

## 7<sup>th</sup> Annual Workshop of the National Reference laboratories for *E. coli* in the EU / 8. – 9.11.2012

Alfredo Caprioli (EU RL VTEC) toivotti osallistujat tervetulleeksi ja esitteli kansallisten vertailulaboratorioiden tilannetta ja kokouksen ohjelmaa. Kansallisia vertailulaboratorioita (NRL) on nyt 34 (27 EU-maasta) ja 8 laboratoriota EU:n ulkopuolisista maista. Paikalla tilaisuudessa oli 34 NRL:ää (32 näistä oli EU maista).

Ohessa kokouksen aiheet linkitettyinä otsikoittain:

- [The perspectives of whole genome sequencing in the study of VTEC infections \(Katrine Grimstrup Joensen\)](#)
- [Using new generation sequencing to develop next generation typing for VTEC O157 \(Tim Dallman, NRL UK\)](#)
- [A pathogenicity island coding the SubAB is frequent in LEE –negative STEC of human and ovine origin \(Valeria Michelacci, NRL Italy\)](#)
- [A large outbreak of sorbitol fermenting VTEC O157 associated with unpasteurized milk and contact with cattle in Finland \(Saija Hallanvuo, NRL Finland\)](#)
- [Development of databases for molecular testing of foodborne pathogens in view of outbreak preparedness \(Kris de Smet, DG Sanco\)](#)
- [The ECDC FWD pilot project for molecular typing of human strains \(Angela Lahuerta-Marin, ECDC\)](#)
- [The EFSA program for molecular typing of food and animal strains \(Pierre-Alexandre Beloeil, EFSA\)](#)
- [Molecular typing of VTEC: The role of the network of RLs for \*E. coli\* \(Stefano Morabito, EU-RL\)](#)
- [VTEC and the environment \(Eelco Franz\)](#)
- [E. coli other than VTEC: which role in food safety? \(Flemming Scheutz\)](#)
- [A foodborne outbreak of entero-invasive \*E. coli\* \(EIEC\) infection in Italy \(Martina Escher, NRL Italy\)](#)
- [Detection methods for VTEC: update and perspectives in the EU and USA \(Stefano Morabito, EU-RL\)](#)
- [The collaborative study for the validation of the ISO 16654 method \(Stefano Morabito, EU-RL\)](#)
- [Results of the 8th PT on the detection of VTEC in water \(Rosangela Tozzoli, EU-RL\)](#)
- [Prevalence of the 7 major serogroups of VTEC in fresh minced beef in France \(Estelle Loukiadis, NRL France\)](#)
- [VTEC in raw cow's milk in Denmark \(Jeppe Boel, NRL Denmark\)](#)
- [VTEC in raw cow's milk in Italy \(Antonella Maugliani, NRL Italy\)](#)
- [Towards a control program for VTEC O157 in Swedish cattle \(Anna Aspan, NRL Sweden, SVA\)](#)
- [A local outbreak of infections with VTEC O157 associated with the consumption of raw meat products \(Sarah Denayer, NRL Belgium, PHI\)](#)
- [The activities of the NRL at the National Food Institute \(Pavle Sekulovski, NRL Macedonia\)](#)
- [Developments in the legislation on food hygiene related with VTEC \(Kris De Smet, DG Sanco\)](#)
- [PTs on VTEC detection and typing: results of a 6-years' experience \(Rosangela Tozzoli, EU-RL\)](#)
- [The upcoming PTs: PT 9 on the detection of VTEC in seeds and PT 10 on strain typing \(Rosangela Tozzoli, EU-RL\)](#)
- [Organization of PTs by the NRLs: the results of an inventory \(Stefano Morabito, EU-RL\)](#)

### The perspectives of whole genome sequencing in the study of VTEC infections (Katrine Grimstrup Joensen)

DTU:ssa Tanskassa aloitettu hanke genomisen sekvenssiedon järjestämisestä ja prosessoinnista (Center for Genomic Epidemiology). Työkaluna sekvenssaattori, joka pystyy genomiseen sekvensointiin 18h:ssa. Pyrkivät tekemään reaaliaikaista kokogenomisekvenssointia SSI:n (Statens Serum Institute) lähettämistä kannoista. Tuloksia pyritään vertaamaan SSI:n perinteisten tyypitysmenetelmien kanssa (työkaluina ResFinder, MLST finder, snp Tree). Hankkeessa rakennetaan VirulenceFinder tietopankkia tyypitystuloksista. Esim. parasta aikaa Tanskassa meneillään olevasta VTEC epidemiasta on pystytty analysoimaan kantoja ja saatu

identtisiä tuloksia useiden tyyppitysmenetelmien metatiedolla. Yhden kannan käsittelyn materiaalikustannukset ovat noin 500 euroa.

### **Using new generation sequencing to develop next generation typing for VTEC O157 (Tim Dallman, NRL UK)**

Uusia tekniikoita testattiin olympialaisiin liittyvissä valmiusharjoituksissa. Kolmessa tapausharjoituksessa virulentit VTEC –kannat pystyttiin tyyppittämään ja tunnistamaan vuorokaudessa. Menetelmiä on testattu myös epidemioiden selvittämisen yhteydessä. Tapauksissa on yksittäisten emästen muuntelun perusteella pystytty jäljittämään kantojen ja niissä tapahtuneiden muutosten historiaa lyhyellä aikavälillä. HPA selvittää parhaillaan perinteisten molekyylytitysmenetelmien korvaamista uusilla sekvensointimenetelmillä. Haasteena ovat mm. syntyvän tiedon käsittelytavat ja kansainvälinen harmonointi.

### **A pathogenicity island coding the SubAB is frequent in LEE –negative STEC of human and ovine origin (Valeria Michelacci, NRL Italy)**

Lähtökohtana oli selvittää mikä on LEE –negatiivisten kantojen patogeenisuuden takana. Työ keskittyi subtiilaasi -sytotoksiinia koodaavien alueiden tutkimiseen. Uuden SubAB-variantin, SubAB<sub>2</sub>, geenien todettiin yleensä esiintyvän patogeenisuusaarekkeessa SE-PAI (subtilase encoding PAI). SE-PAI:ssa on myös geenit integraasille, *shiA* (attenuation of shigella induced inflammation reaction) ja *tia* (invasion determinant in ETEC). Toisin kuin alkuperäinen *subAB*, uusi variantti ei sijaitse plasmidissa pO113. *subAB* alleelien esiintymistä kartoittavassa tutkimuksessa tutkittiin 123 LEE –negatiivista VTEC –kantaa ja lisäksi myös kantoja SSI:n kantakokoelmasta Tanskasta. Suurimmalla osalla kannoista löytyi *subAB* alleelivariantteja, nautakannoista 17 %, lammaskannoista 91 % (98 % uutta *subAB*<sub>2</sub>-varianttia). Sytotoksinen aktiivisuus on mahdollisesti synerginen verotoksiinin aktiivisuuden kanssa. Näillä kannoilla saattaa olla kolonisointimekanismi, joka korvaa puuttuvan LEE:n.

### **A large outbreak of sorbitol fermenting VTEC O157 associated with unpasteurized milk and contact with cattle in Finland (Saija Hallanvuo, NRL Finland)**

Esittelin viime kesän EHEC –epidemian selvitystyötä. Vaikuttaa siltä, että ainoastaan Ranskassa on onnistuttu aiemmin yhdistämään naudat tähän bakteerikantaan (sorbitoliposiitivinen VTEC O157) naudanlihaan liittyneen epidemian yhteydessä. Jälkeenpäin käydyssä keskustelussa Ranskan NRL:n edustajan kanssa bakteerikannoilla vaikutti olevan paljon yhtäläisyyksiä. Ranskalaisilla on tarkoitus selvittää ko kantojen alkuperää (myös saksalaista alkuperää olevien kantojen osalta). He ovat kiinnostuneita tekemään tutkimusyhteistyötä kanssamme.

### **Development of databases for molecular testing of foodborne pathogens in view of outbreak preparedness (Kris de Smet, DG Sanco)**

Epidemiologiset tutkimukset ovat pakollisia jäsenvaltioille zoonosien monitorointidirektiivin perusteella (2003/99/EC). Olemassa olevia verkostoja on jo paljon, kuten myös hälytysjärjestelmiä (RASFF ja EWRS). Molekyylytitystietokantojen rakentamisessa EU komissio, EFSA ja ECDC tekevät tiivistä yhteistyötä, mutta kansallisten vertailulaboratorioiden mukanaolo on tärkeää. Tavoitteena on perustaa kaksi tietokantaa EFSA:lle (elintarvike-, rehu- ja eläinkannat) ja ECDC:lle (humaanikannat). EU-RL:n tehtävänä on huolehtia tietojen yhteensopivuudesta humaanipuolen kanssa ja toimia kuraattorina tyyppitystiedon keräämisessä. Tietojen omistamissuhde on selvä: kuka maksaa tutkimuksen, omistaa tiedon. Jos tyyppitystieto syntyy EU – budjetoidussa hankkeessa, komissio omistaa tiedon. Jos tieto on saatu kansallisessa valvontaohjelmassa tai virallisessa näytteenotossa, jäsenvaltio omistaa tiedon.

## **The ECDC FWD pilot project for molecular typing of human strains (Angela La- huerta-Marin, ECDC)**

Tavoitteena on päästä havaitsemaan hajanaisia kansainvälisiä epidemioita ja jäljittää niiden alkuperä mahdollisimman tarkasti. Esiteltiin Tessa 3.0 molecular typing pilot -ohjelmaa, esimerkikohteina Salmonella, VTEC ja Listeria (muutkin bakteerit tulevat kyseeseen). ECDC toimii kuraattorina ja tiedon ryhmittelijänä. Ohjelmassa voidaan yhdistää laboratoriosta tulevia taustatietoja molekyyli-epidemiologiseen tietoon. Tietoturvallisuuden takaa tietoja syöttävien henkilöiden nimeämiskäytännöt. Esiteltiin pilottiprojektin aikatavoitteita tälle ja ensi vuodelle.

## **The EFSA program for molecular typing of food and animal strains (Pierre- Alexandre Beloeil, EFSA)**

EFSA:lla on samat tavoitteet tyypitysjärjestelmän suhteen kuin ECDC:llä ja erityisesti vertailu humaanikan-  
toihin tarkalla erottelukyvyllä. EFSA ja ECDC eivät ole vielä päättäneet tarkasta muodosta Euroopasta kerä-  
tyn datan keskinäiseen vertailuun. EFSA ei ole päättänyt kuka huolehtii tiedon validoinnista ja valtuutetusta  
lähettämisestä kansallisella tasolla. EFSA:n mukaan ei ole päätetty osallistuvatko EU-RL:t tietojen analysoin-  
tiin vai lähettävätkö kansalliset vertailulaboratoriot tiedot suoraan EFSA:n tietovarantoon. EU-RL:t toimivat  
järjestelmässä kuraattoreina huolehtimassa tyypitystiedon teknisestä kelpoisuudesta. Tarkoituksena on sisäl-  
lyttää järjestelmään Salmonella, VTEC and Listeria ja tekniikoista PFGE ja MLVA (*S.Typhimurium*) ainakin  
aluksi. Suunnitelmissa on että NRL:t lähettävät sekä kuvailevaa että tyypitystietoa. Kuvaileva tieto säilyy  
EFSA:ssa, ainoastaan tyypitystietoja vertaillaan ECDC:n kanssa. Kuvaileva tieto pitää sisällään eristetyn kan-  
nan eristysmaan, elintarvike/eläintiedon (mistä eristetty), alueen, näytteenottoajan, ym. EFSA perustaa asi-  
antuntijaryhmän (myös NRL:t edustettuina) suunnittelemaan molekyylytyypityksen tietovarantoa käytännös-  
sä. EFSA, ECDC, EU-RL:t ja NRL:t pyrkivät muodostamaan tiiviin yhteistyön tyypitystietokantojen osalta  
yhteisillä sopimuksilla laajemmista kokonaisuuksista ja yksityiskohdista.

## **Molecular typing of VTEC: The role of the network of RLs for *E. coli* (Stefano Mo- rabito, EU-RL)**

EU-RL teki taannon kyselyn molekyylytyypitysmenetelmien käyttöasteesta NRL:ssä. Kaikki NRL:t vastasivat  
kyselyyn (100%). Laboratorioista 23/32 raportoi että heillä on PFGE tyypitysmahdollisuus, mutta ainoastaan  
10 kertoi että osaavat menetelmän hyvin (6:lla oli Pulsenet laadunvarmistuskierrokselta saatu sertifikaatti, ml.  
Evira). Suurin osa laboratorioiden analysoimista kannoista on O157 –serotyyppejä, seuraavina O26, O103,  
O145 ja O111. Virulenssityypityksessä kaikki kyselyyn vastanneet kertoivat tutkivansa eae -geeniä ja  
28(87,5%) laboratorioita kertoi tekevänsä vtx –geenien alatyypitystä. Seuraava tyypityskierros on keväällä  
2013 ja se katsotaan pakolliseksi niille laboratorioille jotka raportoivat hyvää kokemusta tyypitysmenetelmistä  
(Evira mukaan lukien). Ensimmäisellä kierroksella laboratoriot palauttavat tiff-kuvat ja ne analysoidaan yksit-  
tään EU-RL:ssä, eli keskitytään kuvien/profiilien laatuun. Jos laboratorioilla havaitaan vaikeuksia, annetaan  
neuvoja, järjestetään koulutusta tai tullaan paikanpäälle käymään (EU-RL:n vierailut NRL:ssä käynnistetty  
2012).

## **VTEC and the environment (Eelco Franz)**

Ympäristön rooli VTEC infektioiden lähteenä on korostunut viime vuosina. Aiemmissa tutkimuksissa on to-  
dettu että esim. kävely laitumella on suurempi riskitekijä VTEC infektiolle kuin hampurilaisten syöminen. Ti-  
lastojen perusteella voisi olettaa että kasvisten välittämät VTEC infektiot ovat lisääntyneet. Vihanneksissa  
on hyvin pieniä VTEC määriä, mutta niitä syödään sellaisenaan ja suuria määriä kerralla. Pesu- ja dekonta-  
minaatiovaiheet voivat olla tehottomia koska bakteerit voivat olla tiukasti kiinni kasvin pinnassa tai esiintyä  
syvemmillä kasvissa. Pilkkomisvaiheet vapauttavat bakteerille lisää ravinteita ja laajentavat kontaminaatio-  
pintaa. *E. coli*n kasvuvaiheissa on erotettavissa isäntäriippuvainen vaihe (esim. naudassa) ja isännästä riip-  
pumaton vaihe (ympäristössä). Ympäristössä bakteerin kasvu taittuu ja puhutaan enemmän selviytymisestä

kuin varsinaisesta lisääntymisestä. Ulosteeassa vähäinen kuitujen määrä ja samalla yksinkertaisten sokerien runsas määrä takaavat parhaat edellytykset *E. coli*n kasvulle (rehun tyyppi vaikuttaa). *E. coli* O157 selviää parhaiten laimennetuissa maanäytteissä ja maanäytteissä, joissa on vähän kilpailevia kantoja. Virulenssitekijöiden esiintymisessä ei havaittu tutkimuksessa merkittäviä eroja niiden O157 kantojen välillä jotka selvisivät maaperässä vähän aikaa tai kauan aikaa (vaihteluväli 47 – n. 200 päivää). Eroja ryhmien välillä havaittiin kuitenkin ravinnon käytössä, pitkään säilyvät pystyivät käyttämään paremmin rasvahappoja. Säilyminen riippuu rpoS stressinsietojärjestelmästä. Geenialueen suhteen mutantit ovat herkempiä esim. pH:n vaihtelun ja UV-säteilyn aiheuttamalle stressille, mikä vaikeuttaa niiden selviytymistä ympäristössä yhtä kauan kuin villityypin kantojen. Esim. naudoissa stressin vastustamiseen tarvittavat geenit ovat yleisempiä kuin ihmiseläimistöissä. Tutkimuksissa on myös havaittu että kasveissa esiintyvillä *E. coli* –kannoilla oli muita korkeammat RpoS stressitekijätasot mikä viittaa parempaan selviytymiseen ympäristössä. Vuoden 2011 laajan ituepidemian aiheuttaneella EHEC O104 –kannalla oli muita patogeenisiä *E. coli* -kantoja tehokkaampi ravinteiden käyttö ja se ryhmittyi tutkimuksissa pitkäänselviytyvien kantojen kanssa. Kanta oli poikkeuksellinen tässäkin suhteessa enteroaggregatiiviseksi kannaksi. Hollantilaisessa aineistossa oli selvä ero metabolian osalta ihmisistä ja naudoista eristettyjen kantojen välillä. Puhuja korosti vielä, että lisääntyvän sekvenssitiedon keräyksessä ei ole syytä unohtaa fenotyyppisiä ominaisuuksia ja bakteerien metaboliaa.

### ***E. coli* other than VTEC: which role in food safety? (Flemming Scheutz)**

Esittelyn kohteena olivat EPEC, A/ECC, ETEC, EIEC, EAggEC, DAEC (pois lukien VTEC). EPEC:t jaetaan tyyppillisiin ja epätyypillisiin bfp/EAF:n mukaan unohtamatta serotyypitystä luokittelussa. Luokittelulla, joka ottaa huomioon uudet mahdolliset virulenssigeenialueet, on pystytty havaitsemaan merkittäviä esiintyvyyseroja potilastapausten ja verrokkien välillä, vaikka perinteisellä EPEC luokittelulla eroa ei ole pystytty aiemmin osoittamaan. Mahdolliset diagnostiset virulenssimarkkerit on siis pystytty tunnistamaan. EIEC ryhmässä noin puolet seroryhmistä on yhteisiä Shigellan kanssa ja keskusteluja Shigella - ja *E. coli* –bakteerien luokittelun uudistamisesta on käyty. Enteroaggregatiiviset *E. coli*t (EAggEC) puolestaan ovat erittäin heterogeeninen ryhmä. Suolistokolien lisäksi mukaan tulevat vielä ekstraintestinaaliset *E. coli*t (ExPEC:it), joiden elintarvikehygieeninen merkitys on noussut tutkimuskohteeksi viime aikoina. ExPEC:n zoonootista merkitystä on pohdittu ja esiintymistä eri elintarvikeryhmissä on kartoitettu. Saksassa on dokumentoitu meningiitti- ja sepsistapauksia tämän ryhmän aiheuttamana (julkaisematon tutkimus). Elintarvikeyhteyksiä on pyritty todistamaan. Yleisestä esiintyvyydestä ihmisillä: ETEC on yleisempi alle 4 v ikäryhmässä (maissa joissa on käytettävissä genotyypitysmahdollisuudet). Eräässä epidemianselvityksessä ETEC:n esiintyminen mahdollisesti aiheutti epidemiassa esiintyneet nopeasti oireet illallisen nauttimisen jälkeen. Tanskalaisissa vesiepidemiassa on pystytty eristämään kampylobakteerien ja virusten lisäksi muita patogeenisiä *E. coli* -bakteereita. Esiteltiin ETEC epidemioita, jotka todistavat bakteerien elintarvike- ja vesivälitteisyydestä. ETEC tapauksia ja epidemioita paljastui myös Tanskassa VTEC O104 epidemian selvityksen yhteydessä kun kliiniset laboratoriot päättivät tutkia kaikki toksiset *E. coli*t. Tietty serotyypit ovat selvästi ripulin aiheuttajia, mutta joillekin ryhmille tarvitaan tarkennusta miten ”ripulin aiheuttaja” itse asiassa määritellään.

### **A foodborne outbreak of entero-invasive *E. coli* (EIEC) infection in Italy (Martina Escher, NRL Italy)**

Epidemiassa milanolaisia palomiehiä (n=109) sairastui veriseen ripuliin, kuumeeseen, vatsakipuihin ja oksenteluun. Osalla oireet olivat hyvin voimakkaita (69% hakeutui heti terveyskeskukseen hoitoon). Yhdistävänä tekijänä oli syöminen palomiesten ruokalassa. Epidemiologiset tutkimukset osoittivat yhteyden keitettyihin kasviksiin. Invaasioon liittyvä plasmidiantigeeni H (ipaH) esiintyi 17 potilaalla ja 2 oireettomalla keittiötyöntekijällä (yksi heistä oli palannut juuri matkalta Vietnamista). Positiivisia näytteitä lähetettiin jatkotutkimuksiin ISS:ään. Näytteistä eristettiin *E. coli* O96:H19. Kannoilla oli keskenään identtiset PFGE –genotyypitysprofiilit. Kyseessä on ensimmäinen epidemia EIEC:n osalta Italiassa ja mahdollisesti koko Länsi-Euroopassa. Keittiötyöntekijöitä pidettiin epidemiakannan lähteenä ja he todennäköisesti kontaminoivat keitetyt kasvikset ruoanvalmistuksen yhteydessä.

## Detection methods for VTEC: update and perspectives in the EU and USA (Stefano Morabito, EU-RL)

Saksan epidemia veti huomion *eae* –negatiivisten VTEC:ien toteamiseen tietyistä matriiseista. Tästä eteenpäin on huomioitava myös top-5 serotyyppien (monivuotisissa infektiotilastoissa esiintyvät 5 tärkeintä aiheuttajaserotyyppiä) ulkopuoliset VTEC:it jotka aiheuttavat vakavan taudinkuvan ihmisille. Sekä USA:ssa että Euroopassa on alettu huomioida VTEC:t lainsäädännössä. USDA:n menetelmä tähtää top-7 serotyyppihin. Tässä vaiheessa USA:ssa tutkituissa matriiseissa esiintyvyys on ollut 1-2%:n luokkaa jauhelihan raaka-aineissa. Vähän yli puolessa näytteistä kyseessä on ollut non-O157 serotyypit ja loput ovat O157 serotyyppiä. Kesken esitystä saatiin tieto että tekninen spesifikaatio ISO 13136, jonka laajennetulla sovellusalueella kaikkien VTEC:ien havaitseminen on mahdollista, on juuri julkaistu! Sovellusalueetta laajennettiin vielä tänä syksynä ennen julkaisua siten, että ei ainoastaan *eae* –positiiviset vaan kaikki VTEC:it huomioidaan. Vaikka top-5 serotyypit ovat vielä mukana, kaikista toksinigeenien suhteen positiivisista näytteistä (myös top-5 serotyyppien ulkopuolisista) on yritettävä eristystä. Mainittiin myös, että EFSA:ssa on käynnistynyt työryhmätyökentely, jossa pohditaan uutta patogeenisen VTEC:in määritelmää.

## The collaborative study for the validation of the ISO 16654 method (Stefano Morabito, EU-RL)

*E. coli* O157 viljelymenetelmän EU-mandaattiin kuuluvan validoinnin viimeinen vaihe suoritettiin kesällä 2012 (Evira/ELMI mukana). Loppukokous pidetään mahdollisesti vuoden 2013 alussa ja raportointi tapahtuu vuoden 2013 aikana. Validoinnissa on huomioitu (sovittu CEN kokouksessa Kairossa 2007) NMKL:ssa aiemmin suoritettu kollaboratiivinen testaus, mikä vähentää viimeisessä vaiheessa testattavien matriisien määrää. Mukana oli 15 akkreditoitua laboratoriota. Kaikki laboratoriot pystyivät toteamaan O157:n kaikista positiivisista näytteistä, mutta mukana oli positiivisia tuloksia siirrostamattomista näytteistä, mikä alentaa menetelmän spesifisyyttä. Herkkyyks käytetyillä siirrostustasoilla (50-500 pmy/näyte) oli siis 100%.

## Results of the 8th PT on the detection of VTEC in water (Rosangela Tozzoli)

Laboratorioiden pätevyystestauskierrokselle osallistui 32 NRL:ää (82% kaikista nimetyistä NRL:stä). A näyte oli siirrostamaton, B näytteessä pitoisuus oli 1200 pmy/ml. Kaikki laboratoriot saivat tällä kierroksella kaikki tulokset oikein (Myös Evira osallistui). DG Sanco kysyi syytä miksi 4 NRL:ää ei osallistunut kierrokselle. Syiksi ilmoitettiin mm. unohdus, taloudellinen syy ja laitteiston puute. DG Sanco korosti kaikkien velvollisuutta osallistua.

Jälkikeskustelussa kysymys kuului mitä tehdään positiivisilla tuloksilla (valvonnallisesti) nyt kun menetelmätekniset asiat näyttävät olevan kunnossa? Alfredo Caprioli (EU-RL) viittasi vastauksessaan lainsäädäntöön jonka mukaan elintarvikkeet eivät saa sisältää patogeenisiä bakteereita.

## Prevalence of the 7 major serogroups of VTEC in fresh minced beef in France (Estelle Loukiadis, NRL France)

EHEC:n voi määrittellä epidemiologisen tiedon (epidemia, esiintyminen ihmisissä) perusteella tai molekyyli-markkereilla (virulenssigeenit). Tutkimuksessa oli mukana serotyypit O157, O26, O103, O111, O145, O121 ja O45. Rikasteena käytettiin BPW:n ja käyttöä perusteltiin sillä että näytteissä olevat bakteerit ovat oletettavasti rasittuneessa tilassa (monet paikalla olevista laboratorioista eivät halua käyttää antibiootteja rikasteessa selekoimassa liikaa tutkittavia kantoja –tämä kävi ilmi useissa ”käytäväkeskusteluissa”). Standardi antaa tähän mahdollisuuden, sillä käyttäjän määriteltäväksi jää, milloin bakteerien voidaan epäillä olevan ”rasittuneessa tilassa”. Ranskalaisessa tutkimuksessa *nlb* geenien läsnäoloa kartoitettiin *stx*- ja *eae*-geenialueiden lisäksi. Lisäksi tehtiin PCR-tutkimus O-seroryhmien ja niitä vastaavien *eae*-alatyypin varalta ja vain PCR-positiivisista näytteistä yritettiin eristää vastaava kanta. Top-5 serotyyppiä havaittiin 0,2%:ssa näytteistä (6/2476) ja top-7 serotyyppiä 0,3% näytteistä (puhuja jätti huomioimatta alustavat eli PCR –positiiviset näytteiden rikasteiden tulokset ja raportoi vain varmistuneista tuloksista eli eristetyistä kannoista).

Alustavissa tuloksissa n. 20%:ssa näytteiden rikasteissa todettiin toksiinigeenejä. O26 oli yleisimmin eristetty serotyyppi (O111 ja O121 kantoja ei eristetty). Jatkotutkittavien kantojen määrää vähensi huomattavasti nleB -alueen mukaanotto skreenaukseen, vaikka lopputulos (varmistuneiden top-7 serotyyppien kantojen määrä) pysyi samana ISO/TS 13136 menettelyyn verrattuna. Ehdotuksena olikin sisällyttää nleB mukaan skreenaukseen jatkotutkimusten työmäärän helpottamiseksi.

### **VTEC in raw cow's milk in Denmark (Jeppe Boel, NRL Denmark)**

Tanskalaisessa tutkimuksessa käytettiin rikastuksessa TSB-lientä (8mg/l novobiosiiniä), inkubointi 16h +37° C:ssa. Näytteet tutkittiin sekä ISO 16654 –menetelmällä (viljely) että ISO/TS 13136:n toksiinigeeniskreenauksen kautta. Tutkimuksessa tehtiin myös validointia 30 positiivisella ja 30 negatiivisella näytteellä. Varsinaisissa näytteissä noin 20%:ssa esiintyi *vtx1*, 10,6%:ssa *vtx2*, 32,7%:ssa *eae* ja 11%:ssa näytteitä sekä *vtx* että *eae*. Eristysyrityksissä saatiin kaksi kantaa eristettyä, jotka olivat *stx2*-positiivisia, O157- ja *eae* -negatiivisia Toksiininegatiivisia *E. coli* O157 –kantoja eristettiin 20 näytteestä (6%). Kannat eivät kasvaneet CT-SMAC –alustalla, joten eristys tapahtui verilevyiltä. Johtopäätöksenä oli että sekä *E. coli* että VTEC esiintyvät raakamaidossa. Toksista *E. coli* O157:aa ei todettu tutkimuksissa, mutta non-O157 VTEC:it vaikuttavat olevan yleisiä maidossa. Samassa tutkimuksessa todettiin myös kolme salmonellapositiivista näytettä.

### **VTEC in raw cow's milk in Italy (Antonella Maugliani, NRL Italy)**

Italiassa on tällä hetkellä 1424 raakamaitoautomaattia. Tehdyssä tutkimuksessa näytteitä otettiin automaateista ja tilatankeista. Menetelmänä ISO TS 13136. Otetuista 657 näytteestä 35 oli PCR -positiivisia (5,3%). Viljelyllä saatiin varmistettua 5 näytettä (0,78%). Kannat kuuluivat serotyypeihin O145, O26 (2 kpl), O103, O157. Tutkimuksessa osoitettiin DNA:n eristysvaihe kriittiseksi bakteerien toteamisen kannalta. Käytetyissä eristysmenetelmissä toteamisraja vaihteli 6 - 350 pmy:n välillä/ml riippuen valitusta eristysmenetelmästä. Erikseen Alfredo Capriolin/EU-RL kanssa käydyissä keskusteluissa kerroin Suomessa meneillään olevista keskusteluista raakamaidon suhteen. Italian kokemuksiin vedoten hän toivoi hartaasti että raakamaidon vaapaampi saatavuus ei etenisi Suomessa kansanterveydellisiin syihin vedoten.

### **Towards a control program for VTEC O157 in Swedish cattle (Anna Aspan, NRL Sweden, SVA)**

Tutkimuksissa on löytnyt geneettinen ryhmä (clade 8, 6 VNTR-lokusta/1 SNP), joka on yleinen karjassa (noin 25 %) ja aiheuttaa merkittävän osan ihmistartunnoista (yli 50 %). Pelkästään jo tämän ryhmän hallinta toisi mahdollisesti merkittävää muutosta humaanitilastoihin. Tulevissa tutkimuksissa 2500 teurasnautanäytteen tilanne kartoitetaan PCR:llä ja viljelyllä. Aikaisempien tutkimusten perusteella näyttää että MLVA-genotyypit kasautuvat tietyille maantieteellisille seuduille, joten kokonaista aluetta pitäisi tarkastella epidemiologisena yksikkönä, ei ainoastaan yksittäisiä tiloja. Ruotsissa eläinlääkärin neuvontakäynnillä VTEC O157 –tartuntatiloilla ei todettu olevan merkitystä bakteerin häviämiseen tilalta. Tulevissa tutkimuksissa aiotaan tutkia myös karjan myyntireittien ja VTEC esiintyvyyden/infektoiden välisiä yhteyksiä.

### **A local outbreak of infections with VTEC O157 associated with the consumption of raw meat products (Sarah Denayer, NRL Belgium, PHI)**

Epidemiassa sairastapauksia oli 17, joista 7 pystyttiin linkittämään epidemiologisesti. Selvityksissä pystyttiin jäljittämään tartunnan aiheuttajaksi epäilty tuote teurastamolle ja otetuista näytteistä pystyttiin eristämään *E. coli* O157:H7 *vtx1*-, *vtx2*- ja *eae*-positiivinen kanta. Selvitysten aikana havaittiin ongelmia VIDAS –menetelmällä saatujen näytteiden viljelyvarmistuksessa. ISO 16654 viljelymenetelmällä saatiin 4 näytteestä eristettyä epidemian aiheuttajaa, mutta VIDAS eristysmenetelmyllä kaikki näytteet olivat negatiivisia. Tämä on ongelmallista, koska ko. VIDAS menetelmällä on AFNOR hyväksyntä ja sen käyttö tulisi siten olla mahdollista.

## **The activities of the NRL at the National Food Institute (Pavle Sekulovski, NRL Macedonia)**

Makedoniassa on hiljattain perustettu Food and Veterinary Agency yhdistämällä laitoksia (Food directorate, veterinary directorate). Maassa on lisäksi kansanterveyslaitos ja 10 sen alueellista laitosta. Näiden yksiköiden kapasiteetti tunnistaa VTEC –kantoja on kyseenalainen. Vaikka laitos on nimetty referenssilaboratorioksi 2008, se ei saa rahoitusta valtiolta. Maassa ei ole valvontaohjelmia VTEC:lle vielä. Elintarvikeväitteisten epidemioiden selvittämistä vaikeuttaa heikot linkit laitosten välillä.

**Session päätteeksi Flemming Scheutz muistutti vielä HUSEC:n määritelmästä. Tutkimusaineistojen perusteella VTEC –kannat, joissa *vtx2a-* ja *eae* –geenit esiintyvät yhdessä liittyvät merkittävästi useammin HUS –oireisiin. Tämä ryhmä pitäisi huomioida erikseen merkitykseltään vakavampana EFSA:n tulevilla uusissa VTEC määritelmissä.**

## **Developments in the legislation on food hygiene related with VTEC (Kris De Smet, DG Sanco)**

Viime aikoina EU:ssa on kiinnitetty huomiota ei-eläinperäistä alkuperää oleviin elintarvikkeisiin, ja uusia säännöksiä on luotu jäljitettävyydestä, mikrobiologisista kriteereistä ja hygieniatoimista. Käytännössä jäljitettävyyden vaatimus käsittää askeleen eteen ja taaksepäin tuotantoketjussa. Lisäksi on säädetty dokumenttien säilyttämisestä, tuontitodistuksesta, ituja tuottavien laitosten hyväksymisestä ja mikrobiologisesta kriteeristä. Kriteerin tutkimusvaatimus koskee kaikista uusista siemeneristä (0,5% painosta) idätettyjä ituja (48h inkubaatio) ja niiden idätysvettä. Tutkimuksia tehdään vähintään kerran kuussa 1.3.2013 alkaen. Tutkimuskohteenä 6 VTEC serotyyppiä (eli top-5:n lisäksi O104). Käytännössä 0,5% erän painoa vastaava määrä idätetään ennen varsinaista tuotantoerää (esi-idätys). Erän määritelmää on jouduttu tarkentamaan epäselvyyksien välttämiseksi. Uutta siemenerää idätetään 48h, jonka jälkeen näytteenotto tapahtuu iduista (5x 25g) tai idätysvedestä (5x200ml). Näytteitä ei saa yhdistää ellei voi osoittaa menettelyn validiteettia. Ituja ei voi päästää myyntiin ennen kuin tutkimustulokset valmistuvat. Markkinoille pääsyyn riittää VTEC:n poissulkeminen (toksiinigeeninegatiivisuus). Mikrobiologiset kriteerit ovat tarkoitettu elintarvikeyrityksille, virallinen näytteenotto on erikseen. Käsiteltiin vielä sitä miksi kampylobakteerit siipikarjanlihassa tai VTEC naudanlihassa eivät ole mikrobikriteereissä. Kampylobakteerikriteerillä olisi ollut aikoinaan liian suuri taloudellinen seuraamus kampylobakteereiden runsaan esiintyvyyden vuoksi (keskustelu avataan ehkä uudelleen) ja VTEC:ssä taas pienen esiintyvyyden vuoksi kalliit näytteenotokustannukset tulivat vastaan. Saadaanko tulevaisuudessa kriteeri lihalle? Prosessi kohti kriteeriä kulkisi niin että ensimmäisessä vaiheessa työstetään EFSA:n kannanotto ja täsmennetään VTEC:n määritelmää. Kriteerin eteneminen seuraavaan vaiheeseen vaatisi näyttöä siitä että kriteerillä pystytään vähentämään merkittävästi ihmisten tartuntoja. Puhuja esitti vielä yleisiä vastaan tulleita tulkintavaikeuksia mikrobiologisia kriteereitä koskien. Esim. *Listeria* –kriteeriä ei voi soveltaa raakaan kalaan, mutta toimenpiteisiin voidaan ryhtyä jos *Listeria* todetaan sushissa ja VTEC raa'assa jauhe-  
lihassa.

## **PTs on VTEC detection and typing: results of a 6-years' experience (Rosangela Tozzoli, EU-RL)**

Kansallisten vertailulaboratorioiden suorituskyky on parantunut vuosien varrella. Vuosien 2009 – 2012 aikana pidettyjen PT kierrosten (4 kpl) aikana osallistuvien laboratorioiden määrä on kasvanut ja hyvien (k>/= 0,75) tulosten suhteellinen osuus on kasvanut.

## **The upcoming PTs: PT 9 on the detection of VTEC in seeds and PT 10 on strain typing (Rosangela Tozzoli, EU-RL)**

Seuraavalle kierrokselle (PT 9) on ilmoittautunut runsas määrä laboratorioita. Italiassa viime vuonna tehty laboratorioiden välinen vertailututkimus luonnollisesti kontaminoituneilla näytteillä osoitti tämän tyyppisten

näytteiden tutkimiseen liittyvät vaikeudet. ISS eristi näytteistä *vtx2* –positiivisen ja *eae*-negatiivisen O74 - kannan, mutta mukana olleet laboratoriot eivät saaneet samoja tuloksia edes PCR -skreenaustasolla. Todenkokoisin syy ristiriitaisiin tuloksiin on bakteerien epätasainen jakautuminen siemenessä. Tulevalla kierroksella käytetään siksi keinotekoisesti kontaminoituja näytteitä. Tätä varten siemenet liotetaan VTEC bakteeriliuoksessa tunnin ajan. Näin käsitellyissä siemenissä yksittäisen siemenen kontaminaatiotaso on  $10^6$ - $10^7$  pmy. Yksi tällainen siemen sekoitetaan erään puhtaita siemeniä ja näytteet lähetetään laboratorioille. PT 10:ssä lähetetään 15 kantaa, joista 11 kantaa PFGE tyyppitetään. Normaalin tunnistuksen ja tyyppityksen lisäksi tänä vuonna on pakollinen osuus 12 eri tyyppin serotyyppityksestä. PFGE –tyypityksessä käytetään Pulsenet –protokollaa O157 –serotyypille.

### **Organization of PTs by the NRLs: the results of an inventory (Stefano Morabito, EU-RL)**

Kyseeleyn NRL:ien aktiivisuudesta järjestää vertailututkimuksia omille kansallisille laboratorioilleen vastasi 30/34 laboratoriota. Pätevyydestejä järjesti 14 NRL:ää. Mukana oli elintarvikematriiseja, joista suurin osa oli jauheliha-, maito- ja sivelynäytteitä. EU-RL oli tyytyväinen tulokseen, mutta määrän tulee kasvaa. EU-RL aikoo järjestää ISO 17043 (vertailututkimusten järjestämisestä) mukaista koulutusta NRL:lle.