



Årsrapport 2012

31. marts 2013
Proj.nr. 2000207
SUM/JUSS

Mikrobiologisk beredskab

Sammendrag

I projektet Mikrobiologisk beredskab sikres opdateret viden om mikrobiologiske analysemetoder. Virksomhederne får adgang til den nyeste viden og sparer derved tid til opdatering. Udviklingen med nye mikrobiologiske udfordringer er fulgt inden for: Multiresistente salmonella, MRSA, ESBL, VTEC, norovirus, hepatitis E virus og Schmallerberg virus. Laboratoriets beredskab af akkrediterede mikrobiologiske analysemetoder er vedligeholdt sammen med DNA-metoder til hurtig smittesporing. Salmonella 12 real time PCR metoderne med hhv. King Fisher DNA-oprensning og kogelysning er fusioneret i en metode og godkendt af NordVal. Metoderne anvendes til størstedelen af kødindustriens rutinemæssige overvågning af salmonella i fersk kød. Der er afprøvet eller vurderet 5 mikrobiologiske analysemetoder; kromogent substrat til påvisning af *Listeria monocytogenes*, hurtigmetode til aerobt kimtal baseret på bakteriologisk iltforbrug, real time PCR metode til verotoxinproducerende *E. coli* (VTEC), lateral flow immunoassay til påvisning af norovirus og udstyr til isotermisk DNA amplifikation. Der er indkøbt real time PCR metode til påvisning af norovirus i kød og kødprodukter og Schmallerberg virus i kødsaftprøver. Der er løbende deltaget i NMKL arbejdsgrupper med det formål at sikre opdatering og udarbejdelse af relevante metoder for kødindustrien. Der er deltaget i 3 internationale konferencer: Food Micro, AOAC-NMKL-NordVal Rapid Methods Symposium og COST 929.

Susanne Mansdal
Teamleder
Mikrobiologisk laboratorium

Indledning

Formål I projektet sikres en opdateret viden om nyheder indenfor mikrobiologiske analysemetoder. Dette bidrager til en målrettet gennemførelse af udviklingsprojekter og til en rationel laboratoriedrift. Virksomhederne får adgang til den nyeste viden og sparer derved tid til opdatering.

Baggrund De senere år har vist, at der akut kan opstå problemer i relation til håndtering af fødevarer sikkerhed og -kvalitet samt hygiejne, som det er hensigtsmæssigt at kunne løse inden for en kort tidshorizont. Kødindustrien har behov for opdateret og perspektiveret viden om nyheder inden for det mikrobiologiske analyseområde. Der er generelt et ønske om at nedbringe omkostninger og svartider for mikrobiologiske analyser, og myndigheders og kunders krav til dokumentation af fødevarer sikkerhed skærpes løbende. Hurtig smittesporing ved fund af patogener mikroorganismer er også vigtig og kan foretages med DMRI's beredskab af moderne PCR-metoder. Laboratoriet er akkrediteret til en række mikrobiologiske analysemetoder, hvilket sikrer analyseresultaternes kvalitet og laboratoriets uvildighed.

Afprøvning, vurdering og indkøring af nye mikrobiologiske analysemetoder

Nyheder indenfor mikrobiologiske analysemetoder overvåges systematisk ved kontakt til leverandører og abonnement på relevante nyhedsmedier, sociale netværk og hjemmesider. Følgende metoder er vurderet, afprøvet eller indkørt.

Kromogent substrat til påvisning af *Listeria monocytogenes* Kromogent agarsubstrat til påvisning af *Listeria monocytogenes*, ChromID L. mono agar fra bioMérieux er afprøvet og sammenlignet med standardmetoderne. Færdigfremstillet agar blev indkøbt og afprøvet på 10 prøver af fersk svinekød podet i to koncentrationer med renkulturer af *Listeria spp.* Metoden blev sammenlignet med NMKL nr. 136 og ISO11290. Der var god overensstemmelse. Der var ikke umiddelbart nogen grund til at vælge ALOA-agar fremfor ChromID L.mono-agar eller omvendt.

Hurtigmetode til aerobt kimtal System til automatisk kvantitativ bestemmelse af aerobt kimtal i fødevarer, som alternativ til dyrkning på agar eller film, GreenLight fra Mocon er vurderet. Systemet forhandles af Biolab A/S og er beregnet til påvisning af aerobt kimtal på 2-8 timer afhængig af fødevarer matrice og startkimtal. En optisk sensor måler oxygenforbrug. Systemet er udviklet til hygiejneprøver fx svaberprøver af miljø og slagtekroppe. Systemet ser lovende ud, men findes endnu kun til aerobt kimtal.

VTEC real time PCR metoder Udviklingen med VTEC, efter udbruddet i Tyskland i 2011 fra spirer med VTEC O104:H4 er fulgt, herunder analysemetoder til de aktuelle serotyper. VTEC O104 påvises ikke med de nuværende USDA og ISO metoder. USDA har indført nul-tolerance i hakket kød overfor følgende VTEC serotyper: O26, O103, O45, O111, O121 og O145 ("the big six") samt O157, som er de serotyper USDA metoden

påviser. I Europa påviser ISO/TS13136:2012 følgende 5 VTEC serotyper: O157, O26, O111, O103 og O145. Efterfølgende er der udviklet separate metoder til VTEC O104. Der forventes nye europæiske kriterier i midten af 2013. Her forventes, at frø til spirer skal testes for ovennævnte 5 VTEC serotyper plus O104:H4. Der findes flere real time PCR metoder på markedet, og der kommer løbende nye.

Flow immunoassay til norovirus En hurtigmetode Noroscreen fra Microgen Bioproducts er afprøvet til screening af svaberprøver for norovirus fra miljø- og produktoverflader. Metoden er udviklet til påvisning af norovirus Genogruppe I og Genogruppe II i human fæces fra patienter. Følsomheden angivet til 10^5 - 10^6 virus viste sig ikke at være tilstrækkelig til at påvise norovirus i så lavt niveau, som der forventes i fødevarer eller produktionsmiljø.

Isotermisk DNA amplifikation 3M har lanceret nyt Molecular Detection System, MDS til isotermisk DNA amplifikation ved 60 °C og påvisning med bioluminescens. Systemet er valideret med 24 timers opformering efterfulgt af 75 min. analyse. Håndtering af udstyr og prøvehåndtering er meget enkel. Der findes indtil videre protokoller til salmonella og *E. coli* O157:H7, og flere er på vej. Metoden blev ikke afprøvet, pga. den lange opformeringstid, der indtil videre kræves, men isotermisk DNA amplifikation ser lovende ud, som alternativ til real time PCR, og forventes at kunne reducere den samlede analysetid.

Norovirus Projektet har bidraget til indkøring af EUROVITAL's real time PCR metode til påvisning af norovirus i fersk kød, kødprodukter og produktionsmiljø. Metoden kan påvise norovirus på 4-6 timer.

Schmallenberg virus På baggrund af fund af Schmallenberg virus i får overalt i Europa, også i Danmark, blev der i løbet af meget kort tid indkørt en real time PCR metode på laboratoriet, for at imødekomme en akut efterspørgsel fra den danske kødindustri. Der blev i alt analyseret omkring 100 prøver af kødsaft, som alle var negative for Schmallenberg Virus.

Mikrobiologisk metodeberedskab, netværk og konferencer

Samlet NordVal godkendelse af Salmonella 12 metoden Salmonella 12 real time PCR metoden med de to forskellige prøveforberedelser, er blevet fusioneret til en metode og fornyet i ét NordVal certifikat. Man kan nu vælge simpel kogelysning eller King Fisher DNA-oprensning (NordVal certifikat nr. 41). Godkendelsen er gældende fra den 1. november 2012 til den 1. november 2014. Metoden er beregnet til fersk kød og svaberprøver fra kvæg, svin og fjerkræ. Metoden er fortsat den billigste og enkleste på markedet og anvendes til mange af den danske kødindustri's salmonella analyser.

Ringtest af Yersinia metode fra ISO DMRI har deltaget i planlægning af ringtest af ny *Yersinia enterocolitica* metode for ISO. Selve ringtesten inkluderer 5 prøvetyper og forventes gennemført i 2013-2014.

<i>NMKL arbejdsgruppe</i>	Der deltages løbende i NMKL møder, hvor det besluttes, hvilke nye NMKL metoder, der skal udarbejdes, og hvilke af de eksisterende metoder, der skal revideres. Årsmødet blev holdt i Helsinki i august. DMRI deltager i at udarbejde nye NMKL metoder til <i>Clostridium difficile</i> og shigella, samt revision af metoderne til hhv. real time PCR og dyrkning af <i>Yersinia enterocolitica</i> . NMKL har besluttet at udarbejde en NMKL metode til norovirus, og her overvejes at tage udgangspunkt i EUROVITAL metoden, som DMRI har indkøbt på laboratoriet. Metoden er dog midlertidigt stillet i bero, da der ikke kunne findes en referent til udarbejdelse af NMKL-metodeforskriften.
<i>DANAK akkreditering og årsmøde</i>	Laboratoriets DANAK akkreditering blev fornyet fra maj. Der er deltaget i DANAK's årlige akkrediteringsdag i juni, hvor DANAK orienterede om generelle nye tiltag indenfor akkrediteringsområdet, bl.a. om nyt webtool, database med oversigt over akkrediteringer på DANAK's hjemmeside, om nyt fællesadministrationsbidrag ens for små og store laboratorier, om ændrede tidsfrister for DANAK's tilbagemeldinger og om fleksibelt akkrediteringsområde, flexible scope. Fra de deltagende mikrobiologiske laboratorier, blev der udtrykt stort ønske om vejledning fra DANAK om usikkerhedsestimering for mikrobiologiske analysemetoder, hvilket er på programmet for næste DANAK årsmøde i juni 2013. Laboratoriets akkrediterede analysemetoder er løbende vedligeholdt. Akkrediteringen af de nuværende metoder jf. ISO17025 er vurderet at være dækkende indtil videre. Foruden de akkrediterede analysemetoder har laboratoriet også et beredskab af specialanalyser, som ikke er akkrediterede. DMRI's kvalitetsstyringssystem er baseret på GLP, der følges for alle analyser.
<i>Fødevareautenticitet - artsbestemmelse</i>	Følsomheden af kommercielle kit på markedet til at artsbestemme køds oprindelse, er undersøgt. I 2012 er endnu ikke fastsat regler på området. Der findes såvel real-time PCR metoder som ELISA metoder på markedet. Ved kontrol af forurening med kød fra andre arter end angivet, kan analysemetodernes følsomhed på 1-2 % være et problem. Ved bevidst snyd med tilsætning af kød fra andre arter, er følsomheden tilstrækkelig.
<i>AOAC-NMKL-NordVal Rapid Methods Symposium</i>	Der er deltaget i AOAC- NMKL-NordVal internationale hurtigmetode symposium i København i maj. Med 200 deltagere fra hele verden, flest fra Norden, blev nye hurtigmetoder og validering af hurtigmetoder til mikrobiologisk fødevarer sikkerhed belyst. PCR metoder til VTEC, salmonella og artsbestemmelse af kød var blandt de vigtigste nyheder. DMRI holdt indlæg om anvendelse af hurtigmetoder i kødindustrien i Danmark og DMRI's udvikling af real time PCR metoder: Salmonella 12 metoden, <i>Salmonella</i> DT104, <i>Salmonella</i> Dublin og norovirus.
<i>Food Micro konference</i>	Projektet har bidraget til deltagelse i konferencen Food Micro nr. 23, Global Issues in Food Microbiology, der blev afholdt i Istanbul i september. Her deltog DMRI endvidere med poster om norovirus. I konferencen deltog 800 personer fra hele verden. Campylobacter, yersinia, salmonella, listeria og VTEC har fortsat stor bevågenhed, som hovedårsag til fødevarebårne infektioner. Der var stor

fokus på ikke dyrkningsbaserede metoder, fordi mange mikroorganismer i fødevarer ofte er vanskelige at dyrke. En relativ ny teknik, DNA fuldgenom sekventering, er blevet væsentligt billigere og anvendes derfor mere og mere til undersøgelse af fødevarer, fx til kortlægning af bakteriefloraen i forbindelse med fordærv.

COST 929 konference

Der er deltaget i en international virus netværkskonference, COST 929, i Lissabon i oktober. Her blev især fokuseret på problemerne med, hvorvidt de vira, som påvises med DNA/RNA-baserede PCR hurtigmetoder, er infektiøse eller kan være uskadeliggjort. Metoder til at skelne mellem infektiøse og ikke-infektiøse vira forventes at blive næste indsatsområde indenfor virusforskningen.