spiseklare salater, hvor *L. monocytogenes* blev påvist i kontrolprojektet.

Først er det værd at bemærke, at *L. monocytogenes* ikke blev påvist i salater, hvor kål var anvendt sammen med andre friske grøntsager uden ekstra fyld (Tabel 6). Derimod viser Tabel 6, at hovedingredienserne i 12 ud af de 37 prøver, svarende til 32%, var kål i kombination med kylling, hvor grønkål toppede med 10 ud af disse 12 prøver. Kål i kombination med ost eller kornstivelser gav anledning til påvisning af *L. monocytogenes* i 10 af disse prøver, svarende til 27%. Det bør derfor undersøges om, der kan forventes en øget forekomst af *L. monocytogenes*, når kål kombineres med kylling, ost eller kornstivelser.

Tabel 6. Hovedingredienser i de 37 prøver af spiseklare, køleopbevarede salater, hvor *Listeria monocytogenes* er blevet påvist i 25 g.

Antal prøver ud af 37	Kål	Fjerkræ	Ost	Kornstivelseser	Bælgfrugter	Fisk
10 (27%)	X (grønkål)	X (kylling)				
5 (13%)	X (spidskål)		X (salatost)			
4 (11%)	X (palmekål)			X (perlespelt)		
4 (11%)					X (bønner)	
3 (8%)			X (feta)	X (kerneblanding)	X (bønner)	
3 (8%)			X (salatost)			
3 (8%)				X (hvedekerner)		
2 (5%)	X (kål)	X (kylling)				
1 (3%)		X (kylling)				
1 (3%)	X (glaskål)			X (perlespelt)		
1 (3%)					X (kikærter)	X (tun)
	22 (59%)	13 (35%)	11 (30%)	11 (30%)	8 (22%)	1 (3%)

I Tabel 7 er datasættet opdelt efter forskellige parvise kombinationer af kål med andre ingredienser. For eksempel sammenlignes salater, hvor kål og kylling indgår, med salater, hvor kål indgår sammen med alle andre ingredienser end kylling. Der sammenlignes også med salater, hvor kylling indgår sammen med alle andre ingredienser end kål. Dette giver en mulighed for at vurdere om nogle kombinationer med kål havde en øget forekomst af *L. monocytogenes* i forhold til alle salater med kål. Den evt. øgede forekomst er testet ved at beregne 95%-konfidensintervaller, for de tre opdelinger beskrevet ovenfor, og se på om disse overlapper. Er der et overlap, kan man ikke med statistisk sikkerhed sige, at der er en øget forekomst af *L. monocytogenes* i salaterne, hvor kombinationen af de to ingredienser indgår.

Tabel 7. Observerede forekomster (% positive prøver) af *Listeria monocytogenes* i spiseklare, køleopbevarede salater med og uden diverse fyld ud over friske grøntsager, frugt og nødder.

Ingredienser	Antal prøver	Antal prøver med <1 cfu i 25 g	Antal prøver med ≥1 cfu i 25 g	Forventet % positive prøver
				Gen. (95%-CI)
Kål & kylling	45	33	12	27 (15 – 42)
Kål uden kylling	200	190	10	5,0 (2,4 – 9,0)
Kylling uden kål	55	54	1	1,8 (0,1 – 9,7)
Grønkål & kylling	15	5	10	67 (38 – 88)
Grønkål uden kylling	25	25	0	0 (0 – 14)
Kylling uden grøn kål	85	82	3	3,5 (0,7 – 10)
Kål & ost	15	10	5	33 (12 – 62)
Kål uden ost	230	213	17	7,7 (4,4 – 11)
Ost uden kål	55	49	6	11 (4,1 – 22)
Kål & kornstivelseser	40	35	5	12 (4,2 – 27)
Kål uden kornstivelseser	205	188	17	8,3 (4,9 – 13)
Kornstivelseser uden kål	115	109	6	5,2 (1,9 – 11)

Tabel 7 viser, at salaterne, hvor kål var kombineret med kylling, havde en signifikant øget forekomst af *L. monocytogenes* i 25 g med gennemsnitlig 27% (95%-CI, 15 – 42%) sammenlignet med gennemsnitlig 5% (95%-CI, 2,4 – 9,0%) for salaterne indeholdende kål men ikke kylling. Det kan dog ikke konkluderes alene ud fra

denne sammenligning, at den øgede forekomst skyldes kombinationen af kål og kylling, idet man ikke kan udelukke, at kontaminationen stammer fra kylling. Derfor sammenlignes også med forekomsten i salaterne indeholdende kylling, men ikke kål. Da Tabel 7 viser, at disse salater havde en signifikant lavere forekomst af *L. monocytogenes* på gennemsnitlig 1,8% (95%-CI, 0,1 – 9,7%) end salaterne med kylling og kål, peger resultaterne på, at der skal forventes en hyppigere påvisning i 25 g, når spiseklare salater indeholder både kylling og kål. Det er værd at bemærke, at det hovedsageligt var, når kyllingen var kombineret med grønkål, at *L. monocytogenes* blev påvist i salaten, altså sandsynligvis ikke kål generelt (Tabel 7). Tabel 7 understreger, at der var tale om en særlig høj forekomst på gennemsnitlig 67% (95%-CI, 38 – 88%) af *L. monocytogenes* i salater med grønkål og kylling. De 15 prøver af salat, som indeholdt både grønkål og kylling, var alle udtaget på produktionsdagen, så den højere forekomst kan ikke forklares med prøvernes alder ved indsamling, ej heller med prøvernes alder ved analysetidspunktet, da prøverne blev analyseret på 2. dagen. Det kan dog ikke udelukkes, at der kan have været vækst af *L. monocytogenes* i en eller flere af ingredienserne før salaterne blev blandet, hvilket kunne føre til hyppigere påvisning i 25 g. Denne hypotese er ikke mulig at efterprøve med det nærværende datasæt, men fire ud af de 10 prøver af grønkålssalat med kylling, hvor *L. monocytogenes* blev påvist, havde koncentrationer ≥ 10 cfu/g, hvilket ellers kun blev fundet i én anden prøve (Tabel 5). De 15 prøver af grønkålssalat med kylling, der er tale om, udgjorde fem prøver af tre forskellige salater. De tre salater stammede alle fra samme detailkæde, men fra hvert sit salgssted, dvs. butikker i Aalborg, Ribe og Odense. Det vides ikke om, denne detailkæde har et fælles produktionssted, hvor salaterne evt. kunne være blevet kontamineret med *L. monocytogenes* inden de blev distribueret til de forskellige salgssteder. Men det er iøjnefaldende, at de to grønkålssalater med kylling, hvor *L. monocytogenes* blev påvist i alle 10 prøver, blev produceret den samme dag og solgt i butikker fra den samme detailkæde.

Salaterne i Tabel 7, hvor kål var kombineret med ost, havde også en signifikant højere forekomst af *L. monocytogenes* i 25 g med gennemsnitlig 33% (95%-CI, 12 – 62%) sammenlignet med gennemsnitlig 7,7% (95%-CI, 4,4 – 11%) for salaterne indeholdende kål men ikke ost. Sammenligningen med forekomsten på gennemsnitlig 11% (95%-CI, 4,1 – 22%) i salaterne indeholdende ost, men ikke kål, viser dog et overlap mellem 95%-konfidensintervallerne, dvs. der ikke er datagrundlag til at konkludere, at påvisningen af *L. monocytogenes* i 25 g er højere i salater med kål og ost end i andre salater med ost (Tabel 5).

For salaterne, hvor kål var kombineret med kornstivelseser, var den gennemsnitlige forekomst af *L. monocytogenes* i 25 g på 12% (95%-CI, 4,5 – 27%). Selvom denne forekomst var højere end de gennemsnitlige 8,3% (95%-CI, 4,9 – 13%) for salaterne med kål uden kornstivelse og også højere end de gennemsnitlige 5,2% (95%-CI, 1,9 – 11%) for salaterne med kornstivelseser uden kål, var der overlap mellem 95%-konfidensintervallerne, og derfor ikke belæg for at konkludere, at kombinationen kål og kornstivelseser giver anledning til en øget påvisning af *L. monocytogenes* i 25 g (Tabel 5).

Denne statistiske analyse af specifikke kombinationer af ingredienser peger på, at der kan være risiko for en øget forekomst af *L. monocytogenes* i salater, som indeholder både kål og kylling, i særdeleshed når der anvendes grønkål sammen med kylling. Det kan dog ikke udelukkes, at der er tale om et sammenfald med, at disse salater er produceret samme sted, så årsagen ligger i håndteringen og ikke er et resultat af kombinationen af ingredienser. Og, da ingen af de andre kombinationer af specifikke ingredienser kunne påvises statistisk at give anledning til øget forekomst af *L. monocytogenes* i salaterne, vurderes det, at der ikke er nok evidens til, at dette inddrages i det videre arbejde. Der bør dog være øget opmærksomhed på leverandørstyring, temperaturstyring og hygiejne ved anvendelsen af kål og kylling som ingredienser i den samme salat, indtil vi ved mere om problemstillingen.

Baseret på Tabel 5 er datasættet blevet opdelt i nedenstående grupper af salater bestående af forskellige typer af fyld med henblik på at estimere individuelle log-normalfordelinger på baggrund af de fundne koncentrationer af *L. monocytogenes* i salaterne;

- Alle typer af kendt fyld (n=415, 6,4 – 12% påvist i 25 g)
- Fyld af kylling ELLER ost (n=165, 9,6 – 21% påvist i 25 g)
- Alt andet fyld end kylling eller ost (n=250, 2,8 – 8,7% påvist i 25 g)
- Fyld af varmebehandlede grøntsager (inkl. kartofler) ELLER cerealier, men UDEN kylling, ost, rødt kød, fisk eller æg (n=125, 5,1 – 16% påvist i 25 g)
- Fyld af rødt kød, fisk ELLER æg, men UDEN kylling, ost, varmebehandlede grøntsager eller cerealier (n=55, 0 – 6,5% påvist i 25 g)

Mulige effektkriterier for acceptabel vækst

Alle estimerede log-normalfordelinger er fremkommet ved parallelforskydning af fordelingen for friske grøntsager publiceret af Crépet et al. (2007) og kan ses i Figur 1. Simuleringer for ovenstående liste af salater fremgår af Tabel 8. Simuleringen for friske grøntsager baseret på fordelingen fra artiklen af Crépet et al. (2007) er medtaget som sammenligningsgrundlag. Det samme er effektkriteriet, som blev besluttet under udarbejdelsen af "Sikre fødevarer", for acceptabel vækst af *L. monocytogenes* i snittede friske grøntsager. For denne produktgruppe blev effektkriteriet besluttet ud fra et risikomål om, at maks. 9 ud af 100.000 prøver må overskride effektmålet på 100 cfu/g af *L. monocytogenes*.

Tabel 8. Koncentrationerne af *Listeria monocytogenes* i køleopbevarede spiseklare salater med forskellig slags fyld, der danner baggrund for de tilknyttede simuleringer af antal salater ud af 100.000, der vil kunne overskride 100 cfu/g af *L. monocytogenes*, når vækst under køleopbevaringen tillades.

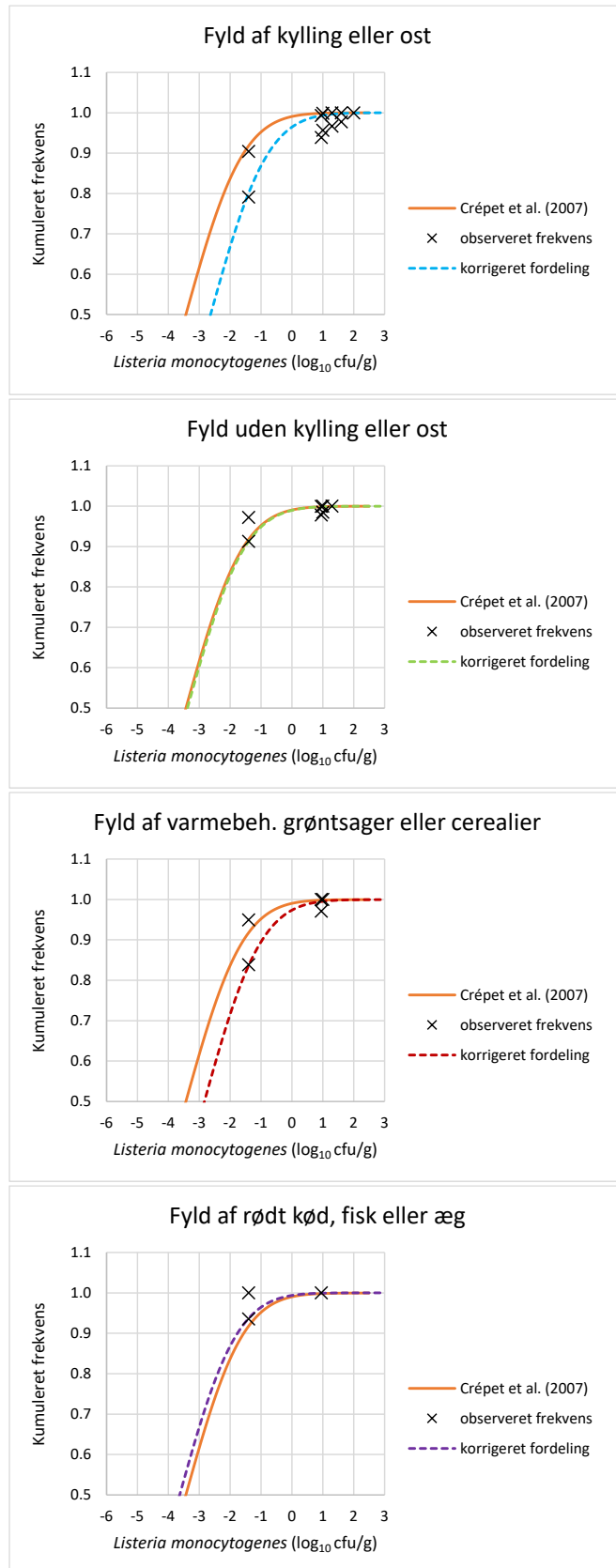
Gruppe af spiseklare salater	Datasæt	Antal prøver					Log ₁₀ -stigning der fører til maks. 9 prøver ud af 100.000 over 100 cfu/g	Antal prøver over 100 cfu/g i 100.000 ved accept af følgende log ₁₀ -stigninger		
		I alt	Med <1 cfu i 25 g	Med 1 cfu i 25 g til <10 cfu/g	Med 10 cfu/g	Med >10 cfu/g		0 log	0,3 log	0,5 log
Friske grøntsager ^a	Crépet et al. (2007)	25.078	24.324	- ^b	-	1,09% ^c	<0	11	25	42
Snittede friske grøntsager (inkl. kål)	Sikre fødevarer ^d	396	395	1	0	0	1,1	0,3	0,8	1,6
Diverse fyld	Kontrolprojekt 5216	415	378	32	3	2	<0	25	53	85
Fyld af kylling eller ost	Kontrolprojekt 5216	165	141	20	2	2	<0	85	169	260
Diverse fyld UDEN kylling eller ost	Kontrolprojekt 5216	250	237	12	1	0	<0	13	28	47
Fyld af varmebehandlede grøntsager (inkl. kartofler) eller cerealier UDEN kylling, ost, rødt kød, fisk eller æg	Kontrolprojekt 5216	125	113	12	0	0	<0	53	108	169
Fyld af rødt kød, fisk eller æg UDEN kylling, ost, varmebehandlede grøntsager eller cerealier	Kontrolprojekt 5216	55	55	0	0	0	0,1	7	15	25

^a Trimmede, snittede, revne eller vaskede

^b Ikke oplyst i artiklen

^c Bestemt ud fra 104 ud af 9.517 prøver. 11 ud af 12.451 prøver, svarende til 0,09%, indeholdt >100 cfu/g af *L. monocytogenes*

^d 226 straksprøver, 0-2 dage, 2015-2019 og 170 salater kun af grønt (inkl. kål), frugt og nødder fra kontrolprojekt 5216



Figur 1. Grafiske illustrationer af de anvendte estimerede kumulative koncentrationsfordelinger for *Listeria monocytogenes* i spiseklare salater ved start på køleopbevaringen. Punkterne for observeret frekvens repræsenterer 95%-konfidensintervaller beregnet ud fra data i Tabel 8.

Når log-normalfordelingen af kontaminering med *L. monocytogenes* betragtes som ens for alle salater med ekstra fyld, viste simuleringerne, at 25 prøver ud af 100.000 forventes at overskride det kritiske niveau på 100 CFU/g af *L. monocytogenes* allerede ved starten af køleopbevaringen (0 log), altså langt flere end de 9, 12 og 5 der tidligere er accepteret som risikomål for hhv. friske grøntsager, og spiseklare ikke-varmebehandlede produkter af kød og fisk (Fødevarestyrelsen 2022). Opdelingen af salaterne efter forskellige typer af fyld viser, at risikoen for overskridelse af 100 cfu/g forventes at være størst for salater med fyld af kylling eller ost, hvor 85 prøver ud af 100.000 allerede ved starten af en evt. køleopbevaring simuleres at overskride effektmålet (Tabel 8). Dette tal falder til 13 ud af 100.000 prøver, for alle salater med fyld, der ikke består af kylling eller ost. En yderligere opdeling af salaterne uden kylling eller ost i to grupper, dvs. en gruppe med fyld af varmebehandlede grøntsager (inkl. kartofler) eller cerealier og en anden gruppe med rødt kød, fisk eller æg, peger dog på, at salater med fyld af varmebehandlede grøntsager, kartofler eller cerealier har større risiko for at indeholde >100 cfu/g af *L. monocytogenes* ved start på køleopbevaringen end salater med fyld af rødt kød, fisk eller æg (Tabel 8).

I princippet betyder disse simuleringer, at man ikke kan tillade vækst af *L. monocytogenes* i spiseklare salater med diverse fyld, hvis det gældende risikomål skal kunne overholdes. For at skabe lidt fleksibilitet i muligheden for at tillade begrænset vækst kan man vælge en anden tilgang. For eksempel kan man konkret se på, hvornår man med sikkerhed kan registrere, at der er vækst af *L. monocytogenes*. Det anvender man også i Listeriavejledningen, hvor det er beskrevet i afsnit 5.3, at en tilvækst på maks. 0,5 log₁₀-enhed er foreneligt med et stabiliseret produkt. En anden tilgang kan være at sætte holdbarheden lig med nølefasens længde, hvilket jo ville betyde, at der ikke er mulighed for en yderligere stigning i antallet af *L. monocytogenes* inden for holdbarheden. Når man vil angive et effektkriterium som en log₁₀-stigning, kan et alternativ til nølefasens længde være at bruge 0,3 log₁₀-stigning, da det svarer til en fordobling, som jo er den mindste enhed, der kan indikere, at en bakterie er kommet ud af nølefasen. På dette grundlag er Tabel 8 suppleret med det simulerede antal af prøver af de forskellige blandede salater, der forventes at overskride 100 cfu/g af *L. monocytogenes* ud af 100.000, for hhv. 0,3 og 0,5 log₁₀-stigning.

Kilder

Fødevarestyrelsen (2022). NOTAT. Effektkriterier for *Listeria monocytogenes* i spiseklare fødevarer under køleopbevaring. Ministeriet for fødevarer, landbrug og fiskeri, J.nr. 2021-28-19-00815.

Hansen, T.B., Birk, T. & Hansen, L.T. (2019). NOTAT. Udpegning af holdbarhedsbegrænsende mikrobiologiske risikofaktorer i køleopbevarede spiseklare og ready-to-cook fødevarer. DTU Fødevareinstituttet, oktober 2019.

Hansen, T.B. & Hansen, L.T. (2021). NOTAT. Forekomster og koncentrationer af *Listeria monocytogenes* i straksprøver af spiseklare produkter. DTU Fødevareinstituttet, marts 2021.

Little, C.L., Taylor, F.C., Sagoo, S.K., Gillespie, I.A., Grant, K. & McLauchlin, J. (2007). Prevalence and level of *Listeria monocytogenes* and other *Listeria* species in retail pre-packaged mixed vegetable salads in the UK. Food Microbiology 24, 711-717.

Van Paeppeghe, C., Taghlaoui, F., De Loy-Hendrockx, A., Vermeulen, A., Devlieghere, F., Jacxsens, L. & Uyttendaele, M. (2024). Prevalence and growth potential of *Listeria monocytogenes* in innovative pre-packed, plant-based ready-to-eat food products on the Belgian market. International Journal of Food Microbiology 410, 110506.