



Matkakertomus

EURL-Listeria

10-12.4.2019

Maria Simola

MIBO/ELRE

13th Workshop of the European Union reference Laboratory & National Reference Laboratories (NRLs) for *Listeria monocytogenes* (LM)

Osallistuin EU:n Listeria-referenssilaboratorioiden vuosittaiseen tapaamiseen 10-12.4.2019 Ansesissa, Pariisissa. Paikalla oli hieman yli 50 henkeä, referenssilaboratorioiden lisäksi edustajat EFSA:sta ja ECDC:stä sekä paljon Ansesin henkilökuntaa. Edellisvuodesta yhteistyöverkkoon liittyi kaksi NRL lisää, Cetal Espanjasta ja Matis Islannista.

Tilaisuuden avasivat edellisvuoden tapaan EURL johtaja **Laurent Laloux** ja referenssilaboratorion toiminnassa erittäin pitkään mukana ollut **Bertrand Lombard**. Tänä vuonna palattiin vanhaan järjestykseen: kokous oli kolmepäiväinen ja kaikki listeria-analytiikan osa-alueet käsiteltiin. Referenssilaboratorioiden edustajien esittelyn jälkeen **Martial Plantady** EC DG Santesta esitteli päivitetyn komission asetuksen elintarvikkeiden mikrobiologisista vaatimuksista (2073/2005). Martial nosti esiin päivityksestä kohdan 1.2, jonka mukaan idut on nyt laskettu mukaan elintarvikkeisiin, joissa LM voi kasvaa. Hän esitteli myös uudistetun virallista valvontaa koskevan lainsäädännön, jossa on mm. aiempaa selkeämmin esitelty referenssilaboratorion rooli.

EC DG Santen esityksen jälkeen **Johanna Takkinen** ECDC:stä päivitti tietomme LM infektioiden esiintyvyydestä ihmisissä. Listeriainfektoiden määrä on edelleen kasvanut viime vuosina: nykyään esiintyvyys on 0.48/100 000 henkilöä. Suhteessa saman verran, noin 20 % vuosien 2013-2017 aikana, on kasvanut myös LM aiheutuneiden kuolemien (225 kpl v. 2017) määrä. LM esiintyy sellaisissa tuotteissa, joissa on Euroopan laajuinen levikki ja massiiviset LM epidemiat ovat siten mahdollisia. Keinoksi epidemioiden hallintaan Johanna nosti esiin erityisesti LM kantojen vertailemisen kokogenomisekvensoinnin (WGS) avulla. **Valentina Rizzi** EFSA:sta esitteli potilasdatan vastinparin, LM esiintyvyyden eläimissä ja elintarvikkeissa. Viime vuosina LM esiintyvyys on kasvanut etenkin kalatuotteissa ja salaateissa. Eläimissä LM esiintyvyys on pysynyt melko samana, muutamassa prosentissa. Vuonna 2017 havaittiin 10 LM epidemiaa, joissa sairastui 39 ihmistä. Vuonna 2018 tapahtunut pakastemaissin välityksellä levinnyt LM epidemia tuotti EFSA:ssa raportin suosituksista LM näytteenottoon pakastevihanneksissa, <https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.2903/sp.efsa.2018.EN-1445>

Tauon jälkeen **Lena Barre** Ansesista esitteli päivitetyn version standardista EN ISO 18593 "Sampling techniques from surfaces of food/feed environment". Standardi antaa ohjeistusta pintanäytteiden ottoon osoitettaessa mikro-organismeja prosessipinnoilta. Näytteiden lähettämistä koskien standardi on harmonoitu standardin ISO 7218 kanssa. Seuraavaksi EURL-Listeria työstää päivityksen tekniseen ohjeistukseensa ottaen huomioon standardiin tehdyt päivitykset. Lenan esitystä sivuten **Thomas Brauge** Ansesista esitteli tutkimuksen, jossa verrattiin pintanäytteiden ottamiseen käytettäviä menetelmiä. Johtopäätös, jonka mukaan erilaiset näytteenottosienet, tepsit ym. välineet olisivat yhtä tehokkaita LM osoittamiseen, kyseenalaistettiin. Erityisesti Italian edustajan **Francesco Pomilion** mukaan pienet pumpulipuikot eivät riitä LM osoittamiseen. Francescon omassa esityksessä kuvattiin italialainen tutkimus

tehdasympäristön pinnoilla kasvavien LM kantojen kyvystä muodostaa biofilmiä. Mielenkiintoinen tulos oli, että toisin kuin aiemmin on ajateltu, osa LM kannoista muodostaa tehokkaammin biofilmiä viileissä olosuhteissa kuin 30°C lämpötilassa.

LM osoittamisesta prosessipinnoilta siirryttiin sujuvasti vertailunäyte (PT) kierroksiin. **Lena** esitteli v. 2017 kvantitatiivisen kierroksen savukalasta ja v. 2018 LM osoittamiskierroksen kypsennetystä kanasta. Silloinen Evira osallistui molempiin kierroksiin hyväksyttävien tuloksin. Lenan jälkeen **Ludivine Bonanno** esitteli v. 2018 toteutetun LM tyyppityskierroksen. Evira osallistui kierrokseen WGS menetelmällä hyväksytyin tuloksin.

PT kierroksista siirryttiin LM epidemioihin. Suomen kannalta kiinnostavin esitys oli Unkarin edustajan **Zsuzsanna Lancin** päivitys pakastemaissin ja mahdollisesti muiden pakastevihannesten välityksellä levinneeseen epidemiaan. Epidemiaan kirjattiin 47 potilastapausta, joista peräti 9 kuoli. Epidemian välittäjäksi osoitettiin pakastemaissi, jota ei ollut tarkoitettu syötäväksi sellaisenaan. Paketissa luki kuitenkin vain kuumennusohje, ei kuumennuskehoitusta. Epidemiaselvityksen johdettua epäilyn Unkarilaiselle pakastemaissia tuottavalle tehtaalle, tehdas teki takaisinvedon kaikesta sen tuottamasta markkinoilla olevasta pakastemaissista ja muista vihanneksista 29.6.2018. Takaisinvedetty määrä vihanneksia painoi yhteensä 565 023 208 kg ja tuotti tappiota yritykselle yhteensä 30 miljoonaa euroa. Toiminnassa pidetyn tauon jälkeen laitos yritettiin avata uudelleen, mutta LM ST6 havaittiin jälleen tuotteissa. Tarkan näytteenoton jälkeen kontaminaation syy jäljitettiin yhteen tehtaan pakastustunneleista.

Pakastemaissiepidemian lisäksi kuulumme **Taran Skjerdalin** esityksen Norjassa tapahtuneesta epidemiasta, jossa välittäjäelintarvike oli ”rakfisk”, jonkinlainen graavikalan ja hapansilakan välimuoto. Kalan prosessoinnissa oli ilmeisesti tehty pahoja virheitä, sillä paketeista eristettiin jopa 2,2 miljoonaa LM solua/g, mutta tuotantoprosessissa ei listeriaa ollut havaittu. Taranin jälkeen **Bart Wullings** kertoi LM epidemiaseurannasta WGS avulla. Alankomaissa sekvensoidaan noin 200 elintarvikkeista eristettyä LM kantaa vuosittain ja tuloksia verrataan potilaskantoihin. MLST -tyypitys skeema on heillä validoitu LM:lle.

Epidemia-aiheista siirryttiin EURL referenssilaboratorion kuulumisiin. EURL tukee jäsenmaita WGS käyttöön otossa kouluttamalla henkilöstöä sekä märkälaboratorio-osuuteen että sekvenssianalyyysiin. Jälkimmäisen tueksi on tulossa genomien referenssipaneeli, jonka **Maroua Sayeb** esitteli. Paneeli koostuu 30 referenssistä, joiden avulla analysoitavien LM kantojen kuuluminen tiettyyn ryhmään (klonaalinen kompleksi) voidaan todeta. EURL tukee Ruokavirastossa LM analysointiin valitun Ridom SeqSphere -ohjelmiston käyttöä, mikä helpottaa kommunikointia mm. epidemiatilanteessa.

Torstain viimeisenä aiheena oli ryhmäkeskustelu, jossa kokouksen osallistujat jaettiin kahteen ryhmään keskustelemaan vuoron perään LM osoitus- ja määritysmenetelmistä ja tyyppityksestä. Käytännössä molemmat keskustelut olivat EURL haastatteluita, joissa kysyttiin kokemuksia ja käytäntöjä. LM osoitusmenetelmien kohdalla keskusteltiin näytteiden poolaamisesta ja todettiin, että jäsenmaat eivät sitä tee LM:lle. Tyyppityskeskustelussa **Benjamin Felix** toi esiin PCR menetelmän, jota voisi soveltaa LM kantojen seulomiseen WGS varten. Menetelmää lähdetään kehittämään reaaliaikaiselle PCR laitteelle soveltuvaksi ja tätä varten perustetaan työryhmä ja tehdään validointi.

Perjantaina ohjelmassa oli LM säilyvyyskokeet. **Helene Bergis** Ansesista esitteli uudistetun referenssilaboratorioille tarkoitetun EURL ohjeistuksen säilyvyyskokeiden tekemiselle. Ohjeistuksen tärkein muutos on lämpötila, jossa kokeet tehdään, kun tutkitaan kaupoissa myynnissä olevia elintarvikkeita. Lämpötila laski 12°C -> 7°C. Helene kertoi myös vastikään julkaistusta standardista EN ISO 20976-1:2019 (Microbiology of the food chain - Requirements and guidelines for conducting challenge tests of food and feed products - Part 1: Challenge tests to study growth potential, lag time and maximum growth rate). Päivitysten jälkeen käytiin läpi vielä vertailunäytekierroksen tulokset. Vuonna 2018 silloinen Evira ei osallistunut PT kierrokseen itse vaan kierrokseen osallistui toinen akkreditoitu laboratorio Suomesta.

Suunnitelma EURL-Listeria laboratorion aktiviteeteista vuosille 2019-2020 jaettiin tulosteena kokouksen osallistujille. Tärkeimmät tavoitteet ovat seuraavat:

- ISO 17043 mukainen akkreditointi vertailumittauskierrosten (PT) järjestämiselle v. 2020
- PT:t vuonna 2020: LM osoittaminen maitotuotteesta, kun LM pitoisuus on pieni; LM tyyppittäminen PCR- tai WGS menetelmällä; säilyvyyskoe, jossa tutkitaan LM kasvupotentiaalia kalassa ja mahdollisesti kasvituotteessa
- päivitys ohjeeseen, joka koskee ympäristönäytteiden ottoa ja ISO 11290 1&2 -menetelmän käyttöä ympäristönäytteiden analysoinnissa
- päivitys ohjeeseen, joka koskee LM säilyvyyskokeiden tekemistä, kun matriisina on sellaisenaan syötävät elintarvikkeet
- WGS menetelmään referenssikokoelma, jonka avulla voidaan määrittää mihin klonaaliseen kompleksiin LM isolaatti kuuluu
- WGS menetelmien harmonisointi tarjoamalla ohjeistus tarkoitukseen soveltuvista ohjelmistoista sekä uuden ohjelmiston tarjoaminen käytettäväksi
- epidemiaseelvityksissä tukeminen mm. tarjoamalla analyysipalveluita ja vertaamalla eri jäsenmaissa eristettyjä LM kantoja toisiinsa
- osallistuminen CEN/ISO työryhmiin



Kuva. Kokoukseen osallistujat.