

Mikrobilääkejäämien toteaminen maidosta Delvotest SP-NT -testillä

1 Menetelmän tarkoitus ja soveltamisala

Delvotest SP-NT (DSM Food Specialities, Delft Alankomaat) -testi soveltuu maidossa esiintyvien antibioottijäämien osoittamiseen testin herkkyysalueella. Antibiootilla tarkoitetaan tässä yhteydessä myös synteettisiä mikrobilääkkeitä. Testi on epäspesifinen, eli se osoittaa antibioottien lisäksi myös muiden bakteerien kasvua estävien aineiden läsnäolon. Testi soveltuu lehmän raakamaidon, nestemäisten maitovalmisteiden ja heran testaamiseen mutta ei sovellu hapanmaitovalmisteiden tutkimiseen. Testillä saatu tulos on aina ainoastaan suuntaa-antava eli kertoo sen, että maidossa on jotakin bakteerien kasvua estävää ainetta.

2 Määritelmä ja periaate

Delvotest SP-NT -testi on mikrobiologinen testi. Testiampullissa on tunnettu määrä *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis* C953 -itiöitä, joiden germinoituminen ja kasvu estyy tai hidastuu antibiootin läsnäollessa. Testiorganismi ja -olosuhteet on valittu siten, että testi osoittaa useat utaretulehduksen hoidossa käytettävät antibiootit, mikäli näiden pitoisuus ylittää kyseisille antibiooteille asetetut suurimmat sallitut eli MRL (Maximum Residue Limit) -arvot.

Bacillus stearothermophilus -itiöiden germinoituminen ja kasvu alkaa 64°C:ssa. Bakteerin aineenvaihdunnassa muodostuu happoja, joiden vaikutuksesta alustan pH-indikaattori vaihtaa väriä violetista keltaiseksi. Jos näyte sisältää bakteerin kasvua estäviä aineita, indikaattorin violetti väri säilyy.

Maitonäyte säilytetään jääkapissa testaukseen asti. Ellei testiä voida tehdä saman tai seuraavan päivän aikana, näyte pakastetaan -70 °C:een, jolloin se voidaan tutkia 3 kk sisällä. Rinnakkaisnäyte pakastetaan heti -70 °C ja säilytetään 2 kk tutkimuspäivästä lukien.

3 Mahdolliset virhelähteet ja työturvallisuus

Testi on herkkä säilytyslämpötilan vaihtelulle ja hyvin herkkä ympäristön biosidisille aineille (pesuaine-, desinfektioaine-, säilöntäaine- ja antibioottijäämät ym.).

Pese, huuho ja kuivaa kädet huolellisesti. Älä käytä käsissä tai pöytäpinnalla desinfektioaineita juuri ennen testin suorittamista; voit käyttää kertakäyttöhansikkaita ja pöydällä suojapaperia.

Testituloksen luotettavuus riippuu oleellisesti sekä inkubointiajan pituudesta että inkubointilämpötilasta.

Näytteen korkea bakteeri- tai solupitoisuus voi aiheuttaa virheellisen tuloksen.

Testin antama tulos on vain laadullinen, eikä testille voida ilmoittaa tarkkoja antibioottikohtaisia toteamisrajoja. Testituloksen luotettavuus heikkenee, kun testataan lähellä MRL-arvoja olevia jäämäpitoisuuksia. Utaretulehdusmaitoon erittyvät bakteereiden kasvua estävät aineet voivat aiheuttaa virheellisen positiivisen testituloksen.

Negatiivisen tuloksen antanut näyte voi sisältää estoaineita pitoisuutena, joka on alle menetelmän toteamisrajan.

Ampullit voidaan inkuboida myös vesihauteessa ohjeessa mainitussa lämpötilassa. Tällöin on huolehdittava, ettei kondenssivettä pääse ampullien sisään.

Mikrobiologisessa laboratoriossa työskenneltäessä noudatetaan toimintaohjetta LAB 223.

4 Ympäristöolosuhteet, testaustilat

Tavanomainen laboratorioympäristö

5 Laitteet ja välineet

- 5.1 Sakset
- 5.2 Lämpöhaude (lämpöblokki, vesihaude) tai lämpökaappi $64,0 \pm 0,5$ °C
- 5.3 Finnpiipetti ja kärkiä

6 Kalibrointi

Lämpökaapissa, vesihauteessa olevien lämpömittarien sekä pipettien kalibroinnissa noudatetaan kalibrointiohjelmaa. Lämpöblokin lämpötilan seuranta kuvataan kohdassa 8.

Ampullien herkkyys testataan antibioottien ryhmäedustajilla erän vaihtuessa, kuitenkin vähintään kaksi kertaa vuodessa. Erätestauksen tulokset kirjataan seurantalomakkeeseen.

7 Reagenssit ja elatusaineet

- 7.1 Delvotest SP-NT-ampullipakkaus (DSM, Alankomaat, maahantuoja Labimex oy). Säilytys 4-15 °C
- 7.2 Negatiivinen kontrollinäyte, jossa ei ole antibioottijäämiä
- 7.3 Positiivinen kontrollinäyte, jossa on tunnettua antibioottia niin paljon, että tulos on varmasti positiivinen (työohje LAB 7031 vertailunäytteiden tekemiseksi)
- 7.4 Positiivinen kontrollinäyte, jossa sulfadiatsiinia 0,2 µg/ml
- 7.5 Positiivinen kontrollinäyte, jossa sulfadiatsiinia 0,1 µg/ml (käytetään tarvittaessa uusintatestauksen yhteydessä)

8 Suoritus

Esilämmitä lämpöhaude.

Tarkista ja kirjaa lämpöblokin lämpötila ennen testausta. Lämpötilan mittaamista varten tarvitset jompaankumpaan blokin testausaukoista mahtuvan, kalibroidun lämpömittarin.

Jos käytät lämpöhaudetta, tarkista ja kirjaa aina myös lämpöhauteen veden lämpötila.

Kirjaa testin eränumero.

Leikkaa varoen irti tarvittava määrä ampulleja.

Numeroi ampullit.

Puhkaise ampullit lävistämällä alumiinisuljin esim. ruiskun tylpällä päällä.

Sekoita maitonäytteitä kääntelemällä näyteputkia ylösalaisin.

Siirrosta tutkittavaa maitonäytettä ja kontrollinäytettä 0,1 ml (ota näyte noin 1 cm syvyydeltä) vastaavaan ampulliin agarin päälle.

Rutiinitestauksessa riittää yhden positiivisen kontrollin käyttö (kirjaa antibiootti ja tarvittaessa pitoisuus työlomakkeeseen, esim. pen, sulfa 0,2 µg/ml).

Käytä jokaiselle näytteelle omaa kärkeä.

Inkuboi ampulleja 3 h $64,0 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$. Tulokset luetaan ensimmäisen kerran, kun putkia on inkuboitu 2h 15min ja sen jälkeen aina 15min välein.

Lue tulokset luonnonvalossa valkoista taustaa vasten. Lopulliset tulokset kirjataan heti, kun negatiivinen kontrolliputki on muuttunut keltaiseksi; tätä ajankohtaa kutsutaan ”kontrolliajaksi” (Control Time, CT). Yleensä kontrolliajan saavuttamiseen kuluu 2h 30min – 3h.

3h:n Inkubointiaikaa ei saa ylittää; ellei negatiivinen (antibioottia sisältämätön) kontrolli tällöin ole keltainen ja positiivinen kontrolli violetti (tai harmaan violetti), tutkittujen näytteiden tulokset pitää hylätä, kontrollit tarkastaa ja näytteet tutkia uudestaan.

9 Tulokset

9.1 Tulosten tulkitseminen

Tulos on positiivinen (+), kun näyte sisältää antibioottia (tai muuta bakteerien kasvua estävää ainetta) ja ampullin väri säilyy violetina. Tulos on negatiivinen (-), kun näyte

ei sisällä estoaineita ja ampullin väri muuttuu keltaiseksi. Pienikin värimuutos tarkoittaa epävarmaa tulosta. Tällaisen tuloksen lukee aina vähintään kaksi henkilöä.

Huom. Sulfadiatsiini 0,2 µg/ml -kontrollin tulos tulee olla joko positiivinen tai epävarma positiivinen. Myös sulfadiatsiini 0,2 µg/ml -kontrollia lievemmän värimuutoksen aiheuttanut näyte tulkitaan epävarmaksi positiiviseksi.

Epävarman tai positiivisen tuloksen antanut näyte testataan uudelleen viimeistään seuraavana päivänä siten, että näyte kuumennetaan ennen testausta 80-85°C:ssa 5 minuuttia (kontrollinäytteitä ei kuumenneta).

Uusinnan yhteydessä testataan lisäksi penisilliinikontrollinäyte, negatiivinen kontrollinäyte ja tarvittaessa sulfadiatsiinikontrolli 0,1µg/ml (sen tulos voi olla positiivinen, epävarma tai negatiivinen).

9.2 Tulosten ilmoittaminen

Tulos ilmoitetaan ”Mikrobilääkejäämiä todettiin” tai ”Mikrobilääkejäämiä ei todettu” tai ”Epävarma positiivinen”. Mikäli näyte on jouduttu tutkimaan uudestaan, tuloksena ilmoitetaan uusintatutkimuksen tulos.

Positiivinen ja epävarma positiivinen tulos ilmoitetaan valvontaosastoon heti, kuten vierasaineohjelmassa on sovittu. Epävarman tai positiivisen tuloksen antaneet vierasainevalvontaohjelman näytteet lähetetään tutkittaviksi kemian tutkimusyksikköön niiden antibioottien varalta, joihin on menetelmä. Muiden näytteiden osalta kemiallinen varmennus sovitaan tutkimuksen teettäjän kanssa näytekohtaisesti.

10 Menetelmän validointi

Menetelmälle on tehty käyttöönottovalidointi EELAssa vuonna 2005.

Validointiaineisto ja yhteenveto säilytetään Delvotest -kansiossa.

Yhteenveto menetelmämuutoksesta Delvotest SP > Delvotest SP-NT ja yhteenveto kontrollien testaamisesta lisätty validointiraporttiin 24.1.2007.

Menetelmälle on tehty jatkovalidointi Evirassa vuonna 2010. Jatkovalidointiaineisto ja -raportti säilytetään Delvotest -kansiossa.

11 Laadunvarmistusmenettelyt

Laboratorioiden väliset vertailututkimukset	<input checked="" type="checkbox"/>
Menetelmävertailut	<input type="checkbox"/>
Vertailuaineet tai -kannat	<input type="checkbox"/>
Kontrollinäytteet	<input checked="" type="checkbox"/>
Valvontanäytteet	<input type="checkbox"/>
Saantokokeet/siirrostetut näytteet	<input type="checkbox"/>
Rinnakkaismääritykset	<input type="checkbox"/>
Sokeakokeet/steriiliytestit	<input type="checkbox"/>
Elatusalustojen toimivuuden varmistus	<input type="checkbox"/>
Valvontakortit	<input type="checkbox"/>
Muut menettelyt (kemiallinen varmistus)	<input checked="" type="checkbox"/>

12 Menetelmäviitteet ja poikkeamat

Valmistajan DSM Food Specialities, Delft Alankomaat, testiä koskevat ohjeet.

Kang, JH, Jin, JH, Kondo, F. 2005. False-Positive Outcome and Drug Residue in Milk Samples Over Withdrawal Times. J Dairy Sci 88, 908-913.

Kang, JH, Kondo, F. 2001. Occurrence of False-Positive Results of Inhibitor on Milk Samples Using the Delvotest SP Assay. J Food Prot 64, 1211-1215.

Rapid Test Kits for the Detection of Antibiotics and Sulphonamides in Milk. The Food Safety Authority of Ireland, 2002.

13 Muutokset edelliseen versioon

Lämpötilan seurantaohjeet (kohta 6 ja 8) päivitetty nykykäytäntöä vastaaviksi.
Ohjeen laatija: Katariina Pekkanen