



Årsrapport 2020

Nye mikrobiologiske metoder

Birgit Groth Storgaard

12. marts 2021
Proj.nr. 2007948
Version: 1
Init.
BGS/MT/LME/TJAN

Formål med rapporten

Formålet med nærværende rapport er at afrapportere aktiviteter udført i SAF-projektet "Nye mikrobiologiske metoder" i 2020. Desuden formidles udviklingsarbejde med mikrobiomanalyser, som er udført i projekterne "Resultatkontrakt F2 Fødevarekvalitet og convenience – value for money" og "DNAPROKON" (GUDP-finansieret og Resultatkontrakt).

Sammendrag

Test af nye mikrobiologiske metoder

3M Molecular Detection System (3M MDS) er evalueret med henblik på en indledende test af instrumentet og er fundet velegnet til hurtig påvisning af *L. monocytogenes* og *Salmonella* i spiket kød og kødprodukter.

Petrifilm (EB) til bestemmelse af Enterobacteriaceae er testet overfor standardmetode efter NMKL-metode nr. 144 ved 37°C inkuberet i 24 ± 2 timer og fundet sammenlignelig hermed.

Der er afprøvet en ISO-metode til bestemmelse af mikrobiologisk belastning (bioburden) på lavkimholdige produkter. Metoden er implementeret i mikrobiologisk laboratorium som en akkrediteret metode.

DMRI arbejder fortsat med DNA-baserede analysemetoder til identifikation af mikroorganismer fra fødevarer og produktionssystemer, primært Illumina sekvenator og Oxford Nanopore Minion. DMRI har succesfuldt testet 16S-analyser via Oxford Nanopore Minion som en "ude af laboratoriet" -test på en fødevareraktivitet.

DMRI har udviklet et software, CelerSeq Version 1.0, til simpel og brugervenlig behandling af data fra mikrobiomanalyse samt fx produktinformation. En fungerende version af CelerSeq kører på TI's lokale netværk og skal i projektet "DNAPROKON" videreudvikles og testes på virksomheder.

NMKL
Nordisk Metodikkomité
for Levnedsmidler

NMKL's generalsekretariat har skiftet placering til Havforskningsinstituttet, Institute of Marine Research, Bergen, Norge. NMKL tilgås via <https://www.nmkl.org/>

Følgende mikrobiologiske NMKL-metoder er blevet opdateret og publiceret:

- Presumptive *Shigella* spp. Detection in foods (NMKL method No. 151, 2019).

- *Escherichia coli* O157. Detection in food and animal feed (NMKL method No. 164, 2019)

Fornyede certifikater:

- NordVal International Certificate 050 (CompactDry YM RAPID, Hyserve)
- NordVal International Certificate 049 (RAPID'Staph fra Bio-Rad)

Udvidede certifikater:

- NordVal International Certificate 037 udstedt til Bio-Rad for "iQ-Check® *Listeria monocytogenes* II".

Zoonoser fra EFSA og DTU

I Europa og Danmark har følgende top fem mikroorganismer forårsaget fødevarer- og vandrelaterede sygdomsudbrud i 2019:

Danmark

1. *Norovirus*
2. *Clostridium perfringens*
3. *Campylobacter*
4. Andre *Salmonella* serotyper
5. *Salmonella* Typhimurium

Europa

1. *Campylobacter*
2. *Salmonella*
3. *Escherichia coli* (Shiga-toksinproducerende)
4. *Yersinia*
5. *Listeria*

Formål og mål

Formålet med projektet "Nye mikrobiologiske metoder" er at sikre slagteri- 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 kødindustri mulighed for at bevare sit forspring i forhold til konkurrenterne. Nye, relevante analysemetoder afprøves for at give bedst mulig sparring til kødindustrien 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 samt mere effektive og tidsbesparende end traditionelle analysemetoder, både hvad angår samlet analysetid og tidsforbrug til håndtering. Et hurtigere analysesvar kan give mulighed for at agere, inden videredispnering 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 perspektivering 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.

MDS-test Afprøvning af 3M MDS på kød og kødprodukter

3M Molecular Detection System (3M MDS) er evalueret med henblik på en indledende test af instrumentet med fokus på hurtig påvisning af *L. monocytogenes* og *Salmonella* i spiket kød og kødprodukter. Der blev udført en række uafhængige test for at opnå en føling med instrumentet og sammenligne med traditionelle dyrkningsmetoder. Der er således ikke blevet kørt systematiske forsøgsrækker, ej heller optimering af prøvehåndtering- og testgennemførelse.

MDS er en kvalitativ detektionsmetode baseret på LAMP, med behandlingstid på <2 timer (uden opformeringstrin). 3M MDS-specifikationerne lever jf. producenten op til kravene om at kunne påvise 1-5 CFU i 25 g færdigprodukt og er AOAC- og AFNOR-certificeret.

Overordnet set viste de gennemførte test, at MDS-metoden kunne påvise *Salmonella* og *Listeria* i de testede niveauer, som svarer til 10 CFU/25 g prøve i fersk hakket kød og forædlede kødprodukter. I det afprøvede test-setup blev der anvendt opformeringstider på 28 timer for *L. monocytogenes* og 10 timer for *Salmonella*. 3M MDS-metoden kunne således påvise *L. monocytogenes* på under 30 timer og *Salmonella* på under 12 timer.

De AOAC- og AFNOR-godkendte protokoller har forholdsvis "brede" tidsrammer for anbefalede opformeringstider (10-30 timer), og det vurderes – med afsæt i de udførte test – at en implementering af metoden vil kræve en forudgående optimering af opformeringstrinnet (særligt tiden), og at opformeringstrinnet valideres for individuelle kødmatricer.

Samlet set opleves MDS-metoden som brugervenlig, men kræver praktisk oplæring for at mindske risikoen for krydskontaminering og signal-artefakter pga. ukorrekt prøvehåndtering. Herudover er det vigtigt, at udstyret samt materialer og pipetter m.m. rengøres grundigt før og efter analyse. Indledende træning i håndtering af udstyret leveres af 3M.

Petrifilm

Petrifilm (EB) til bestemmelse af Enterobacteriaceae er testet overfor standardmetode efter NMKL-metode nr. 144 ved 37°C inkuberet i 24 ± 2 timer. Der er gennemført to mindre tests ifm. præstationsprøvninger.

Testene viste, at kimtal bestemt ved Petrifilm (EB) stemmer overens med kimtal bestemt efter NMKL 144, og at der er en tidsbesparende effekt, idet rendyrkning og verificering ved oxidasetest kan udelades, når der bruges Petrifilm.

Petrifilm (EB) vurderes enkel at pøde og aflæse, såfremt antallet af kolonier ikke overstiger 100, hvilket også er anbefalet af producenten.

Petrifilm (EB) til bestemmelse af Enterobacteriaceae er AFNOR-certificeret.

Bioburden-analyse med filtreringsteknologi

Der er afprøvet en metode efter ISO 11737-1:2018 og DS/EN 14683:2019 til bestemmelse af mikrobiologisk belastning (bioburden) på lavkimholdige produkter som fx fødevarer, svaberprøver (gaze eller vatpinde), behandlet procesvand, emballage og andet fast materiale.

Metoden baseres på filtrering af en vandig opløsning af en prøve efterfulgt af inkubering af filtre på selektive og/eller ikke-selektive substrater. Metoden anvender kommercielt tilgængelige filtre, substrater og vandfiltreringsudstyr.

Idet der analyseres større prøvelumener (fx 100 ml mod 1 ml ved klassisk 10-fold fortynding af prøver), kan der opnås højere følsomhed end traditionelle dyrkningsmedier.

Metoden er implementeret i mikrobiologisk laboratorium som en akkrediteret metode.

Mikrobiomanalyser

Videreudvikling og optimering af mikrobiomanalyser

Der arbejdes fortsat med DNA-baserede analysemetoder til identifikation af mikroorganismer fra fødevarer og produktionssystemer.

Specifikt arbejdes der med mikrobiomanalyse (bakterieidentifikation og -sammensætning) på Illumina sekvenator og Oxford Nanopore Minion. Der arbejdes med udvikling og optimering af både den bioanalytiske pipeline (sampling og DNA-analyse) og prototype af IT-værktøj til behandling af sekventeringsdata (se side 6 ang. CelerSeq).

Test af Flongles

Engangsflowceller (Flongles) til Oxford Nanopore Minion er afprøvet til 16S sekventering. Flongles har mindre kapacitet og arbejder langsommere end traditionelle flowceller, men koster 1/10 af prisen for normale flowceller.

Kvaliteten af selve sekventeringen er god, men udbyttet er på under 50% af den angivende kapacitet, dvs. mængden af sekvensdata er mindre end forventet. Resultatet er en svagere identifikation pga. den mindre data-mængde eller en længere sekventeringstid for at øge mængden af sekvensdata.

Der skal fortsat arbejdes videre med optimering af opsætningen med Flongles.

16S-analyser som field-test på en fødevareraktivitet

I samarbejde med projekterne "Resultatkontrakt F2 Fødevareraktivitet og convenience – value for money" og "DNAPROKON" har DMRI testet 16S-analyser som en "ude af laboratoriet"-test på en fødevareraktivitet.

Formålet var at teste anvendeligheden af det samlede workflow til 16S/ITS-analyse som et nyt fremtidigt at-line værktøj til proceskontrol.

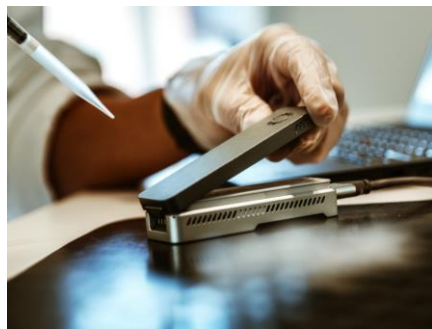
Der blev anvendt Oxford Nanopore Minion sammen med DMRI's pipelines til bioanalyse (sampling og DNA-analyse) og rådataanalyse kombineret med en prototype af et IT-værktøj, CelerSeq (udviklet af DMRI) til behandling og visualisering af sekventeringsdata.

Der blev opnået succesfuld indsamling af svaber- og produktprøver, oprensning af DNA, sekventering og sekvensanalyse samt afrapportering til virksomheden samme dag. De afrapporterede data bragte virksomheden umiddelbar værdi i form af detaljerede oplysninger om kvaliteten af dagens produktion.

Fieldtesten gav desuden stor indsigt i de praktiske problemstillinger, som opstår, når avanceret mikrobiologi udføres udenfor laboratoriet, og DMRI har nu et stærkt fundament for det videre arbejde med optimering af analyseprocessen. Det skal både være lettere og hurtigere at gennemføre analysen.

Perspektiverne ved at anvende DNA-analyser i et fremtidigt at-line processtyringsværktøj er store. Fieldtesten viser, at det er muligt at opnå hurtige (indenfor en arbejdsdag) og detaljerede informationer om produktkvalitet og produktionshygiejne. Der er naturligvis en del optimering af både workflow, teknologi og ikke mindst test hos fødevarer virksomheder, førend et sådant at-line processtyringsværktøj kan bringes i anvendelse.

Resultater og perspektiver ved at anvende de nye redskaber til proceskontrol er desuden formidlet i [Plus Proces—Side 24 \(ipapercms.dk\)](https://www.ipapercms.dk) og DMRI's nyhedsbrev offentliggjort den 30. november 2020 <https://www.teknologisk.dk/projekter/premiere-paa-at-line-sekventering-i-foedevarevirksomhed/42549> samt præsenteret på en tværfaglig konference, TI Fødevarer konference "Fremtidens Fødevarerproduktion" den 19. november 2020 <https://www.teknologisk.dk/projekter/konference-fremtidens-foedevareproduktion/session-1/42581.3>.



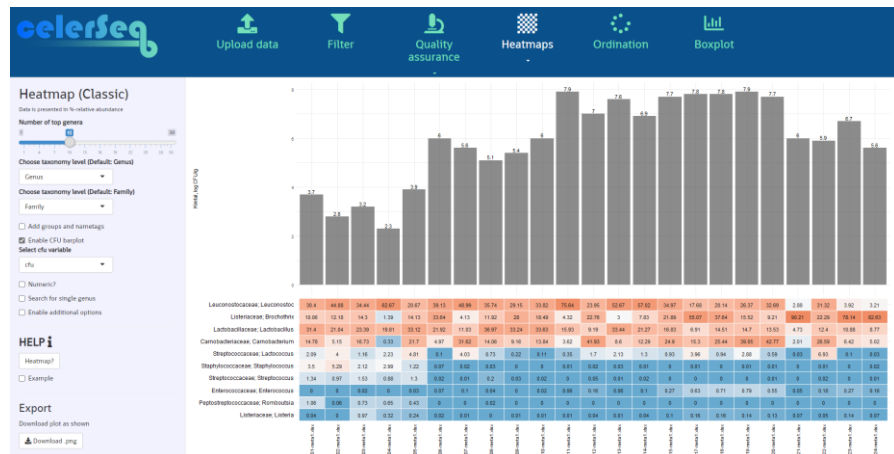
IT-værktøj til brugervenlig behandling af DNA-data

I samarbejde med projektet "Resultatkontrakt F2 Fødevarer kvalitet og convenience – value for money" har DMRI udviklet et software, CelerSeq Version 1.0, til simpel og brugervenlig behandling af data fra mikrobiomanalyse på Illumina sekvenator og Oxford Nanopore Minion samt metadata (fx produktinformation, antal af bakterier o.l.), som overføres til CelerSeq via en Excel-fil.

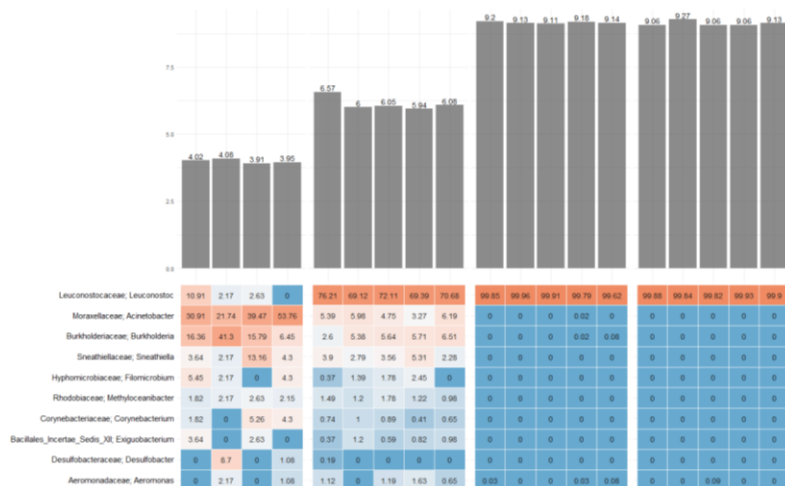
IT-værktøjet har flere forskellige muligheder for kvalitetskontrol og visualisering af data. CelerSeq indeholder et datafiltreringssystem, der tillader brugere at forme eventuelle visualiseringer efter deres behov, se CelerSeq eksempel 1 og 2 nedenfor. I CelerSeq eksempel 1 er identifikationsdata for hver enkelt prøve sammenholdt med metadata i form af total kimtæl (bestemt ved klassiske mikrobiologiske analyser). I CelerSeq eksempel 2 er data desuden sorteret efter "antal lagringsdage" i et lagringsforsøg.

Desuden har CelerSeq eksportfunktioner for alle visualiseringer og data. Der er ydermere udviklet en "pipeline" til at bearbejde rådata (minion fast5/fastq data), som forkorter processen ned til ~60 minutter (med tilstrækkelig computerkraft). En fungerende version kører på TI's lokale netværk og skal i projektet "DNAPROKON) fremover videreudvikles og testes på virksomheder.

CelerSeq Eksempel 1



CelerSeq Eksempel 2



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

Hvert år udgiver EFSA & ECDC en zoonoserapport (The European Union One Health 2019 Zoonoses Report, 2021), der indeholder resultater fra det foregående års overvågning af forskellige zoonoser. I overvågningen deltager 36 lande, 28 lande fra EU og 8 ikke-medlemslande.

[The European Union One Health 2019 Zoonoses Report \(europa.eu\)](https://www.efsa.europa.eu/en/one-health).

Opgørelsen viste følgende top fem patogener, der havde forårsaget sygdomsudbrud i 2019 (i alt 5.175 fødevarerborne udbrud):

1. *Campylobacter* (antal udbrud stabilt i perioden 2015-2019)
2. *Salmonella* (antal udbrud stabilt i perioden 2015-2019)
3. *Escherichia coli* (Shiga-toksinproducerende) (antal udbrud stigende fra 2015)
4. *Yersinia* (antal udbrud stabilt i perioden 2015-2019)
5. *Listeria* (antal udbrud stabilt i perioden 2015-2019 efter en lang periode med stigende tendens)

Der blev i alt rapporteret 5.175 fødevarerborne udbrud, hvilket er et fald på 12,3% i forhold til 2018.

I Danmark blev der i 2019 registreret 51 fødevarerborne sygdomsudbrud med 1.929 tilfælde ifølge DTU Fødevarerinstitutionens årlige zoonoserapport. <https://www.food.dtu.dk/publikationer/sygdomsfremkaldende-mikroorganismer/zoonoser-aarlige-rapporter>.

Størstedelen (63%) af udbruddene var regionale og/eller lokale. 18 udbrud var nationale, hvoraf 4 var internationale. Den hyppigst forekommende kilde til sygdomsudbrud var "restauranter" (29%).

Top fem mikroorganismer, der var årsag til fødevarer- og vandrelaterede sygdomsudbrud i Danmark i 2019 var:

1. *Norovirus* (37,3%)
2. *Clostridium perfringens* (19,6%)
3. *Campylobacter* (17,6%)
4. Andre *Salmonella* serotyper (9,8%)
5. *Salmonella Typhimurium* (5,9%)

NMKL. Nordisk Metodikkomité for Levnedsmidler

Der deltages løbende i NMKL-møder. DMRI deltager med en repræsentant i den mikrobiologiske komité. I arbejdsgruppen revideres eksisterende metoder, og der besluttes, hvilke nye NMKL-metoder der skal udarbejdes. NMKL-årsmødet blev i 2020 afholdt som et virtuelt møde under ledelse af den danske nationalkomité. DMRI deltog ikke ved årsmødet.

NMKL's generalsekretariat skifter placering. Generalsekretariat har holdt til på DTU fra 2016-2020, men skifter nu placering til Havforskningsinstituttet,

Institute of Marine Research, Bergen, Norge pga. ændringer i DTU's strategi og økonomi. NMKL tilgås via hjemmesiden <https://www.nmkl.org/>.

Følgende mikrobiologiske NMKL-metoder er blevet opdateret og publiceret:

- Presumptive *Shigella* spp. Detection in foods (NMKL method No. 151, 2019).
- *Escherichia coli* O157. Detection in food and animal feed (NMKL method No. 164, 2019)

Følgende mikrobiologiske NMKL-metoder er under revision og på vej:

- *Bacillus cereus*-gruppen. Bestemmelse i levnedsmidler (NMKL-metode 67, 2020). *Metoden er pr. 21. december 2020 trukket midlertidigt tilbage og forventes re-publiceret i starten af 2021.*
- Pathogenic *Yersinia enterocolitica*. Detection in food and animal feed and environmental samples (NMKL-metode 117, 2020)

Fornyede certifikater:

- NordVal International Certificate 050 udstedt til CompactDry YM RAPID fra Hyserve er blevet fornyet.
 - CompactDry er et klar til brug, tørmediark, der indeholder et dyrkningsmedium og et koldopløseligt geleringsmiddel. CompactDry YM Rapid-metoden indeholder et kromogent medium og selektive midler til påvisning og tælling af gær og mug efter 3 dages inkubation. Metoden er anvendelig til en bred vifte af fødevarer med en a_w på $> 0,95$. Ligesom referencemetoden er CompactDry YM RAPID ikke beregnet til skimmelsporer eller til varmebestandige skimmelarter.
- NordVal International certificate 049, udstedt til RAPID'Staph fra Bio-Rad, er blevet fornyet. RAPID'Staph er baseret på en optimeret Baird-Parker-formel for tælling af *S. aureus*. Nogle *Staphylococcus* koagulasepositive stammer kan give kolonier med en lille eller uden halo efter 24 timers inkubation. En yderligere inkubation på 24 timer kan være nødvendig for at se en halo. Ved hjælp af RAPID'Staph producerer de typiske staphylococci grå til sorte kolonier, der er skinnende og dækket med en klar halo. Metoden er anvendelig til optælling af koagulasepositive *Staphylococcus* (*Staphylococcus aureus* og andre arter) i en bred vifte af fødevarer.

Udvidede certifikater:

- NordVal International Certificate 037 udstedt til Bio-Rad for "iQ-Check® *Listeria monocytogenes* II" er blevet udvidet. Fremgangsmåden er prøveforberedelse ifølge en af tre mulige protokoller efterfulgt af reeltids-PCR ved anvendelse af fluorescerende prober. Et udvidet studie er udført for protokoller for miljøprøver. Det gælder for Easy llyseringsprotokollen, en ny berigelsesprotokol og en protokol til brug af Free DNA Removal Solution (FDRS) samt en ny applikationsprotokol, APF Fast. NordVal International har konkluderet, at "iQ-Check® *Listeria monocytogenes* II" til detektion af *Listeria monocytogenes* giver resultater, der svarer til

referencemetodens resultater, når den anvendes for bestemmelse i et bredt udvalg af fødevarer og miljøprøver.

Eurolab Danmark

Planlagte møder i 2020 i Eurolab Danmarks netværksgrupper er udsat til foråret 2021. Eurolab Danmarks hjemmeside: www.eurolabdanmark.dk er blevet opdateret, og kundeportalen indeholder et bibliotek med referater fra generalforsamlinger og netværksmøder, præsentationer fra netværksmøder samt andre aktuelle dokumenter i forbindelse med det arbejde, som Eurolab Danmark er involveret i.

Konferencer

På Teknologisk Institut har DMRI og AgroTech afholdt en digital fødevarer-konference "Fremtidens fødevarerproduktion" den 19. november 2020. Konferencen forventes fremadrettet at blive afholdt en gang årligt. DMRI/Fødevarer-sikkerhed bidrog bl.a. med en præsentation om 16S sekventering som et forslag til fremtidens processtyringsværktøj.

<https://www.teknologisk.dk/projekter/konference-fremtidens-foedevareproduktion/udfordringer-og-klimasmarte-loesninger/42581>

DANAK, akkreditering

Laboratoriets DANAK-akkreditering er opretholdt. DANAK har i marts 2020 auditeret det akkrediterede mikrobiologiske laboratorium iht. ISO 17025:2017, og akkrediteringen er herefter overgået til ISO 17025:2017.

Laboratoriet har gennemført de planlagte præstationsprøvninger med tilfredsstillende resultat, og DMRI's kvalitetsstyringssystem er blevet ajourført. Foruden de akkrediterede analysemetoder har laboratoriet et beredskab af specialanalyser, som ikke er akkrediterede.

Laboratoriet har i 2020 implementeret en ny akkrediteret metode til analyse af bioburden for lavkimholdige produkter vha. filtreringsteknik.