

13th Annual Workshop of the National Reference Laboratories for *E. coli* in the EU, 18. - 19.10. 2018, Rooma

EU:n VTEC referenssilaboratorion (EU-RL VTEC) järjestämässä workshopissa oli mukana kansallisten referenssilaboratorioiden (NRL) edustajia 27 EU-maasta ja ETA-maista (Islanti, Norja). Mukana oli myös Australian, Kanadan ja USA:n edustajat, jotka osallistuivat workshopia edeltäneeseen (17.- 18.10.) ISO/TS 13136 menetelmästandardin kokoukseen.

Alla on linkkiluettelo käsiteltyihin aiheisiin. Osa esityksistä tulee saataville EU-RL VTEC:n verkkosivuille (<http://www.iss.it/vtec>):

Session 1. Update of surveillance and monitoring activities on STEC in the EU and the collection of molecular typing data on STEC

- [Update on the annual reporting of STEC in the EU and on EFSA activities for molecular typing data collection for food and animal isolates. Valentina Rizzi, EFSA](#)
- [Update on the STEC Network preparedness for molecular typing data collection \(PT-PFGE6\), Antonella Maugliani, EURL-VTEC](#)

Invited talks

- [Results of the EQA-8 organized by SSI. Flemming Scheutz, International Escherichia Centre \(WHO\)](#)
- [Conclusions from the VTEC 2018 conference. Flemming Scheutz, International Escherichia Centre \(WHO\)](#)
- [Update on the U.S. National Advisory Committee \(NACMCF\) report on STEC. Peter Feng, Food and Drug Administration \(FDA\)](#)

Session 2. Genomics: Applications to public health microbiology

- [Toward strain-resolved metagenomics for microbial epidemiology and pathogen monitoring. Nicola Segata, University of Trento](#)
- [Update on the preparedness on the use of NGS for characterization and typing of pathogenic *E. coli* and EURL initiatives \(PT-WGS1\). Valeria Michelacci, Arnold Knijn EURL-VTEC](#)
- [EU initiatives: EFSA and EC survey on the use of WGS in the EU/EFTA countries. Valentina Rizzi, EFSA](#)
- [EU initiatives: inter-EURLs working group and EFSA working group on NGS. Stefano Morabito, EURL-VTEC](#)

Session 3. Laboratory methods and proficiency testing (PT)

- [Results of the inter-laboratory study on the detection of STEC in rocket salad \(PT20\) and in sprouts \(PT21\). Rosangela Tozzoli, EURL-VTEC.](#)
- [Update on the revision of the ISO TS 13136:2012. Rosangela Tozzoli, EURL-VTEC](#)

Session 4. Presentations from the NRLs and other participants

- [STEC O157 infections linked to burger consumption in the UK in 2018. Frieda Jorgensen, NRL UK](#)
- [STEC in beef prevalence study in Ireland. Montserrat Gutierrez, NRL Ireland](#)
- [Epidemiology of non-O157 STEC in paediatric haemolytic uremic syndrome. Gaia Scavia, NRL Italy](#)
- [Network activities, general discussion, and closing remarks. Stefano Morabito EURL VTEC](#)

Update on the annual reporting of STEC in the EU and on EFSA activities for molecular typing data collection for food and animal isolates. Valentina Rizzi, EFSA

Valentina Rizzi EFSA:sta kertoi STEC esiintyvyydestä Euroopassa vuoden 2016 tilastojen valossa. STECin esiintyvyyden trendi on nouseva vuosina 2008 - 2016. STEC infektiota vaatii sairaalahoitoa n. 35 % tapauksissa, mikä on suurempi osuus kuin salmonella- ja kamylobakteeri-infektioissa. Seroryhmien esiintymisjärjestys ihmisten tartunnoissa vuonna 2016 oli O157, O26, O103, O146, O91, O145 ja O128. Elintarvikkeiden *E. coli* O157 menetelmän (ISO 16654:2001) käyttöaste on vihdoinkin vähentynyt ja korvautunut STEC -menetelmällä ISO/TS 13136, jota 91,5 % laboratorioista käytti vuonna 2016. Tätä pidettiin EURL:n saavutuksena. Jäsenvaltioista 8 raportoi itutuloksia: vuonna 2016 oli tutkittu 344 näytettä, joista 1 oli positiivinen. Kaikkien elintarviketyyppien tilastossa vuonna 2016 seroryhmää O157 esiintyi eniten ja O26, O146 ja O113 esiintyivät seuraavaksi eniten. Eläinnäytteissä O146 seroryhmää esiintyy eniten. EFSA oli luokitellut elintarvikkeiden välittämät taudinaiheuttajat vakavuusasteen perusteella (eniten epidemioita, sairaalahoitoa vaativia infektioita ja kuolemantapauksia). STEC kasviksissa ja hedelmissä sijoittui heti toiseksi tilastossa kananmunasalmonellojen jälkeen. Suomi mainittiin EFSA:n tyyppitysdatabankin liittyneenä maana, joka myös lähettää tietoja järjestelmään elintarvikkeiden/eläinsektorilta (8 maan joukossa). Huhtikuussa 2019 EFSA:ssa pitäisi valmistua raportti WGS (kokogenomisekvensoinnin) tyyppitystiedon keräämisen integroinnista yhteisen EFSA-ECDC tietovarantoon. Selvityksen alla on ollut jäsenmaiden kyky tyyppityksiin, ajankohtaisimmat työvuot, ajantasaisimmat analysointi- ja vertailukeinot. Kriittikää annettiin jälleen kerran STEC tiedonkeruun keskittymisestä seroryhmiiin, kun pitäisi keskittyä kantojen virulenssigeeneihin. EFSA jatkaa virulenssigeenien raportoinnin tärkeyden korostamista, vuonna 2016 noin kolmasosa raportoi nämä tiedot.

Update on the STEC Network preparedness for molecular typing data collection (PT-PFGE6), Antonella Maugliani, EURL-VTEC

Todettiin PFGE (pulssikenttägeelelektroforeesi)-tyypitystiedon keräysjärjestelmän elävän viimeisiä vuosiaan ennen kuin WGS tulee korvaamaan PFGE:n. Toistaiseksi 60 % laboratorioista tuottaa PFGE tyypitystietoa. Osallistuneista laboratorioista (n =19) 80 % onnistui tuottamaan hyviä profiilikuvia. Geelikuvien visuaalinen arviointi, bändien asettelu, näytteiden numerointi tuotti eniten ongelmia.

Results of the EQA-8 organized by SSI. Flemming Scheutz, International Escherichia Centre (WHO)

Flemming Scheutz kertoi humanisektorin laboratorioiden laadunvarmistus EQA-8 kierroksen tuloksista, mukana oli tällä kertaa myös klusterianalyysi molekyylylyypitysmenetelmillä. Jäsenmaista 25 osallistui ja klusterianalyysin teki 11 maata WGS:llä, 9 maata PFGE:llä ja kaksi maata molemmilla. Tyypitysklusterissa oli ST 21 kantoja, jotka laboratorioiden tuli tunnistaa klusteriksi. Laboratorioista 6/9 oli pystynyt tunnistamaan klusterin oikein. Perus cgMLST tyypityskeema, kuten esim. Enterobase antoi hyvin homogeenisia tuloksia osallistujien kesken. Edelleen laboratorioilla oli puutteita stx-alityyppien määrittämisen kanssa. Tämä johtui siitä että laboratoriot olivat päättäneet valikoida joitakin kantoja tyypitykseen, vaikka ne olisi pitänyt tyypittää kattavasti. Stx -alityyppien luokittelua koskevan julkaisun (Scheutz *et al* 2012, <https://jcm.asm.org/content/50/9/2951.long>) jälkeen on esiintynyt tarvetta uusien tyyppien nimeämiseen. Tyyppin stx2e nimeämisestä seroryhmän O8 kannan osalta todettiin että se on hiljattain nimetty uudelleen stx2l-tyypiksi. Stx alatyypitys-PCR tarvitsee teknistä päivitystä. Tyyppi stx2j on vielä julkaisematta. Vielä ei ollut selvää huomioivatko nykyiset ISO/TS 13136 sekvenssit nämä uudet alatyypit.

Conclusions from the VTEC 2018 conference. Flemming Scheutz, International Escherichia Centre (WHO)

Flemming esitteli yhteenvedossaan hiljattain valmistunutta WHO:n raporttia STEC riskeistä elintarvikkeissa (World Health Organization & Food and Agriculture Organization of the United Nations (2018). Shiga toxin-producing Escherichia coli (STEC) and food: attribution, characterization, and monitoring: report. World Health Organization. <http://www.who.int/iris/handle/10665/272871>). Peter Feng ja Flemming Scheutz johtivat työryhmää raportissa osuuden Criteria for hazard identification and characterization osalta. Serotyypit ovat hyödyllisiä tunnistamisessa mutta eivät kerro mitään patoosista tai ennusta patogeenisuutta. Hybridikannoille on omistettu oma kappale. Adherenssi on kriittistä patogeenisuudelle (eae ja aggR). Raportti korostaa virulenssigeenien karakterisoinnin merkitystä seroryhmien sijaan STEC elintarvikeliöiden riskinarvioinnissa. Seroryhmät ovat kuitenkin tärkeä lisä epidemiologiseen taustatietoon. STEC löydöksen riskiä tulisi arvioida seuraavan taulukon mukaisesti

TABLE 5. Combinations of STEC virulence genes and the estimated potential to cause diarrhoea (D), bloody diarrhoea (BD) and haemolytic uraemic syndrome (HUS) ¹

Level	Trait (gene)	Potential for:
1	<i>stx_{2a}</i> + <i>eae</i> or <i>aggR</i>	D/BD/HUS
2	<i>stx_{2d}</i>	D/BD/HUS ²
3	<i>stx_{2c}</i> + <i>eae</i>	D/BD ³
4	<i>stx_{1a}</i> + <i>eae</i>	D/BD ³
5	Other <i>stx</i> subtypes	D [^]

NOTES: 1. depending on host susceptibility or other factors; e.g. antibiotic treatment
 2. association with HUS dependent on *stx_{2d}* variant and strain background.
 3. some subtypes have been reported to cause BD, and on rare occasions HUS

Lisähuomioitavaa ominaisuusyhdistelmistä:

Level 1-5: *stx_{2a}* + *eae/aggR*, (LAA, LIC) > D/BD/HUS

Pvm/Datum/Date
25.10.2018

stx2d > D/BD/HUS tai stx2d + eae (O80)

WHO:n raportti ottaa myös hyvin kantaa PCR -skreenaukseen, jonka antamien alustavien tulosten tulkinta on aiheuttanut ongelmia monissa maissa, myös Suomessa:

Screening involves the detection of biomolecules (genome sequence, antigens, etc.), which indicate the possible presence of STEC or a specific STEC group. The role of screening tests is commonly misunderstood. The purpose of screening enrichment broths is not detection of the target organism, because the enrichment broth contains a mixed population of organisms and there is a potential for false positive results, which need to be eliminated by isolation and characterization. Instead, the purpose of screening enrichment broths is to reduce the number of samples that need to proceed to isolation, reducing the cost and time to achieve a negative result.

Kongressin yhteenvedona todettiin myös että Stx2f varianttikantojen lähde ihmisten infektioissa ei ole pulut. Stx2f faagipartikkeli siirtyi tEPECiin ja yhdistyy useisiin serotyyppeihin (kuten O63). Kongressin esityksistä kävi selväksi että faagit kommunikoivat keskenään, ja että STEC genotyypit eivät vertaudu aina fenotyyppeihin. STEC O26:H11 syntyi yli 400 vuotta sitten, mutta vasta 60 vuotta sitten se sai stx2a faagin. STEC:illä tunnetaan yli 470 serotyyppiä, joista yli 100:aa pidetään ihmiselle sairautta aiheuttavana. STEC virulenssiominaisuudet ovat suoraan suhteessa taudin vakavuuteen, mutta yhtäkään stx-alityppiä ei voida pitää viattomana taudinaiheuttamiskyvyn suhteen. Kongressin satona todettiin että immuniteetin supressio ensimmäisen infektion aikana altistaa karjan kantajuuteen uudelleeninfektion aikana. Tuotantoympäristö muuttuu yhä enemmän ei-lihaperäiseksi ja tuoretuotteiden osuus STEC infektioiden välittäjänä on yhtä suuri kuin lihan. On hyvä muistaa myös että STEC analyysituloksista tehtävät tulokset ovat merkittävässä asemassa (vrt. skotlannin viranomaiset joutuivat korvaamaan juustojen tuottajalle miljoonakorvaukset kun takaisinvento oli tehty raakamaidon tulosten perusteella, ei varsinaisen lopputuotteen perusteella ja laitoksessa tehdyssä tarkastuksessa ei vastaavalla ajanjaksolla ollut havaittu huomautettavaa).

Update on the U.S. National Advisory Committee (NACMCF) report on STEC. Peter Feng, Food and Drug Administration (FDA)

USA:n raportissa keskityttiin STEC tautitaakkaan (kliiniset ja epidemiologiset ominaisuudet), mutta myös esiintyvyyteen kasvistuotteissa, karjassa ja maitotuotteissa. Virulenssitekijät ja patogeneesi -osatyöryhmässä käytiin läpi huomaani-infektioihin liittyviä seroryhmiä ja tärkeimpiä virulenssitekijöitä, joista muodostettiin riskikuvaaja (stx2a + EAEC ylimpänä ja stx+ ilman eae:tä alimpana). STEC:in osoittamisen ja karakterisoinnin kohdalla teollisuuden mielenkiinto oli testin herkkyydessä kun viranomaiset vaativat testiltä muutakin. Dokumentti on luettavissa:

<https://www.fsis.usda.gov/wps/wcm/connect/981c8e0a-6a5b-45d1-a04d-1934463a666c/NACMCF-STEC-2018Aug.pdf?MOD=AJPERES>

Nyt tehty riskiluokitus katsoo asiaa ihmisten infektioista eristettyjen kantojen perusteella. Virulenssitekijöiden arvioinnissa monet tahot ovat viime aikoina arvioineet suurimmaksi riskiksi stx2a + aggR tai eae ominaisuudet (mikä tahansa serotyyppi). Tuoretuotteissa takaisinvento tehdään vain näiden riskiluokitusten perusteella. Esim. stx2b esiintyminen ei aiheuta takaisinvento, jos kyseinen kanta ei ole yhdistettävissä aiempiin epidemioihin. Riskiluokitukset on tehty varovaisuusperiaatteella, aiemmin todettiin kaikki STEC kannat mahdollisiksi riskeiksi ja myöhemmin todettiin karanteeniin joutuvan paljon lieväoireisia ihmisiä. Ei ole kuitenkaan varmaa, että nämä vakavammaksi riskiksi nyt luokitellut kannat aiheuttaisivat välttämättä infektion ihmisellä. Jokainen arvio korkeasta/matalasta riskistä tehdään hyödyntämällä tapauskohtaista asiantuntija-arviota. Saimme demonstraation asiantuntija-arvioiden hienoisista eroista: Peter Feng ajatteli että stx2a yksinään on yhdistelmää stx1a + 2a vaarallisempi. Jos kannalla on molemmat, voidaan ajatella että esiintyy kilpailua samasta kiinnittäytymispaikasta suolessa. Flemming Scheutz taas totesi että stx2a on 100 x kyvykkäämpi tuottamaan toksiniin, joten molempien geenien esiintyessä kyseessä on mahdollisesti tavallista virulentimpi kanta.

Toward strain-resolved metagenomics for microbial epidemiology and pathogen monitoring. Nicola Segata, University of Trento

Saimme mielenkiintoisen ja innostavan esityksen metagenomiikan saavutuksista Segatan ryhmän tutkimusten kautta. Yksittäisiä kantoja on kyetty jäljittämään epidemian alkupisteen selvittämiseksi. Mikrobeja tutkittaessa näytemateriaali "siivotaan" ihmisgenomista. Nykyinen trendi on tuottaa shotgun metagenomiikalla kantalistauksia jonkun mikrobipopulaation koostumuksesta (määräsuhteista). Ryhmä yrittää päästä tällaisesta lähestymistavasta kantatason genomivertailuihin (strain level profiling). Voiko metagenomiikalla tehdä patogeeniprofilointia? Ryhmä oli todistanut tämän MRSA:lla mahdolliseksi; 0,0009 % ero isolaatista eristetyn DNA:n ja metagenomiikan avulla tuotetun genominn uudelleen rakentamisella välillä. Mikrobiomi-DNA:n eristämässä ei voi saada virheetöntä eristystulosta kaiken DNA:n osalta. Metagenomisen datapankin koko on TB -luokkaa, joten datan säilytys on suunniteltava hyvin. Genomidatasta katsotaan mitkä lajit ovat läsnä, mutta myös mitkä funktiot (pathways) ovat läsnä. Myös MLST analyysi on onnistunut (Zolfo ym. 2017 metaMLST: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5314789/>) ja sitä varten on kehitetty työkalu: <http://segatalab.cibio.unitn.it/tools/metamlst/>. Saksan STEC ituepidemian aiheuttajan klusteri ja siihen liittyvien kantojen ominaiset geenit oli mahdollista tunnistaa suoraan ulostenäytteistä (Loman ym. 2013 <https://pdfs.semanticscholar.org/617c/8bca5de3f6b958603a0502b4b67820bcd4c.pdf>).

Shotgun metagenomidataa syntyy kiihtyvällä vauhdilla. Jotta sitä voitaisiin luotettavasti hyödyntää perustettiin tietokanta: CuratedMetagenomicData (Pasolli et al 2017, Nature Methods <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5862039/>).

Ihmisessä on 100 x enemmän mikrobigeenejä kuin omia geenejä ja ihmisen metagenomiikkaa ei voi tutkia perustuen nykyisiin referenssigeenitietopankkeihin. Äiti-vauva pareissa huomattiin että tietyn tyyppiset *E. coli* kannat siirtyivät äidistä lapseen (sama geneettinen profiili) ja pysyivät pitkään lapsessa. Toiset tyyppit taas eivät siirtyneet ollenkaan. Pystyttiin osoittamaan että kantatasoinen metagenomiikka (uloste- ja sivelynäytteistä) oli mahdollista. Ihmisen mikrobiomi vaikuttaa olevan äärimmäisen yksilöllinen. Tällä hetkellä ryhmä seuraa *Eubacterium rectale* -bakteerilla (hyvin yleinen ihmisen suolistossa) ihmisen esihistoriallista siirtymistä maanosasta toiseen. *Prevotella copri* alatyypit (clade A-D) löytyvät jääkauden ihmisistä, mutta alatyypit ovat häviämässä länsimaistuneissa ihmisissä. Jokin ravinnossa muuttaa lopullisesti suoliston mikrobiomia. Ryhmä on löytänyt n. 4000 uutta mikrobilajia ihmisen mikrobiomista. Kysyttiin metagenomiikan herkkyydestä esim. elintarvikenäytteiden analyyseissä, joissa etsityn bakteerin pitoisuus voi olla erittäin pieni. Mikrobit joiden suhteellinen osuus on yli 0,5 % saadaan esiin analyyseissä (eli näytteen kohdebakteerin rikastamista ainakin saatetaan vielä tarvita). Myös faageja voidaan profiloita ja verrata (irtonaiset faagit ja profaagit genomissa).

Update on the preparedness on the use of NGS for characterization and typing of pathogenic *E. coli* and EURL initiatives (PT-WGS1). Valeria Michelacci, Arnold Knjin EURL-VTEC

Arnold Knjin kertoi EURL:n WGS tyyppitykseen rakentamasta ARIES järjestelmästä ja sen viimeisistä uudistuksista. ARIES käyttäjiä yli 100 (4 Suomessa). Järjestelmään kuuluu laadunvarmistustyökalut, trimmaus, serotyyppitys, MLST (7 geeniä) ja STEC virulenssigeenien tunnistus. Esiteltiin ARIES järjestelmään tehtyjä muutoksia: Serotyyppitys database (Joensen et al. JCM 2015). Virulotyping: patotyyppitys INNUENDO projektista (database Joensen et al 2014). Työvuohon on otettu INNUENDOn laadunvarmistus- ja koontityökalut. PopPUNK (population partitioning using Nucleotide Kmers) on myös uutta. ARIES löytyy: <https://w3.iss.it/site/aries/>.

Valeria Michelacci kertoi ensimmäisen WGS vertailututkimuksen tuloksista. Vertailututkimukseen osallistui 21 laboratoriota (18 EU-NRL:ää, 3 IT virallista laboratoriota). Materiaaliksi saatiin lopulta 17 paired-end sekvenssiä ja neljä single-end sekvenssiä. Lukusyvyyks vaihteli paljon laboratorioden välillä (ei annettu sääntöä), mutta se vaihteli myös laboratorion sisällä kantojen välillä. N50 ja koonnin kattavuus (assembly coverage) vaihtelivat myös laboratoriokohtaisesti. Alleelien määrittämiseen (gene-by-gene analysis) käytettiin chewBBACA -työkalua INNUENDO-projektista. Sekvenssityypin määrittäminen ei onnistunut 15/144 kannasta. Alleelien määrittämisessä tuli esiin että joillakin laboratorioilla oli sekvensoinnissa systemaattiselta virheeltä vaikuttavia eroja.

Lukusyvyyys yli 18 näytti riittävän oikeiden tulosten saamiseen kun tavoitteena oli sero- tai virulenssigeenien tyyppitys ja 7 geenin MLST. Fyloneettinen analyysi vaati enemmän lukusyvyyttä (yli 30 tarpeellinen?) ja koonnin tarkkuuden korjaamista (esim Pilon -työkalu), mikä paransi merkittävästi klusterioitumista. EURL oli hyötynyt INNUENDO-projektissa rakennetuista, koonnin laadun parantamiseen tähtäävistä työkaluista (emästen ja koonnin virheiden korjailu, aukkojen täydennys). Nyt pohditaan seuraavalle vuodelle NRL verkoston käyttäjäkoulutuskurssia yhdessä muun EURL verkoston kanssa (PFGE ja WGS) tai erillistä kurssia ARIESin parissa.

EU initiatives: EFSA and EC survey on the use of WGS in the EU/EFTA countries. Valentina Rizzi, EFSA

EFSA:n kysely WGS tyyppityskapasiteetista kansallisille referenssilaboratorioille ja virallisille laboratorioille. Kyselyyn vastasi EURL VTEC verkostosta 30 NRL:ää ja 32 virallista laboratoriota. 44 % NRL:ää ilmoitti voivansa tehdä WGS analyysjä, kun taas ainoastaan 7 % virallisista laboratorioista ilmoitti pystyvänsä analyysseihin. Suurin osa laboratorioista ilmoitti käyttävänsä WGS tyyppitystä epidemianselvityksissä. Kansallisista vertailulaboratorioista 11/14 vastanneesta ilmoitti tekevänsä bioinformatiikkaa vaativat analyysit omassa yksikössään, useimmiten analyysjä suoritti ei-bioinformatikko. Suurin osa laboratorioista oli kiinnostunut yhteistyöstä toisten kansallisten laboratorioden kanssa etenkin epidemioiden selvityksen osalta.

EU initiatives: inter-EURLs working group and EFSA working group on NGS. Stefano Morabito, EURL-VTEC

EURL referenssilaboratorioiden verkostossa tehdyn kyselyn mukaan 12/20 vastanneesta VTEC laboratorioista teki WGS analyysjä, joista 4/20 oli ulkoistanut sekvensoinnin ja 2/20 oli ulkoistanut myös data-analyysin. Kyselyssä WGS:ää ilmoitettiin käytettävän eniten tutkimusprojekteja varten, seuraavaksi eniten epidemian selvityksiin ja seurantaan. Suurimmassa osassa laboratorioita DNA:n eristys perustui spinkolumneihin (8 kpl), magneettikuulia käytti kaksi laboratoriota. Laboratorioista 12 käytti Illuminaa (Illumina MiSeq suosituin) ja kaksi IonTorrentia. Laboratoriot vastasivat myös mitä arviointikriteereitä käyttävät sekvenssidatan laadun arvioinnissa. Järjestys oli: lukusyvyyys(coverage), phred score, N50 arvo kootuille lukusekvensseille(assembled contigs), koottujen lukusekvenssien lukumäärä, koottujen emäsparien kokonaismäärä(total base pairs assembled). Kyselyyn osallistujat toivoivat lisää koulutusta, erityisesti EURL:ssä laboratoriossa tapahtuvaa koulutusta ja verkkokursseja.

Results of the inter-laboratory study on the detection of STEC in rocket salad (PT20) and in sprouts (PT21). Rosangela Tozzoli, EURL-VTEC

Rosangela Tozzoli raportoi viimeisten kahden vertailututkimuskierroksen (PT 20 rukolanäytteillä ja PT 21 itunäytteillä) tuloksista. PT 21 sisälsi vapaaehtoisen rinnakkaisrikastuksen 41,5 °C:ssa (jota suunnitellaan standardin ISO/TS 13136 uusimistyössä uudeksi rikastuslämpötilaksi 37 °C:n sijasta). Tutkimuksen pakolliseen osuuteen osallistui 39 *E. coli* NRL-laboratoriota, jotka edustivat 27 EU-maata ja muita maita (Egypti, Islanti, Norja, Venäjä ja Sveitsi). Lisäksi tutkimukseen osallistui Italian virallisia laboratoriota. Tutkimuksen vapaaehtoiseen osuuteen (41,5 °C) osallistui 48 *E. coli* NRL-laboratoriota (31 NRL:ää ja 17 Italian virallista laboratoriota). Kierros osoitti 41,5 °C rikastuksen paremmuuden; EURL oli havainnut 5 Ct:n pudotuksen positiivisissa tuloksissa 41,5 °C rikastuksella verrattuna 37°C rikastukseen (vastaava tulos monilla osallistuneilla laboratorioilla). Kun verrattiin kaikkia laboratoriota (myös 37°C rikastukseen osallistuneet Italian viralliset laboratoriot) saatiin seuraavia tuloksia bakteerin eristämisen osalta

Eristysaste viljelymenetelmällä:

Näyte	37°C rikastus (eristäneet laboratoriot)	41,5 °C rikastus (eristäneet laboratoriot)
matala STEC pitoisuus	29/45 (64,4 %)	43/47 (91,5 %)
korkea STEC pitoisuus	35/46 (76,1 %)	44/47 (93,6 %)

EURL sai kaikki osallistajat huomioiden menetelmän toteamisrajoiksi 5,5 CFU/g (37 °C rikastus) ja 1,7 CFU/g (41,5 °C rikastus). Tuloksia 41,5 °C rikastuksen paremmuudesta hyödynnetään mm. ISO/TS 13136 standardin uusimistyössä.

Update on the revision of the ISO TS 13136:2012. Rosangela Tozzoli, EURL-VTEC

ISO/TS 13136 standardin uudistamistyöstä kerrottiin. Viimeinen kokous pidettiin tämän workshopin yhteydessä 17. - 18.10.2018. Sovitut uudistukset lyhyesti:

- Standardin ISO 13136 Osa 1 (luonnon): stx1, stx2 ja eae –geenien skreenaaminen elintarvikkeen rikastusliemestä ja STEC bakteerien viljelyvarmistus (kaikki STEC bakteerit)
- Käytetään yksinomaan BPW rikastusta
- Nykyiset stx- ja eae-sekvenssit säilytettäisiin (mikä tarkoittaa että stx2f ei tule sisältymään standardiin)
- Eläinperäiset ja alkutuotannon näytteet sisällytetään standardiin (erillinen liite niille?). Ehdotin kyselyä niille tällä hetkellä käytössä olevista menetelmistä. Käytettävästä rikastusliemestä, lämpötilasta, ja inkubointiajasta ei vielä päätetty
- Bakteerien viljelymenetelmään on suunniteltu happokäsittelyä (1 h pH 2), joka vaikuttaa parantavan saantoa esim. itujen kaltaisissa matriiseissa joissa on voimakas taustakasvu. Osuus tulee olemaan vapaaehtoinen (tehdään rikasteelle rikastuksen jälkeen ennen maljausta).
- Inkubointilämpötilan nosto 37 °C:sta 41,5 °C:een on todennäköistä (seuraava vertailututkimuskierros PT 22 toteutetaan 41,5 °C:ssa)
- Standardin ISO 13136 Osa 2 (luonnon):: STEC karakterisointi serotyypin osalta
- Osa 2 käytetään vain osalla 1 eristettyjen kantojen karakterisointiin. Sovittiin että EAEC:tä ei tulla skreenaamaan suoraan elintarvikkeista (osa 1) mutta se tullaan sisällyttämään osaan 2 (kantojen karakterisointi)
- Toivottiin, että osassa 2 kuvattaisiin tärkeimmät virulenssigeenit ja mm. stx-alityypit serotyypin lisäksi (jotta riskinarviointiin saataisiin todellinen mahdollisuus)
- Osan 2 analyysien tulisi olla pääosin vapaaehtoisia ja tapa mahdollisimman vapaa (huomioisi myös WGS:n käyttämisen). Asiasta ei vielä päätetty.

Aiemmin sovittua:

- Kasteluveden esikäsittelytekniikka lisätään STEC standardiin.
- EURL:n julkaisema yhteenveto PCR:n toimivuudesta 2009 - 2016 välillä tehtyjen vertailututkimusten tulosten perusteella julkaistaan ISO 13136:n liitteenä.

Standardin jako kahteen osaan korjaa joitakin merkittäviä standardin aiempia valuvikoja kun ”alustava STEC todettu” tulos jää historiaan. Ongelmakohtaksi voi tulla, jos omavalvonnan toimija haluaa soveltaa tiukempaa kriteeriä (kuin viranomainen) varovaisuusperiaatteella ja haluaa toimia pelkän alustavan PCR –skreenaustuloksen perusteella. Takaisinvedossa tarvitaan dokumentointia saadusta tuloksesta. Laboratorion oikeusturvan kannalta voi muodostua ongelmaksi miten alustava tulos tällöin annetaan/dokumentoidaan (”epävirallisen” tuloksen antaminen menetelmän ollessa kesken).

STEC O157 infections linked to burger consumption in the UK in 2018. Frieda Jorgensen, NRL UK

Epidemianselvityksen yhteydessä kotipakastimessa säilytetyistä hampurilaispihveistä eristettiin potilaskantaa geneettisesti vastaava O157 STEC-kanta. Pakastetuotteelle tyypillisesti tartunnat olivat ajallisesti hajaantuneet monen kuukauden jaksolle. Takaisinveito toteutettiin useasta erästä. Pohdittiin, voisiko pihveissä olla tavanomaista enemmän STEC:iä. Määrää pihveissä tutkittiin *E. coli* O157 elintarvikemenetelmään (rikastus) perustuen MPN -tekniikalla (20

putkea rikastettiin ja tutkittiin PCR:llä ja varmistettiin viljelemällä). Määrä pihveissä oli erittäin pieni (< 1 MPN/näyte), joten runsas STEC määrä ei näyttänyt olevan syynä epidemiaan. Tuotantoketjussa ei havaittu virheitä, eikä näyttänyt siltä että kuluttajat olisivat jättäneet noudattamatta kuumennusohjetta. Kuumennusohjeessa oli riittävä turvallisuusmarginaali sairastumisen kannalta. Todettiin kuitenkin että epidemian todennäköisin syy oli pistemäinen runsas STEC pitoisuus yhdistettynä virheelliseen kypsennykseen. Saannin arviointia tehdään vielä lisää tämän tapauksen osalta. Tutkitaan vielä onko aiheuttajakanta erityisen lämmönkestävä.

STEC in beef prevalence study in Ireland. Montserrat Gutierrez, NRL Ireland

Irlannissa on Euroopan korkein STEC insidensi (16,62 / 100 000 asukasta, Euroopan keskiarvon ollessa 1,67). Irlannin VTEC One Health projektissa kartoitetaan kattavasti eri STEC lähteitä, nyt esiteltiin naudanlihan kansallisen perustason esiintyvyyden selvittämiseen tähtäävää tutkimusta. Näytteenotossa siveltiin naudan ruhon rinta ja kankku (4000 + 4000 cm²) ja otettiin kaksi sivelynäytettä (yksi kummastakin: ennen sisälmysten poistoa ja ennen jäähdystystä), sekä yksi koostettu lihanäyte. PCR osuus osoittautui käteväksi suorittaa, mutta viljelyvarmistus muodostui työlääksi pullonkaulaksi henkilöresurssien osalta. Tutkittiin 786 sivelynäytettä ja 357 lihanäytettä. STEC esiintyvyys oli lopulta vähän yli 1 %. Ongelmaksi analyyseissä koettiin sekaviljelmäpesäkkeet, eli STEC:iä oli vaikea saada puhtaana jatkoanalyyseihin (eivät tehneet laimennoksia).

Epidemiology of non-O157 STEC in paediatric haemolytic uremic syndrome. Gaia Scavia, NRL Italy

Kyseessä oli sama esitys kuin toukokuussa STEC kongressissa (kts. raportti kongressista). Todettiin että maantieteellisesti pysyvien tartuntaklustereiden takana on todennäköisemmin vesi- tai ympäristölähde kuin eläimet. Lähdettä ei ole pystytty vielä osoittamaan. STEC O26 tapaukset liittyivät haja-asutusalueille ja serotyyppien esiintymisessä havaittiin maantieteellistä jakaumaa (mm. O157 pohjoisessa, O111 etelässä).

Network activities, general discussion, and closing remarks. Stefano Morabito EURL VTEC

Yhteenvetoa workshopista: EFSA: n työryhmä aloittaa STEC patogeenisuuden arvioinnin, joka voi johtaa STEC elintarviketurvallisuuskriteeriin. JEMRA raportti korostaa, ettei serotyyppi ennusta patogeenisuutta, mutta on hyödyllinen epidemiologisessa seurannassa. Näytteenoton harmonisointi voisi lisätä tiedonkeruun tehokkuutta. Elintarviketurvillisuuden virulenssigeenien karakterisointia pitäisi lisätä. Virulenssityyppien liittyminen vakaviin tautimuotoihin (kuten HUS) on selvää, mutta silti kaikki toksiinialatyypit voivat liittyä kannan kykyyn aiheuttaa ripulioireita. Miten pitäisi suhtautua lievempiä tautimuotoja aiheuttaviin STEC kantoihin? Pidetäänkö niitä elintarvikehygieenisena uhkana?

STEC monitorointia/tiedonkeruuta haittaa näytteenottomenetelmien hajanaisuus ja harva maa toimittaa tietoa esim. STEC:in esiintymisestä iduissa (mikrobikriteeri). Tauolla keskusteltiin että EFSA:n olisi syytä kysyä toimittamisen ongelmista niiltä mailta jotka eivät tällä hetkellä toimita tietoa.

Vaikka NGS on tulossa, silti esim. 50 % laboratorioista terveydenhuoltosektorilla käyttää vielä PFGE:tä ja 60 % STEC NRL:stä on koulutettu käyttäjiksi. WGS kierroksella laboratoriot erosivat suuresti tyyppitysdatan laadun suhteen. Positiivista oli, että vähemmälläkin (taloudellisilla) ponnistuksilla sekvenssin laatuun saatiin virulenssi- ja serotyyppit esiin. Samalla on huomattava että fylogeniassa tarvitaan parempaa laatua ja koonnin optimointia.