

EURL-AP 12. WORKSHOP

Aika: 24.-25.4.2018, Pulawy, Puola

Järjestäjä: EURL-AP (CRA-W)

1. päivä

Tervetuloa ja kokouksen ohjelma / EURL-AP ja NVRI

EU:n eläinproteiini -vertailulaboratorion (EURL-AP) edustajat toivottivat osallistujat tervetulleeksi ja esittelivät kokouksen ohjelman. Kokousta isännöi Puolan kansallinen eläinlääketieteellinen tutkimusinstituutti (National Veterinary Research Institute, NVRI), joka on perustettu vuonna 1945. Myös NVRI:n edustaja toivotti osallistujat tervetulleeksi ja esitteli instituutin toimintaa. Kokoukseen osallistui yhteensä 58 edustajaa 29 maasta.

Puolan kokemukset BSE:stä / Miroslaw Polak, NVRI, Puola

Puolassa BSE-testausta tekee nykyään NVRI:n lisäksi kolme alueellista diagnostista laboratoriota. Vuonna 1996 aloitettiin passiivinen BSE-seuranta, joka laajeni totaaliseen rehukieltoon (feed ban) vuonna 2003. Puolassa eläimestä todettiin BSE edellisen kerran vuonna 2013. Tapausten vähentymisen johdosta myös testattavien eläinten määrää on vähennetty. Vuonna 2015 testattuja eläimiä oli noin 220 000. Puolan BSE-seurantaohjelmaan kuuluu sekä aktiivista että passiivista seurantaa.

Puolan kansallinen referenssilaboratorio ja sen toiminta / Anna Weiner, NVRI, Puola

Prosessoituja eläinproteiineja tutkitaan rehuhygienian osastolla, jolla työskentelee 23 henkilöä. Laboratorio tekee viranomaisnäytteiden lisäksi myös kaupallista testausta. Mikroskopointimenetelmällä tutkitaan vuosittain vajaa 300 rehunäytettä, perinteisellä PCR-menetelmällä hieman yli 300 ja reaaliaika PCR -menetelmällä vajaa 200. Kaikissa neljässä alueellisessa laboratoriossa näytteitä tutkitaan vuosittain yhteensä noin 3000. Lisäksi laboratoriossa on tehty GC-MS-menetelmäkehitystä glyserolitriheptanoaatin (GHT) toteamiseksi mm. liha-luujuuhosta, eläinrasvasta ja maanparannusaineista.

Technical zero -konsepti / EURL-AP

Rehujen reaaliaika PCR -analytiikassa ollaan ottamassa käyttöön ”teknisen nollan” konseptia. Sen mukaan PCR-tulos katsotaan negatiiviseksi, jos DNA-kopioiden määrä ei ylitä tiettyä rajaa. EURL-AP:n laatima, teknisen nollan konseptia esittelevä raportti julkaistiin vuonna 2017. Konsepti odottaa EFSA:n hyväksyntää.

Useat jäsenmaat kritisoivat konseptin nimen olevan käyttötarkoitukseensa sopimaton. Aihe herättikin eniten keskustelua läpi kokouksen. Laboratoriot ovat haluttomia käyttämään termiä nolla, jos näytteessä on kuitenkin todettu DNA-kopioita. Toisaalta termi myös katsottiin laboratorioille merkityksettömäksi, koska valvontaviranomaiset kuitenkin lopulta päättävät toimintarajan. EURL-AP:n edustajat perustelivat nimivalintaa sillä, että ”tekninen nolla” on ollut käytössä GMO-lainsäädännössä jo vuodesta 2011, minkä vuoksi se oli helppo ottaa käyttöön myös eläinproteiineille. Soveltuvampina niminä konseptille pidettiin esimerkiksi ”Required Action Limit”, ”Tolerance Level” tai ”Action Limit”, joista ainakin kaksi ensimmäistä ovat ilmeisesti jo nyt käytössä lainsäädännössä muissa yhteyksissä.

Vuoden 2017 vertailunäytetulokset - mikroskopointi ja PCR / EURL-AP

Vertailunäytekierrokselle osallistui 26 kansallista vertailulaboratoriota ja neljä laboratoriota EU:n ulkopuolisista maista. Tsekin tutkimukset on ulkoistettu Slovakialle. EURL esitteli oikeat tulokset ja näytteiden koostumukset. Vuonna 2017 testattiin ensimmäistä kertaa osallistujien kykyä soveltaa SOP:ia (Standard Operational Protocol) analyysimenetelmän valinnassa. Väärä tulkinta ei tänä vuonna kuitenkaan johtanut hylättyyn suoritukseen. Yhteen näytteistä oli tutkimustarkoituksessa lisätty myös hyönteismateriaalia, mutta sen tunnistamista ei sisällytetty suoritustulosten arviointiin.

Vertailunäytekierroksen mikroskopointiosuudessa kaikki laboratoriot saavuttivat hyväksyttävän tason ja suurin osa suoritui erinomaisesti. Muutamilla laboratorioilla oli ollut ongelmia veripartikkeleiden ja maaeläimen luiden tunnistamisessa. Vain 4/25 laboratoriosta onnistui tunnistamaan hyönteismateriaalin rehun seasta nykyisin käytössä olevalla näytteen konsentroidin- ja mikroskopointimenetelmällä. Evira oli yksi näistä. Todettiin, että laboratoriot tarvitsevat edelleen koulutusta hyönteismateriaalin tunnistamisessa. Lisäksi EURL-AP:n kehittämä kaksoisedimentaatiomenetelmä, joka konsentroi hyönteisfraktion, helpottaa hyönteismateriaalin toteamisessa. Hyönteismateriaalin mikroskooppisesta tunnistamisesta järjestetään kesäkuun alussa kollaboratiivinen tutkimus, johon osallistuminen on vapaaehtoista. Näytemateriaali on vielä harkinnassa. Kollaboratiivisessa tutkimuksessa laboratoriot pääsevät myös kokeilemaan kaksoisedimentaatiota. Todettiin, että hyönteismateriaalille tulisi perustaa oma kategoria maaeläinpartikkelien ja kalapartikkelien rinnalle.

PCR-osuudessa suurin osa laboratorioista suoritui erinomaisesti, mutta neljä hylättiin puuttuvien tulosten takia. Yksi laboratorio sai väärän positiivisen, koska oli käyttänyt väärää DNA-eristysmenetelmää.

Laboratorioista 64 % sovelsi SOP:ia menetelmän valinnassa oikein, mutta 36 % epäonnistui vähintään yhden kohdan noudattamisessa. Eniten ongelmia aiheutti hemoglobiinijauhoa sisältänyt kalanrehunäyte, jolle olisi SOP:ia oikein soveltaen kuulunut tehdä pelkkä märehittäjä-PCR-testaus. Yksi laboratorio sovelsi myös vertailunäytekierroksen näytteisiin SOP:n sääntöä kohdassa 7.3, jonka mukaan märehittäjä-PCR-testauksen saa tehdä vain 1/10 kalanrehunäytteestä, jonka on ilmoitettu sisältävän sallittuja verituotteita. Tästä virisi keskustelu, että kyseisen säännön soveltaminen tulisi harmonisoida jäsenmaiden välillä ja SOP:ia tulisi päivittää tältä osin.

Lajispesifisten lihaspeptidi-PAP:ien tunnistaminen LC-MS/MS:lla / Marta Leporati & Daniela Marchis, Italia

Italian edustajat esittelivät kehittämänsä menetelmää kudospääteainesten lasispesifiseen tunnistamiseen rehusta massaspektrometrialla. Menetelmälle on tarvetta, sillä maidon ja maitotuotteiden lisääminen rehuun on sallittua ja aiheuttaa vääriä positiivisia tuloksia märehittäjä-PCR:llä. Massaspektrometrian avulla on mahdollista erottaa, onko rehun märehittäjä-DNA peräisin kielletystä vai sallitusta materiaalista. Menetelmä pystyy myös erottelemaan eri eläinlajit, joilla on omat tunnistuspeptidinsä.

Siipikarja-PCR -validoinnin tulokset / EURL-AP

Siipikarja-PCR validointi onnistui erinomaisesti ja menetelmä on valmis implementoitavaksi. Plasmidikalibraattorien säilyvyyttä EURL selvittää vielä tarkemmin.

Massaspektrometria-menetelmän käyttö kalanrehulle ja soveltaminen siipikarjanrehulle / EURL-AP

EURL-AP on kehittänyt rutiinianalytiikkaan soveltuvaa multi-target LC MS/MS -menetelmää kalanrehulle ja siipikarjalle. Näytteiden tutkiminen menetelmällä kestää yhteensä yhden työpäivän. Tällä hetkellä tutkimusta keskitetään siipikarjanrehu-menetelmän kehittämiseen, koska lähitulevaisuudessa rehukieltoa olisi tarkoitus löyhentää siten, että siipikarjalle voidaan syöttää sikaperäisiä PAP:ja. Menetelmällä pystytään toteamaan rehusta 0,1 % maitojauhetta, verijauhoa ja hemoglobiinijauhoa sekä 1 % märehittäjä-PAP:a. Ongelmana on

PAP:en heterogeenisyys. Rehujen massaspektrometria-menetelmiä kehitetään tällä hetkellä aktiivisesti useissa maissa ja laboratorioiden edustajat toivoivatkin, että kehitystyötä koordinoitaisiin paremmin päällekkäisen työn vähentämiseksi.

Sekvensointimenetelmien hyödyntäminen hyönteisten tunnistamisessa / EURL-AP

Rehujen hyönteisanalytiikkaan ollaan kehittämässä sekvensointiin perustuvaa menetelmää, jolla voidaan erottaa, kuuluuko rehuun lisätty hyönteisproteiini sallittuihin seitsemään lajiin (2017/893/EC). Vaihtoehtoisia menetelmiä ovat kokogenomisekvensointi, DNA-viivakoodaus ja tiettyjen DNA-alueiden rikastamiseen yhdistetty sekvensointi. Jälkimmäistä menetelmää on hyödynnetty onnistuneesti GMO-analytiikassa ja sitä EURL-AP ilmeisesti piti potentiaalisimpana vaihtoehtona. EURL-AP on ilmeisesti julkaisemassa eri menetelmiä vertailevan raportin.

2. päivä

Ajankohtaista TSE:n torjunnasta ja rehukiellon uudelleenarviointi / Sara Perucho Martinez, DG SANTE

TSE:n torjuntaan tähtävää lainsäädäntöä (TSE-tiekartta) ollaan päivittämässä erityisten riskimateriaalien, rehukiellon laajuuden sekä valvonta- ja seurantaohjelmien osalta.

Erytisten riskimateriaalien listaan on esitetty liennytyksiä pienille märehittäjille.

Rehukieltoa ollaan lieventämässä sallimalla siipikarja-PAP sioille ja sika-PAP siipikarjalle, joista ensimmäiseksi keskitytään jälkimmäisen läpiviemiseen. Liennytysten jälkeisen valvonnan edellyttämät menetelmät märehittäjä-DNA:n ja sika-DNA:n toteamiseksi ovat jo valmiina ja validoitu. Siipikarja-PCR-menetelmä on implementointivaiheessa. Ongelmia aiheuttavat kuitenkin maidon ja sianverituotteiden yleinen käyttö rehuissa, mikä aiheuttaa vääriä positiivisia tuloksia. Ratkaisuksi on esitetty toleranssitason nostamista (technical zero) sekä massaspektrometrian ja ELISAn käyttöä positiivisen signaalin aiheuttaneen materiaalin tunnistamiseksi. Menetelmät eivät kuitenkaan ole vielä valmiina. Laboratorioiden edustajien mukaan kehitystyötä tulisi keskittää ELISAn sijaan massaspektrometriaan, jolla pystytään tunnistamaan sekä maitotuotteiden läsnäolo että erottelemaan eri eläinlajeista peräisin olevat kudostyyppit. Pelkän PCR:n ja ELISAn käyttö kun eivät poissulje sitä, etteikö rehussa voisi olla lisäksi myös kiellettyä PAP:a. Rehukiellon liennytykset ovat tällä hetkellä hyvin korkealla komission prioriteettilistalla.

Lisäksi esitettiin tilannepäivitys CWD:sta. Taudin toteamiseen ei ole vielä validoitua pikatestiä.

Laboratorioiden edustajat tiedustelivat, onko lähitulevaisuudessa tavoitteena löyhentää rehukieltoa hyönteisten osalta, esim sallia muille kuin vain kaloille. Vastauksena oli, että ei lähitulevaisuudessa.

Näytteiden jauhamistutkimus / Jeroen Vancutsem & Ruth Vanhoof, Belgia

Belgian edustaja esitteli tekemäänsä vertailututkimusta eri myllyjen/laitteiden käytöstä näytteiden jauhamiseen PCR-tutkimuksia varten.

EURL-AP:n työsuunnitelma vuodelle 2018 / EURL-AP

EURL jatkaa täydentävien ja vaihtoehtoisten menetelmien kehittämistä. Pääpaino on massaspektrometria-menetelmän kehittämisessä siipikarjanrehulle. Suunnitteilla on myös kaksoisedimentaation validointi hyönteisille. Lisäksi EURL on järjestämässä asiantuntijatapaamista, joissa käsitellään mm. uutta SOP:a (siipikarja) ja massaspektrometria-menetelmien kehittämistä. EURL järjestää myös vertailunäytekierroksen, joka todennäköisesti toteutetaan samaan aikaan kuin viime vuoden kierros.

Seuraava vuosikokous järjestetään keväällä 2019 Sveitsissä.