



Årsrapport 2019

Nye mikrobiologiske metoder

Steffen Lynge Jørgensen

6. januar 2020

Proj.nr. 2007053

Version 3

Init. STJO/MT/BGS

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 2019 medført, at 3 PCR-metoder samt 4 DNA ekstraktionsmetoder blev afprøvet.

To PCR-baserede metoder fra hhv. SwissDeCode og ProComCure til påvisning af *L. monocytogenes* i fersk kød blev testet, men ingen af metoderne er for nuværende sensitive eller robuste nok i forhold til de opstillede kravspecifikationer.

En kvantitativ qPCR-metode fra Takara til kvantificering af total kim, som supplement til dyrkningsmetoderne, blev afprøvet i prøver med kendt antal bakterier. Men kittet var uspecifikt, ikke-robust og overestimerede antallet af bakterier i de testede prøver.

Der blev testet fire DNA-ekstraktionskits fra hhv. Qiagen, Invitrogen, Zymo og MN til forbedring af mikrobiomanalyser (bakterieidentifikation og -sammensætning) og kvantitative qPCR-metoder på fødevarer matricer, der har et højt indhold af PCR-inhibitorer fra fx blod. Zymo-kittet var især velegnet til qPCR, mens kittet fra Invitrogen var velegnet til mikrobiomanalyser.

I 2019 er der udviklet standardiserede computerprotokoller til mikrobiomdataanalyse på sekventeringsdata fra både Illumina og Oxford Nanopore instrumenterne. Hertil er der også blevet udviklet en venlig brugerflade til mikrobiomdataanalyse.

Der er deltaget i en række møder og konferencer, NMKL-stormøde, ISOPOL-konference samt AOAC-symposium, hvor der blev hjemtaget viden om nye detektionsmetoder til især *Listeria*. Fælles for flere af arrangementerne var den stigende interesse for brugen af DNA-sekventering i fødevarer industrien og den manglende validering og standardisering af DNA-sekventerings-baserede metoder og udstyr.

Indledning

Formål og mål

Formålet med projektet "Nye mikrobiologiske metoder" er at sikre slagterierne og forædlingsvirksomhederne i grisekødsbranchen adgang til og et overblik over den nyeste viden om mikrobiologiske problemstillinger og analysemetoder.

Målet er, at 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 kødindustris mulighed for at bevare sit forspring i forhold til konkurrenterne. Nye relevante analysemetoder afprøves for at give bedst mulig sparring til svinesektoren og for at sikre de bedst egnede metoder til brug i projektarbejdet i DMRI's udviklingsprojekter.

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. Der kommer hele tiden nye produkter på markedet, og målet i nærværende projekt er at overvåge markedet, teste udvalgte produkter og videregive opnået viden til den danske kødindustri. Det er ligeledes målet at følge udviklingen inden for sygdomsfremkaldende bakterier bl.a. via konferencer og litteraturen.

Afprøvning og vurdering af nye mikrobiologiske metoder

Nyheder indenfor mikrobiologiske analysemetoder overvåges systematisk bl.a. ved direkte kontakt til leverandører, gennem netværk og hjemmesider samt abonnement på relevante nyhedsmedier. Følgende metoder er afprøvet og vurderet.

Test af DNA oprensningsskits til forbedring af 16S sekventering samt til kvantitative qPCR-metoder

Der arbejdes med at forbedre og teste nye kvantitative qPCR-metoder, bl.a. efterspørges hurtigmetoder til kvantificering af totalkim. Kvantitativ qPCR på 16S genet ses brugt til kvantificering af totalkim. Men da 16S genet kan findes i mange kopier pr. celle, kan der derved skabes en kvantificeringsbias, altså en overestimering. Der blev testet et qPCR kit til kvantificering af totalkim fra Takara, der er baseret på kvantificering af *tuf*-genet (som kun findes i én kopi pr. celle).

Der blev også arbejdet på forbedring af DNA-oprensning fra kødmatricer, som kan indeholde stoffer fra fx blod, der kan forringe eller ligefrem inhibere PCR-reaktioner. Dette kan have effekt på kvantitative qPCR-metoder, såvel PCR-steps som 16S mikrobiomanalyser. Der er blevet testet DNA-oprensningsskits, som er optimeret i forhold til at ekstrahere mindre PCR-inhiberende stoffer fra prøver med højt indhold af PCR-inhibitorer samt forbedret evne til at ekstrahere DNA til 16S mikrobiomanalyser.

Fire forskellige DNA oprensningsskits blev sammenlignet: MN Soil kit, Zymo mini, Invitrogen Purelink Microbiome og Qiagen Blood and Tissue.

De fire kits blev testet ved at:

- sammenligne mængden og kvaliteten af ekstraheret bakterie-DNA fra kødsaft med et kendt antal tilsat *Clostridium*-sporer. Sammenligningen blev udført ved test af detektionssensitivitet og robusthed med nyt Takara kvantificerings qPCR-kit til totalkim samt med DMRI's *Clostridium* qPCR-test.
- sammenligne kittenes præcision til at ekstrahere korrekte andele DNA-mængder fra Zymo Mock community (mikrobiom referenceprøve med kendte mængder af forskellige bakterier). Sammenligningen blev gennemført ved 16S mikrobiom sekventering på det ekstraherede DNA.

Test af oprensningsskits på Clostridium qPCR af 4 Clostridiesporer i kødsaft

I test af oprensningsskits på kødsaft med kendt antal tilsat *Clostridium*-sporer blev der overordnet ekstraheret størst mængde DNA med Zymo-kittet.

Ved test med DMRI's qPCR-metode til kvantificering af *Clostridium*-sporer viste Zymo kittet højere sensitivitet og robusthed sammenlignet med de tre andre kits og kunne detektere og kvantificere *Clostridium*-sporer ned til 10^2 log CFU/ml. Dette forbedrer mulighederne for at kunne detektere sporer i fødevarer, da sporerne kan være særdeles svære at dyrke på agarplader.

Test af oprensningsskits på Takara tuf-gen qPCR til molekylær totalkim kvantificering

Bakterie-DNA ekstraheret fra kødsaft med de fire oprensningsskits blev testet på Takara qPCR kit til kvantificering af totalkim. qPCR-resultaterne for alle fire kits gav imidlertid en indikation af, at der var sket en uspecifik binding (binding af primers til andet end det ønskede *tuf*-gen), hvilket førte til ukorrekt overkvantificering, der ikke stemte overens med det kendte antal *Clostridium*-sporer, der var tilsat kødsaftprøverne eller med kittets standardkurve. Takarakittet er baseret på kvantificering af *tuf*-genet, som kun findes i én kopi pr. celle. *Tuf*-genet er ikke unikt for bakterier, men findes i nogle forskellige varianter i andre celletyper, heriblandt gær, svampe og eukaryote celler (fx grisevæv, plantevæv, blod, mitochondria etc.). Det er meget sandsynligt, at der er sket kvantificering af disse også.

I litteraturen kan der findes eksempler på, at Takarakittet har været anvendt med succes. Vi har dog vurderet efter test på DMRI, at kittet ikke er specifikt eller robust nok til oprensning af bakterie-DNA fra kødmatricer.

Test af oprensningsskits på Zymo-referenceprøve til 16S mikrobiom sekventering

DNA fra Zymo mikrobiom referenceprøve blev oprenset med alle fire kits til mikrobiom sammenligning med 16S sekventering på Illumina. Mikrobiomresultaterne viste, at producentens oplyste fordeling af bakterier i referenceprøven stemte bedst overens med analyse gennemført med Invitrogen kittet. Ved brug af Invitrogen kittet blev der således opnået det mest præcise estimat for referenceprøvens indhold af bakterier.

Test af hurtigmetoder fra SwissDeCode og ProComCure til påvisning af *L. monocytogenes* samt *Salmonella* sp.

To nye molekylære påvisningsmetoder til *L. monocytogenes* fra ProComCure og SwissDeCode blevet testet. Metoderne bygger på moderne PCR-metoder med høj specificitet til hurtigere påvisning af *L. monocytogenes* og *Salmonella*.

ProComCure ProComCures PhoenixDx® *L. monocytogenes* kit er baseret på 24 timers prøveopformering efterfulgt af DNA-ekstraktion og kvantitativ qPCR. Med dette kit var det muligt at detektere ca. 2,5 log CFU/ml i hakket grisekød og brystflæsk podet med *L. monocytogenes*. Der blev foretaget en række forsøg med reduktion af opformeringstiden inden analyse for at reducere den samlede analysetid, men herved blev robustheden reduceret. Med 24 timers opformering vil man indenfor 26 timer kunne have svar på, om der er fravær af *L. monocytogenes* i en prøve på 25 g, da DNA-ekstraktion og PCR kan foretages på mindre end 2 timer. Samlet set blev kittet dog ikke vurderet robust nok til industriel brug, da der var flere tilfælde af falsk negative resultater.

SwissDeCode SwissDeCodes kits (DNA-foil) til detektion af hhv. *Salmonella* og *Listeria* bygger på isotherm PCR, som helt praktisk kan laves i en kop varm vand med visualisering af prøveresultatet på en simpel papirstrip, en slags graviditetstest. Kittene er designet til, at alle trin i prøveanalysen, der i alt tager ca. 1 time, kan foregå uden brug af laboratoriefaciliteter.

I de gennemførte test for detektion af *L. monocytogenes* var det ikke muligt at detektere under 4,5 log CFU/ml fra brystflæsk podet med *L. monocytogenes*.

Tilsvarende test blev udført med *Salmonella*. *Salmonella* kunne detekteres ned til 2 log CFU/ml, men robustheden var ikke tilfredsstillende. Samlet set blev de to kits vurderet til ikke at være robuste nok til industriel brug, da der var flere tilfælde af falsk negative resultater.

Review om analysemetoder til samtidig analyse for flere uønskede stoffer og organismer i samme prøve

Der er udarbejdet en perspektiverende rapport om analysemetoder til detektion af flere uønskede stoffer eller organismer i samme prøve. Fokus har været på analyse af flere organismer på samme tid. Der blev taget udgangspunkt i immunoassays, kemiske "elektroniske næser", PCR-baserede metoder og sekventering. Samlet set blev det vurderet, at traditionelle immunoassays og DNA-PCR-metoder er gode metoder (blandt de metoder, der er tilgængelige i dag) til detektion af flere organismer og evt. stoffer på én gang.

Immunoassays er baseret på binding af specifikke antistoffer til specifikke target antigener. Target antigenerne er ofte større molekyler, heriblandt peptider, proteiner og polysaccharider, som kan være sygdomsrelaterede molekyler såsom toksiner, antibiotikarester, samt overfladeproteiner og polysaccharider fra specifikke organismer.

Antistoffers evne til at diskriminere mellem subtyper er bl.a. meget effektiv indenfor flere velkendte patogener fx *Salmonella* og *E. coli*. ELISA-metoden har været brugt i årtier, og der findes mange kommercielle produkter og kits til detektion af mange forskellige organismer og metabolitter. Der er inden for de sidste par år blevet udviklet ELISA-metoder, der kan multiplexes. Der findes flere kommercielt tilgængelige multiplex ELISA-kits fra bl.a. RayBiotech Life (<https://www.raybiotech.com/quantibody-multiplex-elisa-array/>) og ELISA-Genie (<https://www.elisagenie.com/multiplex-elisa>). Disse kits er dog primært målrettet kræft og stofskiftesygdomme, og der er endnu ingen kits, der er målrettet til bakterier eller bakteriemetabolitter.

Den umiddelbart mest potentielle teknologi på nuværende tidspunkt er moderne RNA-PCR-metoder, der ikke kræver reverse transskribering (RNA, der omdannes til DNA). RNA-PCR er mere sensitiv og vil kunne udføres hurtigere og med færre falsk positive resultater (fra døde og inaktiverede celler) end traditionel DNA-PCR. Metoden er meget lig traditionel DNA-PCR, som er velkendt for industrien. DNA-PCR kan multiplekseres, så flere organismer eller metabolitter kan detekteres på én gang. Der findes ikke kommercielle kits, men der kan tages udgangspunkt i gen-targets fra allerede eksisterende DNA-PCR protokoller, der vil lette den videre udvikling og validering.

DNA sekventeringsteknologier fra Oxford Nanopore og nye computeranalyse-software er med til at gøre sekventering meget mere tilgængeligt. Amplikonsekventering som 16S eller 18S kan identificere mange bakterier eller svampe på én gang. Der er stadig ikke nogen kommercielle løsninger, der er helt klar. Tilsvarende har Oxford Nanopore-teknologien også gjort dybdegående metagenomsekventering mere tilgængelig. Metagenomsekventering er sekventering af alt DNA i en prøve og kan identificere både bakterier, gær, parasitter og genpulje på en og samme gang, men analysen er stadig tung og forholdsvis dyr.

Kemiske analyser som gaskromatografi og væskechromatografi, der kan fungere som "elektroniske næser", er ved at blive så avancerede, at de kan måle flere stoffer og biomarkører for organismer simultant. Metoderne er specifikke og sensitive, og der arbejdes for at udvikle udstyr, der kan håndtere komplekse prøvematrixer som fødevarer, animalsk væv og blod.

Videreudvikling, optimering og standardisering af computerprotokoller til mikrobiomanalyser

Illumina pipelines

Illumina 16S mikrobiomanalyser bruges til at identificere den relative bakterielle sammensætning i en prøve. Computeranalyse af data har ikke været standardiseret tidligere. Der er blevet arbejdet på at få strømlinet og standardiseret analysemetodens computerprotokoller, således at de optimale softwareløsninger bliver brugt til 16S mikrobiomanalyse. Der er blevet udviklet en komplet software pipeline fra sekventeringsoutputtet, produceret af programmet BION, til den færdige rapport i programmet R, der inkluderer tabeller og lister over de tilstedeværende bakterier. Som del af SAF-projektet "Processtyring for konstant holdbarhed" er der udarbejdet udførlige protokoller samt videovejledninger, der gennemgår alle trin i dataprocessen, samt en separat rapport, der gennemgår de forskellige trin i protokollen og mikrobiomanalysen.

	Transportbaand			Rystebord			Kant efter tumbler		
Photobacterium-	76.9	23	1	39.1	33.3	0	85.9	75.6	0
Brochothrix-	0.4	1.5	0.1	2.9	0.6	1.3	0.7	5.5	0
Leuconostoc-	0	0.1	0	0.2	0.2	0.6	0.1	4	0.4
Pseudomonas-	6	8	11.7	9.3	30	5.8	0.8	0.3	7.3
Carnobacterium-	0.6	0.3	0.4	2.6	0.3	0.7	0.1	0.3	0.1
Acinetobacter-	10.4	11.5	21.9	13.4	25.3	2.1	1.5	0.6	5.8
Psychrobacter-	0.6	1.5	3.1	1	0.9	3	3.1	3.2	0.3
Arcobacter-	0	0	3.3	0.5	0	0.8	2.5	0.9	84.9
Bacillus-	0	29.9	0.1	0.2	1.6	0	0	1.4	0
Lactobacillus-	0.2	4.4	0.2	6.5	1.2	0	0.3	1.3	1.5
	Batch_1	Batch_2	Inden start	Batch_1	Batch_2	Inden start	Batch_1	Batch_2	Inden start

Eksempel på tabel, der beskriver bakteriesammensætningen/mikrobiom på overfladen af produktionsudstyr.

Med udgangspunkt i SAF-projektet *Undgå pustning af kødprodukter og sammensatte produkter* blev pustede pålægspakker undersøgt for tilstedeværelsen af fordærvende gær. Gær blev identificeret ved brug af kombineret 18S-ITS sekventeringsanalyse. 18S-ITS-data behandles i programmet USEARCH, der producerer tabeller og lister, der beskriver, hvilke gær der er til stede i prøven. Til denne undersøgelse blev 18S-ITS mikrobiom-analyseprotokollen ligeledes standardiseret.

Opsætning af Oxford Nanopore Minion

Oxford Nanopore Minion sekventeringsudstyr er testet til 16S mikrobiom sekventering af en bred vifte af bakterier, særligt de holdbarhedsforringende bakterier. Minion-sekventering blev brugt til identifikation af holdbarhedsforringende bakterier og identifikation af mikrobiomsammensætning i fødevarer og produktionsudstyr. Med Oxford Nanopores eget MinKnow software kan der på mindre end 2 timer produceres sekvensdata, der kan give et groft overblik over, hvilke organismer der kan identificeres i en miljø- eller fødevarerprøve. MinKnow software kan ikke lave beskrivende analyser af mikrobiomsammensætningen, hertil har DMRI udviklet brugervenligt IT-værktøjer til mikrobiomanalyser.

Minion-sekventering har en højere fejlrate i sekventeringen (2-13%) sammenlignet med Illumina-sekventering (ca. 0,1%). På nuværende tidspunkt vurderes det, at sekventeringsresultaterne på artsniveau kan benyttes som pejlemærke for, hvilke bakteriearter der findes i en prøve.

Forberedelsen af DNA til Minion-sekventering er overordnet mere simpel end til Illumina, men kræver fortsat optimering af sekventeringsopsætningen i laboratoriet. Minion er bl.a. blevet brugt i projektet "Fødevarer kvalitet og convenience – value for money", der er en resultatkontrakt, der er finansieret af Styrelsen for Institutioner og Uddannelsesstøtte under Uddannelses- og Forskningsministeriet.

Overvågning af fødevarerborne patogener (og analysemetoder) via litteratur, netværk og konferencer

Hvert år udgiver EFSA & ECDC en zoonose rapport (The European Union One Health 2018 Zoonoses Report, 2019), der indeholder resultater fra det foregående års overvågning af forskellige zoonoser. I overvågningen deltager 36 lande, 28 lande fra EU og 8 ikke-medlemslande. Opgørelsen viste følgende top fem patogener, der havde forårsaget sygdomsudbrud i 2018 (i alt 5.146 vand- og fødevarerborne udbrud):

1. *Campylobacter* (antal udbrud stabilt siden 2014)
2. *Salmonella* (antal udbrud stabilt siden 2014)
3. *Escherichia coli* (Shiga-toksinproducerende) (antal udbrud stigende fra 2014)
4. *Yersinia* (antal udbrud stabilt siden 2014)
5. *Listeria* (antal udbrud er stigende)

AOAC Europe – NMKL – NordVal International symposium – International symposium in Norway in June 2019: Speeding towards -omics ... – Oslo, Norway

Der blev deltaget i AOAC symposium i Oslo, hvor fokus var på moderne molekylære detektionsmetoder til brug i fødevarer. I de seneste år er der sket en stor udvikling på området, og metoderne er blevet billigere og mere tilgængelige, inklusiv håndholdte devices, der endda er tilgængelige for alm. forbrugere.

Der var præsentationer af en række automatiserede "håndholdte" maskiner fra bl.a. ADRIA og DTU, der begge byggede på ældre PCR-teknologi, til påvisning af især *L. monocytogenes*, *Campylobacter* og *Salmonella*.

Neogen har udviklet det AOAC-certificerede *ANSR Listeria Right Now kit*, der detekterer *Listeria* sp. RNA med NEAR-PCR-teknologi inden for 60 minutter med en detektionsgrænse på 4 cfu/svaber uden forudgående opformering. Metoden virker meget attraktiv til trods for, at den "kun" kan detektere på slægtsniveau. Men med metoden vil fravær af enhver *Listeria*-slægt, inklusive *L. monocytogenes*, altså kunne påvises.

Metagenomics-sekventering er sekventering af alt DNA i en prøve. Metagenomics er blevet et stærkt værktøj ikke bare til at beskrive mikrobiom sammensætninger i fødevarer og produktionsmiljøer, men også til detektion af specifikke sub-species og udbredelsen af specifikke gener, fx antibiotikaresistens eller virulensgener. Metagenomics-sekventering er stadig omkostningstungt og ikke just tilgængeligt for industrien endnu, men forskerne har en klar målsætning om, at metagenomics i fremtiden skal blive et tilgængeligt værktøj til optimering af fødevarerprocesser og fødevarerikkerhed.

Der blev under symposiet diskuteret mangel på fastsættelse af retningslinjer til validering af både DNA-sekventeringsbaserede metoder og traditionelle qPCR-baserede metoder. Det er fortsat primært på det medicinske/genetiske område, at der bliver godkendt validerede sekventeringsmetoder.

DMRI havde en præsentation med om brugen af 16S rRNA gensekventering som del af proceskontrol i kødindustrien.

[Abstract](#)

NMKL årsmøde nr. 73 – Reykjavik, Island

Der deltages løbende i NMKL-stormøder. DMRI deltager med en repræsentant i den mikrobiologiske komité. Der diskuteres og besluttet, hvilke NMKL-metoder der skal revideres, og hvilke nye metoder der skal udarbejdes. Til stormødet var der generelt stort fokus på mikrobiologiske påvisningsmetoder til *Yersinia*, *Shigella* og *E. coli* O157.

ISOPOL 2019 International Symposium on Problems of Listeria and Listeriosis – Toronto, Canada

Der blev deltaget i ISOPOL-konferencen. Helgenomsekventering (WGS)-metoder var et populært emne. WGS-teknologi er blevet mere tilgængeligt og meget billigere end tidligere. Dette har medført, at WGS hyppigere bliver brugt til sporing af smitekilder under udbrud af fx listeriose samt til karakterisering af *Listeria*, men også til identifikation af kontamineringsveje i fødevarerproduktioner.

Der var præsentation af nye metoder og teknologier til hurtigere detektion af *Listeria*. En del af disse var baseret på moderne varianter af PCR, heriblandt qPCR-metode til detektion af inaktiverede *L. monocytogenes* (DTU FOOD). Der var også præsentation af alternative metoder med syntetiske bakteriofager, altså ufarlige vira, med høj specificitet. Heriblandt kommercielt tilgængelig bakteriofagbaseret detektionsmetode fra ROKA, "Sample6 De-tect/L", der kan detektere 3-4 cfu i miljøprøver på 7 timer. Metoden er AOAC-certificeret, og prisen er 16 US\$ pr. prøve. Nanuluc luminescens præsenterede bakteriofag-biosensorer, der kan detektere 1 celle, som dog stadig ikke er kommercielt tilgængeligt endnu.

DMRI havde to posters med til konferencen. Den ene poster handlede om dekontaminering af *Listeria monocytogenes* på fersk grisekød ved brug af bakteriofager. Den anden havde fokus på udfordringerne ved brug af moderne molekylære metoder til detektion af *Listeria* i fødevarer, når der ønskes en samlet svartid på mindre end 12 timer fra prøvetag til analyseresultatet foreligger.

[Poster 1](#)

[Poster 2](#)