

Henry Kuronen, Satu Hakola

**EURL-Salmonella workshop XVI, 19.-20.5.2011, Zandvoort, Alankomaat**

19.5.2011

Vuosittain järjestettävään workshopiin osallistui EU – maiden lisäksi Norjan kansallisten vertailulaboratorioiden (salmonellan osalta) sekä EU-komission ja EFSA:n edustajat sekä vierailevia puhujia. EURL-Salmonella workshopin esitykset löytyvät EU:n referenssilaboratorion nettisivuilta <http://www.rivm.nl/crlsalmonella/workshops/>.

Kirsten Mooijman avasi workshopin, esitteli ohjelman ja kertoi parista muutoksesta EURL:n toimintaan liittyen: Wendy van Overbeek ja Irene Pol ovat liittyneet osa-aikaisesti EURL:n tiimiin ja EURL-nimitys on tullut virallisesti voimaan maaliskuussa 2011 voimaan astuneen EC 208/2011 myötä. Kujpersin ja Mooijmanin artikkeli 'Detection of Salmonella in food, feed and veterinary samples by EU laboratories' on hyväksytty Food Research International –julkaisussa ja julkaistaan pian.

Giusi Amore (EFSA) esitteli zoonoosien tiedonkeruuta ja antoi yleiskatsauksen vuoden 2009 zoonoosiraportin salmonellaosuudesta. Humaanipuolella todettiin salmonellatartuntoja noin 108 000 (n. 22/100 000) ja ne ovat toiseksi yleisimpiä kamylobakteeritartuntojen jälkeen (n. 198 000). EU-tasolla trendi on ollut laskeva salmonellojen osalta, vuonna 2004 noin 45/100 000 ja 2009 siis 22/100 000, vuodesta 2008 laskua oli 17,4 %. Yleisimmät serotyypit ovat edelleen Enteritidis (n. 52 %) ja Typhimurium (n. 23 %), kananmunat, siipikarjan ja sianliha merkittävimmät lähteet. EU:ssa käyttöön otetuilla salmonellavalvontaohjelmilla uskotaan olleen merkittävä vaikutus vähenemiseen.

Gallus gallus – siipikarjan jalostusparvien osalta 18 EU-maata on saavuttanut tavoitteen alle 1 % ja munivien kanojen osalta 17 EU-maata oli saavuttanut itselleen 2009 mennessä asetetun vähennystavoitteen. Broilerin valvontaohjelmat olivat voimassa ensimmäisen kerran vuonna 2009 ja 18 EU-maata saavutti tavoitteen alle 1 % parvista positiivisia. Salmonella aiheutti valtaosan raportoiduista ruokamyrkyksistä ja suuri osa niistä liittyi kananmuniin. Jauheliha ja lihavalmisteet sekä elävät nilviäiset ylittivät useimmiten EU:n salmonella mikrobiologiset raja-arvot. Zoonoosiraportti löytyy EFSA:n nettisivuilta [www.efsa.europa.eu](http://www.efsa.europa.eu).

Seuraavaksi Klaus Kostenzer SANCOsta kertoi EURL:n arvioinnista. Kaikkien 26 elintarvikkeiden ja rehujen turvallisuuteen liittyvien EURL – laboratorioiden toimintaa 2006 – 2010 oli arvioitu ulkopuolisen arvioijan (CIVIC CONSULTING) järjestämänä (kyselyt Komissiolle, NRL laboratorioille sekä EURL:ien kyselyt ja haastattelut). EURL-Salmonella koskeviin kyselyihin oli vastannut 28 NRL. Kysytyistä viidestä osa-alueesta (esim. apu NRL:lle, menetelmät, lainsäädännön täyttäminen) EURL-Salmonella oli saanut kolmesta erinomaisen ja kahdesta seuraavaksi parhaan arvion arvioinnissa. Munivien kanojen pysyvistä tavoitteesta on keskusteltu komissiossa ja Typhimuriumin ja Enteritidiksen lisäksi on otettu 1,4,[5],12:i- vastustettaviin serotyypeihin, omavalvontanäytteiden yhdistäminen tulee mahdolliseksi ja sivelypölynäytteet tulossa. Tuoreen siipikarjanlihan yksityiskohtaiset salmonellakriteeriehtotukset käsittelyn alla ja pitäisivät tulla voimaan

joulukuussa. SANCOssa oli tapahtunut organisaatiomuutoksia ja Kostenzer esitteli uuden kaavion.

Kirsten Mooijman esitteli ISO 6579 uudistamisprosessia. Serotyyppityösosasta ollaan tekemässä enemmän ohjeellista kuin varsinaista standardia ja 2008 ja 2009 lähettyjen kyselyiden tulosten perusteella muokattu versio on edennyt siihen vaiheeseen, että se voidaan lähettää ISO/TC34/SC9 ja CEN/TC275/WG6 ryhmien jäsenille heinäkuussa 2011äänestettäväksi. Mini-MSRV MPN – tekniikkaan perustuvaa lukumäärän määrittämisstandardia on kehitelty 2007 alkaen ja standardi odottaa yhä CENin hyväksyntää ennen kuin se voidaan lähettää äänestykseen. Salmonellan osoittamismenetelmän uudistaminen on siinä vaiheessa, että toiveissa on sen lähettäminen äänestykseen ISO/TC34/SC9 ja CEN/TC275/WG6 ryhmien jäsenille heinäkuussa 2011. Tärkeimpiä muutoksia ovat mm.:

- ISO 6785 (maito ja maitotuotteet) yhdistäminen?
- alkutuotantonäytteiden lisääminen
- Typhin ja Paratyphin osoittamiseksi uusi annex seleniitti-kystiini-rikastuksella
- RVS tai MSRV ovat vaihtoehtoisia elintarvikkeille ja MKTTn pakollinen, alkutuotantonäytteille vain MSRV
- rikastusvaihe 24 h, alkutuotantonäytteille tarvittaessa myös 48 h
- PPV ja rikastuselatusaineiden kylmäsäilytys max. 72 h inkuboinnin jälkeen ennen jatkoviljelyä
- XLD:n säilyttäminen pakollisena eristysmaljana, mutta selkeämpi ohjeistus toisen maljan valinnalle (taulukko)
- muutetaan maljavaiheen kuvaus vähemmän ohjailevaksi yksityiskohtien suhteen
- varmistusvaiheessa vain yksi pesäke varmistukseen, jos kielteinen, niin 4 pesäkettä yhteensä lisää eri rikastus-maljavaiheita
- mahdollisuus käyttää ei-selektiivistä maljaa puhtausviljelmissä vaiheissa
- sallitaan biokemiallisten testien ja puhtaustarkistuksen yhtäaikaista käyttöä
- VP on poistettu sekä indoli ja  $\beta$ -galaktosidaasi vapaaehtoisiksi
- serotyyppitys omaan osaan
- elatusaineiden laadunvarmistus lisätty
- lisätty annex elintarvikkeiden analysoinnin validoinnista MSRV:llä

Mooijman kertoi heidän testauksistaan liittyen tuoreen siipikarjan lihan yhdistämiseen (kyselyitä tullut johtuen tulevista mikrobikriteereistä, ei salmonellaa 25 grammassa, 5 näytettä). EURL testaa sekä "kuivayhdistämistä" (näytteet ennen esirikastusta) että "märkäyhdistämistä" (esirikasteiden yhdistäminen). Suunnitteilla on, että testataan sekä nahatonta että nahallista broilerin ja kalkkunan lihaa stressatuilla kannoilla (esityksessä myös kuvaus kantojen stressaamistavoista).

Angelina Kuijpers esitteli syksyn 2010 sika-nautajauhelihallalla ja keväällä 2011 siipikarjan ulosteilla salmonellan osoittamisesta järjestettyjen vertailututkimusten tuloksia.

Jauhelihan vertailututkimuksessa vertailtiin MSRV -, RVS - ja MKTTn – rikastuksia 31 NRL –laboratoriossa: 28 EU maasta ja 3 EFTA maasta. 28 laboratoriota täyttivät hyvän menestymisen kriteerit. Kaksi laboratoriota joutui tekemään uusintänäytteitä, koska

molemmat totesivat 2 positiivista blankokapseleista, toinen vielä kahta eri faagityyppiä eli ristikontaminaatio myös laboratorion omista näytteistä. Uusintanäytteillä molemmat täyttivät hyvän menestymisen kriteerit. Yhdellä laboratoriolalla oli tullut kirjausvirheitä tuloksia ilmoitettaessa, jolloin tulkittiin kohtalaiseksi menestymiseksi. STM 5 (S. Typhimurium 5 pmy/ kapseli) todettiin 25 g jauhelihaan ympättynä MSRVI:llä 98 %, RVS 97 % ja MKTTn 98 % sekä STM50 100 % kaikilla.

Ulostetutkimuksessa MSRVI:n toimivuutta testattiin siipikarjan ulostenäytteillä 32 NRL – laboratoriossa: 28 EU maasta, 3 EFTA maasta ja 1 Euroopan ulkopuolelta. Muutoksina edellisiin 25 g ulostetta 10g sijaan, mahdollisuus lisätä PPV ulosteeseen tai uloste PPV:hen ennen esirikastusta sekä kantojen lähettäminen uudentyypisissä kiekkoissa entisten ampullien sijaan, jolloin niille ei tarvinnut erillistä liuotusvaihetta. 29 laboratoriota täytti hyvän menestymisen kriteerit. Kahdella oli ongelmia SE6 kanssa (toisella 24 tunnin sähkökatko säilytyksen aikana) ja yksi löysi salmonellan blankosta kontrollinäytteestä (ei ulostetta). Uusintanäytteet ovat kesäkuussa. MSRVI:n sensitiivisyydet ulosteilla (25 g) olivat 99 % (STM6), 100 % (STM61), 90 % (SE 6) sekä 99 % (SE 57). 48 h:n MSRVI lisäsi yhteensä noin 10 % löydöksiä, mutta SE 6 lisäys oli 30 %. Eri esikäsittelytavoista (mm. astiat, PPV:n esilämmitys, PPV/uloste järjestys, PPV:n sekoitus) oli myös kysytty tarkemmin kuin aiemmin, mutta niillä ei havaittu olleen vaikutusta tuloksiin.

Kirsten Mooijman esitteli tulevia vertailututkimuksia. Syys-lokakuussa 2011 CRL järjestää vertailututkimuksen jauhelihaalla. Näytemäärä on 25 g, keinotekoinen kontaminointi erilaisilla kapseleilla (lenticules vs. aikaisemmin capsules, liuotus helpompaa) sekä näytteen käsittely normaalirutiinin mukaisesti esim. stomacherilla. Marras-joulukuussa 2011 järjestetään serotyypitys vertailututkimus ja helmi-maaliskuussa 2011 vertailututkimus ulostenäytteillä (25 g, lenticules), eläinlaji jäi vielä auki (sika / nauta).

Wilma Jacobs-Reistma esitteli syksyn 2010 serotyypitystutkimuksen tuloksia, serotyypitykseen osallistui 33 laboratoriota. Tutkimukseen valitaan vuosittain 20 kantaa, joiden joukossa ovat ainakin viisi tärkeintä serotyyppiä EU:n alueella sekä kantoja, jotka voidaan sotkea edellisiin tai muuten aiheuttavat vaikeuksia tyyppityksessä. Serotyypityksessä käytetään Pasteur Instituutin ylläpitämää White-Kauffmann-Le Minor (2007) – serotyypilueteloa. 20 laboratoriota 33 vastanneesta laboratoriota vastasi kaikki oikein. Eniten ongelmia aiheuttivat S. Liverpool (4 laboratoriota väärin), Chester (4) ja Schwarzengrund (4). Tutkimuksissa O-antigeenit olivat 98 % oikein, H-antigeenit 95 % ja serovarien nimet 95 % oikein. Serotyyppien Enteritidis, Typhimurium, Infantis, Hadar ja Virchow väärästä nimeämisestä saa kustakin 4 virhepistettä ja muiden serotyyppien osalta yhden virhepisteen. Hyvän menestymisen kriteerinä pidetään alle 4 virhepisteen saamista. Jos laboratorio saa 4 tai enemmän virhepisteitä, sille lähetetään 10 kantaa lisää tutkittavaksi. 4 laboratoriota sai syksyllä 2010 enemmän kuin 4 virhepistettä, mutta lisäkannat menivät kaikilla 3 uusintaan osallistuneilla hyvin. Syksyn 2011 tutkimus tulee olemaan samantyyppinen. Jacobs-Reistma kehotti kiinnittämään erityistä huomiota kunkin seerumin valmistajan ohjeisiin eli esim. aikaa on noudatettava tarkasti tuloksia tulkitessa. Eri seerumien valmistajilla aika voi vaihdella 5-10 sekunnista 1 minuuttiin.

Eva Møller Nielsen kertoi *Salmonella* Typhimuriumin MLVA – tyyppityksestä ja sen käytöstä parissa epidemiaselvityksessä. MLVA – tyyppitys on erityisesti FT104 kohdalla erotteluvampi kuin yleensä käytetty PFGE – tyyppitys. MLVA:n harmonisointi on aloitettu mm. julkaisemalla nimeämisohjeet 2009 ja järjestämällä joulukuussa 2010 – kesäkuussa 2011 ECDC:n johdolla tutkimus, johon kaikki laboratoriot ovat voineet osallistua tilaamalla

kannat (hinta 300€), ohjeet ja korjauslaskelmaohjelman Statens Serum Instituutilta. Hyvin useat tekijät voivat vaikuttaa tuloksien arviointiin, joten vertailtavuuden vuoksi on käytettävä standardikantoja ja muokattava raakadataa niiden ja korjauslaskelmien avulla.

Annemarie Pielaat esitteli Biotracer EU-projektiin liittyvää tutkimusta, jossa jäljitettiin salmonellaa sianlihassa teurastusketjun aikana Hollantilaisella teurastamolla. Salmonellasaastutus lihaan voi tulla eläinten ulosteiden mukana, ihon mukana tai teurastamon ympäristössä ja välineissä säilyneistä kontaminaatioista. Prevalenssi- ja lukumäärätutkimuksessa teurastuskäsittelyn aikana ko. tutkimuksessa salmonellat vähenevät noin kolmasosaan ja lukumäärä noin satakertaisesti prosessin aikana. Tutkimus osoitti kuitenkin sen, että positiiviset ruhot ja teurastamolle pesiintyneet salmonellat (tutkitussa teurastamossa halkaisusaha) voivat saastuttaa uusia ruhoja käsittelyn aikana.

20.5.2011

Päivän aluksi Latvian, Luxemburgin, Irlannin, Norjan ja Slovenian edustajat esittelivät omien kansallisten salmonellavertailulaboratorioidensa toimintaa.

Giusi Amore EFSAsta piti esityksen EFSA:n käsityksestä Salmonella Typhimuriumin kaltaisten kantojen monitoroinnista ja kansanterveydellisestä merkityksestä. Ko. kannat ovat lisääntyneet viimeisten vuosikymmenten aikana, mutta koska niiden raportointi on ollut vaihtelevaa eri maissa, niiden merkitystä on ollut vaikea arvioida. Niinpä on tarvetta harmonisoida käytetyt menetelmät, nimeämiset ja riskinarviointi. Typhimurium -kantojen antigeenikaava on 1,4,[5],12:i:1,2. Typhimuriumin kaltaisilta kannoilta puuttuvat joko 1. faasin antigeeni i, 2. faasin antigeenit 1,2 tai molempien faasien antigeenit. Arvioiden mukaan variantilla, jolta puuttuu toinen faasi eli siis ns. monofaasisella Typhimuriumilla (1,4,[5],12:i:-), on lisääntyvää merkitystä. Ko. variantti voidaan eristää nykyisillä viljelymenetelmillä. Nimeämisessä tyypitetään antigeenikaava niin pitkälle kuin mahdollista ja ilmoitetaan löydetty antigeenit. Antigeenikaavan, faagityypityksen ja PCR – tutkimuksen toisen faasin geenin puuttumisesta perusteella nimetään ja raportoidaan monofaasinen Typhimurium. Nimeäminen on tärkeää siksi, ettei aiheudu turhia toimenpiteitä, jos kanta ei olekaan Typhimurium peräinen ja toisaalta ei menetetä kansanterveydellisesti tärkeää tietoa, jos nimetään virheellisesti joksikin muuksi kuin Typhimurium peräiseksi. Ko. kannalla on samanlaisia virulenssi- ja resistenssiominaisuuksia (mm. multiresistenttejä kantoja) kuin Typhimurium – kannoilla ja se on leviämässä nopeasti maailmanlaajuisesti, joten sen seuraaminen on tärkeää kansanterveydelliseltä kannalta.

Lisa Barco Italiasta kertoi monofaasisen Typhimurium (1,4,[5],12:i:-) kantojen varmistamisesta PCR – menetelmällä. Serotyypityksessä ongelmaksi tulee se, kuinka monta kertaa kantaa yritetään kääntää (kun faasi H i todettu) ennen kuin voidaan päätellä, että kyseessä on monofaasinen kanta. Niinpä PCR-tutkimuksella voidaan päästä nopeammin ja helpommin varmuuteen siitä, puuttuuko ominaisuus oikeasti. Monofaasiselta Typhimuriumilta puuttuu fliB – geeni ja Typhimuriumilla ja monofaasisella on molemmilla samanlainen fliB-fliB välinen IS2000 fragmentti. Näiden avulla ko. kannat tunnistetaan ja erotellaan muista B ryhmän serotyypeistä. Testauksen aikana 399 serotyypityksellä (1,4,[5],12:i:-) – kannoiksi määritellyistä kannoista 96,4 % varmistui PCR:illä ko. monofaasiseksi kannaksi ja 3,4 % Typhimurium – kannoiksi.

Anne Brisabois Ranskasta kertoi liikkumattoman (1,4,[5],12:-:-) kannan (ei siis ilmentänyt kumpaakaan H –faasia) aiheuttamasta ruokamyrkytys-epidemiasta vuonna 2009. Tarkemmissa molekyylläisissä tutkimuksissa kanta oli Typhimurium. Lähteenä oli todennäköisesti kananmunien saastuttama kotitekoinen tiramisu. Brisabois kertoi myös 2010 olleesta (1,4,[5],12:i:-) –kannan aiheuttamasta kansallisesta epidemiasta (127 sairastunutta). Epidemiologisten selvitysten perusteella lähteenä oli kuivatusta sianlihasta tehty makkara, mutta salmonellaeristystä ko. erästä ei saatu.

Lopuksi Mooijman kävi läpi EURL:n tulevan vuoden toimintaa. Lisäksi hän kertoi, että MSR – menetelmän CEN – validointitutkimus (alkutuotannon näytteille?) näyttäisi lopultakin käynnistyvän todennäköisesti syksyllä 2012. Ainakin 10 laboratorion pitäisi osallistua, 5 eri matriisia, jos horisontaali menetelmä (jos vain alkutuotanto, 2 eri matriisia), 3 eri kontaminaatiotasoa (blanko, matala ja korkea) sekä 6 rinnakkaista per taso. NRL-laboratorioiden toivotaan osallistuvan.