

9.6.2014
Satu Hakola
Elintarviketurvallisuusvirasto Evira
Tutkimus- ja laboratorio-osasto, Elintarvike- ja rehumikrobiologian tutkimusyksikkö

MATKAKERTOMUS

8th Workshop of the NRLs for Coagulase Positive Staphylococci (Including *Staphylococcus aureus* and their toxins) 4.-6.6.2014

ANSES, Maison-Alfort, France

Kyseessä oli järjestyksessä kahdeksas Koagulaasipositiivisten stafylokokkien (**CPS**), mukaan lukien *Staphylococcus aureus* ja stafylokokkien enterotoksiinit (**SET**) -kansallisten referenssilaboratorioiden kokous. Kokouksessa oli 33 edustajaa EU:n tai ehdokasmaiden sekä Norjan kansallisista vertailulaboratorioista (NRL). Lisäksi osallistujia oli Euroopan unionin instituutioista EFSA ja DG SANCO sekä Belgian tutkimuskeskuksesta JRC-IRMM ja EURL-CPS referenssilaboratoriosta (ANSES, Ranska).

Matkakertomukseen on poimittu subjektiivisesti tulkiten kiinnostavimmista esityksistä paloja. Lisätietoja esityksistä ja kokousmateriaali ovat saatavissa Satu Hakolalta.

Agenda of 8th workshop of the NRLs for Coagulase Positive Staphylococci – 4 to 6 June 2014 – ANSES Laboratory for Food Safety, Maisons-Alfort, France

European Union Reference Laboratory for Coagulase Positive Staphylococci - ANSES Laboratory for Food Safety, 23 avenue du Général de Gaulle, 94706 Maisons-Alfort cedex <http://eurl-staphylococci.anses.fr/>

13:00-14:00 Registration

14:00-14:10 Welcome and opening of the workshop
(Laurent LALOUX, Head of the EURL for Coagulase Positive Staphylococci (CPS))

14:10-14:45 Presentation of the workshop
(Bertrand LOMBARD, EURL CPS)

Roll call of participants

14:45-15:00 Revision of the Reg 882/2005 (Martial PLANTADY, DG-SANCO)

15:00-15:30 New website (Adrien ASSERE, EURL CPS)

Outcome of 2013 satisfaction questionnaire
(A. ASSERE)

15:30-15:45 New NRL in Croatia (Diana BRLEK GORSKI, HZJZ, Zagreb, HR-NRL)

16:00-16:20 2012 CPS reporting in animal and food
(Valentina RIZZI, EFSA, Parma, Italy)

16:20-17:30 SFPOs in member states

- in Belgium (Nadine BOTTELDOORN, WIV-ISP, Brussels, BE-NRL)

- in France (Florence GUILLIER, Anses, Maisons-Alfort, FR-NRL)

- In Germany (Alexandra FETSCH, BfR, Berlin, DE-NRL)

- In Poland (Elżbieta MAĆKIWI, PZH, Warsaw, PL-NRL)

9:00-9:15 Purposes of PT trials organised by EURL for NRLs
(B. LOMBARD)

(9:15-11:00)

Introduction (Frédéric AUVRAY, EURL CPS)
Proficiency testing (PT) trials (Alexandra CAUQUIL, EURL CPS)
Results of PT 2013 for CPS enumeration in powdered infant formulae
Organization of PT 2014: for CPS enumeration in prawns
Study of sample types for PT and Comparison of inoculation techniques
Measurement uncertainty (Anne-Laure LARDEUX, EURL CPS)
Impact of test portion size and preparation of initial suspension on measurement uncertainty

S. aureus growth and SEA production in conditions similar to cheese-making (Asa ROSENGREN, SLV, Uppsala, SE-NRL)

(11:30-13:00)

Introduction (F. AUVRAY)
Dispatch of strains and analyses for NRLs (F. AUVRAY)
NRL training: (Noémie VINGADASSALON, EURL CPS)
PFGE (2013)
PCR on *se* genes November 2014
Problems encountered with PFGE (N. VINGADASSALON)
Development of multiplex real-time PCR for detection of *se* genes (N. VINGADASSALON and Angélique ROUSSEAU, EURL CPS)

(14 :00 -16:30)

Introduction (Jacques-Antoine HENNEKINNE, EURL CPS)-5'
Development of certified reference materials, collaboration with JRC/IRMM (Reinhart ZELENY, JRC IRRM, Geel, EC and Yacine NIA, EURL CPS)
Results of 2013 PT trial (Y. NIA and Isabelle MUTEL, EURL CPS)

PT 2014 organisation (Y. NIA)
PT 2013 in Germany (A. FETSCH)
NRL training sessions (Y. NIA)
Support to NRLs and Confirmatory ELISA test for NRLs (Y. NIA)

(9:00-10:45)

Use of mass spectrometry for SE characterisation and quantification in food (Aida ZUBEROVIC-MURATOVIC, SLV, Uppsala, SE-NRL and Mirjana ANDJELKOVIC, WIV-ISP, BE-NRL)
CEN Mandate M/381: standardization of a method for SE detection in food, intra- and inter-lab validation studies (J.-A. HENNEKINNE)
Revision of the European Screening Method (J.-A. HENNEKINNE)

(11:15-12:30)

Proposals of programme of work for 2015 & further (F. AUVRAY and J.-A. HENNEKINNE)
2015 Workshop in Italy dedicated to staphylococcal enterotoxins?
Any other items

Closure

(14:00-15:00)

Visit of the Laboratory for the new workshop participants
optional

DG-SANCO

- Martial Plantady käsitteli revidoitavana olevan valvonta-asetuksen 882/2005 suunniteltuja muutoksia. Uusi versio tulee todennäköisesti 2016 ja siinä on tarkoitus kuvata tarkemmin sekä EURL:ien että NRL:ien tehtävät ja velvollisuudet. Asetus laajenee myös kasvinterveyteen ja kasvien lisäysmateriaaleihin, kasvilaboratorioille annetaan 5 vuoden siirtymäaika akkreditoitumiseen. On mahdollista, että asetuksen muutosten myötä tulee uusi haku ja valinta NRL:ille.

NRL:t

- Nadine Bottelsdoorn (BE) kertoi neljästä ruokamyrkytystapauksesta. Ensimmäinen tapahtui vanhainkodissa, aiheuttaja perunasose, joka oli valmistettu edellisenä päivänä ja lämmitettiin tarjoilupäivänä. Näytteestä eristettiin 270 pmy/g koagulaasipositiivisia stafylokokkeja (CPS), toksiineja ei löydetty Vidas-analyysissa, mutta kannalla todettiin toksiinintuotto toksiineille (SE) A, C ja D. Keittiöhenkilökunnan jäseneltä todettiin CPS, mutta oli eri pulssityyppiä kuin sairastuneilla ja kannalla.
Toisessa tapauksessa grillijuhlien perunasalaatista todettiin toksiineja SEA ja SEC.
Kolmannessa tapauksessa sairastuneita lapsia, aiheuttaja porkkanasose-kala lastenruoka (kotona valmistettu). Lasten hoitajasta eristettiin saman tyyppin CPS.
Neljännen aiheuttajaksi epäillään kanawrappia, CPS 200 pmy/g, tuotteessa ei toksiineja, mutta kannalla toksiinin sea geeni.
- Florence Guillier (FR-NRL) kertoi kahdesta CPS:ien aiheuttamasta ruokamyrkytyksestä. Hääkakun kermasta eristettiin CPS $>10^5$ pmy/g. PCR tyyppitys osoitti kannalla olevan toksiinigeenit sea ja seh. Mahdollisesti oireiden aiheuttaja on SEH, jolle ei tällä hetkellä ole osoitusmenetelmää.
Juoksu- ja pyöräilykilpailussa 42 sairastunutta, toksiinitulokset olivat negatiivisia, kannalla toksiinigeenit sea ja seh. Myös tässä mahdollinen aiheuttaja SEH.
Todettiin, että on tarve kehittää toteamismenetelmiä suuremmalle joukolle toksiineita, SEH ->. Ongelmalliseksi tämän tekee joidenkin toksiinien vaikea = mahdoton saatavuus niiden bioaseksi luokittelun vuoksi. Ilman toksiineita ei voida kehittää menetelmiä.
- Alexandra Fetch (DE-NRL) kertoi kahdesta ristiäisjuhlien CPS-ruokamyrkytyksestä. Toisessa aiheuttaja hotellin jäätelö, näytteissä todettiin erittäin korkeita CPS pitoisuuksia ja myös toksiineita todettiin kolmesta eri jäätelömausta. Toisen aiheuttaja oli perunasalaatti.
- Aida Zuberovic-Muratovic (SE-NRL) piti esityksen toksiinien toteamisesta massaspektrometrialla. Olisi mahdollista toteuttaa Maldi-tofilla, mutta vaatii proteiinin eristyksen SDS-Pagesta sekä trypsinoinnin. Massaspektrometriaan perustuva menetelmä on herkkä ja spesifinen ja yhdessä ajossa on mahdollista todeta useita SET:ja, mutta valitettavasti on hidas ja hyvin työläs.

EURL-CPS esityksiä, vertailumittauskierrosten tulokset

- Käsiteltiin NRL:ille järjestettyjen vertailumittauskierrosten tulokset. Painotettiin taas, että analyysit on suoritettava täsmälleen referenssimenetelmän mukaisesti sekä CPS:ien määrittämisessä että toksiinien toteamisessa ja myös yleisstandardeja näytteiden säilytyksessä ja

esikäsitellyssä on noudatettava. Suomen tulokset hyväksyttiin hieman yllättäen mukaan tilastolliseen käsittelyyn näytteiden säilytyslämpötilan poikkeamasta huolimatta (standardin suositus 3 ± 2 °C, Evirassa käytössä 5 ± 2 °C). Jälleen NRL:ät kyseenalaistivat joidenkin hylkäämiseen johtaneiden menetelmäpoikkeamien merkittävyyden, mutta EURL:n kanta on järkkymätön.

MUUTA

- Keskusteltiin ristiriitaisista tilanteista, joissa menetelmästandardi velvoittaa viljelemään laimennoksista rinnakkaiset maljat (kuten EN ISO 6888-1), vaikka standardi ISO EN 7218 mahdollistaa rinnakkaisten pois jättämisen, mikäli pesäkkeet ovat laskettavissa kahdesta peräkkäisestä laimennoksesta. Todettiin 7218:n ylittävän menetelmästandardit ja rinnakkaiset maljat voidaan jättää pois. Huomautettiin kuitenkin, että tähän sisältyy riski, etteivät saada laskentakelpoisia maljoja kahdelta laimennostasolta, jolloin oltaisiin tarvittu rinnakkaiset maljat.
- EN ISO 6888-1 on revidoitavana. Kuultiin Anne-Laure Lardeuxin (EURL CPS) esitys näytteenoton vaikutuksesta mittausepävarmuuteen kovilla juustoilla. Aineisto näytti, että näytekoon tulisi olla ≥ 100 g, jotta suurta mittausepävarmuutta saataisiin laskemaan. Suositeltiin myös otettavan 1. laimennostasosta nesteosa eikä nesteen ja kiintoaineksen seosta. Käytiin kyselykierros NRL:ien mielipiteestä nostaa näytemäärä 10 g sijasta 25 g:aan tai 100 g:aan. Yleinen mielipide (myös Suomen) oli, että kovilla matriiseilla näytemäärän nosto 25 g:aan on perusteltua, mutta 100 g aiheuttaisi ensimmäisen 1:10 suspension suuren tilavuuden vuoksi käytännön analytiikassa ongelmia. EURL:n selvitettäväksi jäi, miten suhtauduttaisiin alkususpension suhteeseen esim. 1:2, jolloin tilavuus ei kasvaisi niin suureksi. Todettiin, että mikäli koko näyte on homogenisoitavissa, tulee se homogenoida ja ottaa sen jälkeen analysoitava näyte. ISON työryhmä pohtii näytemäärän muutosta ja keskustelee kansallisten laboratorioden kanssa.
ISO 6888-1 menetelmään on tulossa putkikoagulaasitestin rinnalle varmistustestiksi RPFA -malja. RPFA -varmistus ei ole kuitenkaan yhtä toimiva *Staphylococcus aureukselle* eikä raakamaitotuotteille.

TULOSSA 2014

- Marraskuu 2014 CPS vertailumittauskierros NRL:ille, matriisi katkaravut, tarjolla aikaisemmasta poiketen kaksi vaihtoehtoista analyysien aloituspäivää
- Syyskuun jälkeen tulossa päivitetty European Screening Method toksiineille, versio 6

TULOSSA 2015

- Vertailumittauskierros CPS
- Vertailumittauskierros SET, näitä tuloksia käytetään myös CEN mandaatin toteuttamiseen menetelmästandardin luomiseksi
- tarvittaessa NRL:ille koulutusta kantojen tyyppitykseen ja toksiinien analytiikkaan