



Årsrapport 2018

Nye mikrobiologiske metoder

Anita Forslund

20. december 2018
Proj.nr. 2000207
Version 1
ANFO/MT

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 metoder har i 2018 medført, at fire metoder er indkørt, afprøvet eller opdateret.

Der har i 2018 været fokuseret på at forbedre og effektivisere metoder til sekventeringspipelinen. For fremadrettet at være opdateret og kvalitetssikret på de moderne og hurtige DNA-teknikker er automatisk DNA-oprensning ved robot, generering af DNA-biblioteker og kvantificering af DNA-koncentrationen i det adapterligerede bibliotek blevet afprøvet i 2018.

En metode til påvisning og kvantificering af hepatitis E virus i gylle, lever og kød er blevet afprøvet og indkørt. Ydermere er der set på metoder til DNA-ekstraktion og fuld genom sekventering af parasitter og virus.

Der er deltaget i en række netværksmøder, NMKL og EUROLAB samt konferencerne "Rapid Methods Europe 2018" og "Food Micro 2018".

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 svinesektoren 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*. Der er derfor fortsat stort behov for nye og hurtigere analysemetoder til dokumentation af kvaliteten og sikkerheden af fødevarer. Hurtig smittesporing ved fund af patogene 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:

Automatisk DNA-oprensning

Der er i 2018 afprøvet to maskiner til automatisk oprensning af DNA fra prøver.

Qiacube fra firmaet Qiagen kan automatisk oprense DNA i en prøve. Qiacube udfører lysning, centrifugering og eluering af DNA i en proces, der ikke kræver håndtering af prøven undervejs. Der anvendes samme oprenningskit som ved manuel DNA-oprensning. Qiacube kan oprense DNA fra 12 prøver ad gangen. Der blev med Qiacube opnået en højere og mere ensartet DNA-koncentration i prøverne sammenlignet med manuel DNA-oprensning. Der kunne nås færre prøver i Qiacube pr. dag, da oprensningstiden var længere end ved manuel oprensning. Qiacube vurderes ikke på nuværende tidspunkt at kunne effektivisere analysearbejdet i laboratoriet.

Fra Promega er afprøvet Maxwell til automatisk DNA-oprensning. Metoden er baseret på, at DNA bindes til maskinens beads vha. antistoffer og frigives ved ændring af pH. Overordnet kunne Maxwell-maskinen med hjælp fra en del forbehandlingsprotokoller åbne og ekstrahere DNA fra alle testede prøvetyper. Mængden og kvaliteten var varierende, og der var gentagne problemer med at få maskinen til at eluere produktet uden at få beads med i den endelige opløsning. Test viste, at der generelt skulle udvikles en del separate protokoller til hver enkelt prøve og matricetype. Det vurderes, at Maxwell ikke er en effektiv løsning, når der skal oprenses DNA fra mange forskellige typer af matricer.

Generering af DNA-biblioteker I forbindelse med forbedring og effektivisering af metoder til sekventeringspipelinen er der afprøvet et kit, QiaSeq, fra Qiagen til enzymatisk generering af DNA-biblioteker til sekventering som alternativ til Illumina's produkt. Kittet gav en mere ensartet fragmentering af sekvenser sammenlignet med Illumina's kit. Resultat af identifikation af bakterieisolater efter fuld genom sekventering ved brug af QiaSeq kit og Illumina Nextera kit viste meget få basevarianter. Det vurderes, at begge kit vil generere sammenlignelige og ensartede DNA-biblioteker. Aktuell pris er afgørende for valget af kitproducent.

Kvantificering af DNA Ligeledes fra Qiagen er afprøvet QiaQuant, som kan kvantificere DNA-koncentrationen i det adapterligerede DNA-bibliotek. Dette skulle give en mere nøjagtig kvantificering af DNA, der påsættes MiSeq og sikrer en korrekt DNA-tæthed (clusterdensitet) under sekventering sammenlignet med Qubit DNA-målingsmetoden, der måler koncentrationen af total DNA. Hvis clusterdensiteten bliver enten for lav eller for høj, kan DNA-baserne ikke identificeres, og sekventeringsdybden forringes, hvorved antallet af læste DNA-baser reduceres, og identifikationen bliver usikker. QiaQuant gav en standardkurve, så kvantificering af DNA var muligt. Der sås en god overensstemmelse med hovedparten af bakteriestammerne sammenlignet med koncentrationsmålinger på Qubit, hvor QiaQuant detekterede samme eller højere koncentrationer. Det vurderes, at QiaQuant-metoden kan hjælpe til at opnå en bedre clusterdensitet ved sekventering og dermed en mere nøjagtig bakterieidentifikation.

Sekventering af fødevarebårne gærarter Identifikation af sammensætningen af gærarter i en prøve kan bestemmes ved at sekventere henholdsvis 18S, 26S eller ITS-regionen af ribosomet. Der er indhentet viden og erfaring om sekventering af gærarter med primere i 18S regionen sammen med ekstern samarbejdspartner. Sekventeringer af udvalgte gærisolater viste, at "18S sekventering" ikke gav den ønskede identifikation af testprøvens sammensætning af gærarter. Ny litteratur foreslår ITS-regionen som en bedre kandidat til at kunne differentiere mellem gærarter. Det er valgt at arbejde videre med "ITS-sekventering", hvor valgte ITS-primere er testede og kan identificere sammensætningen af fødevarebårne gær på slægtsniveau.

Følgende metode er afprøvet og indkørt:

Påvisning af hepatitis E virus Som indledning til indkøring af detektion og kvantificering af hepatitis E virus (HEV) er udarbejdet et litteraturnotat om forekomst og koncentration af HEV-RNA i kød og gylle/fæces.

Metode til kvantitativ bestemmelse af hepatitis E virus (HEV) består af tre trin: opkoncentrering af HEV-partikler, ekstraktion af HEV-RNA og detektion af HEV RNA ved real-time RT-qPCR. Der anvendes et kommercielt kit til kvantitativ PCR-bestemmelse af HEV, og ekstraktionsmetoden følger ISO 15216-1:2017 Quantification of hepatitis A virus and norovirus using real-time RT-PCR. Metoden til opkoncentrering og ekstraktion af virus RNA er indkørt for tre typer materialer: gylle, lever og kød.

HEV blev detekteret i gylle- og leverprøver. I kød- og tarmprøver kunne HEV ikke detekteres. Fabrikanten af kittet garanterer en detektionsgrænse på 100 genom kopier pr. µl. Det var muligt at detektere en koncentration på 0,1 genom kopier pr. µl svarende til ca. 10 HEV genom kopier pr. ml i gylle.

Optimering af resultat, pipeline til 16S sekventering

16S sekventering bruges til at identificere den relative bakterielle sammensætning i en prøve. 16S sekventering forventes på sigt at blive udbredt som en bakteriel proceskontrol til at kunne detektere sammenhænge mellem produktionshygiejne og holdbarhed af produkter. Der er arbejdet med at anvende de optimale bioinformatikprogrammer til at analysere 16S data samt for at kunne udarbejde hensigtsmæssige rapporter til de store 16S datasæt.

DANAK-akkreditering

Mikrobiologisk metodeberedskab, netværk og konferencer

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

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

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

National og international vidensudveksling

Der deltages løbende i NMKL-møder. Vi deltager med en repræsentant i den mikrobiologiske komité. I arbejdsgruppen revideres eksisterende metoder, og der besluttet, hvilke nye NMKL-metoder der skal udarbejdes. Der er generelt stort fokus på hurtigere mikrobiologiske analysemetoder. Her arbejdes på at afholde seminarer om nyeste viden inden for mikrobiologiske hurtigmetoder og sekventeringsmetoder til bestemmelse af specifikke patogener samt florasammensætningen i fødevarer.

Desuden deltages løbende i EUROLAB-sammenslutningens møde i Netværket for Mikrobiologi. Der har i 2018 været afholdt et møde om forskellige dyrkningsmetoder for Legionella og hygiejnisk design i fødevarereindustrien, set både i forhold til de generelle udfordringer og relateret til udfordringer med Legionella dyrkningsmetoder.

Rapid Methods Europe 2018

Konferencen "Rapid Methods Europe 2018" er dedikeret til hurtigmetoder i bl.a. fødevareranalyser. På kongressen blev der især sat meget fokus på lateral flow metoder ("graviditetstests"), hvor der i de seneste år er blevet udviklet mange typer af lateral flow tests til at identificere et bredt udvalg af organismer og molekyler inden for både den kliniske verden, fødevarereindustrien og miljøundersøgelser.

Der er meget fokus på "hurtigmetoder", der kan laves på stedet og med meget kort analysetid. Der bliver udviklet mange interessante metoder og håndholdte "devices", men indtrykket fra konferencen var, at mange af metoderne stadig ikke er 100% færdigudviklede, samt at fabrikanterne ikke har de store muligheder for at "customize" deres devices, så de passer til de organismer eller molekyler, forskellige kunder kunne ønske.

Food Micro 2018

På konferencen "Food Micro 2018" var forskning af den bakterielle florasammensætning ved 16S sekventering et hot emne og inkluderet i mange af præsentationerne. Udfordringen er på sigt at standardisere NGS (Next Generation Sequencing) metoderne, så studier kan sammenlignes og bias reduceres. Der er p.t. ikke publiceret nogen standardmetode til NGS.

Analysemetoden er påvirkelig af bl.a.:

- lavt celleantal og dermed et lavt DNA-indhold.
- antal PCR-cykler i proceduren, som kan forskyde den relative fordeling mellem bakterier, fx falder diversiteten ved øget antal PCR-cykler.
- DNA-oprensningen påvirker bakteriefordelingen. I nogle DNA-ekstraktionsmetoder/-kit mistes fx clostridier som følge af, at bead-beating ikke bliver anvendt ved DNA-ekstraktion.
- Dannelse af DNA-biblioteker kan inducere bias, fx kan read-filtrering reducere biodiversitet.

Hovedbudskabet fra konferencen var, at det er vigtigt for sammenligning af resultater at informere om fx procedurerne for DNA-ekstraktion, PCR-cykler og read-filtrering, indtil der publiceres en standardiseret metode.