



Årsrapport 2017

21. december 2017
Proj.nr. 2000207
Version 1
ANFO/MT

Nye mikrobiologiske metoder

Anita Forslund

Sammendrag

I projektet "Nye mikrobiologiske metoder" sikres virksomhederne adgang til den nyeste viden inden for mikrobiologiske analysemetoder til dokumentation af holdbarhed og fødevarer sikkerhed af fersk kød og kødprodukter samt til hygiejnekontrol af produktionsfaciliteter.

Overvågningen af markedet for nye, hurtige og omkostningseffektive analysemetoder har i 2017 medført, at 3 metoder er indkøbt, afprøvet eller opdateret.

For fremadrettet at være opdateret på de moderne og hurtige DNA-teknikker er fuldgenom sekventering af gramnegative patogener blevet afprøvet i 2017. Tynningsprotokol for *Listeria monocytogenes* er blevet videreudviklet til også at omfatte Salmonella, verotoxinproducerende *E. coli* og *Yersinia* spp. og indkøbt på Illumina MiSeq sekvenator.

En metode til dyrkning og påvisning af *Legionella* spp. i vand er blevet afprøvet og indkøbt. Differentiering af *Yersinia* spp. er blevet afprøvet på et kommercielt medium, Chromogen Agar Yersinia, og et videnskabeligt publiceret medie, modificeret CIN-agar.

Ydermere er der set på metoder til DNA-ekstraktion og detektion ved real-time PCR for parasitter.

Der er deltaget i en række netværksmøder, NMKL og EUROLAB. På seminar og workshop om hurtigmetoder i fødevareranalyser blev forekomst og detektion af virus fremlagt med hovedvægt på stigningen i forekomst af fødevarerborne hepatitis E virus-tilfælde i Europa.

Indledning

Formål

Formålet med projektet "Nye mikrobiologiske metoder" er at sikre virksomhederne i kødindustrien nem og hurtig adgang til den nyeste viden om mikrobiologiske problemstillinger og analysemetoder. Viden om og overblik over de nyeste mikrobiologiske analysemetoder gør det muligt at vælge de bedste og mest omkostningseffektive løsninger og være på forkant med kunde- og myndighedskrav. Derved sikres den danske kødindustri mulighed for at bevare sit forspring i forhold til konkurrenterne. Nye, relevante analysemetoder afprøves for at give bedst mulig sparring med svine sektoren og for at sikre de bedst egnede metoder til brug i projektarbejdet i DMRI's udviklingsprojekter med kødindustrien.

Baggrund

Baggrunden for projektet er, at nye mikrobiologiske analysemetoder ofte er billigere, mere effektive og tidsbesparende, både hvad angår samlet analysetid og tidsforbrug til håndtering. Et hurtigere analysesvar kan give mulighed for at agere inden viderediskonering eller afsendelse af produktet og dermed forhindre tilbagekald. Udviklingen inden for sygdomsfremkaldende bakterier fortsætter, og særlig relevant er patogenerne *E. coli* (VTEC), *Listeria monocytogenes* og *Yersinia enterocolitica*. Der er løbende rapporter om tilfælde af smittede mennesker fra fødevarer med fx *Listeria monocytogenes*. Ligeledes har der været en fortsat stigning i sygdomstilfælde forårsaget af *Yersinia enterocolitica*. Der er derfor fortsat stort behov for nye og hurtigere analysemetoder til dokumentation af kvaliteten og sikkerheden af fødevarer. Hurtig smit�esporing ved fund af patogenerne mikroorganismer er også vigtig og kan foretages med DMRI's beredskab af DNA-metoder. Laboratoriet er endvidere akkrediteret til en række mikrobiologiske standardanalysemetoder, hvilket sikrer analyseresultaternes kvalitet og laboratoriets uvildighed.

Afprøvning og vurdering af nye mikrobiologiske analysemetoder

Nyheder inden for mikrobiologiske analysemetoder overvåges systematisk ved kontakt til leverandører og netværk samt abonnement på relevante nyhedsmedier og hjemmesider.

Følgende metoder er afprøvet og vurderet:

Fuldgenomsekventering – WGS – af gramnegative bakterier

Mi-Seq fuldgenomsekventering (WGS) fra Illumina blev indkøbt med støtte fra Norma og Frode S. Jacobsens Fond i 2015. WGS forventes at blive udbredt til karakterisering af patogenerne bakterier generelt og er blevet implementeret hos myndighederne som DNA-metode til opklaring af fødevarerborne sygdomsudbrud.

Fokus for fuldgenomsekventering har i 2017 været afprøvning og indkøring af metode for sekventering af de gramnegative patogener, VTEC, Yersinia og Salmonella. I proceduren indgår oprensning, tagmentering/klargøring, sekventering og analyse af sekvensdata. Sekvensdata er analyseret ved hjælp af sekventeringsværktøjer tilgængelige på Center for Genomic Epidemiology, DTU-FOOD og på National Center for Biotechnology Information (BLAST). Sekventeringsresultaterne stemte overens med tidligere identificeret bakteriel identitet.

Prisen pr. prøve afhænger af, hvor mange prøver der analyseres samtidig. Prisen for én chip til at analysere 15 prøver er ca. 10.000 kr. Den samlede materialepris vil være ca. 1.000 kr. pr. prøve under forudsætning af, at analysechippet fyldes helt op ved kørslen. Det tager omkring 2½ dage for en kørsel, og dertil kommer prøveforberedelse og resultatbehandling.

Påvisning af Legionella ifølge DS 3029-2001 Legionella er en naturligt forekommende bakterie i ferskvand og er et stigende problem i vandforsyning og varmtvandssystemer. Legionella-bakterien spredes via luften i små vandpartikler fra en inficeret vandressource. Smittekilder kan bl.a. være brusere, airconditionanlæg og ventilationssystemer, varmtvandstanke, drikkebeholdere og køletårne. Påvisning af Legionella ifølge DS 3029-2001 er afprøvet og indkørt i laboratoriet. Metoden er kvantitativ og baseret på opkoncentrering og dyrkning på substrater (BCYE og GVPC), som er selektive for Legionella. Metoden er afprøvet med kommercielt tilgængelige færdigstøbte agarplader. Indkøringen viste, at metoden først er rentabel ved et stort analysebehov af vandprøver som følge af kort holdbarhed og prisniveauet for kommercielle, færdigstøbte agarplader.

Chromogent agar til differentiering af Yersinia spp. Chromogent agar til påvisning af patogene Yersinia enterocolitica, Chromogent Agar Yersinia (CAY), fra Emm er afprøvet og sammenlignet med CIN-agar og en modificeret CIN-agar beskrevet i litteraturen. CIN-agar er standardmedie til detektion af Yersinia spp., men der kan være udfordringer med at identificere Yersinia spp på dette medie, da andre bakterier kan vokse på mediet og danne tilsvarende røde kolonier. Modificeret CIN-agar er beskrevet til bedre at kunne differentiere Yersinia spp. på basis af kolonimorfologi. Der er samlet testet 24 Yersiniastammer, herunder Yersinia enterocolitica, Yersinia kristensenii og Yersinia frederiksenii. Resultatet viste, at kolonimorfologien af Yersinia enterocolitica på CAY var ensartet og med karakteristisk rødbrune kolonier, hvilket gjorde dem let differentierbare fra baggrundsfloraen i kød. Baggrundsfloraen fra kød vokser på CAY med hvide kolonier. Det var muligt at differentiere patogene Yersinia enterocolitica og Yersinia kristensenii fra Yersinia frederiksenii, der vokser med metallic blue kolonier. Desuden vil non-patogene Yersinia enterocolitica biotype 1a vokse med metallic blue kolonier på CAY.

Afprøvningen viste, at CAY er et egnet medie til identifikation af *Yersinia enterocolitica* på kød. Prisen på CAY er højere end CIN-agar, men på gengæld har CAY-agarplader en holdbarhed på 1 måned sammenlignet med CIN-agar, der skal bruges indenfor 24 timer.

DANAK akkreditering

Mikrobiologisk metodeberedskab, netværk og konferencer

Laboratoriets DANAK-akkreditering er opretholdt. DANAK har været på eksternt audit af det akkrediterede laboratorium, og akkrediteringen er herefter fornyet.

Foruden de akkrediterede analysemetoder har laboratoriet et beredskab af specialanalyser, som ikke er akkrediterede.

Der er gennemført de planlagte præstationsprøvninger med tilfredsstillende resultat, og DMRI's kvalitetsstyringssystem er blevet ajourført.

National og international vidensudveksling

Der deltages løbende i NMKL-møder. Vi deltager med en repræsentant i den mikrobiologiske komité. I arbejdsgruppen besluttes, hvilke nye NMKL-metoder der skal udarbejdes, og hvilke af de eksisterende metoder der skal revideres. Der er generelt stort fokus på hurtigere mikrobiologiske analysemetoder. Her arbejdes på at udgive nye, PCR-baserede standardmetoder, revision af dyrkningsbaserede metoder samt nye metoder til kvalitetssikring af PCR- og WGS-analyser.

Der deltages løbende i EUROLAB-sammenslutningens møde i Netværket for Mikrobiologi. På møde med temaet "Patogener i vand" bidrog DMRI med foredrag om fødevarerelaterede zoonotiske bakterier og virus i vand, inklusiv sygdomsudbrud via grundvand, og hvordan bakterier og virus kan havne der. Der var indlæg om sundhedsrisikoen ved at lede overfladevand (regnvand blandet med kloakoverløb) ind i parkområde og indlæg om de vandbårne zoonotiske parasitter, *Cryptosporidium* spp. og *Giardia* spp., herunder eksempler på vandbårne udbrud. Der er deltaget i EUROLAB's initiativ til opstart af et nyt netværk for Praktisk Måleteknik. På opstartsmødet fortalte Morten Due om Dons Lab, deres analyseområder, metodekrav og analysemetoder.

Der er internationalt et øget fokus på fødevarerbårne vira. Derfor har deltagelse i møder og workshops omhandlende vira været prioriteret ved bl.a. deltagelse i "Rapid methods in food safety Analysis" i Potsdam, Tyskland i september 2017. Resultatet af deltagelsen er øget viden om vira og virusdetektion, som formidles videre til den danske svinekødssektor (bl.a. ved temadag i november 2017).