



Matkakertomus  
EURL-Listeria  
11-12.4.2018  
Maria Rönqvist  
MIBO/ELRE

### **12th Workshop of the European Union reference Laboratory & National Reference Laboratories (NRLs) for *Listeria monocytogenes***

Osallistuin EU:n Listeria-referenssilaboratorioiden vuosittaiseen tapaamiseen 11-12.4.2018 Ansesissa, Pariisissa. Paikalla oli noin 50 henkeä, referenssilaboratorioiden lisäksi edustajat EFSA:sta ja ECDC:stä sekä paljon Ansesin henkilökuntaa. Edellisvuodesta maaedustus oli lisääntynyt yhdellä, kun Sveitsi oli liittynyt yhteistyöverkkoon.

Tilaisuuden avasivat **EURL johtaja Laurent Laloux** ja referenssilaboratorion toiminnassa erittäin pitkään mukana ollut **Bertrand Lombard**. Tämän vuoden kokous painottui listerian tyyppittämiseen, minkä vuoksi kokousaikaa oli supistettu kahteen täyspitkään päivään kolmen sijasta ja perinteiset listerian osoittamis- ja määrittämismenetelmät jätettiin käsittelemättä. Kokouksen avausta seurannut referenssilaboratorioiden edustajien esittelykierron oli tilaisuudessa järjestetty mieleenpainuvasti, sillä jokaisesta jäsenmaasta näytettiin esittelyn aikana kartta, taidekuvia sekä jäsenen valokuva.

Aamupäivän laajempaa teemana oli epidemiologia. **Margot Einöder-Moreno ECDC:stä** Ruotsista esitteli ECDC:n toimintaa listerian osalta sekä listerian esiintyvyydestä Euroopasta. Margot vahvisti aiemmat tiedot siitä, että listeria-infektiot ovat lisääntyneet huomattavasti viime vuosina. Erityisesti ikääntyneillä ja nuorehkoilla naisilla infektioita oli ollut ennätysmäärä. Suomessa esiintyvyys (nk. notification rate), oli korkein Euroopassa keskimäärin, vaikka ikääntyneiden ihmisten kohdalla samaa luokkaa monen Pohjoismaan kanssa. Voisi siis päätellä, että listeria voisi olla Suomessa keskimääräistä yleisempää aikuisväestöllä, tosin herkkyys havaita ja ilmoittaa listeriatapauksia on Suomessa myös korkea, mikä voi vaikuttaa tuloksiin.

Listeriaepidemioiden ja niiden selvittämisen osalta oli huomattavaa havainto, että kolmannes ryvästymistä (samaa listeriatyyppiä usealla potilaalla, elintarvikkeissa, ympäristössä jne.) koskee useampaa kuin yhtä EU maata. Monilla listerian riskituotteilla, esimerkiksi pakastetuilla kasviksilla, on laajat toimitusketjut mikä osittain selittää laajat ryvästymät. Toinen tärkeä havainto oli samojen listeriatyyppien säilyminen elintarvikeketjuissa vuosien ajan. Siten tietoa listerian tyypeistä kannattaa kerätä tyyppittämällä esimerkiksi kokogenomisekvensoinnilla (WGS) kantoja pitkältä ajanjaksolta ja tehdä vertailuja kauaskin menneisyyteen. Samoin tyyppittämiseen käytettävää pulssikenttäelektroforeesia ei liene kannattavaa lakata kokonaan käyttämästä, jotta voidaan vertailla uusia ja vanhoja listeriakantoja keskenään tällä sekvensointia halvemmalla menetelmällä.

**Valentina Rizzi EFSA**sta esitteli listerian esiintyvyydestä elintarvikkeissa ja eläimissä. Euroopan taannoinen vaikea taloustilanne on heijastunut listeriatutkimuksiin siten, että tietoa esimerkiksi sellaisenaan syötävistä elintarvikkeista eristetyistä listerioista saapuu nykyään EFSAan huomattavasti vuosikymmenen alkua vähemmän. Valentina esittikin esityksessään huolensa siitä, miten listeria katsotaan

yleisesti vaarallisimmaksi elintarvikevälitteiseksi patogeeniksi, mutta jäsenvaltiot tutkivat sitä koko ajan vähemmän. Valentina kaipasi lisää tutkimustuloksia myös EFSA-ECDC yhteistyössä rakennettuun tyyppityskantakokoelmaan (Joint ECDC-EFSA molecular typing database). Suomesta kokoelmaan on lähetetty elintarvikekantoja, mutta ei ihmisistä eristettyjä kantoja.

Muutama vuosi sitten alkanut ja mahdollisesti edelleen käynnissä oleva ST6-tyyppiä olevan *L. monocytogenes* -bakteerin aiheuttama epidemia herätti paljon keskustelua. Epidemia havaittiin Suomessa viime syksynä, mutta mahdollinen yhteys elintarvikkeisiin saatiin selville vasta alkuvuodesta, kun pakastemaissista eristettiin saman tyyppin listeriabakteeria. Epidemiasta on julkaistu raportti maaliskuussa: <https://www.efsa.europa.eu/en/supporting/pub/1402e> (Wiley Online Library ei toimi tällä hetkellä Eviran verkossa). Margot Einöder-Moreno esitti ECDC:n ja EFSA:n näkökulmasta epidemian tapahtumakulkua. Pakastemaissi, josta ST6 tyyppin listeria eristettiin, oli pakattu Puolassa ja kasvatettu Unkarissa. Vielä ei tiedetä, onko kontaminaatio peräisin kasvatusalueelta vai pakkaamosta.

EURL oli pyytänyt minulta **Evirasta** esitystä Listeria ST6 epidemiasta, sillä ensimmäiset tiedot epidemiasta olivat tulleet Suomen lähettämissä EPIS(potilaat) ja RASFF(elintarvikkeet)-ilmoituksissa. Esitys on matkakertomuksen liitteenä. **Monica Ricao-Canelhas** Ruotsista esitteli esitykseni lomassa myös Ruotsin tapahtumia epidemian ajalta. Esityksemme jälkeen Irlannin edustaja ihmetteli, käytetäänkö pakastemaissia todella sellaisenaan syötävänä tuotteena Suomessa. Puolassa, jossa epidemiaan linkitetty maissi oli pakattu, pakastemaissi katsotaan tuotteeksi joka kuumennetaan aina, eikä siitä siten ole otettu listerianäytteitä sellaisenaan syötäville elintarvikkeille tarkoitetun lainsäädännön mukaisesti. Esityksemme sivuhuomiona ihailtiin Suomen lainsäädäntöön kuuluvaa asetusta (1174/2006 16 §), jonka nojalla Eviraan saadaan ainakin periaatteessa kaikki maassa elintarvikkeista eristetyt listeriakannat. Ruotsissa ja monessa muussa EU maassa tilanne on toinen: listeriakantoja pitää pyytää paikallislaboratorioista, mikäli on vahva epäilyys että jokin tietty elintarvike on aiheuttanut ihmisissä sairastumisia.

Lounaan jälkeen epidemiologia -aihe vaihtui yhteistyöryhmiin. **Pamina Suzuki EC/DG Santesta** esitteli "EURL working group on NGS" -työryhmää, jonka pitkäaikaisena tavoitteena on yhtenäistää käytäntöjä kokogenomisekvensointiin liittyen. Listeria referenssilaboratorio on saanut tehtäväkseen Bench markingin (tarkoittaa oman toiminnan vertaamista toisten toimintaan mutta en saanut selville, mitä se tarkkaan ottaen tarkoittaa tässä yhteydessä). **Michel-Yves Mistou Ansesista** kuvasi tavoitetta tarkemmin. Niin kutsutussa WorkingGroup25 työryhmässä, jonka jäsenenä Suomesta on Anniina Jaakkonen MIBOsta, pyritään luomaan suuntaviivoja NGS-tekniikoiden käyttöön siten, että ne joustavat kun tekniikka kehittyy. Suuntaviivojen laatimisessa keskitytään bakteerianalytiikkaan, eli virukset, parasitiitit ja metagenomiikka jätettiin niiden ulkopuolelle. Suuntaviivoista on laadittu dokumentti, jonka ensimmäinen versio on kommenttikierroksella.

Tauon jälkeen jatkoimme kahdessa rinnakkaisryhmässä, joissa kukin verkoston jäsen esitteli missä vaiheessa NGS-tekniikoiden käyttöönotto heillä on. Ilmeni, että vaihtelua on verkoston jäsenvaltioiden välillä hyvin paljon. Osa käyttää kokogenomisekvensointia jo osana rutiinidiagnostiikkaansa, osa ei edes aio aloittaa resurssipulaan vedoten. Vaikutti siltä, että Suomi on melko hyvin mukana tekniikan kehityksessä, sillä meillä toimintaa käynnistellään jo.

2. Päivä, 12.4.2018

Toinen päivä keskittyi Listeria-vertailulaboratorion toimiiin kuluneen vuoden aikana. **David Albert Ansesista** aloitti päivän kuvaamalla lyhyesti, mitä EURL:ssä on tapahtunut. 2016 kesällä oli vertailunäytekierron listerian osoittamiseksi, 2017 kvantitatiivinen määrittäminen. 2016 oli lisäksi listerian tyyppittämiseen keskittynyt kiertokierros. Evira osallistui kaikkiin näihin vertailututkimuskierroksiin hyväksytyillä tuloksilla. Kuluneena vuonna oli märkälaboratorioon keskittyvän toiminnan lisäksi osallistuttu CEN/ISO standardien laatimiseen ja kommentoimiseen.

**Ludivine Bonanno Ansesista** kävi läpi tarkemmin edellisen (2016) listerian tyyppitykseen keskittyvän vertailunäytekierron tuloksia. Kierrokseen oli vaihtoehtona valita osallistuminen serotyypit erottelevalla PCR -menetelmällä, MLST - tyyppityksellä tai kuten Evirassa, pulssikenttätyypityksellä (PFGE). PFGE menetelmästä on enemmän aiemmassa matkakertomuksessani, "Training session on the Listeria monocytogenes PFGE typing and link with WGS-based methods" (<https://intra.evira.fi/organisaatio/toimialat/matkakertomukset/>). PFGE tyyppitys ei ollut mennyt laboratorioilta kovin hyvin, sillä vain 5/15 laboratoriota oli saanut hyväksyttävän tuloksen. Erityisten huolestuttavana oli pidetty sitä, että standard operation -protokollaa ei ollut noudatettu kantoja lähetettäessä.

Vuoden 2018 vertailututkimuskierroksiin on osallistumassa 37/40 jäsenmaata. Kierrokset ovat vuonna 2018 listerian säilyvyystutkimus, listerian osoitus ja listerian tyyppityskierros. Tyyppityskierroksella on ensimmäistä kertaa mukana WGS. Siihen on osallistumassa 14/40 jäsenmaata.

**Benjamin Felix Ansesista** kertasi jäsenmaiden mahdollisuudet tekniseen tukeen esityksessään. EURL tarjoaa mm. DNA eristysohjeita WGS:ää varten sekä sekvensoi jäsenmaiden puolesta kansainvälisiin epidemioihin liittyviä listeriakantoja, jos jäsenmaalla ei itsellään ole tähän mahdollisuutta. Benjamin korosti, että PFGE-menetelmään liittyvä Bionumerics-ohjelman database management on edelleen tärkeää, vaikka olemmekin siirtymässä WGS -analyysiin, sillä PFGE:tä käytetään WGS:ää halvempaan menetelmänä haravan tavoin hakemaan mahdollisia epidemiakantoja.

Teknisen tuen esittelyn jälkeen Benjamin esitteli Listeria ST6 epidemian jatkotoimia. Epidemiasta aiotaan julkaista scientific communication, kunhan kaikki WGS data on analysoitu. WGS-analyysijä tekeville oli kiinnostavaa tietää, että EURL käytti sekvenssien kokoamiseen SPADES-nimistä ohjelmaa ja teki core genome MLST -analyysin 1701 geeniä kattavalla pohjalla (skeemalla, julkaissut Ruppitsch et al 2016) sekä wgMLST -analyysin 4804 geeniä kattavalla Applied maths -skeemalla. Muista maista saapuneista kannoista "erityismaininnan" sai UK, jonka raakasekvenssit eivät olleet kovin laadukkaita. UK käyttää DNS eristyksessä robotti-DNA-eristystä ja mietin johtuisiko tämä ongelma siitä. EURL:n suunnitelmana on saada WGS tyyppitys akkreditoitua v. 2020 vertailunäytekierron mennessä.

Koska WGS analytiikka on kallista, EURL on suunnittelemassa WGS:n "esi-analyysiksi" reaaliaikaista PCR -menetelmää, jossa ajetaan serotyypitystä tarkempi profiili tutkittavista kannoista ja jonka perusteella mielenkiintoiset kannat voi sekvensoida. Tällainen menetelmä sopisi erityisen hyvin Eviraan, jossa listeriakantoja tulee vuositasolla paljon. Jos menetelmän DNA eristys olisi nopea ja koko menetelmä melko edullinen, voisi sitä käyttää etsimään potentiaalisia epidemioihin liittyviä kantoja. Menetelmäohjeen nimeksi on suunniteltu: " Multiplex PCR test for characterization of Lm strains: optimization of qPCR format/ intra laboratory validation/inter laboratory validation".

Varsinaisen kokouksen jälkeen oli EURL Lm DB SCOM -ohjausryhmän kokous. Kyseessä on projekti, jossa tarkoituksena oli kerätä jäsenmaista tyyppitysdataa Ansesiin avustamaan epidemioiden tutkimista. Projekti

on nyt päättynyt mutta Ansesiin lähetetty data säilytetään. Siitä anonymisoidaan kaikki metatieto, jotta kantoja ei pysty yhdistämään niiden lähettäjään.

Ohjausryhmän kokouksen jälkeen sain vielä henkilökohtaista opastusta Bionumerics -datahallintaan. Opettelimme kantojen vastaanottamista ja lähettämistä xml -muotoisina sekä kansiodien versiohallintaa. Opetushetkestä on minulle paljon hyötyä, sillä Ansesista tulee kymmeniä kertoja vuodessa pyyntöjä verrata epidemiaan liitettyjä PFGE -kantoja omaan kantakirjastoomme epidemioiden selvittämiseksi.



Kuva 1: Kokouksen osallistajat.