



Slutrapport

Undgå "blown packs" med ny metode

Dato 15/3-2013
Proj.nr. 2000705
Version 1

Tomas Jacobsen

Formål

Lejlighedsvis forekommer problemer med bombage "blown pack" i vakuumpakket oksekød. Problemet er normalt forårsaget af kuldetolerante clostridier. Projektet havde til formål at udvikle en metode, så alle kendte "blown pack" clostridier hurtigt kan påvises når de forekommer i slagterimiljø og på det ferske kød.

English summary

Occasionally, vacuum-packed beef stored at 0-5°C are spoiled due to huge production of gas and foul smelling (blown pack spoilage). This is usually caused by growth from psykrotrophic clostridia. At TI-DMRI we have developed a multiplex PCR analysis that detects the 4 species causing > 95% of blown pack spoilage (*C. estherteticum*, *C. algidicarnis*, *C. frigidicarnis* and *C. gasigenes*). As the clostridia can be present either as vegetative cells or as very resistant spores, the DNA extraction protocol has been further optimized to increase the DNA yield from the spores.

This method can be used for analysis of raw meat, feces and environmental samples in one working day. The Limit of Detection is around 100 spores in a 50 gram sample.

Metodeudvikling

Der blev udvalgt et stamme panel af forskellige clostridier, både stammer som kan give bombage, og stammer som ikke gør det. Alle clostridiestammerne kunne opformeres anaerobt i TPGY bouillon. Nogle få af "blown pack" stammerne kunne danne sporer i laboratoriesubstraterne og blev derfor anvendt som modelorganismer til forsøg med DNA oprensning fra clostridiesporer.

Fra litteraturen blev i første omgang udvalgt 4 primersæt til PCR. Ingen af de 4 afprøvede primere kunne bruges direkte til at identificere samtlige "blown pack" clostridier, idet de enten identificerer et for snævert spektrum af clostridier (EF-ER, CAF-CAR og DBF-DBR) eller har et for bredt spektrum (RCHF-RCHR). Primerne er ikke fuldstændig specifikke, idet alle primerne også giver svagt positive signa-

ler frade fleste andre clostridier .

Det blev forsøgt at kombinere 3 primersæt så *C. estertheticum/laramiense*, *C. algidicarnis* og *C. gasigenes* kunne identificeres ved én analyse. Når de 3 primer sæt mod *C. estertheticum/laramiense*, *C. gasigenes* og *C. algidicarnis* anvendes sammen i en triplex PCR, giver *C. algidicarnis* primerne CAF-CAR en meget højere Ct værdi og dermed en dårligere detektionsgrænse, end når de anvendes alene i en PCR. Ligesom de øvrige afprøvede primere er der nogen uspecificitet i den triplex PCR, idet flere andre clostridier giver et lille positivt signal.

Da primerne fra litteraturen i den triplex PCR ikke var optimale, blev primerne modificeret, dels for at forbedre specificiteten, dels så alle primerne kan anvendes i én og samme multiplex PCR. Samtidig blev et fjerde primersæt tilføjet så alle kendte "blown pack" clostridier påvises i analysen.

Analysen med de nye primere blev optimeret for specificitet, og der blev udviklet en probe der kan anvendes til alle 4 primerpar. Analysen kan dermed påvise alle "blown pack" clostridier i en enkelt PCR kørsel, men ligesom med de oprindelige primere fra litteraturen, ses nogen uspecificitet i forhold til andre clostridier.

På naturligt kontaminerede kødprøver forventes clostridierne at findes på sporeform. DNA oprensning fra sporer med kommercielle DNA oprensningskit gav imidlertid ringe resultat. For at kunne optimere oprensningen er det nødvendigt at have præparationer der udelukkende indeholder sporer, så resultaterne ikke sløres af DNA fra vegetative celler. Til sporeoprensningen blev derfor anvendt en ASTM metode udviklet til sporeproduktion for *C. difficile*. Sporer fra DMRICC 5007 *C. frigidicarnis* kunne oprenses med metoden og denne blev benyttet til optimering af DNA ekstraktion fra sporer. Det er nu lykkedes, at tidoble DNA udbyttet fra *C. frigidicarnis*, ved at bruge en "decoating" metode hvor sporenes cellevæg delvist opløses inden DNA ekstraktionen.

Anvendelse af metoden

Den udviklede PCR metode kombineret med den optimerede DNA-oprensning til sporer er blevet afprøvet på prøver udtaget på slagteri. Undersøgelse af 21 naturlige kødprøver fandt ingen kødprøver positive for "blown-pack" clostridier dagen efter slagtning, men efter 5 ugers opbevaring ved 5°C, vakuumpakket var 3 prøver positive. Ingen af disse havde synlig bombage. Efter podning af tilsvarende kødstykker med sporer fra *C. frigidicarnis*, og lagring i 5 uger ved 5°C, vakuumpakket, blev alle 21 prøver fundet positive med PCR-analysen. Heller ikke for disse var der egentlig bombage, men dog synlige luftbobler. Det kan derfor konkluderes, at den udviklede quadroplex PCR kan påvise "blown pack" clostridier i vakuumpakkede, naturligt kontaminerede kødprøver inden de bomberer. Det præcise antal af clostridier der skal være til stede i pakken før de kan påvises kendes ikke nøjagtigt, men er ved tidligere podeforsøg bestemt til ca. 100 pr. 50 g kød. Ligeledes vides heller ikke, hvor mange "blown pack" clostridier der skal være til stede på kødet, førend der udvikles bombage i vakuumpakket kød. Det kan derfor ikke konkluderes, at metoden i sin nuværende form kan anvendes til at screene det ferske kød og dermed frasortere kød som efterfølgende vil give

bombage ved vakuumpakning og længere tids køleopbevaring. Det kræver at der gennemføres forsøg hvor prøver af naturligt kontamineret kød på pakkedagen analyseres med den udviklede quadroplex PCR for at vise om metoden har tilstrækkelig lav detektionsgrænse til at identificere størstedelen af pakker som efterfølgende bomberer inden sidste holdbarhedsdag.