

Third meeting of the CEN mandate on staphylococcal enterotoxins detection

EURL for CPS, ANSES, Food Safety Laboratory of Maisons-Alfort, Pariisi, Ranska 16.-17.12.2013

Erikoistutkija Annukka Markkula, elintarvike- ja rehumikrobiologian tutkimusyksikkö

Kokous liittyi CEN mandaattiin M/381, jonka päämääränä on tuottaa yhteensä 15 standardisoitua ja validoitua menetelmää elintarvikehygienian alalta. Tämän työryhmän tarkoituksena on luoda standardi stafylokokkienterotoksiinien A-E toteamiseksi elintarvikkeista ruokamyrkytystapauksissa. Tämänkertaiseen, mandaatin viimeiseen kokoukseen osallistui 19 edustajaa 13 maasta kuulemaan laboratorioden välisen, kokousta edeltävällä viikolla päättyneen menetelmävalidointikierroksen tuloksia ja työstämään tulevan menetelmästandardin tekstiä. Menetelmältä vaadittavan detektioherkkysrajan vielä puuttuessa validointikierroksen tulosten analysointi jäi puutteelliseksi. Standarditekstin viimeistelemiseksi kokouksen isäntänä toiminut eurooppalainen referenssilaboratorio pyrkii hankkimaan lisätietoa mm. stafylokokkienterotoksiinien infektiivisestä annoksesta. Lisäksi menetelmän toimivuus toistaiseksi tutkimattomilla näytematriiseilla ja toksiinityypeillä tullaan tutkimaan tulevana kesänä järjestettävällä validointikierroksella. Päivitetty menetelmäversio on tavoitteena saada valmiiksi elokuussa 2014.

Menetelmävalidointikierroksen tuloksista

Validointikierroksen tarkoituksena oli selvittää EU-referenssilaboratorion voimassa olevassa referenssimenetelmässä "Detection of staphylococcal enterotoxins types SEA to SEE in all types of food matrices" versio 5, syyskuu 2010, mainitun dialyysikonsentroidin tarpeellisuus tutkittaessa muita kuin maitopohjaisia elintarvikkeita, joille konsentroidin katsotaan olevan välttämätön mikrobikriteeriasetuksen 1441/2007 perusteella. Lisäksi pyrittiin selvittämään kolmen kaupallisen kitin (Ridascreen SET Total, Vidas SET2 ja Tecra Staph Enterotoxin VIA) detektorajat eri näytematriiselle. Validointikierroksella analysoitiin kaksi matriisia, joista juustonäytteet olivat luontaisesti kontaminoituneet stafylokokkienterotoksiini D:llä (SED) ja kananlihanäytteet oli kontaminoitu enterotoksiini A:lla (SEA). Juustonäytteet tutkittiin referenssimenetelmän mukaisesti dialyysikonsentroitua käyttäen. Lihanäytteet tutkittiin sekä konsentroituna että konsentroituna. Toksiini osoitettiin näyteuutteesta jollain tai joillain kolmesta vaihtoehtoisesta kitistä. Koejärjestelyt on kuvattu tarkemmin edellisen, 28.-29.5.2013 pidetyn kokouksen matkakertomuksessa. Suomi osallistui validointikierrokseen tutkimalla molemmat matriisit kaikkia kolmea kittiä käyttäen.

Järjestävä laboratorio oli varmistanut lähettämiensä näytteiden homogeenisuuden ja juustonäytteiden stabiilisuuden. Lihanäytteiden stabiilisuutta ei ollut kokoukseen mennessä vielä ehditty määrittää. Hyväksyttävistä tuloksista oli lähetänyt yhteensä 21 kierrokseen osallistunutta laboratoriota. Laboratorioista 17 ilmoitti tulokset Ridascreen SET Total-kittiä käyttäen, 16 Vidas

TUTO
MIBI/Annukka Markkula

Pvm/Datum/Date
31.12.2013

SET2 –kittiä käyttäen ja 17 Tecra Staph Enterotoxin VIA –kittiä käyttäen. Pieni osa näytteistä, mm. neljä Suomen näytettä, hylättiin analyysistä näytteen käsittelyssä tapahtuneen virheen vuoksi. Suomen näytteiden hylkäyksen syy oli käsittelyn aikainen liian matala pH. Jokaiselle matriisi-esikäsitteily-kitti –yhdistelmälle oli laskettu sensitiivisyys, spesifisyys ja detektioherkkyysrajat (LOD95 sekä mahdollisuuksien mukaan LOD50). Dialyysikonsentroidi paransi selvästi SEA-toksiinin detektioherkkyttä lihanäytteistä. SEA:n LOD95-arvot konsentroiduissa kananlihauutteissa vaihtelivat 0.093 - <0.1 ng/g. Konsentroiduissa kananlihauutteissa SEA:n LOD95-arvot vaihtelivat välillä 0.063 ng/g - 0.911 ng/g. Konsentroiduista juustonäytteistä tutkitut LOD95-arvot SED:lle olivat <0.2 ng/g – 0.395 ng/g. Menetelmistä herkin oli Vidas ja spesifisin Ridascreen. Vidaksella saatiin yksi (2% juustonäytteistä) ja Tecralla 4 (7% lihanäytteistä) virhepositiivinen tulos. Ridascreen ei antanut virhepositiivisia tuloksia. Tarkempi yhteenveto tuloksista on saatavissa allekirjoittaneelta.

Puheenjohtaja esitti menetelmälle vaadittavaksi detektioherkkyysrajaksi 0,400 ng/g. Työryhmä kuitenkin katsoi, ettei saatavilla ole riittävästi tietoa eri stafylokokkienterotoksiinien infektiivisestä annoksesta herkkyyskriteerien asettamiseksi. Herkkyyskriteerin puuttuessa kierroksen perusteella ei voitu tehdä päätelmiä dialyysikonsentroidin tarpeellisuudesta tai kittien detektioherkkyden riittävydestä.

Tuleva standardi CEN ISO 19020 ja erot referenssilaboratorion voimassa olevaan ohjeeseen ”Detection of staphylococcal enterotoxins types SEA to SEE in all types of food matrices”, versio 5, syyskuu 2010

Standardi tulee kattamaan stafylokokkienterotoksiinien toteamisen ruokamyrkytyspäilynäytteistä. Maidolle ja maitotuotteille standardissa vaaditaan dialyysikonsentroidi mikrobikriteeriasetuksen 1441/2007 mukaisesti. Muille matriiseille konsentroidia ei tässä vaiheessa vaadita. Detektioon käytettyjen kittien tulee olla kaupallisia.

Suosittelava näytemäärä tulee olemaan 25g. Pienemmätkin näytemäärät voidaan kuitenkin analysoida suhteuttamalla myöhemmin käytettävien reagenssien määrä analysoitavan näytteen määrään. Referenssilaboratorion tämänhetkisessä menetelmäohjeessa oleva 12.5 g miniminäytemäärä on peräisin ANSESin tarpeesta saada heille varmistusanalyysiin 2 g konsentraattia.

Homogenisointiastian/pussin huuhteluun käytettävä vesimäärä tullaan rajaamaan (todennäköisesti korkeintaan 10 ml/25g näytettä), jos uutetta ei konsentroida. Huuhteluun voi käyttää lämmintä (37°C) vettä.

pH:ta laskettaessa pH on säädettävä 3,5-4.0:an. Sentrifugoinnin jälkeen pH:n on oltava 3.0-4.5, muuten näyte on hylättävä.

Neutralisaatiossa pH on säädettävä 7.4-7.6:een. Jos pH käy yli 9,0, näyte hylätään. pH:n lyhytaikainen nousu välille 7.6-9,0 ei vaaranna tuloksia ja analyysiä voidaan jatkaa säätämällä pH ohjeen mukaiseen pitoisuuteen suolahapolla.

PEG-liuos valmistetaan liuottamalla jokaista näytettä kohden 30 g PEG-rakeita 70 ml:aan vettä.

TUTO
MIBI/Annukka Markkula

Pvm/Datum/Date
31.12.2013

Konsentroitujen maitotuotteiden huuhtelemiseksi dialyysikalvosta käytetään puskuroitua peptonivettä, jonka pH:n on oltava 7.3 +/-0.2. Liuoksen komponenttien konsentraatioissa saanee olla vaihtelua.

Suolaisten ja makeiden tuotteiden dialyysi poistetaan standardista, koska runsaskaan suola- tai sokeripitoisuus ei häiritse jatkoanalyysissä ja näytteen riittävä konsentroituminen voidaan saavuttaa PEG-liuoksessa.

Standarditekstin valmistelu jäi kesken ja sitä jatkettaneen sähköisesti.

Jatkosuunnitelmat

Työlistalla ollutta, menetelmältä vaadittavaa detektioherkkyysrajaa stafylokokkienterotoksiineille ei katsottu voitavan puutteellisen tiedon takia asettaa. Todettiin että herkkyysrajan määrittämiseksi on saatava lisää tietoa eri toksiinityyppien infektiivisistä annoksista. Puheenjohtaja konsultoi epidemiologeja ja riskinarviointia infektiivisten annosten määrittämiseksi.

Dialyysikonsentroidin kohtalo standardissa muiden kuin maitotuotteiden osalta jätettiin myös odottamaan lausuntoa toksiinien infektiivisistä annoksista ja sen perusteella menetelmälle asetettavasta detektioherkkyysrajasta. Kesäkuussa 2014 järjestettävällä näytekierroksella, jossa on tarkoitus yhdistää menetelmävalidointi ja laboratorioiden pätevyystutkimus, tullaan hankkimaan lisätietoa dialyysikonsentroidin merkityksestä eri matriiseja tutkittaessa. Näytekierroksella on tarkoitus tutkia kolme uutta matriisia (kalavalmiste, leivonnainen ja sellaisenaan syötävä elintarvike) ja toksiinit SEC ja SEE. Alustavan suunnitelman mukaan kierroksella tutkitaan omakustanteisesti 15 näytettä sekä konsentroidimatta että konsentroidimalla yllämainittuja detektiokittejä käyttäen.

Homogenisointiastian huuhtelemiseen käytettävän veden määrän rajaamiseksi standardiin puheenjohtaja pyysi osallistujia seuraamaan paljonko näyteuutteeseen päätyvää huuhteluvettä käytetään tällä hetkellä eri laboratorioissa (uutteen volyymi ennen konsentroitintia tai ennen SET-pitoisuuden mittausta). Huuhteluveden määrä vaikuttaa testin herkkyteen silloin kun uutetta ei konsentroida.

Päivitetty menetelmäversio on tavoitteena lähettää CEN/ISOon elokuussa 2014.

Muuta

Alla olevalta nettisivulta löytyy vapaasti käytettävissä oleva, kyseisen CEN mandaatin statistisen ryhmän luoma taulukkopohja (PODLOD_ver5.xls) LOD50- ja LOD95-arvojen laskemiseksi.

<http://www.wiwiss.fu-berlin.de/fachbereich/vwl/iso/ehemalige/wilrich>