

30. september 2010
Proj. nr.: 1378570-02
SUM/LHAN

Værktøjsområde

Mikrobiologisk overvågning og beredskab

Årsrapport 2010



Susanne Mansdal
Hovedansvarlig for værktøjsområdet



Flemming Hansen
Medansvarlig for værktøjsområdet

Sammendrag

Ud over de konkrete udviklingsprojekter inden for slagtehygiejne og produktsikkerhed hos DMRI er der behov for at deltage i generelle aktiviteter, såvel nationalt som internationalt, for at sikre et højt fagligt vidensniveau, så nyligt opståede problemstillinger hos vore kunder hurtigt kan løses. Salmonella udgør en meget vigtig del af kødbranchens analyseberedskab, og en yderligere reduktion af svartiden, reduktion af materialeforbrug og håndtering vil derfor være meget interessant. Salmonella 12-metoden er fortsat den billigste metode på markedet. NordVals godkendelse af den forenklede metode med kogelysering i stedet for KingFisher oprensning vil resultere i et enklere og endnu billigere alternativ. Fødevarebårne virus har stor betydning, og standard analysemetoder er på vej. MRSA har fortsat stor fokus, og analysemetoder til fersk kød er afprøvet.

Indledning

Formål

Vedligeholdelse af et højt fagligt vidensniveau inden for nye mikrobiologiske metoder, herunder mikrobiologiske hurtigmetoder til kontrol af slagtehygiejne og produktsikkerhed for fersk kød og kødprodukter. Udviklingen inden for nye udfordringer som fødevarebårne virus, methicillin resistente *Staphylococcus aureus* og *Clostridium difficile* følges. Sikre at virksomhederne er bedst muligt rustet til at opfylde krav til hurtigt analysesvar og krav fra myndigheder og kunder, samt sikre beredskab til hurtig smittesporing af patogene bakterier.

Baggrund

Ud over de konkrete udviklingsprojekter inden for slagtehygiejne og produktsikkerhed hos DMRI er der behov for at deltage i generelle aktiviteter inden for området. De senere år har vist, at der hurtigt kan opstå problemer i relation til håndtering af fødevaresikkerheden og slagtehygiejnen, som det er hensigtsmæssigt at kunne løse inden for en kort tidshorizont. Der er generelt et ønske om at nedbringe svartiden for mikrobiologiske analyser, ligesom myndighedernes og kundernes krav om sikre produkter skærpes. En hurtig smittesporing ved fund af patogene mikroorganismer er vigtig og kan foretages med laboratoriets beredskab af moderne DNA-typningsmetoder.

Overordnet oversigt over opgaver i 2009/2010

Oversigt over opgaver i 2009/2010

- Nye mikrobiologiske hurtigmetoder overvåges, og relevante metoder afprøves og vurderes.
- Der deltages i faglige netværk og arrangementer under Dansk Standard, ISO, NMKL, EUROLAB og DANAK.
- Beredskab af moderne DNA-metoder vedligeholdes for hurtig smittesporing.
- Beredskab af akkrediterede mikrobiologiske metoder vedligeholdes.
- Nye mikrobiologiske udfordringer som Norovirus, MRSA og *C. difficile* følges.

Nye mikrobiologiske metoder

- Overvågning af nye mikrobiologiske metoder* En oversigt over vurderede og afprøvede mikrobiologiske metoder findes i bilag 1.
- Forenkling af Salmonella 12-metoden* Salmonella 12-metoden, oprindeligt udviklet af Fødevareinstituttet i samarbejde med DMRI og slagteribranchen, er NordVal godkendt til juni 2011. En forenklet protokol, hvor der anvendes en simpel kogelysning i stedet for DNA-oprensning er afprøvet og ringtestet. Den forenklete protokol er indsendt til NordVal godkendelse som tilføjelse til den nuværende metode (certifikat nr. 31). Metoden forventes NordVal godkendt i oktober 2010. Ved at anvende kogelysning i stedet for DNA-oprensning med KingFisher spares både indkøb af udstyr, reagenser og forbrugsartikler. Der arbejdes på at få Salmonella 12-metoden nævnt direkte i Eksportbekendtgørelsen, så metoden også kan anvendes i forbindelse med eksport af fødevarer til tredje-lande fx USA.
- NordVal godkendelse af Salmonella Dublin metode* DMRI har i et andet projekt udviklet en hurtigmetode til *Salmonella* Dublin baseret på real-time PCR. Metoden er blevet NordVal godkendt og er beregnet til at identificere positive Salmonella isolater fra agar. Metoden blev præsenteret med poster på Food Micro konferencen i København i september 2010.
- DGGE-metode til karakterisering af bakterieflora* Viden om et produkts mikroflora og specifikke fordærvere kan være en hjælp til at løse problemer med holdbarheden fx bombage under opbevaring. Det vil være et stort arbejde at kortlægge de tilstedeværende mikroorganismer i et givent produkt med traditionel dyrkning på mange slags agar og efterfølgende identifikation. Bakterier, som er stressede eller direkte beskadigede under forarbejdningsprocessen af kødet, kan være umulige at dyrke, og bakterier, som er til stede i lille antal, bliver ofte inhiberet af den øvrige dominerende flora. Af disse grunde er det afgørende at have metoder, som tillader identifikation af bakteriepopulationen uden dyrkning. Anvendelse af PCR efterfulgt af denaturerende gradient gel elektroforese DGGE giver nye muligheder for at studere den mikrobielle sammensætning uden behov for dyrkning. Metoden anvendes på DMRI til at karakterisere sammensætningen af den gram positive bakterieflora i kødprodukter, fx mælkesyrebakterier i slicet vakuumpakket kogt eller højtryksbehandlet skinke.
- Agar radial diffusions assay til undersøgelse af antimikrobiel aktivitet* Agar radial diffusions assay anvendes på DMRI til at undersøge antimikrobiel aktivitet af mange forskellige ingredienser til kødprodukter fx krydderi-, bær- og citruskerneekstrakter. Metoden er i andre projekter indkørt på proteinhydrolysat, tang og spisesvampe.
- Virusberedskab* Fødevarebårne virus, specielt Norovirus, har stor international bevågenhed og angives at være årsag til omkring 10% af de registrerede fødevarebårne udbrud. Det vurderes i USA og Europa, at virus er årsag til over 50% af de humane tilfælde af mave-tarminfektioner. I EU-netværket Vital er der udarbejdet metodebeskrivelser til udtagning af prøver og analyse af Norovirus

og HEV. Metode til påvisning af Norovirus er indkørt på DMRI i et andet projekt.

Akkrediterede metoder

DMRI's akkrediterede metoder vedligeholdes løbende, og det vurderes, om nye metoder skal akkrediteres. Der er ikke akkrediteret nye metoder i 2009/2010. Akkrediteringen af de nuværende metoder er vurderet at være tilstrækkelig. DMRI's kvalitetsstyringssystem er baseret på GLP, der også følges for de ikke akkrediterede analysemetoder.

DANAK's krav til usikkerhedsbudgetter er blevet ændret. DMRI har implementeret "top-down" metoden i ISO19036 til beregning af måleusikkerhed, som DANAK's nye retningslinje også er baseret på.

Udvalgsarbejde og konferencer

Dansk Standard, ISO, NMKL, EUROLAB og DANAK

For at få indflydelse på kommende standardmetoder og overvåge nye officielle metoder deltager DMRI i arbejdsgrupper og udvalg under Dansk Standard, ISO, NMKL, EUROLAB og DANAK. Endvidere følges den internationale udvikling inden for nye mikrobiologiske metoder ved deltagelse i relevante internationale konferencer.

Rapid Methods NordVal symposium

Der er deltaget i NordVals 10-års jubilæums symposium om nye mikrobiologiske hurtigmetoder. DMRI holdt ved samme lejlighed indlæg om udvikling af Salmonella real-time PCR metoder til den danske kødbranche (Mansdal 2010).

Food Micro konference september 2010

Der er deltaget i Food Micro i København med to poster. En om real-time PCR metode til verifikation af *S. Dublin* udviklet af DMRI, og en anden om afprøvning af Premi[®]-test til typning af *Salmonella* fra renkulturer (Mansdal 2010).

NMKL årsmøde

Der er deltaget i NMKL årsmøde i Ebeltoft, hvor status for metoder til udarbejdelse eller revision blev gennemgået (Hansen 2010).

Formidling af resultater

Rapporter over afprøvnin-ger, rejser o.lign.

Resultaterne af DMRI's afprøvnin-ger af nye metoder rapporteres løbende. Liste over rapporter i 2009/2010 ses i bilag 2.

Oversigt over vurderede og afprøvede metoder 2009/2010

Applikation	Analysemetode	Resultat
Serotypning af Salmonella med PCR og microarray	Premi [®] -test Salmonella, Check-Point (DSM)	Kit til at verificere og serotype Salmonella. Resultatet af afprøvning hos DMRI viste, at metoden fungerer godt på Salmonella renkulturer som kolonier, men ikke på prøver taget fra MSRIV-plader. Fra MSRIV-plader fandtes mange falsk positive resultater fra kontrolprøver, som ikke indeholdt Salmonella. Resultatet af afprøvningen er præsenteret som poster på Food Micro konferencen i København 2010 (Hansen <i>et al.</i> 2010).
Påvisning af Salmonella med real-time PCR	foodproof [®] Salmonella, Biotecon Diagnostics	Kit til påvisning af Salmonella i fødevarer inkl. fersk kød, bestående af mastermix, enzymopløsning, intern kontrol og Salmonella kontrol template. Beregnet til 96 reaktioner i real-time PCR fx Roche LightCycler [®] 481 II, Stratagene Mx3005P [®] eller andre real-time PCR instrumenter. Er godkendt af NordVal efter opformering i 18 timer. Ifølge producenten arbejdes der på at dokumentere en kortere opformeringstid. Metoden er ikke afprøvet af DMRI, men det kan blive aktuelt, hvis opformeringstiden bliver kortere, og prisen bliver konkurrencedygtig med Salmonella 12-metoden.
Påvisning af Salmonella med real-time PCR	MMB Salmonella, Biotech	Kit til påvisning af Salmonella i fødevarer efter 18 timers opformering. Kittet er fremstillet på licens fra Biotecon Diagnostics (se ovenfor). Forhandles i Danmark af Nordic Biolab. Metoden er endnu ikke godkendt eller valideret. Metoden er ikke afprøvet af DMRI, men det kan blive aktuelt, hvis opformeringstiden bliver kortere, og prisen bliver konkurrencedygtig med Salmonella 12-metoden.
Påvisning af <i>Staphylococcus aureus</i> med kromogen selektiv agar	BBL [™] CHROMagar [™] Staph aureus, Becton Dickinson	Kromogen agar til påvisning af <i>Staphylococcus aureus</i> i fødevarer. Agarpladerne inkuberes ved 35-37°C i 20-28 timer. Der kræves verifikation af typiske kolonier. Metoden er testet af AOAC RI. DMRI har afprøvet substratet, der kun findes som færdigfremstillede agarplader.
Påvisning af koagulasen positive stafylokokker med kromogen selektiv agar	Brilliance Staph 24, Oxoid	Kromogen agar til påvisning af koagulase positive stafylokokker (<i>Staphylococcus aureus</i> og andre non-aureus stafylokokker fx <i>Staphylococcus intermedius</i>) i fødevarer. Agarpladerne inkuberes ved 36-38°C i 22-26 timer. Der kræves verifikation af typiske kolonier. Metoden er valideret af Microval. DMRI har afprøvet substratet, der kun findes som færdigfremstillede agarplader.

Påvisning af koagulase positive stafylokokker på Baird Parker agar tilsat kaninplasma fibrinogen	Baird Parker agar med RPF (Rabbit Plasma Fibrinogen) supplement, Oxoid	Baird Parker agar med RPF supplement til påvisning af koagulase positive stafylokokker fra fødevarer direkte på agarpladen. Kræver gram- og katalasetest som verifikation. Metoden følger NMKL nr. 66, 5. udgave 2009. DMRI har afprøvet metoden.
Påvisning af Norovirus med real-time RT-PCR	MMB Norovirus, Biotest	Kit til real-time RT (Reverse Transcriptase) PCR påvisning af Norovirus genogruppe I og II i fødevarer. Disse genogrupper er de dominerende ved udbrud. Metoden er ikke afprøvet af DMRI.
Påvisning af methicillin resistente Staphylococcus aureus (MRSA) med real-time PCR	SureFood [®] BAC Sure MRSA PLUS V, Congen	Kit til real-time PCR påvisning af MRSA. DMRI har afprøvet metoden på fersk kød podet med renkultur af MRSA. Der er anvendt to-trins opformering inden påvisning.
Påvisning af methicillin resistente Staphylococcus aureus (MRSA) med kromogen selektiv agar	Brilliance [™] MRSA agar, Oxoid	Færdigstøbte kromogene selektive agarplader til påvisning af MRSA. DMRI har afprøvet metoden på fersk kød podet med renkultur af MRSA. Der er anvendt to-trins opformering inden påvisning.

Rapporter over afprøvede metoder og konferencer

2010

Hansen, F., Jacobsen, T., Persson, S., Olsen, J. E. and Mansdal, S. (2010): Development of a PCR Method for Verification of *S. Dublin*. Food Micro 2010. København. Poster.

Hansen, F., Jacobsen, T. and Mansdal, S. (2010): Short Evaluation of the Premi® Test Salmonella Method. Food Micro 2010. København. Poster.

Mansdal, S. (2010): NordVal 10th Anniversary Symposium, Rapid Methods. København. Rejserapport.

Hansen, F. (2010): NMKL årsmøde. Ebeltoft. Rejserapport.

Mansdal, S. (2010): Food Micro conference. København. Rejserapport.

Mansdal, S. (2010): Værktøjsområde Mikrobiologisk overvågning og beredskab. Årsrapport 2010.

Hansen, F. og Mansdal, S. (2010): Forbedret metode påviser *Salmonella* hurtigere. Publisert i Forspring nr. 1, februar 2010.

2009

Hansen, F. (2009): Evaluation of the PremiTest Salmonella analysis. Rapport. Projekt 18304. SF: 54553.

Hansen, F. (2009): Fastlæggelse af optimal resusciteringstid ved kvantitativ bestemmelse af patogener i fermenteret spegepølse. Rapport. Projekt 18576. SF: 54530.

Hansen, F. (2009): Kerneområde Gramnegative patogener. Statusrapport. Projekt 18443.

Mansdal, S. (2009): Rapid Methods Europe 2009. Holland. Rejserapport. Projekt 18304.