

Matkakertomus

The 17th EURL-Campylobacter workshop 26-28.9.2022, Sigtuna, Sweden

Satu Olkkola (etä)

27.–28.9.2022

Ann Lindberg ja Hanna Skarin avasivat kokouksen. Kun kaikki olivat esitelleet itsensä, Hanna kertoi yleisiä ohjeita, mm. että kokousta ei tallenneta ollenkaan sekä kertoi lyhyen yhteenvedon edellisten kokousten arvioinneista (keskimäärin kokousten sisältöihin ollaan oltu erittäin tyytyväisiä. Digitaalisiin työpajoihin Teams-alustalla ollaan oltu myös tyytyväisiä, hyviä puolia: ympäristö, ajansäästö, rahan säästö jne, huonoja verkostoitumisen puute). Hän tiedotti myös EU komission päätöksestä valmistella monivuotinen rahoituspäätös EURL-aktiviteeteille vuosille 2023–2024. Campylobacter-EURL nettisivuilta löytyy nyt päivitetty yhteyshenkilölista eri NRL:iin. Lisäksi laboratory procedures-sivua on päivitetty mittausepävarmuuden suhteen, ja sieltä löytyy mm. ohje ISO 19036:n soveltamiseen sekä raportti matriisiepävarmuustutkimuksesta.

Hanna kertoi myös lyhyesti SVA:n maitotutkimuksista, joissa oli tutkittu pH-säädön (6,7 -> 7 tai 7,6) vaikutusta kantojen elinkykyyn käyttäen joko eri kantoja tai stressaantuneita kantoja. Tuloksena oli, että pH ei vaikuttanut juurikaan mutta stressaantuneet kannat menettivät elinkykynsä nopeammin. Johtopäätöksenä oli, että näytteet olisi tutkittava mahdollisimman pian näytteenoton jälkeen.

Seuraavaksi Giusi Amore EFSA:sta esitteli EU One Health zoonoses (EUOHZ)- ja AMR-seurantareporttien tuloksia kamylobakteerien osalta vuodelta 2020. Vuosi 2020 oli aiempaan verrattuna erityinen, koska kyseessä oli ensimmäinen vuosi, kun UK ei ollut enää mukana, ja lisäksi COVID toi omat haasteensa. Näistä syistä data-analyysi oli haastavampaa kuin normaalista.

Yhteenvedo:

EUOHZ (jossa raportoidaan dataa, jonka keräys perustuu säädöksiin 2003/99/EC: zoonosien ja zoonoottisten taudinaiheuttajien monitorointi, 2073/2005 mikrobikriteeriasetus sekä 2019/627 komission täytäntöönpanoasetus, jonka myötä vuonna 2020 tuli pakolliseksi raportoida em. mukaista dataa broilerin kaulanahoista): Kamylobakterioosi oli edelleen eniten raportoitu zoonoosi (mitä ollut jo vuodesta 2005 lähtien). Ihmisten (matkustukseen liittyvät) kamylobakterioositapaukset vähenivät, mutta tämä johtunee lähinnä Brexitistä sekä COVID-19:sta. Trendi vuosilta 2016–2020 oli kuitenkin stabiili.

Kamylobakteeriepidemiat (outbreaks) vähenivät EU-maissa 41 %:lla vuonna 2020 verrattuna edelliseen vuoteen (laskelmissa huomioitu Brexitin vaikutus), mutta maiden välillä oli eroja. Syynä voi olla vähentynyt altistuminen kontaminoituneille elintarvikkeille tai sitten resurssien keskittyminen muualle sekä mahdollisesti vähentynyt detektio (underdetection) ja aliraportointi. Vuonna 2020 yhteensä 21 jäsenmaata raportoi mikrobikriteeriasetuksen mukaista dataa kamylobakteereista. Tämä oli enemmän kuin vuonna 2019, jolloin vain 14 jäsenmaata raportoi dataa, mikä oli odotettavissa asetuksen 2019/627 voimaantulon takia. Kamylobakteerien suhteen positiivisten parvien lukumäärä ja prosenttiosuus kasvoivat edellisvuodesta. Positiivisten kaulanahkanäytteiden osuus oli tilastollisesti merkitsevästi matalampi kuin vuonna 2008 tehdyssä kartoituksessa, jossa tutkittiin ruhonäytteitä. Eron arvioitiin johtuvan erilaisesta näytteenottotavasta ja siitä, että käytettiin vain kvantitatiivista menetelmää (ei yhtä herkkä). Vuonna 2020 keskimäärin EU-maissa 17 % näytteestä ylitti lainsäädännön pitoisuusrajan 1000 pmy/g. Niiden jäsenmaiden osalta, joista raportoitiin dataa sekä viranomaistaholta että teollisuudesta, em. rajan ylittävien näytteiden määrä oli merkitsevästi suurempi viranomaisnäytteissä kuin teollisuuden omavalvonnassa otetuissa. RTE (Ready-to-Eat) tuotteissa kamylobakteereita todettiin vain vähän, ja tilanne on pysynyt stabiilina vuosia, mutta RTE-tuotteet ovat silti huolenaihe, koska ne altistavat kuluttajan suoraan sairastumiselle. Vuonna 2020 kamylobakteereita todettiin kaikissa suurimmissa eläinryhmissä, broilereissa, kalkkunoissa, naudoissa, sioissa, koirissa ja kissoissa. Broilereita ja kalkkunoita testattiin eniten

(> 60 % tuloksista). Suurin %-osuus positiivisia näytteitä löytyi sioista ja kalkkunoista, mutta tuloksia vääristävät pienet otoskoot.

AMR-seuranta EU:ssa tehtiin vuonna 2020 vielä vanhan asetuksen 2013/652/EU mukaisesti ja tutkittavat antibiootit olivat tetrasykliini, erytromysiini (makrolidi), siprofloksasiini (fluorokinoloni), nalidiksiinihappo (kinoloni), gentamisiini ja streptomysiini (aminoglykosideja). *C. coli*-isolaattien keräys ja herkkyystutkimus oli vielä vapaaehtoista. Päälöydöksinä resistenttien kantojen osuudet vaihtelivat suuresti jäsenmaiden välillä, siprofloksasiinille resistenttien kantojen osuus oli hyvin suuri ihmisiltä eristetyillä kannoilla ja erittäin suuri broilerin, sikojen ja vasikoiden kannoilla. Erytromysiinille resistenttejä *C. jejuni*-kantoja ei juurikaan havaittu ihmisillä, broilereilla tai vasikoilla kun taas erytromysiinille resistenttejä *C. coli*-kantoja löytyi enemmän ihmisiltä, sioilta ja broilereilta. *C. jejuni*-kannat olivat useammin herkkiä kaikille tutkituille antibiooteille (complete susceptibility) kuin *C. coli*-kannat samoista eläinlajeista. Ajanjaksolla 2016–2020 siprofloksiinille resistenttien ihmisten *C. jejuni*-kantojen määrä lisääntyi yhdeksässä maassa, kun taas erytromysiiniresistenssi vähentyi viidessä maassa. Samoin broilereiden *C. jejuni*-kantojen siprofloksasiiniresistenssi lisääntyi vuosina 2009–2020 14 maassa kun taas erytromysiiniresistenssi väheni kuudessa maassa. On huomionarvoista, että vaikkakin ajanjaksot ja dataa tuottavat maat eivät olleet identtiset, samankaltainen lisääntyvä tai vähenevä trendi havaittiin maiden sisällä sekä ihmisten että broilereiden kannoilla, erityisesti siprofloksasiiniresistenssin suhteen. Korkean tason erytromysiiniresistenssiä (MIC > 128 mg/l, mahdollisia *ermB*-geenin kantajia) havaittiin eniten sikojen, kalkkunoiden ja vasikoiden *C. coli*-isolaateissa. Samanaikainen resistenssi sekä siprofloksasiinille että erytromysiinille (kriittisen tärkeät antibiootit ihmisten kampylobakterioosin hoidossa) oli harvinaista tai hyvin matalalla tasolla ihmisten, siipikarjan ja vasikoiden *C. jejuni*-isolaateilla kun taas ihmisten, sikojen, siipikarjan *C. coli*-isolaateilla tällaisten kantojen osuus oli matalalla tai kohtalaisella tasolla.

Seuraavaksi on julkaisuvuorossa vuoden 2021 EU One Health Zoonoses-raportti joulukuussa 2022. Suunnitelmissa on siirtyä staattisemmista zoonosiraporteista interaktiivisempiin työkaluihin, jotka linkkautuvat raportteihin. Tätä varten on kehitetty uusia viestintä- ja visualisaatiotyökaluja: story maps ja dashboards on *Campylobacter*, *Salmonella* ja *Listeria monocytogenes*, jotka myös julkaistaan joulukuussa 2022. Elintarvikevälikkeiden epidemioiden raportointiin vuodelta 2022 tulee uutena mahdollisuus vapaaehtoisesti raportoida molekulaarista dataa (ST ja CC). Seuraava EU summary report on AMR vuodelta 2021 julkaistaan helmikuussa 2023. Siihen on tulossa story map ja dashboard on AMR (erityinen story map ja dashboard kampylobakteereista on suunnitteilla toteuttaa vuosina 2024–2026).

Johanna Takkinen ECDC:stä kertoi ihmisten kampylobakterioosista EU/EEA-maissa vuosilta 2020–2021, mutta data on luottamuksellista/salassa pidettävää koska ei ole vielä julkaistu. Johanna esitteli myös tuloksia kansallisten kliinisten referenssilaboratorioiden (NPHRL = national public health reference laboratory) 7. EQAS-kierrokselta kampylobakteerien osalta vuodelta 2021. Kierroksen tarkoituksena oli tukea harmonisoidun herkkyystestauksen (EU AST) käyttöönottoa kampyloilla ja salmonellalla, arvioida MIC- ja disk diffuusio(DD)-menetelmillä saadun AST-datan laatua eri laboratorioissa, mahdollistaa uusien molekulaarisia menetelmiä (WGS, PCR jne) sekä arvioida lajitunnistuksen onnistumista. Tavoitteina oli löytää yleisiä laboratorio-ongelmia sekä arvioida NPHRL:stä rutiinisti kerättyjen AST-tulosten vertailtavuutta. Kierrokselle osallistui 25 maata, joista 14 raportoi DD-tuloksia, 14 MIC-tuloksia (joko liemilaimennos tai gradient strip-menetelmällä saatuja). Lisäksi 6 raportoi tuloksia WGS-tyyppityksen perusteella. Kierroksella piti tutkia viisi kantaa (AST ja lajitunnistus), pakollisina antibiootteina siprofloksasiini, erytromysiini ja tetrasykliini, lisäksi gentamisiini oli vapaaehtoinen.

Tulosten perusteella MIC-menetelmä antoi useammin odotetun tuloksen, gentamisiinin osalta ero oli huomattava. Erytromysiinin osalta oli eniten vääriä tuloksia molemmilla menetelmillä. Kun arvioitiin tuloksia vain ECOFF:ien perusteella, vääriä tuloksia oli vähemmän. Kaiken kaikkiaan molemmilla menetelmillä menestytettiin kuitenkin hyvin, mutta joidenkin laboratorioiden osalta MIC-testauksen laatua ei pystytty arvioimaan, koska testin pitoisuusväli ei sopinut kannoille.

Seuraavaksi Johanna kertoi ECDC:n pilotti-Campylobacter-WGS-projektista, joka sai alkunsa kahdesta kiireellisestä Ruotsin ja Saksan tekemästä *C. jejuni*-epidemiaan liittyvästä tiedustelusta (inquiries) vuonna 2020. Molempien arvioitiin kattavan useita maita (cross-boarder spread), ja boilerin lihaa epäiltiin infektion levittäjäksi. ECDC kokosi sekvenssejä keskitetysti, jotta maidenvälinen epidemia saatiin varmistetuksi. Tällä hetkellä 5 maata on jakanut DNA-näytteitä tai sekvenssejä 337 isolaatista vuosilta 2020–2021, näistä 326 on otettu mukaan cgMLST-analyyysiin ja analyysi paljasti mahdollisen monen maan välisen epidemian (3/5 maan isolaatit muodostivat klusterin). Tutkimus jatkuu, mahdollisesti otetaan mukaan dataa muistakin maista tai esim. mukaan integroidaan tuloksia elintarvikkeista ja eläimistä. Lopuksi käytiin läpi EpiPulsen toimintaa ja rakennetta sekä kriteereitä, miten elintarviketurvallisuusosalta pääsee alustan käyttäjiksi. Kyseessä on uusi virtuaalinen alusta tapausten seurantaan (event-base surveillance). Siellä asiantuntijat eri verkostoista voivat kerätä, tutkia, jakaa infektiioihin liittyvää tietoa sekä keskustella esim. ECDC edustajien kanssa. Tarkoituksena on rajoja ylittävien uhkien aikainen havaitseminen sekä arviointi.

Vala Fridriksdottirin esitys koski kampylobakteerien ja kampylobakterioosin historiaa Islannissa. Islannissa on pitkät perinteet siipikarjan tuotannosta, sillä viikingit toivat ne Islantiin jo 900-luvulla. Moderni tuotanto alkoi 1940–50-luvuilla ja keskittyi broilereihiin, kalkkunoihin ja muniin. Vuoteen 1996 asti broilerinliha tuli myydä vain pakastettuna, mutta sen jälkeen sallittiin myös tuoreen lihan myynti ja vuosina 1996–1999 tuoreena myydyn lihan osuus kasvoi nopeasti 5- \rightarrow 60 %. Ihmisten kampylobakterioositapaukset lisääntyivät nopeasti vuosina 1998–2000, ne olivat suurimmaksi osaksi kotimaista alkuperää ja ne linkitettiin tuoreen siipikarjanlihan kulutuksen nousuun: kuluttajat eivät olleet tietoisia riskistä eivätkä osanneet käsitellä lihaa oikein.

Ennen vuotta 1998 Islannissa ei juurikaan tiedetty kampylobakteerien esiintymisestä luonnossa tai eläimillä, eikä niitä pidetty ongelmana broilerintuotannossa. Niitä ei myöskään kontrolloitu mitenkään tuotantoketjussa, toisin kuin salmonellaa. Vuosina 1999–2000 Islannissa tehtiin kartoitus, jonka tuloksena huomattiin, että kampylobakteereita löytyy laajalti luonnosta, tuotantoeläimistä, villeistä linnuista, pintavesistä ja viemäreistä. Siipikarjatuotteet, käsittelemätön pintavesi sekä raakamaito olivat vuonna 1998 ja edelleen vuonna 2021 pääsyyt ihmisten kampylobakterioosille. Vuosien 1998–2000 lisääntyneiden kampylobakterioositapausten vuoksi tehtiin interventioita: esiintymistä alettiin kontrolloida broilerintuotannossa ja teurastamoissa, kuluttajia valistettiin mm. mainoskampanjoilla, panostettiin puhtauteen ja raakatuotteiden oikeaan käsittelyyn sekä bioturvallisuuteen tiloilla. Jokainen broileriparvi sai oman uniikin tunnisteensa (Rlnr), ja kaikki tieto parven kampylobakteeri- ja salmonellastatuksesta linkittyy nykyään tuohon numeroon, joka seuraa myös lihaa. Viranomaiset keräävät tietoa parvista säännöllisesti ja kaikki kontrollinäytteet linkittyvät myös tuohon numeroon.

Vuosina 2001–2004 toteutettiin ”Campy on Ice”-projekti (mukana USA, Kanada, Ruotsi, Islanti), joka kartoitti siipikarjan kampylobakteerien lähdeitä ja riskitekijöitä ja merkitystä ihmisten sairastumiseen suljetussa systeemissä. Islanti sopi hyvin malliksi, koska siellä on hyvät rekisterit, kaikki lähellä, vain muutamia tuottajia sekä tiedon keräys helppoa. Hankkeessa kerättiin näytteitä eri tuotantovaiheista sekä monenlaista (maantieteellistä, ilmastollista jne.) dataa, jonka avulla muodostettiin tietokanta, tarkoituksena löytää tärkeimmät infektioreitit sekä infektiioon vaikuttavat tekijät. Projektin perusteella bioturvallisuus oli avainasemassa, erityisesti puhtaus ja hygieniasulut, all-in all-out-systeemit parempia (ei väliharvennuksia), kuljetushäkkien desinfektio, ja veden UV-käsittely. Myös broilerin teurasikä oli keskeinen, sillä infektioriski kasvaa iän myötä. Hankkeen tulosten perusteella kaikki ennen teurastusta kampylobakteerien suhteen positiivisiksi testatuista parvista saatu liha pakastetaan, ruhot pidetään -20 C:ssa vähintään 2 viikkoa, mikä johtaa ainakin yhden login vähenemiseen kampylobakteerien määrässä ja vähentää infektioriskiä 90 %. Tuottajilla on positiivinen kannustin yrittää päästä kampylobakteereista eroon, koska tuoreesta lihasta saa paremman hinnan. Parven statuksen toteamiseksi kaikista parvista otetaan ulostenäytteet viimeistään 5 päivää ennen teurastusta ja positiiviset erät teurastetaan vasta viikon lopussa ja vältetään ristikontaminaatiota teurastamoissa. Interventiot tuntuvat toimivan sillä

kampylobakteerien suhteen positiivisten parvien määrä on vähentynyt tasaisesti ja on jo lähellä nollaa prosenttia.

Hankkeen perusteella kampylobakteerit eivät leviä vertikaalisesti: Islantiin tuotiin isovanhempaispolven parvien, joista 52 % oli kampylobakteeriposiitivisia, hedelmöittyneitä munia, mutta näistä kuoriutuneista broilerivanhemmista kaikki olivat negatiivisia 6 viikon iässä. 19 viikon iässä 69 % oli kampylobakteerin suhteen positiivisia mutta geneettisesti eri kantoja kuin isonvanhemmilla (flaA SVR-tyyppityksen perusteella). Nautatilojen läheisyys näytti lisäävän kampylobakteerien riskiä broileritiloilla, kenties hyönteisten välityksellä. Tärkeäksi havaittiin hyönteisten pääsyn esto tuotantotiloihin (esim. verkkojen avulla), erityisesti kesäkuukausina. Mielenkiintoinen oli myös löydös, jonka mukaan ihmisten kampylobakteeritapauksissa on huippu ennen broilerien esiintymishuippua, joten niillä on mahdollisesti yhteinen lähde.

Kaikista interventioista huolimatta kampylobakterioosi on edelleen tärkein zoonoottisten infektioiden lähde Islannissa(kin): vuonna 2019 tapauksia rekisteröitiin 38.1/100 000 asukasta (EU keskiarvo 59.7). Islannissa oleva lainsäädännön raja (> 500 pmy/g) on tiukempi kuin mikrobikriteeriasetuksen raja (> 1000 pmy/g) ja esim. vuonna 2021 99.2 %:ssa tutkituista niskanahkanäytteistä pitoisuus oli <10 pmy/g kun vain 0,5 %:ssa oli > 500 pmy/g.

Lopuksi esitys käsitteli vielä AMR-tuloksia. Vuonna 2020 tutkittiin 693 broilerien umpisuolinäytettä, joista vain seitsemätä löytyi *C. jejuni* ja kaikki isolaatit olivat herkkiä kaikille tutkituille antibiooteille. Vuonna 2021 tutkittiin sikojen umpisuolia ja tilanne oli hyvin erilainen: 145/152 näytettä oli positiivisia *C. colin* suhteen ja näistä 75.9 % oli resistentti siprofloksasiinille (mutta herkkiä kaikille muille tutkituille antibiooteille). Tulos oli yllätys eikä resistenssin syy ole tiedossa.

Voisiko Islannin mallin (broilerien suhteen) sitten toistaa muualla? Voi olla hankalaa monissa maissa mm. seuraavista syistä: Islanti on harvaanasuttu, broileritilat sijaitsevat kaukana toisistaan ja niitä on vähän, suuria teurastamoja on vain kolme, asioita on helppo kontrolloida, ilmasto on kylmä, ulkoilmakasvatus ei ole mahdollista, hyönteisiä on vähän ja ympäristökuorma ei niin korkea.

Anette Nygaard Jensen kertoi puolestaan Tanskan Campylobacter Action Planista, joita on tehty vuodesta 2003 lähtien. Kyseessä on strategiat, joilla kontrolloidaan kampylobakteerien esiintymistä broileriparvissa ja teurastamoissa. Toimintasuunnitelmat tehdään yhteistyössä viranomaisten (DVFA -Danish Veterinary and Food Institute), teollisuuden ja DTU:n välillä. Uusin suunnitelma kattaa vuodet 2022–2026 ja on nimeltään ”Action plan for Campylobacter in broilers, foods and in the environment”. Tavoitteina on pienentää kuluttajien riskiä saada infektio broilerinlihasta (arvioidaan Relative Risk-mallin avulla, joka päivitetään jokaiselle teurastamolle) ja saada positiivisten parvien määrä pysymään vuoden 2020 tasolla siitä huolimatta, että ulkoilmakasvatus lisääntyy, sekä positiivisten parvien yleinen vähentyminen 5-vuotiskaudella. Tanskalaisessa broilerituotannossa kampylobakteerin esiintymistä valvotaan ottamalla kloaakkisivelynäytteitä jokaisesta parvesta (tila-/hallitason esiintyvyyttä), jalan ihonäytteitä satunnaisesti valikoiduista parvista (teurastamohygienia) sekä kaulanahkanäytteitä satunnaisesti määrättyä parvia (teurastushygienia). Uuden toimintasuunnitelman tarkoituksena on myös arvioida ja muuttaa lopulta seurantaan tarpeen mukaan sekä valvoa tanskalaista ja maahantuotua broilerinlihaa kaupan tasolla. Toimintasuunnitelmassa otetaan kantaa myös lähteiden paikantamiseen (source attribution), tarkoituksena on mm. selvittää, josko sekvenssipohjainen tyyppitys (WGS) voisi auttaa ratkaisemaan kampylobakteeriin liittyviä ongelmia tiloilla, teurastamoilla sekä myös lähteiden paikallistamisessa. Lisäksi halutaan selvittää, mitä dataa tulisi jakaa teurastamoiden ja viranomaisten välillä, jotta lähteiden selvitys kävisi nopeammin, sekä kehittää nopeampia ja halvempia tyyppitysmenetelmiä. Tarkoituksena on myös mm. genomidatan perusteella selvittää, tapahtuuko kontaminaatioita broilereiden ja nautojen välillä, ja mikä niiden suunta on. Jatkovana tavoitteena on estää kampylobakteerien esiintymistä broilerintuotannossa mm. seuraavin keinoin: kehittämällä parhaita menetelmiä osittaisteurastukseen, identifioida korkean riskin tiloja ja käyttää tietoa aktiivisemmin valvonnassa sekä selvittää, mitkä interventiot sopivat parhaiten erityyppisille

riskituloille. Ulkoilmakasvatuksessa yritetään löytää interventioita, jotka vähentäisivät kampylobakteerien määrää lintujen suolistossa sekä optimoidaan bioturvallisuutta, managementtia sekä tilojen ylläpitoa. Lisäksi tilallisia motivoidaan eri keinoin ja teurastamoilla mm. käytetään em. relative risk-mallia jonka avulla voidaan seurata riskin pienentymistä kaikissa neljässä isoimmassa teurastamossa. Lisäksi tehdään erityisiä teurastushygieniaan liittyviä toimia, jotka kohdistuvat pieniin teurastamoihin, sekä kehitetään yleisesti lihantarkastukseen liittyvää kompetenssia broileriteurastamoissa.

Toimintasuunnitelmaan kuuluu myös tiedontuotto eri tutkimusprojektien kautta, esim. SafeChicken-projekti (2021–2024) arvioi rehun lisäaineiden vaikutusta kampylobakteerien vähentämiseen, muitakin projekteja on käynnissä. Kuluttajia tiedotetaan esim. sos. median kanavien kautta kampylobakteerien riskistä ja kaikkia tehtyjä toimenpiteitä (efforts) arvioidaan jatkuvasti.

Michel-Yves Mistou INRAE:sta kertoi [One Health EJP CARE](#)-projektin tuottamasta [CARE-kantakokoelmasta](#). Projektin tässä osassa oli kolme tavoitetta: luoda elintarvikeväliaineiden patogeeneiden fyysinen kokoelma, rakentaa tietokanta ja online-portaali kantojen etsimistä ja tilaamista varten sekä varmistaa kokoelman pysyvyys/ylläpito. Syinä kokoelman keräämiseen olivat mm., että kokeelliseen työhön voi olla hankala saada muutoin kiinnostavia kantoja, koska kaikkea ei voi tehdä *in silico* ja erikoistuneet ja luotettavat kantakokoelmat ovat tärkeitä esim. menetelmäkehitykselle. Kokoelman avulla voi tutkia vaikkapa patogeeneiden evoluutiota, validoida uusia menetelmiä tai järjestää sektorien välisiä PT-kierroksia (kyseessä ei ole kuitenkaan ns. certified reference material eli ei luultavasti käy esim. akkreditoinnin hakemiseen jollekin menetelmälle). Joka vuosi otetaan paljon näytteitä eri tahojen toimesta, mutta suurin osa ei ole saatavilla tutkimuksen ja kehityksen tarpeisiin.

Seitsemän elintarvikeväliaineista bakteeria (*Listeria monocytogenes*, *Yersinia*, *Bacillus cereus*, *Campylobacter*, *Staphylococcus aureus*, STEC, *Salmonella*) valikoitui CARE:n 1. kierrokselle. Kantojen selektiokriteereinä käytettiin vähimmäismäärää metadataa, relevanssia elintarvikeeturvallisuudelle, AMR-fenotyyppiä, kantaa koskevan WGS-datan saatavuutta sekä jaettavuutta. Kantojen lähettäjät säilyttävät omistusoikeutensa kantoihin, mikäli niitä käytetään mihin tahansa kehitystyöhön, josta voisi olla kaupallista hyötyä. Nyt 15 instituuttia yhdeksästä maasta ovat lähettäneet kantoja CARE-kokoelmaan.

Kokoelmaa ylläpidetään tällä hetkellä kolmessa eri mBRC:ssä (microbial biological resource center): CIP (Collection of Institut Pasteur), BVR IZSLER (Biobank of Veterinary resources) ja CIRM-BP INRAE (Centre International de Ressources Microbiennes). mBRC:isä on olemassa laadunvarmistussysteemit kantojen vastaanottoon, validointiin ja karakterisointiin sekä niiden säilyttämiseen ja jakeluun.

Nettisivulta cirmbp.bio-aware.com löytyy kantojen metadata (mm. resistenssiprofiilit) ja linkki ENA:an tallennettuun sekvenssidataan. CARE-portaali on jaettu viiteen osaan: kantojen etsintään, kantojen tallennukseen, kantojen tilaukseen, CARE-team/partners-osioon ja resurssien dokumentaatioon.

Sivustolta voi tilata RM kantoja (CARE collection) maksua vastaan ja kantoja voi myös lähettää näihin kokoelmiin. Tällä hetkellä tietokannassa on 688 kantaa ja gap-analyysi on meneillään. Kampylobakteeri-kantoja on yhteensä 153 neljästä eri maasta, ja ne edustavat 77 ST-tyyppiä. Kokoelmaan sisältyy myös pieni ST-50-tyypin kokoelma eri maista ja sektoreilta. Tietokannasta löytyy linkit WGS-dataan: näytteenottopäivä, -paikka ja sektori, lähettänyt laboratorio, ennustetut AMR- ja virulenssigeenit sekä resistenssiprofiili.

Seuraavaksi Elina Lahti kävi läpi CARE:n työpaketti 1:sta, jonka tavoitteena oli kehittää ohjeistusta monialaisten vertailumittauskierrosten järjestämiseen, jotka testaavat kyvykkyyttä selvittää elintarvikeväliaineisiin taudinpurkauksia eri sektorien välisellä yhteistyöllä sekä varmistaa menetelmien yhdenmukaisuus. Työpakettin tarkoituksena oli tuottaa SOP ja ohjeistusta tulevien monialaisten One Health-vertailumittauskierrosten järjestämiseen, sekä myös tieteellisiä julkaisuja.

Työpaketin puitteissa järjestettiin kolme pilotti-PT:tä joista Elina kävi läpi PT 1:n (**detektio ja karakterisointi**, elintarvikevälitteiset bakteeripatogeenit), jonka tavoitteena oli olla ensimmäinen monialainen PT ja arvioida eri sektoreiden kykyä detektoida ja karakterisoida elintarvikevälitteisiä patogeeneja sekä tuottaa muiden vertailumittauskierrosten kanssa dataa suosituksista tulevaisuuden monialaisten kierrosten järjestämiseen. Osallistujina oli 15 laboratoriota (12 CARE partneria ja 3 sairaalalaboratoriota Ruotsista). Kierroksella simuloitiin epidemiatilanne (taustainfo keksitty) ja se koostui viidestä näytteestä seuraavasti: C1= *C. coli*, C2 = *S. Stockholm*+ *Y. enterocolitica* BT4/O:3, C3= *S. enteritidis*+ *C. jejuni*, C4= blank, C5= *Y. enterocolitica* BT 1A= ei patogeeninen. Näytteet simuloivat uloste- tai ympäristönäytteitä, bakteeritasot olivat lähellä tai yli rutiininäytteiden tasojen. Näytteet tuli analysoida omilla käytössä olevilla menetelmillä laji-, serovaari- tai bioserotyypitasolle, bakteerilajista riippuen. Lisäksi piti vastata kyselyyn käytetyistä menetelmistä, tutkitun näytteen koosta (sample size) ja siitä, olivatko löydökset osallistujan mielestä merkittäviä sekä tutkiiko laboratorio rutiinisti kyseisenlaisia näytteitä/bakteereja.

Tuloksista huomattiin, että detektiotasot erosivat sektoreiden välillä. Virheet olivat enimmäkseen vääriä negatiivisia, C2 osoittautui erityisen haastavaksi (syiksi arvioitiin mm. pieni sample size, ei rikastusta, matala pitoisuus näytteessä). Osallistuvilla laboratorioilla oli erilaisia menetelmiä käytössä:

Kampylobakteerien osalta 13 laboratoriota osallistui, analysoitu näytemäärä vaihteli 10 µl:n ja 10 ml:n välillä, 8 käytti rikastusta ja 6 ei rikastanut, inkubaatiolämpötila oli 37–42 C ja selektiivimedioiden käyttökin vaihteli. Tunnistusmenetelminä olivat käytössä MALDI, biokemiallinen tunnistus, PCR ja WGS.

Lopputuloksena nähtiin tärkeänä, että tällaisia monialaisia PT:itä järjestettäisiin jatkossakin, sillä ne auttavat ymmärtämään One Health-kapasiteettia koskien elintarvikevälitteisten patogeenien detektiota ja karakterisointia (ymmärretään paremmin mitä menetelmiä eri sektoreilla on käytössä datan saamiseksi), ja lisäksi ne toimivat apuna, kun tulkitaan kentältä saatua seuranta-aineistoa (surveillance data). Raportti on [Zenodossa](#), ja käsikirjoitus on valmisteilla.

Hanna Skarin kävi läpi SVA:n organisoimia EURL-vertailumittauskierrosten 31 (enumeration) ja 32 (detektio ja karakterisointi) tuloksia.

PT 31:n EURL tilasi Ruotsin ruokavirastolta (Swedish Food Agency, SFA) ja siinä kvantifioitiin kampylobakteerin määrää broilerinnahassa sekä vapaaehtoisena myös tunnistettiin kampylobakteerilajit näytteistä, menetelmäsuositus oli ISO 10272-2:2017 mutta muutkin sallittiin. Näytteenä oli noin 120 g:n pussi broilerinnahkaa, joka piti jakaa kymmeneen 10 g osaan sekä 10 näytepulloa (vials) kylmäkuivattua näytettä, jossa oli tai ei ollut kampylobakteereita. Näytteet laimennettiin ja lisättiin nahkaeriin. Ennen näytteiden lähetystä EURL teki lukuisia testejä näytteiden stabiilisuuteen ja homogeenisuuteen liittyen, lisäksi EURL:ssä suoritettiin testaus päivä näytteiden lähettämisen jälkeen sekä viimeisen analyysin aloituspäivän jälkeen. Myös kvantitatiivisia testejä tehtiin, jotta varmistuttiin näytteiden stabiilisuudesta kuljetuksen aikana. Käytetty nahka tilattiin teurastamolta, jossa tiedettiin olevan vain vähän kampylobakteeriposiivisia parvia, nahka testattiin kolmena rinnakkaisena rikastamalla sekä bolton- että preston-liemissä ja myös suoraviljelyllä-> kaikki olivat negatiivisia kampylobakteereiden sekä taustakasvun suhteen mCCDA:lla. Nahat pakastettiin vielä -20 C:een ennen lähetystä. Esityksessä käytiin läpi näytteiden lähetystä ja tulosten laskemistapaa, jossa käytettiin keskihajontaa (? Median absolute deviation MADe). Tänä vuonna tuloksissa oli vähemmän hajontaa osallistujien (n= 31) kesken kuin aiemmin ja kaikki ylsivät vähintään hyväksyttävälle tasolle kvantitatiivisten tulosten suhteen. Lajien tunnistuksessa oli muutama virhe, joista suurin osa johtui luultavasti siitä, että kaksi laboratoriota olivat sekoittaneet näytteitä keskenään. Mittausepävarmuusarvoja saatiin 20 laboratoriolta, ja suurin osa oli sallituissa rajoissa. Tulevaisuuden kierroksilla kerätään lisää mittausepävarmuusdataa.

Vertailumittauskierroksella 32 tavoitteena oli arvioida NRL:en kykyä detektoida ja identifioida kampylobakteerilajeja sikojen ulosteesta. Näytteinä lähetettiin 120 g steriloitua sian ulostetta sekä 10 kylmäkuivattua näytepulloa (joissa oli tai ei ollut kampylobakteereita). Jokaisen putken sisältö sekoitettiin 6

grammaan sian ulostetta. Lisäksi oli vapaaehtoinen osuus, jossa voi tutkia kahta 10 gramman erää luonnollisesti kontaminoitunutta tuoretta sian ulostetta. Tälläkin kierroksella näytteet testattiin ennalta homogeenisuuden ja stabiilisuuden suhteen EURL:ssä, myös kuljetuksen aikana. Sian uloste pakolliseen osuuteen kerättiin paikalliselta tilalta kolme kuukautta etukäteen, autoklavoiitiin ja testattiin negatiiviseksi kampyloidien suhteen sekä säilytettiin -20 C:ssa, kun taas vapaaehtoisen osuuden sian uloste kerättiin 3 päivää ennen lähetystä ja säilytettiin siihen asti + 4 C:ssa. Kaiken kaikkiaan 32 osallistuneesta laboratorionista 81 % sai erinomaisen, 28 % hyvän, 3 % hyväksyttävän tuloksen detektiosta, ja vain yhden NRL:n detektiomenetelmät vaativat tulosten perusteella parannusta. Lajintunnistuksen suhteen kaikilla oli erinomainen tulos eli vääriä tunnistustuloksia ei ollut lainkaan.

Vapaaehtoisen osuuden näytteet olivat haastavampia, tulokset vaihtelivat ja useita eri lajeja tunnistui (tutkittujen pesäkkeiden lukumäärä vaihteli 1–25 välillä). SVA tutki itse neljä pesäkettä ja löysi vain *C. jejunia*.

PT 33:n tuloksia ("epidemia-PT") kävivät läpi Asgeir Astvaldsson ja Bo Segerman. Tällä vertailumittauskierroksella osallistujille lähetettiin valmiiksi eristettyä DNA:ta kuudesta *C. jejuni*-kannasta, jotka edustivat samaa ST-19 tyyppiä. Näytteitä oli yhteensä seitsemän, sillä yhden kannan DNA lähetettiin duplikaattina. Kannat oli eristetty eri tiloilta eri ajankohtina, suurin osa oli peräisin broilereista. Kaikille tehtiin EURL:ssä referenssikoonnit käyttäen short-read (illumina) ja long-read (Nanopore)-tekniikoita ja niiden avulla saatiin tehtyä aukottomat koonnit. Osallistujien tuli valmistaa kirjasto, sekvensoida sekä analysoida tulokset omia menetelmiään käyttäen, MLST-analyysi oli pakollinen, AMR-analyysi oli vapaaehtoinen. Klusterianalyysin saattoi tehdä gene-by-gene-, SNP- tai jollakin muulla menetelmällä ja omia cut-off-arvoja tuli käyttää klusterien määrittämiseen. Kaikkien osallistujien tuli ladata tulosdatana sekvensointiraakadata, koonnit, klusterianalyysipuut sekä siihen liittyvä raakadata. Suurin osa osallistujista käytti kirjaston valmistukseen Illuminan DNA Prep Kit:iä, seuraavaksi yleisin oli Illuminan Nextera XT-kitti. Nextera XT-kitin huonona puolena on se, että readit eivät jakaannu tasaisesti koko genomien alueelle ja harhan suuruus riippuu genomien GC-pitoisuudesta, matalan GC-pitoisuuden alueilla on pienempi lukupeitto, joten tarvitaan korkeampi lukupeitto. Tämä on tärkeää huomioida erityisesti matalan GC-pitoisuuden omaavien lajien, kuten kampakampylobakteerien, kohdalla. AMR-tuloksia raportoi 19 NRL ja yleisin käytetty analyysityökalu oli ResFinder (15/19). Suurimmalla osalla kaikki tulokset olivat oikein, mutta näitä ei käytetty PT-kierroksen arvosteluun. Sen sijaan käytetyt kriteerit ja raja-arvot olivat MLST-tulos (piti olla ST-19 kaikilla), Q30-arvo (75 % lukupituudella 250 bp), kontaminaatiotasot (<5 %), referenssigenomin lukupeitto (reference coverage: > 98 % referenssigenomista), ja GC-deviaatio (< 4 % referenssigenomiin verrattuna). Lähes kaikilla osallistujilla nämä kaikki olivat hyvin rajoissa ja tulokset olivat siis hyväksyttäviä. Kusterianalyysissä käytetyin työkalu oli SeqSphere+ (mutta monia muitakin oli käytössä) ja skeema Oxford cgMLST (1343 targets). Klusterianalyysin tuloksia arvioitiin kantojen etäisyyksien perusteella ja tulokset olivat tyydyttäviä kaikilla osallistujilla. 300 bp lukupituuteen liittyvä suuri sekvenssin laadun huononnuksen verrattuna 250 emäspariin (joka oli suositeltu lukupituus). Osa osallistujista käytti myös lyhyempiä lukupituuksia (esim. 150 b), jolloin koonti voi olla hankalampaa. Kaikilla osallistujilla kontaminaatiotasot olivat matalia lukuun ottamatta yhtä näytettä (PT 33-4), joka luultavasti oli kontaminoitunut jo lähetettäessä ja se jätettiin pois arvioinnista. Kontaminaatiot monistuvat koonneissa mutta ne voidaan onneksi yleensä suodattaa pois, mikäli lähde on eri lajin edustaja, eivätkä yleensä haittaa, jos käytetään referenssigenomiin perustuvia koontimenetelmiä. Klusterointitulosten tulkintaan vaikuttavat käytetty menetelmä, ohjelmistot, skeema sekä cut-off-arvot, esim. Ridom SeqSphere+ cgMLST skeema on pieni ja vaatii matalamman cut-off-arvon käyttöä. Kuitenkin Ridom SeqSphere+, Chewbacca ja Bionumerics näyttivät suoriutuvan yhtä hyvin. Yleisöstä kysyttiin, mitä cut-off-arvoa tulisi käyttää, mutta siihen ei ollut selkeää vastausta. Tälläkin kierroksella on tarkoitus verrata eri laboratorioiden käyttämiä cut-off-arvoja, ja jakaa tietoa ja oppia tuloksista. Lisäksi kysyttiin, että mikä olisi paras referenssi SNP-analyysiin. Jotkut käyttävät

referenssikantoja, jotkut taas analysoituja kantoja. Tässä PT:ssä käytettyreferenssi kanta ei vaikuttanut juurikaan klusterointiin. SNP-analyysin voi tehdä myös ilman referenssiä (k-mer based).

Päivän viimeiset kolme luentoa jäivät minulta väliin.

Päivä 2:

Professori Ihab Habi kertoi tutkimustuloksia broilerin ruhojen kamylobakteereista UAE:ssa (United Arab Emirates). UAE:ssa on 10 miljoonaa asukasta ja se on kuiva ja kuuma aavikkohabitaatti. Broilerinlihaa kulutetaan 60 kg/hlö/vuosi. Broilereista 15 % tuotetaan itse ja 85 % tuodaan lähinaapureista, suurin osa pakastettuina, Saudi-Arabiasta ja Omanista myös jäädytettynä yön yli. UAE:sta ei ole olemassa aiemmin julkaistuja tutkimuksia raa'an broilerinlihan kamylobakteeri- tai salmonellastatuksesta. Sen takia tehtiin ensimmäinen baselinekartoitus, jossa testattiin 315 jäädytettyä kokonaista ruhoa kvantitatiivisesti (ISO 10272). Näytteet kerättiin suurimmista supermarketista 10 kuukauden ajanjaksona, mukaan tuli 6 kotimaista ja yksi Saudi-Arabialainen yritys. Eristetyistä kannoista 45:lle tehtiin lisäksi AMR-analyysi ja WGS. Tuloksena kamylobakteereita löytyi noin 30 %:sta (90/315) ruhoja (suoraviljelyllä), 7 %:ssa näistä ylittyi 1000 pmy/g raja, kun taas 71.4 %:lla tuloksena oli <10 pmy/g. Erona länsimaihin korkeampia pitoisuuksia löytyi pienemmistä ruhoista, lisäksi 83 %:sta (75/90) positiivisista näytteistä löytyi *C. colia*, kuudesta *C. jejunia* ja yhdeksästä molempia. 42/45 WGS-tyytipitetyistä kannasta oli resistentti fluorokinoloneille, 30/45 makrolideille, 29 tetrasykliinille ja 17 gentamisiinille (ja nämä genotyyppiset resistenssitulokset vastasivat fenotyyppiin hyvin). Jokaiselta *C. coli*-isolaatilta löytyi myös 7–11 virulenssitekijää. Syitä pienten ruhojen yleisempään kontaminaatioon saattaa olla esim. se, että terastamolinjat sopivat huonosti hyvin pienille (600–700 g) ruhoille. Lisäksi pohdittiin, että kuiva aavikkoilmasto saattaisi olla tekijä siinä, että monista länsimaista poiketen *C. coli* oli yleisimmin löydetty laji. Tuloksista julkaistaan pian artikkeli.

Viimeinen luento kertoi flaA- SVR-sekvensoinnista kamylobakteerikantojen tyyppityökaluna. Siinä tärkeimmät löydökset olivat, ettei osalla kannoista tietokantahaun perusteella olisi koko geeniä (mikä yleisöstä kiistettiin mahdottomana), eikä menetelmä ole yhtä erotteleva kuin perinteiset mikrobiologiset menetelmät mutta mahdollistaa alatyypityksen ilman viljelyä. Projektissa kartoitettiin myös, missä kohdin kamylobakteeri saadaan broilerin kasvatustiloihin ja aiempia tutkimuksia tukien harvennus (thinning) oli kriittisin vaihe.

Hanna Skarin kävi lopuksi läpi tulevaa aikataulua: Seuraava EURL-workshop järjestetään todennäköisesti 26.-27.9.2023, lisäksi materiaali tuleville vertailumittauskierroksille PT 34 (kvantitatiivinen, broilerinnahka) ja 35 (detektio ja lajintunnistus, sukkanäytteet) lähetetään luultavimmin 20.3.2023.

Mittausepävarmuudesta järjestetään kurssi ANSES:ssa Ranskassa 20.-21.10.2022 ja webinaari 14.12.2022. ISO 10272:2017:sta pidetään kurssi SVA:ssa 22.-24.11.2022 (max 5 NRL voi osallistua, ilm. 30.9. mennessä). Alustava suunnitelma tuleville vuoden 2023–2024 kursseille, seuraavat suunnitelmissa järjestetään: Introduction to bioinformatics for WGS data, WGS and bioinformatics for WGS data from campylobacter, ISO 10272:2017-kurssi sekä mittausepävarmuuskurssi.