

## Årsrapport 2011

26. marts 2012  
Proj.nr. 2000207  
SUM/JUSS

### Mikrobiologisk beredskab

### Beredskab af mikrobiologiske og kemiske metoder og laboratoriefaciliteter



Susanne Mansdal  
Hovedansvarlig for området

## Indledning

### Formål

Projektet skal sikre, at virksomhederne har adgang til den nyeste viden om mikrobiologiske analysemetoder for at fastholde og optimere effektiv laboratoriedrift. Udover de konkrete udviklingsprojekter indenfor slagtehygiejne og produktsikkerhed af kød og kødprodukter, er der behov for at deltage i generelle aktiviteter, såvel nationalt som internationalt, for at sikre højt fagligt vidensniveau. Derved kan nyligt opståede problemstillinger hos virksomhederne hurtigt løses.

### Baggrund

Der er generelt et ønske om at nedbringe svartiden for mikrobiologiske analyser, ligesom myndigheders og kunders krav om sikre produkter hele tiden skærpes. En hurtig smittesporing ved fund af patogene mikroorganismer er vigtig og kan foretages med DMRI's beredskab af moderne DNA-typningsmetoder. DMRI's laboratorier er akkrediterede og dermed garanteres for analyseresultaternes kvalitet og laboratoriernes uvildighed.

## Oversigt over aktiviteter i 2010/2011

### Oversigt over aktiviteter i 2010/2011

Nye mikrobiologiske udfordringer som Norovirus, Hepatitis E virus, MRSA, *Clostridium difficile*, Salmonella og VTEC er fulgt. Nye mikrobiologiske hurtigmetoder er overvåget og relevante metoder er afprøvet og vurderet. Der er afholdt møder med DTU Fødevareinstituttet, kødbranchen og producenter af real-time PCR-metoder om samarbejde i forbindelse med udvikling af nye og hurtigere analysemetoder. Der er deltaget i faglige netværk og konferencer under NMKL, EUROLAB og DANAK samt EU-netværkene Biotracer og ViTal. Beredskab af akkrediterede mikrobiologiske metoder og DNA-metoder til hurtig smittesporing er vedligeholdt. Derudover er følgende aktiviteter gennemført:

- Den nye Salmonella 12 real-time PCR-metode er NordVal godkendt med forenklet prøveforberedelse med kogelysning til DNA-ekstraktion i stedet for King Fisher DNA-oprensning. Metoden er indkøbt på kødbranchens laboratorier.
- Real-time PCR metode og selektiv agar til MRSA er afprøvet og sammenlignet på podede prøver af fersk kød.
- Metode til påvisning af *Staphylococcus aureus* er indkøbt.
- Afprøvning af nyt kromogent substrat til *Listeria monocytogenes* og ny ELISA Salmonella test er igangsat.
- Følsomhed af real-time PCR metode til bestemmelse af dyreart i kød og kødprodukter er undersøgt.

## Nye mikrobiologiske analysemetoder

### Nye mikrobiologiske analysemetoder

En oversigt over de enkelte analysemetoder, der er vurderet og afprøvet samt konklusioner findes i bilag 1.

### Forenklet Salmonella 12 metode

Salmonella 12 metoden, oprindeligt udviklet i samarbejde mellem DTU Fødevareinstituttet, den danske kødbranche og DMRI, er blevet NordVal godkendt med

en simpel kogelysering til DNA-ekstraktion i stedet for King Fisher DNA-oprensning (NordVal certifikat nr. 41). Godkendelsen er gældende fra 1. november 2010 til 1. november 2012. Metoden er beregnet til fersk kød og svaberprøver fra kvæg og svin. Metoden er den billigste og enkleste på markedet og anvendes til størstedelen af den danske kødbranches salmonellaanalyser. Det lykkedes desværre ikke, at få Salmonella 12 metoden nævnt i Eksportbekendtgørelsen, så den kan anvendes i forbindelse med eksport til fx USA. Her anvendes AFNOR eller AOAC godkendte metoder. Ved videreudvikling af Salmonella 12 metoden vil det være en fordel, hvis metodens opformeringstid bliver mere fleksibel således, at metoden kan anvendes både med den nuværende korte opformeringstid og med en opformeringstid over fx 16-18 timer.

*ULTRASAL - 2 timers Salmonella metode*

Som en naturlig videreførelse af det gode samarbejde mellem DTU Fødevareinstituttet, den danske kødbranche og DMRI med Salmonella 12 metoden, er der udarbejdet en ansøgning til GUDP om bevilling til udvikling af en 2-timers Salmonella test. Denne bevilling er givet og projektet startede den 1. januar 2012 og varer 2½ år og hedder "Effektiviseret kontrol af fersk kød med ultrahurtig salmonella-test" og forkortes til ULTRASAL.

*Norovirus og Hepatitis E virus*

DMRI er ved at indkøbe ViTAL real-time PCR metode til påvisning af Norovirus i fersk kød og kødprodukter.

*Psykrotrofe clostridier*

DMRI er ved at udvikle en real-time PCR metode til påvisning af luftproducerende, psykrotrofe clostridier. Disse clostridier kan forårsage pustning af vakuumpakket fersk oksekød.

*VTEC*

Udviklingen med det aktuelle VTEC-udbrud i Tyskland fra sporer med O104 er fulgt, herunder analysemetoder til analyse for de aktuelle serotyper. Serotype O104 påvises ikke med USDA og ISO metoderne. USDA vil indføre nul-tolerance i hakket kød overfor følgende VTEC serotyper: O26, O103, O45, O111, O121 og O145, som er de serotyper USDA metoden påviser, "the big six".

**Mikrobiologisk metodeberedskab**

*Akkrediterede metoder*

Laboratoriets akkrediterede metoder er vedligeholdt løbende og der er ikke akkrediteret nye metoder i 2010/2011. Akkrediteringen af de nuværende metoder er vurderet at være dækkende. Foruden de akkrediterede analysemetoder er også udført en lang række specialanalyser efter metoder, som ikke er akkrediterede. DMRI's kvalitetsstyringssystem er baseret på GLP, der også følges for de ikke akkrediterede analysemetoder. Følgende metoder er akkrediterede:

- Salmonella jf. NMKL
- *Listeria monocytogenes* jf. NMKL
- *Yersinia enterocolitica* jf. NMKL
- Aerobt kimalt 6,5 °C, 20°C eller 30°C jf. NMKL
- Mælkesyrebakterier jf. NMKL
- *Enterobacteriaceae* jf. NMKL
- *E. coli* jf. AOAC

<i>Støjsvage stomachere</i>	For at imødekomme ønsker om forbedring af arbejdsmiljøet på laboratoriet og at sikre effektiv laboratoriedrift er markedet for støjsvage stomachere undersøgt. Der blev udvalgt og afprøvet en særlig støjsvag type se bilag 1.
	<b>Udvalgsarbejde og konferencer</b>
<i>NMKL</i>	Der deltages løbende i møder i NMKL, hvor nye mikrobiologiske metoder og revision af de eksisterende metoder besluttet. Årsmødet i august 2011 blev holdt i Norge. DMRI deltager endvidere i udarbejdelse af nye metoder til <i>Clostridium difficile</i> og Shigella samt revision af metoderne til real-time PCR og dyrkning af <i>Yersinia enterocolitica</i> og dyrkning af Shigella. NMKL har besluttet at udarbejde en NMKL metode til Norovirus, og her overvejes at bruge ViTals metode.
<i>DANAK</i>	Der er deltaget i DANAK's akkrediteringsdag i juni 2011, hvor DANAK orienterede om generelle nye tiltag indenfor akkrediteringsområdet, om DANAK's nye bestyrelse og kundetilfredshedsundersøgelse. Især indenfor sporbarhed og usikkerhed på prøvning er der nye krav. Der var endvidere mulighed for at udveksle erfaring om intern audit og ledelsevaluering. Til stor ærgrelse udgik det annoncerede punkt om usikkerhed på mikrobiologisk prøvning, så intet nyt på den front.
<i>EUROLAB</i>	Der deltages i relevante møder i EUROLAB netværket. Der er deltaget i møde om håndtering af risikofyldte prøver i laboratoriet i november 2011. Her blev de arbejdsmiljømæssige og bioterrormæssige problemstillinger med håndtering af farlige bakterier diskuteret fx VTEC isoleret fra humane tilfælde og visse toxinproducerende <i>Clostridium perfringens</i> .
<i>ViTal EU-virusnetværk</i>	DMRI deltager i ViTal EU-virusnetværk, hvor der samarbejdes om standardisering af analysemetoder til påvisning af virus i fødevarer. Der blev afholdt møde i Ljubljana i september 2011. Disse metoder er i et andet projekt indkøbt på DMRI til påvisning af Norovirus i fersk kød og kødprodukter. Metoderne er indtil videre fortrolige, indtil de er publiceret. Det er også disse metoder, der forventes at danne grundlag for de kommende ISO-metoder til Norovirus og Hepatitis E virus.
<i>BioTracer EU-netværk</i>	BioTracer EU-netværket er afsluttet i 2011 og arbejdet er i gang med at blive publiceret. I netværket er der bl.a. arbejdet videre med Salmonella 12 metoden.
<i>Fødevarerautenticitet</i>	Der er deltaget i konference i København om fødevarerautenticitet afholdt af Landbrug og Fødevarer i samarbejdet med DTU Fødevarerinstitutionen i februar 2011. Konferencen omhandlede de mange problemstillinger, der er med at dokumentere oprindelsen af fødevarer, og undgå forfalskninger. Især drejede det sig om hvilke analysemetoder, der findes til at spore produktets oprindelse og hvilke muligheder producenter og myndigheder har for hhv. at dokumentere og kontrollere anprisninger.

## Oversigt over vurderede og afprøvede metoder 2010/2011

Applikation	Analysemetode	Kommentarer
Påvisning af methicillin resistente <i>Staphylococcus aureus</i> (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 30 prøver af hakket fersk svinekød podet med renkultur af MRSA. Der blev anvendt to-trins opformering inden påvisning. Metoden blev endvidere afprøvet til at verificere suspekterte kolonier fra Brilliance MRSA agar.
Påvisning af MRSA med selektiv kromogen agar	Brilliance™ MRSA agar, Brilliance™ MRSA 2 agar, Oxoid	Kromogen selektiv agar Brilliance MRSA til påvisning af Methicillin resistente <i>Staphylococcus aureus</i> . Færdigstøbte agarplader af substratet blev afprøvet på 30 prøver af hakket fersk svinekød podet med renkultur af MRSA. Der blev anvendt to-trins opformering inden udstrykning på agaren. Positive kolonier på substratet blev endvidere undersøgt med real-time PCR Sure MRSA plus V (Congen). Der er siden kommet Brilliance MRSA 2, hvor selektiviteten er forbedret så der er færre falske positive, samtidig med at inkuberings-tiden er reduceret fra 24 til 18 timer. Den første MRSA agar udgave udgår. MRSA 2 agar er ikke afprøvet af DMRI.
Påvisning af <i>Listeria monocytogenes</i> med selektiv kromogen agar	ChromID Lmono agar, bioMérieux	Kromogen selektiv agar til påvisning af <i>Listeria monocytogenes</i> . Færdigfremstillet agar blev afprøvet på 10 prøver af fersk svinekød podet i to koncentrationer med forskellige renkulturer af <i>Listeria</i> spp. Metoden blev sammenlignet med NMKL nr. 136 og ISO11290.
Kvantitativ påvisning af <i>Staphylococcus aureus</i>	Staph Express Petrifilm™, 3M	Kromogen selektiv agarfilm til kvantitativ påvisning af <i>Staphylococcus aureus</i> . Metoden er indkøbt på laboratoriet.
Påvisning af svine DNA i kød med real-time PCR	SureFood® Animal ID Pork, Congen	Real-time PCR metode til påvisning af svine DNA i kød. Følsomheden af metoden er undersøgt. Metoden er ikke afprøvet af DMRI.
Påvisning af Norovirus med Reverse Transcriptase real-time PCR	SureClin® Norovirus PLUS (GGI og GGII), Congen	Reverse Transcriptase real-time PCR metode til påvisning af Norovirus i human fæces. Kittedet er et af de første baseret på real-time PCR. Congen har undersøgt kittedet i sammenligning med ELISA metode Ridascreen® Norovirus og fundet stor forskel på de to metoder, hvilket de konkluderer skyldes velkendte problemer med ELISA metoder til påvisning af virus. Metoden er ikke afprøvet af DMRI.
Påvisning af Norovirus med hurtig ELISA test	Noroscreen, Microgen Bioproducts Ltd.	Hurtigt flow ELISA test til påvisning af Norovirus i human fæces. Metoden påviser Norovirus Genogruppe I og Genogruppe II på 15 min. ifølge producenten. Metoden er ved at blive afprøvet af DMRI på kødprodukter podet med Norovirus.
Påvisning af <i>Salmonella</i> med real-time PCR	Biotest MMB <i>Salmonella</i> (R), Nordic Biolabs	Real-time PCR test til påvisning af <i>Salmonella</i> i kød, efter opformering i 18-20 timer. Godkendt af MicroVal. Ikke afprøvet af DMRI.

Støjsvag stomacher	AES Smacher stomacher, VWR	Stomacheren er mere støjsvag, end aboratoriets. Et vigtigt parameter for at reducere støjen var også opmærksomhed på det underlag stomacherne var placeret på. I vores tilfælde var stomacherne placeret i vindueskarme, som var medvirkende til at forstærke støjen.
--------------------	-------------------------------	---