

Mikrobiologisten menetelmien uudistukset vuonna 2017

**Saija Hallanvuo
Erikoistutkija
Mikrobiologian tutkimusyksikkö, Evira**

Taustaa:

- Mikrobiologisten menetelmästandardien ongelma on ollut validoinnin puute (laboratorioiden välinen vertailututkimus)
- EU antoi CEN:lle mandaatin=toimeksiannon uudistaa ja validoida 15 tärkeintä elintarvike –ja rehumikrobiologian menetelmää (vuosien 2010-2017 aikana)
- Menetelmät julkaistaan ISO-standardeina standardointijärjestöjen (ISO ja CEN) yhteistyösopimuksen puitteissa
- CEN eli eurooppalainen standardointijärjestö toimii jäsenjärjestöjensä avulla (mm. suomalainen SFS)
 - Tätä projektia ohjasi Ranskan standardointijärjestö AFNOR
 - Loppuraportti annettu heinäkuussa 2017
 - Projektin uudistetut standardit julkaistu (viimeistään) heinäkuussa 2017

Uudistetut menetelmästandardit:



Sopimus	Aihealue	Standardi	Projektin vetäjä
1	Elintarvikevirukset	EN ISO 15216-1	CEFAS, UK, James Lowther
2	Histamiini (kalastustuotteet)	EN ISO 19343	ANSES, FR, Guillaume Duflos
3	Stafylokkien enterotoksiinit	EN ISO 19020	ANSES, FR, Jacques-Antoine Hennekine (EURL)
4	<i>Bacillus cereus</i> enterotoksiinit (emeettinen)	EN ISO 18465	NVWA, NL, Paul in't Veld
5	<i>Cronobacter spp.</i> osoittaminen	EN ISO 22964	AINIA, ES, Amparo DeBenito
6 & 7	Patogeenisten Vibrioiden osoittaminen	EN ISO 21872	CEFAS, UK, Rachel Hartnell (EURL)
8 & 16	Enterobakteereiden osoittaminen ja määrittäminen	EN ISO 21528-1 & 21528-2	NVWA, NL, Els Biesta
9 & 10	<i>Listeria monocytogenes</i> osoittaminen ja määrittäminen	EN ISO 11290-1 & 11290-2	ANSES, FR & ACTALIA, FR, Nathalie Gnanou-Besse (EURL) Patricia Rollier
11	<i>E. coli</i> 0157 osoittaminen	EN ISO 16654/AMD1	ISS, IT, Stefano Morabito (EURL)
12	<i>Campylobacter spp.</i> osoittaminen	EN ISO 10272-1	NVWA, NL, Ida Jongenburger
13	<i>Campylobacter spp.</i> määrittäminen (pesäkelaskenta)	EN ISO 10272-2	RIVM, NL, Wilma Jacobs-Reitsma
14	<i>Salmonella spp.</i> osoittaminen	EN ISO 6579-1	RIVM, NL, Kirsten Mooijman (EURL)
15	Patogeeninen <i>Yersinia enterocolitica</i>	EN ISO 10273	EVIRA, FI, Saija Hallanvuo

Uudistetut menetelmästandardit:



Sopimus	Aihealue	Standardi	Projektin vetäjä
1	Elintarvikevirukset	EN ISO 15216-1	CEFAS, UK, James Lowther
2	Histamiini (kalastustuotteet)	EN ISO 19343	ANSES, FR, Guillaume Duflos
3	Stafylokkien enterotoksiinit	EN ISO 19020	ANSES, FR, Jacques-Antoine Hennekine (EURL)
4	<i>Bacillus cereus</i> enterotoksiinit (emeettinen)	EN ISO 18465	NVWA, NL, Paul in't Veld
5	<i>Cronobacter spp.</i> osoittaminen	EN ISO 22964	AINIA, ES, Amparo DeBenito
6 & 7	Patogeenisten Vibrioiden osoittaminen	EN ISO 21872	CEFAS, UK, Rachel Hartnell (EURL)
8 & 16	Enterobakteereiden osoittaminen ja määrittäminen	EN ISO 21528-1 & 21528-2	NVWA, NL, Els Biesta
9 & 10	<i>Listeria monocytogenes</i> osoittaminen ja määrittäminen	EN ISO 11290-1 & 11290-2	ANSES, FR & ACTALIA, FR, Nathalie Gnanou-Besse (EURL) Patricia Rollier
11	<i>E. coli</i> 0157 osoittaminen	EN ISO 16654/AMD1	ISS, IT, Stefano Morabito (EURL)
12	<i>Campylobacter spp.</i> osoittaminen	EN ISO 10272-1	NVWA, NL, Ida Jongenburger
13	<i>Campylobacter spp.</i> määrittäminen	EN ISO 10272-2	RIVM, NL, Wilma Jacobs-Reitsma
14	<i>Salmonella spp.</i> osoittaminen	EN ISO 6579-1	RIVM, NL, Kirsten Mooijman (EURL)
15	Patogeeninen <i>Yersinia enterocolitica</i>	EN ISO 10273	EVIRA, FI, Saija Hallanvuo

- Elatusaineiden laadunvarmistusta ohjaava standardi ISO 11133 on julkaistu 2014 (Microbiology of food, animal feed and water – Preparation, production and performance testing of culture media)
 - Sisältää liitetaulukot E ja F testaukseen käytettävistä mikrobikannoista ja kriteereistä

INTERNATIONAL
STANDARD

ISO
11133

First edition
2014-05-15

Microbiology of food, animal feed and water — Preparation, production, storage and performance testing of culture media

Microbiologie des aliments, des aliments pour animaux et de l'eau — Préparation, production, stockage et essais de performance des milieux de culture

Table E.1 — Test microorganisms and performance criteria for culture media commonly used in food microbiology

Selective media for enumeration of microorganisms											
Media ^a	Type ^c	Microorganism	International Standard	Function	Incubation	Control strain	WDCM number ^c	Reference media	Method of control	Criteria	Characteristic reaction
Agar <i>Listeria</i> according to Ottaviani and Agosti ¹	S	<i>Listeria monocytogenes</i>	ISO 11290-2	Productivity	(44 ± 4) h/ (37 ± 1) °C	<i>Listeria monocytogenes</i> 4b	00021 ^b	TSA	Quantitative	$P_R \geq 0,5$	Blue green colonies with opaque halo
						<i>Listeria monocytogenes</i> 1/2a	00109				
				Selectivity		<i>Escherichia coli</i> ²	00012 or 00013	—	Qualitative	Total inhibition (0)	—
				Specificity		<i>Enterococcus faecalis</i> ⁴	00009 or 00087				
						<i>Listeria innocua</i>	00017	—	Qualitative	—	Blue green colonies without opaque halo
Baird-Parker	S	Coagulase-positive staphylococci	ISO 6888-1	Productivity	(24 ± 2) h to (48 ± 2) h/ (37 ± 1) °C	<i>Staphylococcus aureus</i>	00034 ^b 00032	TSA	Quantitative	$P_R \geq 0,5$	Black or grey colonies with clear halo (egg yolk clearing reaction)
				Selectivity	(48 ± 2) h/ (37 ± 1) °C	<i>Escherichia coli</i> ²	00012 00013				

Kaikille menetelmille yhteistä: Elatusaineiden laadunvarmistus

- ISO:ssa sovittua: ISO 11133 luo yleiset puitteet testaamiselle, mutta taulukkojen E ja F materiaali siirretään vähitellen yksittäisiin menetelmästandardeihin
- Kun yksittäinen menetelmästandardi uusitaan ja siihen sisällytetään elatusaineiden laadunvarmistus > noudatettava tätä ohjeistusta taulukkojen E ja F sijaan
- Koskee kaikkia vuonna 2017 uusittuja standardimenetelmiä ja niiden jälkeen julkaistavia
- Huom! Menetelmät sisältävät siis oleellisena osana elatusaineiden laadunvarmistuksen ISO 11133 periaatteiden mukaan

Muutokset standardeissa, esimerkkejä:

Salmonella spp. osoittaminen, ISO 6579:2017

- MSRV: eläinten ulosteet ja alkutuotannon ympäristönäytteet
- MKTT+RVS/MSRV: elintarvikkeet, rehut, elintarvikkeiden tuotantoympäristönäytteet
 - Huom! MSRV tullut mahdolliseksi elintarvikkeille ja rehuille, mutta ei ilman MKTT:tä rinnalla
 - Käyttäjä voi valita RVS:n ja MSRV:n välillä, mutta rinnalla on käytettävä MKTT:tä
- Kun halutaan tutkia myös *Salmonella* Typhi and *Salmonella* Paratyphi
 - standardin liite D, seleniittikystiiniliemi rinnalla
- Maidon erillinen standardi ISO 6785 on yhdistetty uusittuun ISO 6579:een

Muutokset standardeissa, esimerkkejä:



Salmonella spp. osoittaminen, ISO 6579:2017

- Varmistustestit saa tehdä suoraan selektiivisen alustan pesäkkeestä – rinnalla viljelmän puhtauden varmistus ei-selektiivisellä alustalla.
- Alkuspension teon kuvaus löytyy jatkossa ISO 6867 standardisarjasta
- Inkubointilämpötilan vaihteluväli esirikasteella ja ei-selektiivisellä agarilla on muuttunut: $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C} > 34\text{ °C} - 38\text{ °C}$
 - Huom! Ei pitäisi vaikuttaa akkreditoitujen laboratorioden inkubaattorien toleransseihin > tässä yhteydessä $34\text{ °C} - 38\text{ °C}$ ei ole sama kuin $36 \pm 2\text{ °C}$
- Varmistustestauksessa: yhden rikastus/alusta-yhdistelmän voi varmistaa kerrallaan. Jos jää negatiiviseksi, varmistetaan 4 tyypillistä lisäpesäkettä (jos on) eri alustayhdistelmiltä
 - Muuttuneet vapaaehtoisiksi: β -galactosidaasi- ja indolitestaus
 - Poistunut: VP-testaus

Muutokset standardeissa, esimerkkejä:



Campylobacter spp. osoittaminen, EN ISO 10272-1:2017

- Alkutuotannon näytteet on lisätty sovellusalueeseen:
 - Sovellusalue: elintarvikkeet, rehut, elintarvike- ja rehutuotannon ympäristönäytteet, alkutuotannon näytteet (eläinuloste-, pöly- ja sivelynäytteet)
 - Menetelmään on lisätty toinen rikastusliemi (Preston)
 - estää ongelmaa toteamisessa jos/kun taustamikrobisto on resistentti kolmannen polven β -laktaameille (kefoperatsoni Bolton -liemessä)
 - Menetelmään on lisätty suoraviljely mCCDA –agarille
- Osoitusmenetelmä jakautuu kolmeen osaan:
- A. Rikastusviljely näytteistä, joissa vähäisiä määriä kampylobakteereita ja taustakasvua ja/tai stressattuja kampylobakteerisoluja: Bolton –liemi
 - B. Rikastusviljely näytteistä, joissa vähäisiä määriä kampylobakteereita ja paljon taustakasvua: Preston –liemi
 - C. Suoraviljely näytteistä, joissa paljon kampylobakteereita

Muutokset standardeissa, esimerkkejä:



Campylobacter spp. osoittaminen, EN ISO 10272-1:2017

- Menetelmästä on poistunut mahdollisuus inkubointiin ilman mikroaerobisia olosuhteita (tavallinen inkubaattori) jos suljetut astiat sisältävät vain vähän ilmatilaa > mikroaerobiset olosuhteet pakollisia
- Varmistustestauksessa kasvun testaus: aerobinen kasvu 25 °C:ssa (mikroaerobinen kasvu 25 °C ja aerobinen kasvu 41,5 °C poistuneet)
- PCR testit, serologinen varmistus, matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometer (MALDI-TOF-MS) analyysi sallitaan jos verifioitu (viittaus ISO 7218)
- Toimivuustiedot (validointitulokset) lisätty liitteeseen C.

Muutokset standardeissa, esimerkkejä:

Campylobacter spp. määrittäminen (pesäkelaskenta),

EN ISO 10272-2:2017



- Alkutuotannon näytteet on lisätty sovellusalueeseen
- Peräkkäisiä laimennoksia maljatessa maljauksen voi tehdä ilman rinnakkaisia maljoja (yhdenmukaisuus ISO 7218 kanssa)
- Varmistustestauksessa kasvun testaus: aerobinen kasvu 25 °C:ssa (mikroaerobinen kasvu 25 °C ja aerobinen kasvu 41,5 °C poistuneet)
- Toimivuustiedot (validointitulokset) lisätty liitteeseen C

Listeria monocytogenes osoittaminen, EN ISO 11290-1



- Sovellusalueeseen lisätty *Listeria spp.*
- Rikastus puoli-Fraserissa: inkubointi 25 h \pm 1 h.
- Rikastus Fraserissa: inkubointi 24 h \pm 2 h
- Rikasteliemet voidaan säilyttää jääkaappilämpötilassa ennen siirrostamista max 72 h ajan
- Selektiiviset agarit voidaan säilyttää jääkaappilämpötilassa max 2 päivän ajan ennen lukua
- Varmistustestauksessa mikroskopointi on valinnainen jos eristysagarilla on mahdollista erotella patogeeninen/ei-patogeenisista
- CAMP testi ja katalaasitesti muuttuneet valinnaisiksi
- Toimivuustiedot (validointitulokset) lisätty liitteeseen F

Listeria monocytogenes määrittäminen, EN ISO 11290-2

- Sovellusalueeseen lisätty *Listeria spp.*
- Alkuspension voi tehdä puskuroituun peptoniveteen (BPW), puoli-Fraseriin (supplementtien kanssa tai ilman), laimennosliuoksissa viitataan ISO 6887 (kaikki osat).
- Elvytyssteppi on poistettu
- Varmistustestauksessa mikroskopointi, CAMP testi ja katalaasitesti muuttuneet valinnaisiksi
- Toimivuustiedot (validointitulokset) lisätty liitteeseen E

Muutokset standardeissa, esimerkkejä:

Enterobakteereiden määrittäminen pesäkelaskennalla ISO 21528-2

- Varmistustesteissä:
 - Oksidaasitesti > kuten ennenkin
 - Glukoositestaus korvattu glukoosi OF –fermentaatiotestillä
- Toistettavuus- ja uusittavuusrajat lisätty ohjaamaan laboratorioden suoriutumista
- Validointitulokset: Annex B lisätty
- Elatusaineiden laadunvarmistus lisätty

Osa ISO 21528-1: osoittaminen ja MPN määrittäminen (kun pesäkeluvun oletetaan olevan < 100 pmy/g tai ml)

Muutokset standardeissa, esimerkkejä:

Enterobakteereiden määrittäminen pesäkelaskennalla ISO 21528-2

Table A.1 — Performance criteria of violet red bile glucose (VRBG) agar

Medium	Microorganisms	Function	Incubation	Control strains	WDCM ^a number	Reference media	Method of control	Criteria ^g	Characteristic reactions
VRBG (Solid medium)	<i>Enterobacteriaceae</i>	Productivity	(24 ± 2) h / (37 ± 1) °C	<i>Escherichia coli</i>	00012 ^b 00013	TSA ^e	Quantitative	$P_R^f \geq 0,5$	Pink to red colonies with or without precipitation halo
				<i>Salmonella</i> Typhimurium ^{c,d}	00031				
		Selectivity		<i>Salmonella</i> Enteritidis ^d	00030		Qualitative	Total inhibition (0)	
				<i>Enterococcus faecalis</i> ^d	00009 or 00087		Qualitative	Total inhibition (0)	

^a Refer to the reference strain catalogue at www.wfcc.info for information on culture collection strain numbers and contact details; WDCM: World Data Centre for Microorganisms.

^b Strain to be used by the user laboratory (minimum).

^c Some national restrictions and directions may require the use of a different serovar. Make reference to national requirements relating to the choice of *Salmonella* serovars.

^d Strain free of choice; one of the strains has to be used as a minimum.

^e TSA = tryptone soya agar.

^f PR = productivity ratio.

^g Growth/turbidity is categorized as 0: no growth/no turbidity; 1: weak growth/slight turbidity; 2: growth/good turbidity.