



## Årsrapport 2013

6. marts 2014  
Proj.nr. 2000207  
SUM/JUSS

### Mikrobiologisk beredskab og laboratoriefaciliteter

#### Sammendrag

I projektet Mikrobiologisk beredskab og laboratoriefaciliteter sikres virksomhederne adgang til den nyeste viden inden for mikrobiologiske analysemetoder til dokumentation af kvalitet og fødevarer sikkerhed af fersk kød og kødprodukter samt til hygiejnekontrol af produktionsfaciliteter. Virksomhederne sparer derved tid til opdatering. Projektet bidrager endvidere til målrettet gennemførelse af udviklingsprojekter og rationel laboratoriedrift. Udviklingen med nye mikrobiologiske udfordringer er fulgt inden for: Multiresistente Salmonella, MRSA, ESBL, VTEC, Norovirus og Hepatitis E virus. Laboratoriets beredskab af akkrediterede mikrobiologiske analysemetoder er vedligeholdt sammen med DNA-metoder til hurtig smittesporing. Der er afprøvet eller vurderet 7 mikrobiologiske analysemetoder; Petrikyser til automatisk kimtælling, ISO-metode til *Yersinia enterocolitica*, real time PCR metoder til VTEC fra BioControl, SureTect til Salmonella på PikoReal PCR udstyr fra Thermo Fisher Scientific, kameraløsninger til stereomikroskop og ELISA og PCR-kit til artsbestemmelse af kød. Der er løbende deltaget i NMKL arbejdsgrupper med det formål at sikre opdatering og udarbejdelse af relevante metoder for kødindustrien. Der er afholdt kickoff møde i MIKRONET netværk for hurtigmetoder og deltaget i DANAK og EU-ROLAB møder om akkreditering og kvalitetssikring af analyseresultater.

Susanne Mansdal  
Teamleder  
Mikrobiologisk laboratorium

## **Indledning**

### *Formål*

Projektets formål er at sikre den nyeste viden om mikrobiologiske analysemetoder til dokumentation af kvalitet og fødevarer sikkerhed af fersk kød og kødprodukter samt til hygiejnekontrol af produktionsfaciliteter. Dette skal bidrage til målrettet gennemførelse af udviklingsprojekter og rationel laboratoriedrift. Udviklingen inden for området følges ved udveksling af forskningsmæssig viden nationalt som internationalt, ved deltagelse i arbejdsgrupper og forskningsnetværk. Aktiviteterne sikrer virksomhederne hurtig information om de nyeste analysemetoder og til de indsamlede resultater og erfaringer i forhold til virksomhedernes udfordringer.

### *Baggrund*

Kødindustrien har behov for opdateret og perspektiveret viden om nyheder inden for det mikrobiologiske analyseområde. Det skyldes, at der generelt er et ønske om at nedbringe svartiden for mikrobiologiske analyser, så produkter kan frigives hurtigere. Myndighedernes og kundernes krav til dokumentation af fødevarer sikkerhed og kvalitet skærpes løbende. Med dette projekt kan kunde-krav og myndighedskrav imødekommes ved implementering af nyeste metoder, så antallet af reklamationer og tilbagekald kan reduceres. Hurtig smittesporing ved fund af patogene mikroorganismer er også vigtig og kan stadig foretages med DMRI's nuværende beredskab af PCR-metoder. Laboratoriet er akkrediteret til en række mikrobiologiske analysemetoder, hvilket sikrer analysesresultaternes kvalitet og laboratoriets uvildighed.

## **Afprøvning og vurdering af nye mikrobiologiske analysemetoder**

Nyheder inden for mikrobiologiske analysemetoder overvåges systematisk ved kontakt til leverandører og abonnement på relevante nyhedsmedier, netværk og hjemmesider. Følgende metoder er afprøvet og vurderet.

### *Semi-automatisk aflæsning af agar plader*

Firmaet Bioras har udviklet et udstyr, Petrilyzer baseret på Image Analysis (billedanalyse) til semi-automatisk kimtælling af agar plader. Udstyret kan kalibreres til forskellige typer af agar medier i petriskåle og anvender såvel gråtone-skala som farveskala. Udstyret blev afprøvet hos DMRI på forskellige typer agar bl.a. Plate Count Agar og Oxford Agar. Efter kalibrering af kolonistørrelse og farve i forhold til manuel aflæsning med tællekasse, var det muligt at opnå god overensstemmelse mellem metoderne. Tælling af antal kolonier med Petrilyzer var meget hurtig; det tog kun få sekunder pr. agarplade efter kalibrering, og kan aflaste laboranter for det meget ensidige og tidskrævende arbejde, som kolonitælling kan være. Selve prøvehåndteringen med nummerering og registrering af prøvenummer og resultater var endnu ikke færdigudviklet, men forventes at kunne tilpasses laboratoriets LIMS system.

<i>Ringtest af ny ISO-metode til Yersinia</i>	ISO har udarbejdet en ny <i>Yersinia enterocolitica</i> dyrkningsmetode. DMRI var i 2012 med i planlægningen af ringtesten og deltog i år i den indledende del af ringtesten for én matrice. Resultatet af ringtesten er endnu ikke opgjort af arrangøren. Den nye ISO-metode er mere omfattende en den tilsvarende NMKL metode.
<i>VTEC real time PCR metoder</i>	Udviklingen med VTEC, efter udbruddet i Tyskland i 2011 fra spirer med VTEC O104:H4 er fulgt, herunder analysemetoder til de aktuelle serogrupper. Der findes flere real time PCR metoder på markedet, og der kommer løbende nye. Vi har set nærmere på VTEC metoden GDS Assurance fra BioControl, der forhandles af SSI Diagnostica. Kittet er meget fleksibelt og giver valgfrihed i forhold til de forskellige serogrupper, Top 6: O103, O111, O121, O145, O26 og O45 og Top 7, som foruden de 6 serogrupper i TOP 6 også påviser O157:H7. Kittene anvendes på Rotorgene PCR maskine og kan anvendes til undersøgelse af fersk kød. Prisen er ca. 50 kr. pr. test og dertil kommer selve PCR maskinen.
<i>Fuldgenom sekventering</i>	Der har været afholdt møder med Roche og Life Technologies vedrørende deres udstyr til fuldgenom sekventering. Disse to producenters udstyr anvendes flere steder til smittesporing af bl.a. MRSA og VTEC. Fuldgenom sekventering forventes at blive mere udbredt til påvisning af patogene bakterier generelt, og bør anskaffes, hvis DMRI fremadrettet skal beherske de moderne DNA-metoder. Prisen for selve udstyret er ca. 250.000,- og derefter ca. 200 kr. pr. test i materialer afhængig af, hvor mange test, der køres ad gangen.
<i>Hurtigere real time PCR til Salmonella</i>	SureTect™ til Salmonella på PikoReal PCR fra Thermo Fisher blev afprøvet parallelt med Salmonella 12 metoden. Selve PCR kørslen foregår på 60 min. og er dermed en del hurtigere end de 2½ timer, som traditionelle real time PCR udstyr, fx Stratagene MX3005 bruger til Salmonella 12 metoden. SureTect Salmonella var ikke ligeså følsom, som Salmonella 12 metoden. Metoden kan måske blive et alternativ til Salmonella 12 metoden, hvis den bliver optimeret og godkendt til en kort opformeringsprotokol på fx 8-10 timer.
<i>Artsbestemmelse af kød</i>	Den meget røre om afsløring af snyd ved tilsætning af andre kødtyper til fersk kød har givet efterspørgsel på følsomme metoder. I Danmark er referencemetoden en PCR metode, som kun FVST tilbyder. DMRI har undersøgt, hvilke metoder, der er kommercielt tilgængelige som færdige kit. SureFood® ANIMAL ID fra CONGEN, der forhandles af Food Diagnostics, angiver at have en følsomhed for svin i andet kød på 0,5% og koster 45-55 kr. pr. test. Kommercielle laboratorier er akkrediteret til ELISA-metoder og angiver en følsomhed på 1% og til PCR-metoder med en angivet følsomhed på 0,1%. ELISA metoderne anses ikke af de danske myndigheder for at være tilstrækkeligt følsomme, hvorfor det anbefales at anvende PCR metoder i stedet for.

*Kamera til dokumentation af mikroskopi* Stereomikroskopi anvendes ofte til karakterisering af kolonimorfologi i forbindelse med undersøgelse af bakterieflora på agar plader, fx påvisning af *Yersinia enterocolitica*. Der er derfor ofte behov for dokumentation af fund, hvorfor fotografering vil være en fordel. Kameraer til stereomikroskoper på markedet blev undersøgt og flere kameraer afprøvet; heriblandt også tablet kameraer. Et kamera fra Olympus, som passer til vores Olympus stereomikroskop, viste sig at være en optimal løsning til dette brug.

### **Mikrobiologisk metodeberedskab, netværk og konferencer**

*NordVal godkendelse af Salmonella 12 metoden* Salmonella 12 real time PCR metoden er NordVal godkendt med frit valg mellem to forskellige prøveforberedelser, kogelysning eller King Fisher DNA oprensning. NordVal godkendelsen gælder indtil 1. november 2014.

*MIKRONET netværk om mikrobiologiske hurtigmetoder* Netværket for brugere af mikrobiologiske hurtigmetoder, opnåede støtte af GUDP og startede i slutningen af 2013. Der blev afholdt kickoff møde i november hos Hilton Foods, hvor alle partnere var inviteret og de fleste repræsenteret. I netværket deltager repræsentanter fra kød-, mejeri- og fiskeindustrien.

*NMKL arbejdsgruppe* Der deltages løbende i NMKL møder, hvor det besluttet, hvilke nye NMKL metoder, der skal udarbejdes, og hvilke af de eksisterende metoder, der skal revideres. Årsmødet blev holdt i Sverige i september, hvor problematikken med resistente bakterier ESBL, MRSA og VRE samt hele VTEC problematikken blev diskuteret. Der er dog indtil videre ikke nedsat arbejdsgrupper for disse emner.

*DANAK akkreditering og årsmøde* Laboratoriets DANAK akkreditering er opretholdt. Der er deltaget i DANAK's årlige akkrediteringsdag i juni, hvor DANAK orienterede om generelle nye tiltag inden for akkrediteringsområdet. Der var bl.a. en workshop om erfaringer med elektroniske ledelsessystemer og om hvordan virksomhederne kan hjælpe DANAK til mere effektiv auditering af elektroniske ledelsessystemer. DANAK er ved at udarbejde en ny vejledning i beregning og angivelse af usikkerhed på mikrobiologiske analyseresultater.

Laboratoriets akkrediterede analysemetoder er løbende vedligeholdt. Akkrediteringen af de nuværende metoder jf. ISO17025 er vurderet at være dækkende indtil videre, men udvides med Salmonella jf. ISO 6579. 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.

*EUROLAB møde* Der er deltaget i EUROLAB møde om automatisk godkendelse af akkrediterede analyseresultater. Ifølge Henrik Lykkegård, ledende assessor hos DANAK findes der i ISO 17025 hjemmel til at gennemføre automatisk godkendelse af akkrediterede analyseresultater.