

10th Annual Workshop of the National Reference Laboratories for *E. coli* in the EU

5 – 6 th November, 2015, Istituto Superiore di Sanità, Rooma

Tämänvuotisessa EU:n VTEC referenssilaboratorion (EU-RL VTEC) järjestämässä workshopissa oli mukana kansallisten referenssilaboratorioiden (NRL) edustajia kaikista EU-maista ja ETA-maista (Islanti ja Norja), sekä EU:n ulkopuolisista maista kuten Sveitsistä, Turkista, Makedoniasta ja Venäjältä.

Alla on linkkiluettelo käsiteltyihin aiheisiin. Esitykset on saatavilla EU-RL VTEC:n verkkosivuilla (<http://www.iss.it/vtec>):

- [Update on the annual reporting of VTEC in the EU and on EFSA activities for molecular typing data collection for food and animal isolates, Giusi Amore, EFSA](#)
- [Implementation of the ECDC-FWD molecular surveillance and results of the “Expert Group on the introduction of next generation typing methods for Food- and Waterborne Diseases \(FWD NEXT\), Karin Johansson, ECDC](#)
- [Update on the VTEC Network preparedness for molecular typing data collection, Antonella Maugliani, EU-RL VTEC](#)
- [Session 2. *E. coli* Genomics: possible applications to public health microbiology ARIES: A bioinformatics framework for genomic analysis of *E. coli*, Stefano Morabito, EU-RL VTEC](#)
- [Molecular typing of VTEC: from PFGE to NGS-based phylogeny, Valeria Michelacci, EU-RL VTEC](#)
- [Surveillance and outbreak investigation of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* using whole genome sequencing-time for a change! Marie Anne Chattaway, NRL UK](#)
- [Report on the 9th International Symposium on Shiga Toxin producing *E. coli* infections \(VTEC 2015\): main breakthroughs and the way forward, Flemming Scheutz, International Escherichia Centre \(WHO\)](#)
- [Results of the 14th and 15th inter-laboratory studies \(PT14 and PT15\) on the detection of VTEC in sprouts, Rosangela Tozzi, EU-RL VTEC](#)
- [The problem of low isolation rates from PCR-positive food samples](#)
- [Acid treatment for improved recovery of STEC from enrichment broths, Gro S. Johannessen, NRL Norway](#)
- [Revision of the ISO/TS 13136:2012 method, Stefano Morabito, EU-RL VTEC](#)
- [Management of the risk posed by VTEC in food: the draft guidelines on the application of article 14 of Regulation \(EC\) 178/2002 as regards food where VTEC has been detected, Pamina-Mika Suzuki, DG SANTE](#)
- [The IDESTEC project: thorough identification of STEC in Belgium, Sarah Denayer, NRL Belgium](#)
- [Survey for STEC on beef, leafy vegetables In Sweden, Catarina Flink, NRL Sweden](#)
- [Survey of potentially zoonotic *E. coli* of serotype O26, O103, O111, and O157 in Norwegian cows, Camilla Sekse, NRL Norway](#)
- [Microbiological profiling of biosolids used as top soil improvers, Federica Gigliucci, NRL Italy](#)
- [A case of HUS by VTEC O26 traced back to a sheep herd in a didactic farm, Alfredo Caprioli, NRL Italy & Gabriella Conedera, IZS Venetie](#)
- [From O157 to O26: the evolving epidemiology of VTEC infections, Gaia Scavia, EU-RL VTEC](#)
- [Network activities, Stefano Morabito, EU-RL VTEC](#)
- [General discussion and closing remarks, Alfredo Caprioli, EU-RL VTEC](#)

Update on the annual reporting of VTEC in the EU and on EFSA activities for molecular typing data collection for food and animal isolates, Giusi Amore, EFSA

Tällä hetkellä EFSA:n VTEC raporteista käytettävissä vuoden 2013 tiedot ja vuoden 2014 (luottamuksellinen) luonnos. Tietoja on raportoitu kahdessa luokassa: koko STEC ryhmän osalta ja ainoastaan VTEC O157:an osalta. Vuonna 2014 yhteensä 19 jäsenmaata raportoi tuloksia ja positiivisia tuloksia raportoitiin 15 jäsenmaasta. Eniten positiivisia tuloksia raportoitiin tuoreesta naudanlihasta, raakamaidosta ja ryhmästä maito- ja maitotuotteet. Naudanlihan jälkeen seuraavaksi eniten positiivisia raportoitiin vuohenlihasta. Yhteensä 12 jäsenmaata raportoi serotyypin eristämälleen 226 bakteerikannalle. Eniten raportoitiin serotyyppiä O157, seuraavaksi eniten O26 (raakamaito ja naudanliha), O103 ja O145, O113. Suhteessa eniten eristettiin serotyyppiä O157, O26, O146. Eristetyistä kannoista 53:lla tieto serotyypistä rajoittui tasolle ”non-O157 serotyyppi”. Eri eläinlajeista STEC -bakteereita eristettiin sioista suhteessa otettuihin näytteisiin enemmän kuin naudoista, tässä kuitenkin oli takana vain kahden maan tulokset ja otos voi olla valikoitunutta. Suurin osa eristetyistä kannoista tuli nautakarjasta, vuohista ja lampaista. Yleisimmät eristetyt serotyypit olivat O157 ja O26 ja serotyyppiä O146 raportoitiin pelkästään vuohista. STEC O26 on toiseksi eniten raportoitu serotyyppi niin

Pvm/Datum/Date
18.12.15

humaani-, eläin- kuin elintarvikenäytteistä, ja sen trendi on ollut nouseva vuosina 2011 - 2014. Serotyypin O103 ja O26 raportoinnit olivat ohittaneet O157 raportoinnin, mutta aineiston epäiltiin olevan valikoitunutta.

Molekyyli-tyypitystietojen keräämisestä annettiin tilannepäivitys. EU-referenssilaboratoriot kuratoivat yhteistä EFSA-ECDC datavarastoa ja EFSAsta vain valikoidut tiedot lähetetään ECDC:een. Kokeiluvaiheen raportti on ilmestynyt, samoin tyyppitystietojen keräämisen SOP-ohjeet salmonellalle, listerialle ja VTEC -bakteereille. Tietojenkeruun aloittamisen yhteistyösopimus solmitaan 2015 ja SOP ohje tietojenkeruusta EFSA:n ja ECDC:n välillä on melkein valmis. Tyypitysmenetelmistä PFGE (salmonella, listeria ja VTEC) ja VNTR (salmonella) ovat mukana. Laboratorioille jätetään järjestelmässä myös mahdollisuus saada itselleen kuratoidut tiedot.

Esityksen jälkeen EU-RL VTEC kommentoi: Vuonna 2014 on nähty ensimmäinen väläys muiden serotyypin todellisesta osuudesta, kun analyysimenetelmien huomio ei vääristyneesti keskity enää pelkästään O157:aan. EFSA:n edustaja vielä korosti että EFSA käsittelee positiivisena tuloksena ainoastaan näytteitä joista on eristetty bakteerikanta. Maiden tulisi jättää pelkät PCR -positiiviset tulokset raportoimatta.

Implementation of the ECDC-FWD molecular surveillance and results of the “Expert Group on the introduction of next generation typing methods for Food- and Waterborne Diseases (FWD NEXT), Karin Johansson, ECDC

VTEC molekyyli-työntökeruu keskittyy maiden rajojen ylittävien epidemioiden selvittämiseen. Vuodesta 2007 alkaen tietoa tarkasteltiin neljännesvuosittain, vuodesta 2010 alkaen lyhyemmällä aikavälillä ja vuodesta 2012 on siirrytty (lähes) reaaliaikaiseen seurantaan. Klusterin/tapausryvähksen määrittelyssä kantojen eristämisen aikaväli ei saa ylittää 8 viikkoa. Klusterien havaitsemisen jälkeen SSI Tanskassa on kuratoinut tiedot. Näin saatavista klusteriraportteista syntyy urgent inquiry (UI) -kyselyt. Molekyyli-työntösuosuu (klusterien tutkimus) on avoinna vain maille jotka tuottavat sinne tietoja. VTEC:n osalta esiintyy paljon vähemmän klustereita verrattuna listeriaan, vaikka eristettyjä kantoja on suunnilleen yhtä paljon. Syynä voi olla vähäinen eristettyjen kantojen määrä, joiden PFGE- profiilit varioivat paljon. Puhuja epäili että VTEC PFGE voi olla parempi tapa havaita maan sisäisiä klustereita kuin kansainvälisiä. Järjestelmässä mailta kestää keskimäärin 32 päivää raportoida tiedot, ja ECDC:n pyrkimyksenä on nyt parantaa ajantasaisuutta.

Kokogenomisekvenssoinnin ympärille on perustettu FWD NEXT ryhmä, joka pohtii NGS datan käsittelyä. Ryhmän huolenaiheena on ollut laboratorioiden pyrkimys ottaa yhä enemmän käyttöön molekyyli-detektio menetelmiä, jonka seurauksena eristettyjen kantojen määrät vähentyvät ja WGS -työntöykset kärsivät. ECDC pyrkii puuttumaan tähän lähitu-levaisuudessa. Noin puolet jäsenmaista on korvaamassa tai korvanneet työntöyksen WGS:llä ja karkeasti laskettuna toinen puoli ei aiokaan korvata tai vasta harkitsee asiaa. ECDC kokee ongelmalliseksi tästä johtuvan työntöy-tystiedon epätasapainon. FWD NEXT työryhmä totesi tarpeen mm. standardoida WGS:n laadunvarmistusta (raw read quality and coverage) ja pyrkii arvioimaan toistettavuutta.

Jälkikeskustelussa tuotiin esiin että toistaiseksi on keskitytty perinteiseen MLST:hen ja kysyttiin aikooko ryhmä siirtyä laajempaan lähestymistapaan (wgMLST) joka ei olisi sovellusriippuvainen (BioNumerics). ECDC:n pyrkimys tuntui olemaan kohti globaalimpaa työntöy-tystä. Myös PFGE:n tulkinnasta (termi ”closely related/läheinen riippuvuus”) O104 sero-tyypin epidemian kohdalla keskusteltiin; ECDC oli päättänyt yhden bändin perusteella eroavan kannan kuuluvan samaan epidemiaan. Yleisöstä myös kysyttiin: jos PFGE näyttää nyt heterogeenisenä työntöy-tysofiilien suhteen, eikö se ole hyvä asia työntöy-tysofiilien menetelmälle – kertoo että työntöy-tysofiilien menetelmä on erotteliva? ECDC palasi bakteerien välisten erojen pohdintaansa: listerialle ja salmonellalle on havaittavissa selviä yhteisiä työntöy-tysofiileja, joita ei havaita VTEC:illä. Ovatko samankaltaisuuden arvioinnin kriteerit väärit VTEC:ille? Kokogenomisekvenssoinnista odotetaan vastausta kysymyksiin.

Update on the VTEC Network preparedness for molecular typing data collection, Antonella Maugliani, EU-RL VTEC

EU-RL esitteli PFGE:n NRL:ien laadunvarmistuksen PT-työntöy-tysofiierrosten järjestämistä ja tuloksia. Kahdella viimeisellä kierroksella on käytetty EFSA:n SOP-ohjetta PFGE-profiilien tulkinnasta. EU-RL käyttää tuloksen hyväksyttävyyden raja-

arvona 97% samankaltaisuutta vertailukannan PFGE-profiiliin nähden. Viimeiselle kierrokselle (PT 4) osallistui 26 NRL:ää 21 EU-maasta. Kierros järjestettiin toukokuussa 2015, mutta siitä ei vielä ole julkaistu tuloksia tai raporttia. Osallistujat lähettivät 260 profiilia, joista 203 hyväksyttiin jatkoanalyysiin. Osallistujista 14 sai arvion ”erinomainen”. Näiden laboratoriodien osuus on parantunut PT1:stä alkaen. Laboratorioista 14 (50%) lähetti tiedot BioNumericsin XML-muodossa, minkä EU-RL tulkitsee laboratorion kyvyksi analysoida tietoja BioNumericsissa. PFGE:n laadun parantumista on tapahtunut erityisesti geelikuvien taustassa ja epäselvissä bändeissä. XML- muodossa tulleissa tiedoissa EU-RL oli havainnut myös parantamisen alueita (mm. band assignment in lines, background subtraction)

Session 2. *E. coli* Genomics: possible applications to public health microbiology

ARIES: A bioinformatics framework for genomic analysis of *E. coli*, Stefano Morabito, EU-RL VTEC

Stefano kertoi kokogenomisekvensoinnin (WGS) maailmanlaajuisesta levinneisyydestä, jossa aukkoja löytyy enää ainostaan Etelä-Kiinasta ja Koreasta. Tietojen analysointia pidetään kuitenkin vielä mustana aukkona. Bakteri kokogenomidatan (600 MB) käsittely vie noin 45 min ja se valtaa prosessorin koko kapasiteetin. Tietojen analysointiin on kehitetty useita käyttäjäystävällisiä ohjelmistoja (esim. BioNumerics, Ion Torrentin Suite software), ja web-serveistä ilmaiset Tanskan DTU:n CGE:n tuotteet (suljettu) ja Galaxy työkalut (avoin). EU-RL VTEC:n tekemän kyselyn perusteella 8 NRL:illä on jo benchtop -sekvensaattorien käyttömahdollisuus ja 8 NRL:ää aikoo ulkoistaa tietojen analyysiin. EU-RL vastasi näihin tarpeisiin ARIES:lla, joka on Galaxy -pohjainen web -työskentelytila intensiiviseen tietojen analysointiin. ARIES sisältää kaksi palomuuria käyttäjän tietojen turvaamiseksi. Sisältää käytiin läpi nopeasti, mm. genomien BLAST-hakuihin käytössä on NCBI:n ja CGE:n tietokannat. Aivan viime viikkoina ARIES:ssa on otettu käyttöön useita uusia osia. ARIES:n käyttäjäksi pääsee pyytämällä sähköpostilla käyttöliittymää (aries@iss.it). ARIESin perustuu sosiaalisen tiedeyhteisön periaatteeseen, mutta tiedot ovat paremmin suojattuja kuin käyttäjän omalla koneella. EU-RL ei kerää tietoa itselleen eikä myöskään ota siitä varmuuskopioita, mikä on hyvä huomioida. EU-RL ei myöskään näe käyttäjän tietoja ellei käyttäjä erityisesti pyydä sitä. Tyypitystyökalut ovat EU-RL:n suunnittelema ja ne aiotaan julkaista lähitulevaisuudessa myös vertaisarvioituina julkaisuina. ARIESissa julkaistut työkalut käyvät läpi käyttäjäarvioinnin (järjestelmässä useita mahdollisuuksia jättää palautetta). Yleisöstä kysyttiin vertailukelpoisuudesta: EU-RL tekee ajantasaisesti validointia vertaamalla sekä epidemiologisesti toisistaan riippumattomia että riippuvaisia kantoja eri menetelmillä. Kysyttiin myös *E. coli* faagien analysoinnin pipelinein mukaansaamisesta. Työkalut mahdollistavat jo minkä tahansa genomien osan analysoinnin. EU-RL toivoo lähivuosisien tuovan myös lisää tietoa faagi-DNA:n merkityksestä.

Molecular typing of VTEC: from PFGE to NGS-based phylogeny, Valeria Michelacci, EU-RL VTEC

Esityksessä esiteltiin eri tyypitysmenetelmiä ja aluksi todettiin että PFGE-analyysin erottelukyky on hyvä. MLST (seitsemän housekeeping geenin) on hyvä vaihtoehto, jonka nyt/tulevaisuudessa saa WGS-datasta. MLVA on validoitu VTEC O157:lle Pulse-Netissä. Hiljattain Pulse-Net on laajentanut protokollaa O26 serotyypille, mutta muilta serotyypeiltä MLVA protokolla vielä puuttuu. On tehty laajennusyrityksiä muille STEC-serotyypeille: 10 geenin sijaintipaikan protokolla, jossa mukana O157 ja O26 protokollien sijaintipaikat sekä 3 uutta sijaintipaikkaa. Tuloksena oli hyvä erottelukyky, mutta validointi puuttuu vielä. Kokogenomin wgSNP-analyysi on referenssisekvenssiperusteinen ja työkalut ovat valmiina ladattaviksi, ja niiden avulla voi rakentaa oman pipelinein analyysilleen.

CGE webserver DTU tarjoaa helppokäyttöisiä pipelineja. ARIESilla on reference-free Ksnp3-systeemi. Public Health England on rakentanut strukturoitua järjestelmää SNP osoitteen (SNP address) määrittämiselle (Dallman *et al.* 2015). EU-RL VTEC:in tutkimusryhmässä kehitetty High resolution Virulence allelic Profile (HReVAP) perustuu kolmeen STECin virulenssaarekkeeseen (PAI) (LEE, OI-122 ja OI-57). Klusterianalyseissa (HReVAP ja SNPtrees) serotyypit näyttävät klusteroituvat keskenään. Puhuja vertaili eri menetelmien soveltuvuutta ja totesi MLST:n sopivan erityisesti fylogeeneettisiin analyyseihin, MLVA:n O157 ja O26 serotyyppien tyypitykseen (kehitystyö muille tyypeille on käynnissä), wgSNP:n sopivan referenssigeenipohjaiseen kantatyyppitykseen (pipelinet O157:lle ja O26:lle) ja HReVAP:n sopivan kantatyyppitykseen. Mikään näistä ei yksinään täytä optimaalisen tyypitysmenetelmän kriteereitä (varsinkaan validoinnin ja standardisoinnin osalta). HReVAPin soveltuvuutta kannoille, joilla ei ole LEE-saarekettä epäiltiin. Puhuja vastasi että kokeiluissa erottelukyky ei pudonnut liikaa (?) kun systeemissä verrattiin LEE-negatiivisia kantoja. Tuotiin esiin

että plasmidien mukanaoloa WG data-analyyseissä olisi syytä pohtia: voivat antaa arvokasta tietoa, mutta usein unohdetaan coregenome -datasta.

Surveillance and outbreak investigation of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* using whole genome sequencing-time for a change! Marie Anne Chattaway, NRL UK

Puhuja kertoi Public Health Englandin (PHE) analyysien läpimenoajoista: STEC geenit detektoidaan 1 vrk:ssa (real-time PCR geeneille *stx1*, *stx2*, *eae* ja O157). *stx* -alatyypitys tehdään toisena päivänä. Kolmantena päivänä saadaan valmiiksi Omnilog -tunnistus ja faagityypitys. MLVA-tyypitys tapahtuu päivinä 5-7. PFGE tulisi valmiiksi päivinä 4 -7, mutta sitä ei ole tehty rutiinisti vuosiin (korvattu MLVA:lla). WGS – analytiikka viedään läpi 5 – 7 päivässä. Eristys tapahtuu ensimmäisenä päivänä, kirjaston luonti päivinä 2-3, sekvensointi päivinä 4 – 5, bioinformatiikan validointi ja raportointi saadaan valmiiksi 7 päivässä (käytännössä vie yleensä 10 päivää).

WGS on tuonut parannusta O- ja H –serotyyppityksiin ja epidemioiden tunnistamisiin, sekä jonkin verran *stx* -alatyypityksiin. Yleisin non-O157 serotyyppi on ollut O146 (seuraavaksi O26, O55, O103, O91, O117). PHE:ssä halutaan siirtyä vanhasta serotyyppiajattelusta sekvenssityypiajatteluun ja luokitella sairaudenaiheuttajia sekvenssityyppien perusteella. Tämä on mahdollista vasta kun muutkin maat tekevät niin. Kansallisista laboratorioista suuri osa ei vielä kään tutki non-O157 STEC:jä, mikä on ongelma (alle 10 % laboratorioista käyttää PCR:ää, jonka perusteella non-O157 STECien havaitseminen on mahdollista). Siirtyminen rutiini-WGS:ään on tapahtunut: Gasto on web-pohjainen tietovarasto, joka on avoin kansalliselle Public Health teamille (menetelmät: Tunnistus Kmer:eillä, MLST Inouye et al. 2012 mukaan, serotyyppit Joensen et al. 2015), WGS:illä on säästetty kustannuksia ja käsittelyaika on pudonnut 14 päivästä 7 päivään (ent. PFGE).

Jälkikeskustelussa puitiin teknisiä virhemahdollisuuksia. Teknisten virhemahdollisuuksien seulonnassa palattiin jopa DNA:n eristystavan merkitykseen WGS tulokselle. Englantilaiset olivat testanneet että DNA:n eristysprotokollalla ei ole merkitystä, ainoastaan DNA:n laadulla (mikä oli olettamusten vastaista). Hyviin tuloksiin päästään kun sekvensointikattavuus (coverage) riittävä ja muut laadunarviointiarvot ovat kohdallaan ja laadun mittausta harjoitetaan koko prosessin matkalla.

Report on the 9th International Symposium on Shiga Toxin producing *E. coli* infections (VTEC 2015): main breakthroughs and the way forward, Flemming Scheutz, International Escherichia Centre (WHO)

Flemming Scheutz kertoi ensin pääkohdat suullisista esityksistä, joiden oletti kiinnostavan kansallisia referensilaboratorioita. Näistä esimerkkeinä: *E. coli* genomeiden lukumäärä 2324 julkisissa tietokannoissa, O26 serotyypin ympäröivät ”swimming and camping” tapaukset sekä märehelijäperäisyys ihmisten infektioiden. HUS-kentän ovat tulleet jakamaan non-O157 -kannat yhdessä O157:n kanssa, mm. O59:H19 nostettiin esiin HUS:in aiheuttajana Argentiinassa. O157:H7:n evoluutiossa jotkut geneettiset linjat ovat kotoutuneet tietyille alueille, toiset linjat ovat ”turisteja”. Kongressissa oli esillä paljon tutkimuksia reservuaareista ja supererittäjistä, enimmäkseen naudoista. Ihmisten O157 infektioiden väheneminen heijastuu ko. serotyypin vähentymisestä naudanlihassa (jotain tapahtuu reservuaarissa). Alleeliset sormenjäljet perustuen eri geenialueisiin sopivat tyyppitykseen. Bakteriofaageista *stx2f* EPECissä kyyhkyissä voi olla päätyntä aEPEC:iin tiettyjen vähemmän patogeenisten serotyyppien kautta. Vtx faagit ovat geneettisesti hyvin stabiileita.

WGS –tutkimuksista esiin nostettua: O157:lle voidaan antaa SNP osoite, joka korreloi maantieteellisen esiintymisen kanssa. O157 serotyypin historia 400 vuoden ajalta pystytään selvittämään. Se paljastaa että *stx2*:n mukaantulo on melko myöhäinen tapahtuma O157 kehityshistoriassa. Serotyyppi on levinnyt ensin maailmanlaajuisesti ja sitten paikallisesti. Esimerkkinä SNP-osoitteesta: Tietyllä SNP ositteella oli vahva maan luoteisosiin viittaava sijainti, joka auttoi sopivan lähteen löytämisessä. Uusia tutkimuksia oli esillä myös *E. coli*in lämpökestoisuudesta (*clpK* lämpökestogeneeni). Serotyyppit O69:H11, O11:H25 ja O11:H30 voivat kestää 60 °C lämpötiloja. Epidemiologisten tutkimusten saldoa: Ter-

veiden kantajien infektioiden osuus oli moninkertainen ripulipotilaiden löydöksiin verrattuna, mikä aiheuttaa että käsitteitä ”harvinainen, tapaus ja verrokki” pitää pohtia uudelleen.

Flemming Scheutz tiivisti vielä humaanipuolen laadunvarmistuskierrosten kuulumiset: Humaanipuolella PFGE pärjää yhä paremmin laadunvarmistuskierroksilla, mutta serotyyppitys on ongelma. *aaiC* -geenin kohdalla oli löydetty uusi variantti, joka aiheutti vääriä negatiivisia tuloksia useille laboratorioille (sekä perinteisellä että real-time PCR:llä). Vain laboratorio joka oli käyttänyt reaaliaikaisen PCR:n alukkeita, muttei tunnistinta totesi alueen, mikä paljasti mismatch-kohdan sijoittuvan tunnistimeen (alukkeet ok). WHO:n referenssilaboratoriosta ehdotettiin siis tunnistimen uudelleensuunnittelua.

Stefano Morabito kutsui läsnäolijat seuraavaan (10.) kansainväliseen VTEC-kongressiin Firenzeen Italiaan 6.-9.5.2018.

Results of the 14th and 15th inter-laboratory studies (PT14 and PT15) on the detection of VTEC in sprouts, Rosangela Tozzi, EU-RL VTEC

Raportoitiin viimeiset laadunvarmistuskierrokset iduilla. Molemmissa kierroksissa näytteitä oli 3 kpl, joista kahdessa STEC:iä oli lisätty toteamisrajalla oleva määrä ja tästä kymmenkertainen määrä sekä lisäksi mukana oli yksi lisäämätön näyte. PT 14 –kierrokselle osallistui 41 NRL:ää (28 EU-maasta). Näytteen A tutkimukset (korkea taso) meni paremmin, näytteestä B (toteamisrajan taso) vain 67% labroista pystyi eristämään. Toteamisrajaksi (LOD) saatiin 183 cfu/g. *fliCH4* geenin tutkimatta jättämisestä EU-RL antoi virhepisteitä, koska asetus vaatii sen tutkimista. PT 15 –kierroksella näytteisiin lisätyn VTEC O111 bakteerin virulenssigeenit olivat määritetty oikein 89% laboratorioista näytteessä A ja 78% oikein näytteessä B:ssä. Näytteestä A (high level) O111 STEC –bakteerin pystyi eristämään 67% laboratorioista, kun näytteestä B (matalampi taso) vain 47 % laboratorioista. Eristämisprosentti oli siten huomattavasti alhaisempi kuin PT 14:ssa. PT 16 -kierroksella näytteeksi tulee itujen tuotannossa käytettyä vettä. Kierroksen tarkoitus on enemmän laboratorioiden välinen vertailututkimus itujen tuotantoon käytetyn veden analytiikan kehittämiseksi kuin laboratorioiden suoriutumisen arviointi.

The problem of low isolation rates from PCR-positive food samples

Acid treatment for improved recovery of STEC from enrichment broths, Gro S. Johannessen, NRL Norway

Viime vuoden workshopissa nostettiin esiin STEC –bakteerien alhainen eristysaste PCR-positiivisista näytteistä. Ilmiö on todellinen haaste teollisuudelle, tutkimukselle, ym. tahoille. Osuuden puhujat korostivat että korkealentoisia WGS tutkimuksia ei voida tehdä ilman eristettyjä kantoja. Eristysprosentit Norjassakin ovat yleensä 14 % luokkaa PCR-positiivisista näytteistä. *E. coli* kestää pH 2 happamuutta tunteja, riippuen kasvatusalustasta ja kasvun vaiheesta. *E. coli*lta on kuvattu neljä happokestävyyyteen liittyvää geneettistä systeemiä. Yhteys *stx* -faagikantajuuden ja happokestävyyyden välillä on havaittu (Veses-Garcia *et al.* 2015). Norjalaiset ovat testanneet mm. Belgian NRL:n ja meidän tavoin happokäsittelyn hyödyntämistä bakteerien eristämisen parantamiseksi. Happokäsittelyä tehdään heillä suoraan rikastusliemestä rikastamisen jälkeen, kun esim. meillä ja Ruotsin NRL:ssä sitä on tehty IMS-käsittelyn jälkeen. He fuugaaavat 1 ml rikastetta joka happokäsittellään 30 minuutin ajan pH 2:ssa. Tämän jälkeen fuugataan uudestaan ja resuspendoidaan TSBY:hen. Saivat taustakasvun osuutta maljoilla vähenemään oleellisesti kevään 2015 vertailututkimusnäytteillä.

The problem of low isolation rates from PCR-positive food samples

Sarah Denayer (NRL Belgium)

Eesityksessä otettiin kantaa viime vuoden workshopissa esitettyyn oletusasetelmaan että korkeammilla reaaliaikaisen PCR:n ct-arvoilla (yleensä yli 25) ei saada eristettyä yhtä hyvin bakteerikantoja näytteistä. He olivat verranneet ct-arvoja ja todenneet että kantoja on mahdollista eristää isommillakin ct-arvoilla. Myös heillä happokäsittely lisäsi eristettyjen kantojen määrää. Käytiin läpi projektin tuloksia.

Pvm/Datum/Date
18.12.15**Saija Hallanvuo (NRL Finland)**

Esitin osuudessa yhteenvedon vuoden aikana tekemistämme STEC –eristyksistä menetelmällisistä lähtökohdista. Tehokkaaksi on osoittautunut rikasteesta tehdyn laimennossarjan maljaaminen, jota ehdotin mahdolliseksi vaihtoehdoksi tulevaan protokollaan. IMS-käsittely on toiminut huonosti tietyillä, taustakasvuisilla näytteillä, jonka useat muutkin maat vahvistivat.

Eelco Franz (NRL Netherlands)

Hollanti raportoi jättäneensä näytteiden skreenaamisesta pois *eae:n* ja lisänneet *stx2 f:n*. He myös totesivat että mTSB –rikastusliemestä tehdyn laimennossarjan maljauksella -4 voi olla yksi pesäke joka varmistuu. *stx2f* -geeniä ei ole tois- taiseksi ole löytynyt broilerinlihanäytteistä (joita lähinnä tutkittu). Eelco myös ehdotti ct-arvojen lisäämistä EU-RL vertailututkimuskierrosten raportointiin.

Flemming Scheutz kommentoi keskustelua: Jotta saisimme selville miksi STEC:iä eristetään näytteistä niin vähän, pitäisi selvittää tarkemmin mitä tapahtuu rikastusliemessä. Lyysaavatko faagit soluja ja siksi emme pysty eristämään niitä?

Revision of the ISO/TS 13136:2012 method, Stefano Morabito, EU-RL VTEC

Teknisen spesifikaation julkaisemisen (7.11.2012) jälkeen 70% jäsenmaista on ottanut menetelmän käyttöön. EU:n elintarvikenäytteistä 41,4% analysoidaan sen mukaisesti. Tekninen spesifikaatio on aika revidoida ja siitä on päätetty tehdä standardi. CEN:n mikrobiologinen työryhmä WG 6 (joka vastaa standardin hyväksymisestä) pyysi perustettavaa työryhmää selvittämään uusimistyötä varten erityisesti mitä Euroopan ulkopuolisia menetelmiä on käytössä. Standardin soveltamisalueen tulee sisältää itujen kasteluvedet. Stefano kyseenalaisti kolmen vaihtoehdoisen rikastusliemen käytön standardissa. Myös *stx2f* täytyy sisällyttää mukaan PCR osuuteen, koska ko. ominaisuuden STEC:it on yhdistetty HUS-tapauksiin. DNA:n eristysosuutta pitäisi myös pystyä parantamaan (ja kuvaamaan paremmin!). EU-RL oli testannut rikastusliemestä käytäviä keskusteluja silmälläpitäen 54 eri serotyyppiä edustavan STEC -kannan herkkyyttä novobiosiinille ja akriflaviinille kasvattamalla kantoja rikastusliemissä (mTSB + 16 mg novobiosiiniä ja mTSB + 12 mg akriflaviinia). Tulokset novobiosiinien suhteen osoittivat, että kaikki serotyypin O157 kannat sietivät sitä hyvin, mutta O26 –serotyypin kantojen välillä esiintyi jo herkkyyseroja. Serotyypit O145 ja O113 kasvoivat ja sietivät hyvin, mutta O111, O91 ja O121 eivät sietäneet kovin hyvin.

Akriflaviinin osalta kaikki testatut O157 –kannat sietivät sitä hyvin, mutta O26-serotyypin sisällä vain yksi kanta sietti, muiden kasvussa tapahtui romahdus (melkein tappoi). Serotyypin O145 kannat sietivät akriflaviinia melko hyvin. Serotyyppiä O113 ja O45 akriflaviinilisäys suorastaan suosi, ja todettiin että lisäyksestä voi olla todella hyötyä näiden serotyyppien eristämisessä. Serotyyppien O111 ja O103 sisällä oli paljon kantojen välisiä eroja akriflaviinin siedossa. Jotkut serotyypin O91 kannat sietivät akriflaviinia, mutta serotyypin O121 kannat se tappoi. **Merkillepantavaa on että suurin osa top-5 serotyypeistä inhiboituu näiden lisäaineiden läsnä ollessa.** Standardin uusimisen toimintasuunnitelma: ryhmän jäsenten nimeäminen saadaan valmiiksi keväällä 2016 ja ensimmäinen tapaaminen Roomassa vuonna 2016. Evira osallistuu standardin uudistamistyöhön.

Flemming Scheutz kommentoi: Tanskassa WHO laboratoriossa uutena ilmiönä on tullut esiin serotyyppi O91:H14 humaaninäytteissä. Kansainvälistä standardia varten pitäisi näidenkin kantojen herkkyys testata vielä nykyistä kansainvälisemmällä kantavalikoimalla.

Management of the risk posed by VTEC in food: the draft guidelines on the application of article 14 of Regulation (EC) 178/2002 as regards food where VTEC has been detected, Pamina-Mika Suzuki, DG SANTE

Annettiin tilannekatsaus komission STEC –tulosten tulkintaohjeistuksesta. Käytiin läpi DG Santen tekemän, ohjeistuksen sisältöä koskevan kyselyn vastaukset (koski dokumentin 5. revisiota). Suurin osa jäsenmaista (21 vastanneesta 9) kannatti EU-tasoisia lainsäädäntöä STEC:lle elintarvikkeissa. Ainoastaan UK vastusti. Molekyylihäestymistapaa kannatettiin seropatotyyppien kustannuksella. Ohjeistuksen pitäisi ottaa kantaa siihen milloin ja mitä toimenpiteitä täytyy tehdä, kaikkien elintarvikkeiden osalta (se ei kata toimenpiteitä valvontaohjelmien tulosten perusteella ja näytteenototapaa). Käytiin läpi dokumentin nykyluonnos. Ehdotuksessa Food profile (FP) 1 tuotteilla (sellaisenaan syötävät tuotteet ja tuotteet jotka todennäköisimmin syödään ilman kuumennuskäsittelyä) STEC -vaaran toteaminen riittää tuot-

teen takaisinvetoon, FP 2 tuotteilla patogeenisen serotyypin toteaminen aiheuttaa tuotteen lisäprosessoinnin (jos se ei ole vielä markkinoilla).

Stefano Morabito kommentoi: suurin osa jäsenmaista kannattaa STEC kriteerin laajentamista ainakin sellaisenaan syötäviin (RTE) ruokiin, aikooko komissio toimia? Komissio epäilee, että ongelmia voi kyselyn vastausten perusteella tulla STEC vaaran määrittelyssä. Komission tarkoitus on myös harmonoida tuoreen naudanlihan tulosten tulkin-
taa, joka on ollut epätasaista eri jäsenmaiden välillä erityisesti koskien kolmansista maista tulevaa lihaa.

The IDESTEC project: thorough identification of STEC in Belgium, Sarah Denayer, NRL Belgium

Projekti Belgiassa keskittyi bakteerikantojen eristysasteen parantamiseen (liittyen esille tuotuihin ongelmiin STEC-bakteerien eristämässä näytteistä). Rikastusliemenä heillä käytetään puskuroitua peptonivettä (PBW) ja DNA:n eristys tehdään NucleoSpin Food kit:llä. Eri DNA:n eristyskittejä kittejä vertailtiin ct-arvojen perusteella. Päätyivät valitsemaan kalliimman ja hitaamman kitin, koska antoi parempilaatuista DNA:ta. Belgialaiset olivat todenneet happokäsittelyn tehokkaaksi taustakasvun vähentäjäksi viljelyssä, kun taas IMS –käsittelyllä ei ollut tehoa. He totesivat että Ct-arvo > 25 voi tulla huonommasta eristysmenetelmästä ja suuremmasta taustakasvusta – ei ole suoraan verrannollinen kohdebakteerien määrään. CHROM ID STEC -agarია käytetään CHROMagar STEC:n rinnalla, koska on vähemmän selektiivinen. Heidän menettelyssään skreenataan ensin *uidA*. Jos näyte on positiivinen, kyseessä voi olla *E. coli* tai *Shigella*, ja vain näiden kanssa jatketaan *stx* -skreenaukseen. Tarkemmassa STEC -kantojen karakterisoinnissa sekvenssityypin clade 8 kantojen osuus oli suurempi humaaninaineistossa (n=100) kuin elintarvikeaineistossa (n=70). Yhteenvetona Sarah totesi että teknisen spesifikaation ISO/TS 13136 DNA:n eristysmenetelmää pitäisi parantaa.

Survey for STEC on beef, leafy vegetables In Sweden, Catarina Flink, NRL Sweden

Ennakkotiedosta poiketen esityksessä ei käsitelty raakamaitoa, koska tulokset eivät olleet vielä valmiita. Ruotsalaisten menetelmässä tehdään IMS –käsittely top-5 serotyypeille, muut serotyypit pyritään eristämään immunoblottausten avulla (tehdään myös niille näytteille joissa IMS ei toiminut). Immunoblottaus tehdään kasvustolle TSA + mitomysiini C (25 ng/ml) -maljoilla. Blottaus auttaa suuntaamaan pesäkkeiden poiminnan oikeille maljan alueille, mutta koska pesäkkeitä on tiheässä, joudutaan silti tekemään useamman pesäkkeen yhdistelmiä (poolaamaan) PCR -varmistukseen. Eristysaste keskimäärin 14%. *Stx*- vasta-aineita, jotka eivät välttämättä totea ihan kaikkia *stx* –alatyyppejä, tuottaa vain yksi valmistaja. Tutkituista 630 kasvisnäytteestä 2% oli PCR-positiivisia, yhdestäkään ei eristetty STEC:iä. Lihaprojektissa yksi naudanlihan O157:H7 eristys osoittautui sekvenssityyppi clade 8:aan kuuluvaksi. Tuontilihanäytteistä STEC eristettiin yli 10 % näytteistä (salmonellaa ei löytynyt). Ruotsalaisen lihan tutkimukset tehdään vuosina 2015 - 2016. Kysyttiin lihan alkuperästä: tarkoitettiinko tällä karjan kasvatusta, teurastusta vai käsittelymaata. Kyseessä oli karjan alkuperämaa.

Kysyttiin myös mitkä kaikista lihasta eristetyistä kannoista voitaisiin todeta STEC -vaaraksi komission ohjeluonnoksen mukaan (moni oli *eae* -negatiivinen). Vastauksesta ilmeni että osa jäisi tosiaan noteeraamatta. Ruotsi ei tehty RASFFe- ja tutkimusprojektin näytteistä koska rikastusliemiä jouduttiin säilyttämään pitkiä aikoja pakastimessa (kaikkea ei voitu tehdä yhtä aikaa).

Survey of potentially zoonotic *E. coli* of serotype O26, O103, O111, and O157 in Norwegian cows, Camilla Sekse, NRL Norway

Norjalaiset olivat tehneet nautakarjan seurantatutkimuksen vuonna 2014. He käyttävät BPW -rikastusta ja Qiagenin uloste-eristyskitteitä. He tekevät ensin serotyypispesifisen PCR: (top 5 serotyypit), ja sen jälkeen IMS -eristys. Seurantatutkimuksessa serotyyppejä O111 ei löytynyt, serotyypin O145 osalta yksi karja oli *stx1* ja *eae* positiivinen, toinen pelkästään *eae*:n osalta positiivinen. STEC serotyypin O157 osalta löytyi 4 positiivista karjaa. EPEC O157 todettiin kolmessa karjassa, ja serotyyppi O157 ilman virulenssigeenejä 11 karjassa (huom. Norja mieltää *eae*:n yksin esiintyessään virulenssigeeniksi, jonka perusteella tehdään jatkotutkimuksia). Serotyyppi O26 osalta STEC O26 todettiin 10 karjassa ja EPEC O26 todettiin 27 karjassa. Myös PCR:n korkeilla Ct-arvoilla pystyttiin eristämään bakteerikantoja. Serotyypin O103 osalta STEC O103 todettiin 4 karjassa, EPEC O103 todettiin 13 karjassa ja *E. coli* O103 ilman virulenssigeenejä 30 karjassa. WGS tyyppityksiä tullaan tekemään eri PFGE –tyypeille (yksi eristetty kanta per karja). WGS datasta on tarkoitus irrottaa: H-tyypit, virulenssikarakterisointi, AB resistenssi, MLST- ja SNP-tyypitykset. Ulostenäytteet tullaan skreenaamaan vielä O121 ja O91 serotyypien varalta.

Stefano Morabito kommentoi: STEC O26 serotyypin reservuaari karjassa tulee tutkimuksessa hyvin esiin, suurin osa on *stx1* positiivisia, mutta kysymyksiä riittää vielä *stx2* –positiivisen STEC O26:n reservuaarin suhteen.

Microbiological profiling of biosolids used as top soil improvers, Federica Gigliucci, NRL Italy

Tutkimus keskittyi maanparannusaineiden mikrobiologiseen profilointiin. Mikrobiologisiin riskeihin kuuluu patogeenien leviäminen maahan ja satoon ja AB resistenssigeenien leviäminen mikrobiyhteisöön. Maanparannusaineista löytyi paljon PCR-positiivisia eri virulenssigeenien suhteen, kuten *stx*- ja *ipaH* (Shigelle/EIEC) positiivisia. Tutkimuksessa ei ollut eristetty kantoja mutta *stx2* geenimäärää oli kvantitoitu ja havaittu sen tason olevan usein korkea. Koko mikrobiyhteisön virulenssigeenien eroja tutkiessa kompostimateriaalissa esiintyi vähemmän virulenssigeenejä kuin viemärimateriaalissa (sewage sludge). Tutkija päätteli STECin ja muiden patogeenien pääsyn satoon ja AB resistenssin leviämisen olevan suuri huolenaihe.

A case of HUS by VTEC O26 traced back to a sheep herd in a didactic farm, Alfredo Caprioli, NRL Italy & Gabriella Conedera, IZS Venezia

VTEC O26 jakautuu Vtx1:n tuottajiin ja Vtx2:n tuottajiin (ja sekamuotoihin). Evoluution kannalta Vtx1 tuottajat ovat vanhoja. Jo vuonna 1985 ilmestyi juttu jossa O26 todettiin vasikkaripulin aiheuttajaksi. Serotyyppi todettiin myös ihmisten infektioiden aiheuttajaksi, mutta harvoin HUS:n aiheuttajaksi. Vuodesta 1990 alkaen on tapahtunut muutosta, jossa ko. serotyyppi liittyy yhä enemmän HUS-tapauksiin ja O26:H11/H- nousee esiin. Samalla on tapahtunut vaihdos toksinigeeneissä (*stx1* > *stx2*). Vuosien 1988 -2015 välillä Italiassa todetuissa HUS -tapauksissa serotyyppi O26 on ohittanut serotyypin O157. Opetustilalla tapahtuneessa VTEC infektiossa 13 kk ikäinen tyttö sai HUS:n, jonka aiheutti *vtx2* –positiivinen O26. Tytön sisko oli myös *vtx2* O26 -positiivinen (ei eristettyä kantaa). Perhe oli vierailut opetustautilalla, jossa lapset saavat olla läheisessä kontaktissa eläinten kanssa. Tapauksen selvittämisen yhteydessä Venetian aluelaboratorio oli ottanut näytteitä tilalla. Tutkittiin maidonäytteitä ja juustoja (juustonvalmistus oli lähellä lapsien vierailupaikkaa, lapset pääsivät osallisiksi juustonvalmistuksesta). VTEC -bakteeria ei pystytty eristämään, mutta lehmänmaidosta saatiin *vtx2* positiivisia PCR -signaaleja. Lampaista oli mahdollista eristää O26 (2/9 PCR-positiivisesta ulostenäytteestä). Tilalta löydettiin puutteita lypsyhygieniassa. Myös lasten liikkuminen karjan ja juustonvalmistuksen välillä aikaansai ristikontaminaatiota. Valvontatoimenpiteitä tehtiin ja *vtx2* -geenien toteaminen väheni seuraavalla kahdella näytteenotokerralla. VTEC O26 *vtx2*:n pääreservuaari jäi todentamatta. O26 (*eae*-positiivinen) on yleinen nautakarjassa (5-19%), mutta VTEC O26 harvinaisempi ja VTEC O26 *vtx2* erittäin harvinaisen. Pääreservuaarin etsintöjä on puhujan mielestä vielä jatkettava.

Kommentti yleisöstä: Vastauksia on etsittävä myös lampaiden ja nautojen erilaisesta laidunympäristöstä ja laiduntavasta. Lammas on alttiimpi maan ympäristöperäisille bakteereille (ja myös patogeeneille) syödessään matalampaa kasvustoa.

Alfredo Caprioli kommentoi: Lammas voi olla ohimenevä kantaja - ajattelempa aina eläimen lähteenä ihmiselle, mutta miksi ei myös toisinpäin, esim. viemärijäte (pellon kautta) eläimelle.

From O157 to O26: the evolving epidemiology of VTEC infections, Gaia Scavia, EU-RL VTEC

Italiassa STEC:ien humaniseuranta perustuu HUS-tapauksiin, heillä ei ole mahdollisuuksia seurata tätä lievempiä infektoita. Seuranta on tehty vuodesta 1988 alkaen, ja ISS on koordinoanut sitä vuodesta 2012 alkaen. Seurannan kohdepopulaationa on alle 15 -vuotiaat. Vuosina 1988 – 2015 on todettu toistaiseksi 984 tapausta. Alle 4 -vuotiailla esiintyvyyden trendi on ollut nouseva koko seurantajakson ajan. Kliiniset näytteet on saatu tutkittavaksi 806 tapauksesta ja näistä STEC infektiota on voitu varmistaa 73%:ssa. Seurantajakson kokonaistuloksissa serotyyppi O26 on ohittanut viime vuonna O157:n, seuraavana tulevat O111 ja O145.

Aluksi 90-luvun puolenvälin jälkeen alkoi esiintyä O26 klustereita. Vuosina 2008 – 2015 serotyyppi O26 nousi tilastojen suurimmaksi non-O157 ryhmäksi. Vuonna 2010 tilastoissa O157 infektiot alkoivat laskea ja O26 trendi nousi jyrkästi. Nyt on laskettu kuusinkertainen riski saada O26 HUS kuin O157 HUS. Eristetyissä kannoissa odotetusti *vtx2* + *eae* - profiili esiintyy enemmistöllä kannoista, mutta myös *vtx1* -tapauksia on muutama. Ovatko O26:n lähteet ja reitit samat kuin O157:n? Vahvaa näyttöä eläinreservuaarista on saatu mm. edellä esitetystä lemmikkieläintilalle jäljitetystä epidemiasta. Vuonna 2013 Italiassa oli maakunnallinen, hajanaisempi epidemia, jossa esiintyi 20 HUS -tapausta (O26 *vtx2*

Pvm/Datum/Date
18.12.15

+ *eae*). Selvityksissä saatiin vahvaa näyttöä elintarvikeperäisyydestä (juustoa epäiltiin), vaikka lähde ei lopulta selvinnyt.

Ranskassa esiintyi 16 HUS-tapausta (O26:H11) vuonna 2005, joissa lähteeksi todettiin camembert-juusto. Sekä *stx2*-positiivisia että negatiivisia ja *eae*-positiivisia kantoja pystyttiin eristämään sekä juustosta että sen valmistukseen käytetystä maidosta. *stx2*-negatiiviset kannat antoivat identtisiä profiileja PFGE:ssä *stx2*-positiivisten kantojen kanssa, mistä pääteltiin että kannat menettivät *stx* –faaginsa tutkimusten aikana.

Italiassa esiintyi HUS O26-epidemia toukokuussa 2015 lastentarhassa. Selvityksissä ilmeni yksi HUS-tapaus, 6 veriripulitapausta ja 4 oireetonta kantajaa. Infektio siirtyi lasten välillä lastentarhassa ja joillakin lapsista esiintyi erittäin pitkiä kantajuusajoja, jopa 1,5 kk. Suurin osa sai antibioottikuurin ja lakkasi erittämästä, muutamalla kantajuus lakkasi itsestään. Puhujan mielestä ab-häädölle voisi olla perusteita vastaavissa tilanteissa, tapauskohtaisesti harkiten. Serotyypin O26 esiintyvyyden trendi on nousussa Euroopassa, sekä ihmisissä, eläimissä että elintarvikkeissa. Puhuja pohti syitä O157 serotyypin esiintyvyyden laskulle. Monet nautatilat ovat lopettaneet Italiassa, voisiko olla syy? Serotyyppi O157 oli n. 10 v sitten hetkellisesti nousussa Italiassa raakamaitoinnostuksen ja raakamaitoautomaattien mukaantulon vuoksi. Nyt lainsäädännön myötä asia on paremmin hallinnassa.

Network activities, Stefano Morabito, EU-RL VTEC

EU-RL:n järjestämien laadunvarmistuskierrosten osanottajamäärä on kasvanut tasaisesti, jopa 42 NRL:ää on osallistunut kerralla (kaikista 28 EU-maasta ja EU:n ulkopuolisista maista). Vuonna 2016 järjestetään VTEC tunnistus- ja tyyppityskierros (VTEC ja muut patogeeniset *E. coli*), (järjestyksessä viides) PFGE –kierros, sekä kierros VTEC:n osoittamiseksi elintarvikkeista. Järjestetyistä kursseista vuoden 2014 kurssi keskittyi BioNumerics –ohjelmistoon, vuonna 2015 taas pidettiin peruskurssi NGS-bioinformatiikasta. BioNumerics –kurssi järjestetään vuonna 2016 (kesäkuu) yhteistyössä EU-RL Listerian ja Salmonellan kanssa Pariisissa. Yhteistyö jatkuu ja vuonna 2017 ko. kurssi järjestetään Roomassa. Marraskuussa 2016 on tarkoitus järjestää toinen NGS-bioinformatiikkakurssi. Kurssin on tarkoitus keskittyä *E. coli* –kantojen tyyppitykseen (vrt. ensimmäinen kurssi peruskurssi oli NGS:stä).

EU-RL on järjestänyt myös viikon kurseja ISO/TS 13136 standardin analytiikasta, PFGE –analytiikasta ja vertailukokeiden järjestämisestä ISO 17043:2010 mukaan. Tähän mennessä EU-RL VTEC:iin on tehty 76 tutkijavierailua, joista 37 DG SANTEn tuella. Järjestettyihin kursseihin on oltu palautteen mukaan tyytyväisiä.

General discussion and closing remarks, Alfredo Caprioli, EU-RL VTEC

Yhteenvetona workshopin sisällöstä Alfredo totesi VTEC genomiikan olevan siirtymässä käytännön tyyppitykseen (SNP osoite, HReVAP). Hän toi esiin VTEC O26:n muuttuvan epidemiologian ja tässä yhteydessä eläimet, tarttumisen ihmisestä toiseen, pitkittyneen kantajuuden ja maanparannusaineet mahdollisina tartunnan levittäjinä. Antibioottien käytön yhteydessä on perinteisesti varoiteltu HUS-riskistä, mutta Italian tapauksessa (kts. yllä) ratkaisuja mietittiin yhteisön kannalta (päiväkodin tiivis lapsiryhmä), antibiootteja päätettiin antaa ja pitkä kantajuus saatiin päättymään. VTEC kongressista hän poimi vielä SNP osoitteet, STEC –bakteerien diversiteetin (kyseessä hyvin heterogeeninen ryhmä), STEC -kantajien antibioottihoidon ja sen kuinka tieto faagien roolista infektioissa lisääntyy pikkuhiljaa. Valmiuden ylläpito laboratorioissa on tärkeää uusien VTEC –tyyppien tullessa esiin jatkuvasti ja elintarvikkeiden lisääntyvän kontrolloinnin myötä. NRL:iä muistutettiin oman laboratorioverkostonsa laadunvarmistuksen ylläpidosta (vertailututkimuskierrosten järjestäminen, ym.).