

8.7.2011
Satu Hakola
TUTO / MIBI / REMI

MATKAKERTOMUS

5th Workshop of the NRLs for Coagulase Positive Staphylococci (Including *Staphylococcus aureus* and their toxins) 15.-17.6.2011

ANSES, Maison-Alfort, France

Kyseessä oli järjestyksessä viides koagulaasipositiivisten stafylokokkien (**CPS**) (mukaan lukien *Staphylococcus aureus* ja toksiinit (**SE**)) kansallisten referenssilaboratorioiden kokous. Kansallista vertailulaboratorioista (NRL) oli 28 osallistujaa, lisäksi osallistujia oli järjestävästä EU:n referenssilaboratoriosta ANSES, Ranska (EURL CPS). Edustettuna oli myös Euroopan komission DG-SANCO sekä EFSA, Parma Italia.

ANSES on avannut uudistetut nettisivunsa osoitteeseen <http://www.ansespro.fr/eurl-staphylococci>

- **Valentina Rizzi (EFSA)** esitteli EFSA:n toimintaa sekä raportoituja ruokamyrkytystapauksia EU:n alueella. Raportoituja stafylokokkienterotoksiinien aiheuttamia ruokamyrkytyksiä on vuonna 2009 ollut 293 tapausta.
- **Heinz Schimmel (IRMM -Institute for Reference Materials and Measurements, Belgia)** piti esityksen sertifioiduista vertailumateriaaleista. Insituutti suunnittelee vertailumateriaalin tuottoa stafylokokkitoksiineista, aloitus SEA:sta. NRL:ien toivottiin osallistuvan vertailumateriaalin testaamiseen (=pitoisuusmäärittäykseen). Edellytyksenä ovat hyväksytyt vertailumittaustulokset ja laboratorion akkreditointi. Tämän hetkinen virallinen toksiinimenetelmä on kvalitatiivinen, joten vaatii joitakin muutoksia tms. tulosten tulkinnassa.
- **Manila Bianchi (NRL-Italia)** kertoi laboratorionsa järjestämästä stafylokokkitoksiinien vertailukierroksesta maansa virallisille laboratorioille, lisäksi myös Malta osallistui. Maito ympätettiin toksiinintuotokannalla, jonka jälkeen maidosta valmistettiin juustoa. Laboratoriot analysoivat toksiinit sekä maidosta että juustosta.
- **Jolanta Rola (NRL-Puola)** esitteli vertailumittauskierroksen koagulaasipositiivisista stafylokokkeista sekä enterotoksiini A:sta. Matriisina oli pakkaskuivattu tuorejuusto.
- **Paul In't Veld (NRL-Hollanti)** oli verrannut EU-RL:n virallista toksiinimenetelmää (ESM) emäskäsittelyn (pH 3,5-4,0) kanssa ja ilman Vidas laitevalmistajan (BioMeriéux) menetelmään, johon ei kuulu emäskäsittelyä eikä dialyysikonsentroidia (TCA saostus sen sijaan). Virhenegatiivisia oli runsaasti eri matriiseilla ja eri toksiineilla emäskäsitellyissä näytteissä sekä Vidaksella että Ridascreenillä analysoituna. Anses totesi, että näytteille edelleen edellytetään tehtävän emäskäsittely virallisen menetelmän mukaisesti. He olivat myös yllättyneitä, ettei BioMeriéuxin menetelmä sisällä emäskäsittelyä, koska ESM-menetelmän muokkausvaiheessa BM oli ollut mukana ja pitänyt emäskäsittelyä tarpeellisena.
- **Majbritt Moos (NRL-Tanska)** kertoi Tanskassa olleesta ruokamyrkytystapauksesta lähteenä kanavoileivät.

- **Leena Räsänen** (DG-Sanco, European Commission) esitteli EU-RL CPS:n evaluoinnin tulokset. Kaikki 26 EU-RL laboratoriota on evaluoitu. EU-RL CPS:n toiminta oli arvioitu riittäväksi. Keskustelu validointivaatimuksista vaihtoehtoisille menetelmille viranomaisvalvontanäytteillä jatkuu. DG-Sancon lakiosastolta on odotettu kannanottoa huhtikuusta 2010. Tulossa olevassa 882/2004 revidoinnissa voisi asiaa selventää ja kansallisella tasolla voisi säätää asiasta. Tarvetta vaihtoehtoisille menetelmille on miltei kaikissa maissa. Leena Räsänen seuraajana jatkaa Rosa Peran.

EU-RL:n esitykset

- Vertailukierroksella käytetyn maitojauhenäytteen homogenisuus- ja stabiilisuustestauksen tulokset esitettiin.
- Koagulaasipositiivisten stafylokokkien menetelmä EN ISO 6888-1(BP-agar) on revidoitavana, vaihtoehtoiseksi varmistusmenetelmäksi on tulossa RPFA-malja koagulaasiputkitestin rinnalle.
- RPFA-maljojen säilyvyyttä koskeva kysely NRL:ille. 4 laboratoriota säilyttää (kylmäsäilytys) valettuja RPFA- maljoja, yksi 1 vko, yksi 2 vkoa, yksi 1 kk ja yksi 2 kk. Yksi laboratorio oli testannut säilyvyyden + 15 °C:ssa -> tämän perusteella EU-RL suosittelee säilytystä enintään 5 vkoa +5±3 °C tai maljavalmistajan ohjeiden mukaisesti mikäli sellaiset on.
- Esiteltiin NRL:ille tehdyn kyselyn tulokset juustojen laboratorionäytteiden koostamisesta. 91 % ottaa laboratorionäytteet standardin EN ISO 8261/EN ISO 6887-5 mukaisesti, 82 % laboratorioista ei käsittele erilaisilla erilaisia juustoja (pehmeät, kovat, syötävä kuori jne.) ja 64 % käyttää näytemääränä 10 g. EU-RL aikoo jatkaa selvitystä laboratorionäytteenotosta ja sen vaikutuksesta tulosten epävarmuuteen.
- Katsaus vaihtoehtoisiin menetelmiin *S. aureuksen* (ja CPS:t) määrittämiselle: miniMPN, real time PCR:t
- Immunokvantitatiivisen PCR:n (iQ-PCR) kehitystyö stafylokokkien enterotoksiineille. Nähdyissä kuvaajissa negatiivisten kontrollien (Cycle Treshold) Ct:t olivat samaa suuruusluokkaa kuin positiivisilla näytteillä, joten ongelmia on.
- SET analysointi massaspektrometrillä, kehitteillä
- Laboratorion sisäisen validoinnin tulokset toksiinimenetelmästä, matriisi muu kuin maitotuotteet analysointi Vidaksella ja Ridascreenillä.
- Laboratorioiden välisen validoinnin tulokset toksiinimenetelmästä, matriisina maitotuotteet, analysointi Ridascreenillä.
- Toksiinigeenien detektointit; PCR se-geeneille, Real-Time PCR (kehitteillä 13 se-geenille). Esiteltiin PCR-vertailukierroksen tulokset (Suomi ei osallistunut). 18 osallistui, 9 hyväksyttävät tulokset.

- Tyypitysvaihtoehtoja; PFGE, spa- tyypitys, MLVA, MLST. Todettiin, että tässä vielä vaiheessa on tarpeetonta järjestää koulusta NRL:ille. Odotetaan, että EU-RL:llä on näkemys mikä tyypitysmenetelmistä on soveltuvin.

EU-RL:n ohjelma vuodelle 2012

- Vertailumittauskierros NRL:ille; CPS maitojauheessa
- Kiinteän matriisin siirrostustapojen vertailu
- Homogeenisuus- ja stabiilisuustestaukset matriisille äyriäiset ja nilviäiset
- Laboratorionäytteenoton vaikutus tulosten epävarmuuteen (näytteiden epähomogeenisuus)
- RPPFA-maljojen säilyvyydestä kysely eri valmistajille
- Kvantitatiivisen iQ-PCR SET-menetelmän kehittäminen
- Kvantitatiivisen CPS menetelmän kehittäminen, real-time PCR
- Täydennysvalidointi toksiinimenetelmällä, Ridascreen ja Vidas muilla kuin maitotuotteilla
- Täydennysvalidointi toksiinimenetelmällä, Ridascreen maitotuotteista

Tulossa

- NRL:ille kysely laboratorionäytteenotosta muulla kuin juustomatriisilla
- Lokakuussa 2011 (vkot 40 & 41) NRL:ille tarjolla koulutusta EU-RL:ssä toksiinimenetelmästä
- CEN mandaatin mukaisesti toksiinimenetelmästä on tulossa standardi, tämä aiheuttaa ison validoinnin, joka jakautuu NRL:ille (maks. 72 näytettä, riippuen osallistujien lkm). Osa materiaalikustannuksista korvataan.
- Laboratorioiden välisen validoinnin loppuun saattaminen, toksiinit kattaaen kaikäntyyppiset elintarvikematriisit Ridascreenillä

Vertailumittauskierrokset

- Marraskuu/ joulukuu 2011 PT SET + Vidas
- 2012 PT CPS maitojauheesta

Muuta

- Tehtyjen validointien perusteella virallinen enterotoksiinimenetelmä tullaan päivittämään; Vidas hyväksytään kaikille matriiseille. Huomioitava, että Vidas validoitu ”muille kuin maitotuotteille” vain kinkulla, mukana ei esim. vihanneksia tai riisiä. Ridascreen sallitaan käyttöön toistaiseksi ja odottaa validoinnin täydentämistä.
- NRL:iltä kysyttiin mahdollisuutta lähettää toksiinintuottokantoja tyypitysmenetelmien testaukseen. Kaikki olivat suostuvaisia. Tästä tulee vielä tarkempaa tietoa minkä tyyppisistä ja mistä eristetyistä kannoista ovat kiinnostuneita. Samalla rakentuisi ”Euroopan *S. aureus* –kantakokoelma”, josta NRL:t voisivat tilata kantoja. Oltiin yhtä mieltä, ettei kokoelmaa avata yleiseen käyttöön, rajataan NRL:iin.
- Kuluneena vuonna EU-RL on analysoinut NRL:ien lähettämiä näytteitä toksiinien suhteen. 15 kpl SEA todettu, 2 kpl SEB todettu ja 2 kpl SED todettu. 1 kpl todettu SEA ja SEB, 3 kpl todettu SEA ja SED, 2 kpl todettu SEA, SEB ja SED. Geenien toteamista oli tehty PCR:llä kahdesta NRL:n näytteestä.