



LABRA/Mikrobiologia

Kokousraportti VTEC workshop 2019

14th Annual Workshop of the National Reference Laboratories for *E. coli* in the EU 4-5 November, 2019

EU:n VTEC referenssilaboration (EU-RL VTEC) järjestämässä workshopissa oli mukana kansallisten referenssilaboratorioiden (NRL) edustajia 26 EU-maasta ja EFTA-maista (Islanti, Norja, Sveitsi). Samassa yhteydessä järjestettiin ISO/TS 13136 STEC menetelmän uusimisen standardointikokous, johon Euroopan maiden edustajien lisäksi Kanada otti osaa. Osa esityksistä tulee saataville EU-RL VTEC:n verkkosivuille (<http://www.iss.it/vtec>).

Avauspuheenvuorossaan Stefano Morabito toi esiin vuonna 2018 julkaistun WHO:n raportin (Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and food: attribution, characterization, and monitoring: report <https://apps.who.int/iris/handle/10665/272871>) ja suosituksen siirtymisestä seroryymiin nojaavasta seurannasta STEC virulenssitekijöihin. Muistutettiin myös elintarvikeseurannan aukoiista: tuote, josta ei ole taustatietoa STEC:n esiintymisestä, ei pidä väheksyä mahdollisena STEC:n lähteenä. Tärkeimmät lähteet ovat naudanliha, maitotuotteet ja kasvikset.

Update on the annual reporting of STEC in the EU and on EFSA activities for molecular typing data collection for food and animal isolates (Mirko Rossi, EFSA)

EFSA esitteli STEC infektioiden esiintymistä vuonna 2017, jolloin ihmisten infektioiden määrä oli 6073 tapausta. Esiintyvyyttä ihmisillä keskimäärin 1,77/100 000 (Irlannilla edelleen suurin insidenssi yli 16). ISO/TS 13136 menetelmä on hyvin käytössä elintarvikkeenäytöille (97% raportoinneista käytti). Elintarvikkeiden löydöksissä seroryhmä O157 yleisin (6,2 %), seuraavaksi seroryhmät O103 ja O26.

Molekyylibiologisten tyyppitysmenetelmien käyttöönottoon ja harmonointiin liittyen laaditaan kantojen (molekyyli-epidemiologisen tyyppityksen priorisointi: kansainväliset epidemiat, kansalliset epidemiat ja kansainväliseen kaupankäyntiin liittyvät bakteerikannat). EFSA on tunnistanut yhdeksi kriittisimmäksi tekijäksi tyyppityksen käyttöönotolle sellaisten bioinformatiikkapalveluiden saatavuuden, jotka pystyvät vastaamaan monipuolisiin tarpeisiin eri riskinarviointielimille. Tulevassa toimintamallissa ajatuksena on kysyä ihmisten sairastumisiin liittyvien tapausklustereiden (5 tapausta) kohdalla elintarviksektorilta, onko esiintynyt vastaavia cgMLST tyyppisiä, jotka eroavat alle 8 alleelia humaanikannasta. EFSA:n näkökulmasta kontaktipinnat epidemienselvitystilanteessa ovat EURL:t ja RASFF kontaktihenkilöt, joita kautta jäsenmaihin ollaan yhteydessä. EFSA suunnittelee pelkkien cgMLST alleeliprofiilien jakamista. Tähän päästäisiin käyttämällä identtisiä pipelineja ja takaamalla analyysien toistettavuus. Tällöin kapasiteetti rakennettaisiin jäsenmaahan taolle, resurssit eivät olisi keskittyneitä, ja jäsenmaan ei tarvitsisi jakaa raakasekvenssejä.

ECDC:n puheenvuorossa (Saara Kotila) esiteltiin ECDC:n tulevaisuuden suunnitelmia molekyyli-tyypityksen sisällyttämisestä epidemienselvityksiin: <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/ecdc-strategic-framework-integration-molecular-and-genomic-typing-european>. Interaktiivisista klustereiden visualisointityökaluista mainittiin BioNumerics ja Microreact. Datapankeista BioNumerics ja BIGSdb (Bacterial Isolate Genome Sequence Database). ECDC ei pakota jäsenmaita käyttämään näitä systeemeitä, mutta sekvenssianalysoidaan vertailutilanteessa niiden kautta, jos sitä ei ole jo tehty.

FAO activities on STEC and other pathogenic *E. coli* (Christine Kopko, FAO)

Codex (CCFH) pyynnöstä käynnistettiin JEMRA asiantuntijatapaamiset STEC:in osalta. Tapaamisten (2017 ja 2018) perusteella julkaistiin STEC in food (attribution, characterization and monitoring, kts. linkki alussa). Raportissa on tietopuutteita Lähi-Idän osalta, vaikka tietoja saatiinkin muualta melko kattavasti. Uunituore julkaisu on Source attribution of STEC (juuri painossa): *Attributing illness caused by STEC to specific foods*. Raportin mukaan epidemioissa varmistettuina lähteinä tärkeimpinä esiintyy naudanlihan 30% ja tuoretuotteet n. 30%. Samalla on käynnistymässä uusi projekti, joka keskittyy etenkin naudanlihan ja kasvien tiedonkeruuseen. Tarkoituksena on esim. päivittää kasvien mikrobiologisten riskien kartoitusraportti (vuodelta 2008).

Situation of STEC infections in Argentina (Isabel Chinen, INEI-ANLIS "Dr. Carlos G. Malbrán")

HUS tapauksien esiintyvyyttä on 8-10/100 000, yli 400 tapausta vuodessa ja tilanne on poikkeuksellinen muihin Etelä-Amerikan maihin nähden. Tässä lajissa Argentiina on myös maailmantilastojen ykkönen. HUS tapauksista noin 66% on STEC:in aiheuttamia. Serotyypin O157:H7 lisäksi valtaosa infektioista on serotyypin O145:H28 (non-motile) aiheuttamia. WGS datan



LABRA/Mikrobiologia

Kokousraportti VTEC workshop 2019

keräämisessä Argentiina on ollut mukana mm. Genome TRAKR (FDA) projektissa. Kantojen analysoinnin perusteella genominen linja clade 8 on yleisin maassa. Ripulikolien analytiikkaan on panostettu eri tavoin (real-time PCR, WGS, MalDI-ToF). Analytiikka koskee kuitenkin veriripulitaupauksia, eikä laajentamista kaikkiin ripulitapauksiin ole vielä suunniteltu.

Baking flour as an emerging vehicle for STEC (Alex Gill, Health Canada)

Alkuun puhuja esitteli myllyssä tapahtuvaa viljan jauhatusprosessia. Jyvän jauhatuskeskityksen leipomoteollisuuden vaatimuksiin oikeasta tuotteesta (leipoutuvuuden kannalta), ei mikrobiologisiin riskeihin. Jauhatus ei ole yksinkertainen prosessi – eri jyvät sekoittuvat jatkuvasti ja niitä kierätetään prosessissa, joissa tarkkelys (jauho) erotetaan. Olosuhteet ovat kuivat, eivätkä sisällä mikrobikontaminaatioita vähentäviä toimenpiteitä tai prosesseja. Jauhokuoriaiset kolonisoivat jatkuvasti myllyä, joten tietyn aikavälein (kun niiden määrä lisääntyy kestävämmäksi) mylly desinfioidaan kuoriaisten hävittämiseksi. Jyvän sisältää ”luontaisesti” *E. coli*-bakteereita 3,4 - 4,5 log cfu/g (normaali taso jyvissä). Myllyn prosesseissa bakteerille edullinen lisääntymiskohta on lämpökäsittely ja esim. hyönteiset voivat lisätä *E. coli* kontaminaatiota. Näytteenottoilla oli pystytty osoittamaan, että kuoriaiset toimivat *E. coli*-bakteerien kantajina. STEC seroryhminä epidemioissa ovat esiintyneet O121 ja O26, esim. vuonna 2017/2018 seroryhmä O121:H19 (stx2a, eae, hlyA). Jauhujen MPN määrittämisessä STEC:iä todettiin 0,15 – 0,43 MPN/100 g (Gill *et al* 2019 <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0740002018310177?via%3Dihub>). Samanaikaisesti STEC löydösten kanssa epidemiajauhoissa ei esiintynyt kohonneita koliformimääriä. Kanadassa on tehty satunnaisia löydöksiä myös serotyypeistä O8:H28 ja O146:H21 (näihin ei liittynyt sairastumisia). Kahden vuoden seurannassa sama O121 kanta pystyttiin eristämään jauhoista uudestaan, genomissa (cg) korkeintaan 7 alleelin eroja epidemian aiheuttaneeseen kantaan (yli 2500 alleelin analyysissä). Kyseisellä serotyypin kannalla viivästynyt laktoosin käyttö, joten tutkittiin Lac operoni kolmelta kannalta. Havaittiin B-galaktosidaasigeenin korvautuminen geenien väliin tunkeutuvalla transposasilla. Kuitenkaan STEC kantojen säilyvyyden syytä genomitasolla ei vielä ole selvitetty. Viivästynyt laktoosinkäyttö voisi korreloida säilymiseen, mutta tämä selvitetään jatkotutkimuksissa.

Yhteenvedonä todettiin, että myllyteollisuus on vanhaa ja perinteistä, jyvissä on jatkuvasti *E. coli*. Todennäköisesti erittäin kestävä STEC tyyppi (säilyi yli 2 vuotta) on päässyt pesiytymään jauhoihin epidemiatapauksissa. Hyviä näytteenottoja tarvitaan, koska STEC taso <1 MPN/100 g voi aiheuttaa epidemian. Kvalitatiivisia tuloksia voi käyttää MPN määrittämisessä. Jauhut ovat käsittelemättömää ruokaa, ja kuluttajien Kanadassa yritetään vaikuttaa, että tietoisuus tästä lisääntyisi (kakkutaikinoiden maistelu tai syöminen raakana ei ole suotavaa). Itseasiassa elintarviketeollisuus oli paljon helpompi vakuuttaa vaaroista, kuin kuluttaja.

Euroopan tilanteesta keskusteltiin ja todettiin että se ei todennäköisesti eroa Pohjois-Amerikan tilanteesta. STEC löydöksiä jauhoissa on tehty eri puolilla Eurooppaa, mm. Sveitsissä esiintyvyyttä oli 9 % kun 93 näytettä tutkittiin (<https://foodprotection.org/doi/10.4315/0362-028X.JFP-18-593>). Saksassa myös tutkimuksia (kts. alla Elisabeth Schuh, NRL Germany esitys). EURL vetosi voimakkaasti jäsenmaiden vertailulaboratorioihin, jotta ne hankkisivat tutkimustietoa STEC:iin esiintyvyydestä jauhoissa omilla maillaan.

Mainostettiin myös seuraavaa STEC kongressia: Banff, Alberta, Canada 9-12.5.2021

Komission puheenvuorossa Pamina Mika Suzuki selitti STEC riskinarvioinnin (analyysituloksien tulkinta) vaiheita ja EU:n yhteisen näkemyksen viipymistä. Ennen yhteisen näkemyksen työstämisen jatkoa haluttiin mmm. odottaa WHO JEMRA raporttia. EFSA opinion STEC:stä julkaistaan joulukuussa. Stefano Morabito toi esiin, että on jo paljon tietoa STEC kantojen patogeenisuudesta, mutta jäsenvaltioiden pitäisi raportoida näitä tietoja tarkemmin EFSA:lle. Komissio mainitsi tiedonkeruukäytöstään mm. RASFF-kaavakkeen, jolla näihin tapauksiin liittyvistä kannoista saadaan kerättyä tarkempaa tietoa.

The Danish Surveillance System for pathogenic *E. coli* infections (Flemming Scheutz, Statens Serum Institut, Denmark)

Enterotoksigeenisten *E. coli*en (ETEC) määrät ovat nousussa Tanskassa, kun tarkastellaan kaikkia ripulikoleja. Vaikka ETEC on matkustukseen liittyvä, muistutettiin että huomattava osa ETEC:istä on saatu kotimaassa. Flemming pohti, onko olemassa riittäviä elintarvikemenetelmiä näiden havaitsemiseen.



LABRA/Mikrobiologia

Kokousraportti VTEC workshop 2019

Rikastaminen tehtiin kierroksella EURL 37 °C:een sijasta 41,5 °C:ssa (edellinen vastaava kierros PT 19 tehtiin 37 °C:ssa). Osallistuneista laboratorioista noin 80% laboratorioista sai oikean tuloksen PCR -skreenausmenetelmällä. Viljelymenetelmällä 63 % laboratorioista sai oikean vastauksen. EURL piti tulosta parantuneena verrattuna PT19 -kierrokseen, jossa ainoastaan 17,2 % laboratorioista pystyi eristämään STEC:iä (sama ympäristö, eri kanta).

Results of the inter-laboratory study on the characterization of pathogenic *E. coli* (PT23)

Vertailukoe sisälsi STEC –bakteerien ja muiden patogeenisten *E. coli*ien tunnistamisen bakteerikannoista. EURL edellytti seuraavaa tasoa tunnistukseen:

- 1) STEC/EPEC bakteerien päävirulenssigeenien tunnistus (stx- ja eae-geenit)
- 2) EAEC -merkki geenien tunnistus (aggR ja aaiC)
- 3) *E. coli*in ETEC - (It, st_h, st_p -geenit) ja EIAC -patotyyppien (ipaH -geeni) tunnistus
- 4) Merkittävien STEC -seroryhmien tunnistus (vähintään 13 seroryhmää)
- 5) stx-geenien alatyypitys

Kierrokselle osallistui 37 laboratoriota ja tunnistettavana oli 6 kpl kantoja. Laboratorioista noin puolet (17 kpl) oli käyttänyt kokogenomisekvenssointia kantojen tunnistamisessa. Patotyyppin määrittämisessä virheeksi ei katsottu kannan nro 5 niemiästä yksi nomaan STEC:ksi (89% eli 31/35 osallistuneesta laboratoriosta oli tehnyt näin) tai ETEC:ksi, vaikka kyseessä oli ETEC/STEC hybridikanta (cross-over-kanta). stx-geenien tunnistus ja serotyyppitys oli sujunut laboratorioilta hyvin, tosin moni laboratorio oli tyypittänyt kannan 5 (O2:H27) serotyyppiä O2/O50, erityisesti WGS:llä. O-antigeenisekvenssi wzx on identtinen serotyypillä O2 ja O50, mutta wzy sekvenssi eroaa (molemmat sekvenssit ovat kuitenkin mukana serotyyppityksen *E. coli* sekvenssietokannoissa). Stx-alatyypityksessä 16/35 laboratoriota oli tulkinut alatyypin virheellisesti tai ei ollut palauttanut tulosta. EURL raportoi, että stx2a ja stx2c geenien erottelu säilyi haasteena (tulkitavaisuus vaikuttaa kuitenkin liittyvän perinteiseen PCR-menetelmään). Osallistuneista laboratoriosta 71% (25/35) ei ollut tunnistanut ETEC:iä st_p -geeniä kannalla nro 5. Kannan raportointiin olevan mismatchia sekvenssissään kantava variantti, tästä syystä PCR -negatiivisuutta ei katsottu virheeksi, vaikka WGS tekniikalla havaitsematta jättäminen katsottiin virheeksi.

Eri maiden NRL:ien kuulumisia

Sabine Schlager, (NRL Itävalta) kertoi viljelystä riippumattomien menetelmien käyttöönotosta humanipuolella ja siitä mikä niiden vaikutus on ollut esiintyvyyteen Itävallassa. Vuosien 2016-2018 välillä sairaalalaboratoriot siirtyivät PCR-menetelmiin. Eristysaste on ollut 63% (lähetetyistä 67 PCR-positiivisesta näytteestä pystyttiin eristämään 42 kantaa). Toisella laboratoriolla (skreenaa vain veri ripulitapaukset) eristysaste oli 73%. Kun laboratorio käytti ELISA-pohjaista skreenausta, eristysaste nousi 94%:iin. Keskimäärin eristysaste on ollut 74%. Itävallassa nähtiin viisinkertainen esiintyvyyden nousu, kun ainoastaan yksi aluesairaalalaboratorio siirtyi perinteisistä menetelmistä PCR-skreenaukseen. Keskimäärin esiintyvyys on noussut kolminkertaisesti. PCR-skreenaukseen siirtymisen seurauksena aiemmin aliedustettuina olleet iäkkäämmät väestöryhmät (esim yli 65-vuotiaat) nousivat esiin infektio tilastoissa. Vaikka STEC esiintyvyys nousi, HUS (hemolyttis-ureeminen syndrooma) -jälkitautien tapausmäärät laskivat samaan aikaan. Valitettavasti Itävallassa näkyy HUS-tilastoissa 5-7 vuoden välein esiintyvyyden nousu. Osa 2010-luvun noususta johtui O26 serotyypistä, mutta nykyisen nousun syy ei ole selvillä. Pohdittiin väestön luonnollisen immunoisoinnin merkitystä tilanteessa, koska muidenkin patogeenien esiintyvyytilastoissa voi esiintyä sama ilmiö.

Kinga Wiczorek (NRL Puola) esitteli ruuhon (naudat, siat ja broilerit) sivelnäyteprojektin tuloksia. Kaiken kaikkiaan PCR-skreenauksessa positiivisia oli 30% (152/500). Naudanruuhoissa todettiin skreenauksessa positiivisia 35% (115/300), joista 11% viljelyvarmistettuja. Naudanlihan skreenauksessa 14% oli positiivisia, joista 5% varmistui viljelyssä. Sikojen ja broilerin osuus viljelyvarmistetuissa oli pieni.



LABRA/Mikrobiologia

Kokousraportti VTEC workshop 2019

Elisabeth Schuh (NRL Saksa) kertoi NRL Saksan vastaanottamien STEC kantojen ominaisuuksista. Ja uhoista eristetyt STEC-kannat edustivat melko isoa osaa kasviperäisten löydösten ryhmässä. Vuosina 2014-2017 tutkittiin 51 jauhonäytettä, ja niistä 19% oli viljelypositiivisia. Esiintyvyys oli enemmän myllykohtaista kuin viljalajikohtaista. NRL on tutkinut 105 isolaattia, jotka eristetty pääosin vehnästä, rukiista ja sekoituksista. Näytteenotto tapahtui myllyissä viranomaisnäytteenottona. O187:H28 oli yleisin seroryhmä, mutta yli 20 seroryhmää todettiin. Seroryhmille O146 ja O103 ei löydetty cgMLST analyysissä (2055 alleelia – yhteistyö RKI:n kanssa) yhteneväisyyttä humaanikantojen kanssa, mutta yhdellä O157 kannalla oli yhteys (10 alleelin ero) humaanikantaan (maantieteellinen etäisyys näytteenoton välillä 100 km). STEC:iä on eristetty kontaminoituneesta maaperästä jopa 100 päivän jälkeen ensimmäisestä toteamisesta. STEC jauholöydöksiä on raportoitu nyt Saksasta, Itävaltasta ja Sveitsistä. Kaivattiin taas tietoa, mikä on tilanne muualla Euroopassa. Unkarin edustaja kertoi että 10 tutkitusta näytteestä STEC löytyi yhdestä näytteestä.

E. coli producing Stx2f from food in the Netherlands (Menno van der Voort, NRL Alankomaat)

Kyyhkysistä alun perin löytyneet toksiiintyyppin stx2f STEC-bakteerit tunnistettiin ihmisille tartuntaa aiheuttaviksi vuonna 2009, ja viime vuosina ko. STEC tyyppin elintarvikeperäisyyttä on pohdittu. Elintarvikeperäisyys ja kyyhkysyt pääasiallisena lähteenä on kyselyä laistettu. Munivien kanojen tutkimuksessa 2015 päätettiin skreenata näytteet (myöhemmin myös lihanäytteet) stx2f geenin varalta. Skreenauksessa vuonna 2015 saatiin stx2f positiivisia 14/1479 siipikarjan lihanäytteestä, mutta kantoja ei pystytty eristämään. Lopulta vuonna 2016 ja 2017 eristettiin kahdesta eri tutkimuksesta (jossa molemmissa aineisto yli 5000 näytettä) molemmista kaksi isolaattia. Positiivisten näytteiden joukossa oli yrtejä ja tuoreita kasviksia. Kantoja eristetty lopulta endiivistä (2 kpl), mistä, pinaatista, vuohesta, basilikasta. STEC positiivisten osuus oli 0,03%. Kannat ryhmittäytyivät tyyppityksessä lähemmäksi kyyhkyskantoja ja kauemmaksi humaanikannoista. Oletus on, että kyyhkysyt kontaminoivat kasvikset pellolla ulosteillaan. Loppupäätelmä oli, että elintarvikkeet eivät vaikuttaneet merkittävästi ihmisten stx2f -infektioiden lähteeltä. stx2f-skreenauksen sisällyttäminen uusittavana olevaan standardiin ei pidetty oleellisena.

Characterization of hybrid ExPEC/STEC O80:H2 isolated in Italy (Federica Gigliucci, NRL Italia)

STEC O80 infektiot ihmisillä ovat lisääntyneet huomattavasti Euroopassa viime vuosina. Kanta on muuttunut pääasialliseksi lasten HUS:in aiheuttajaksi Ranskassa. Hybridikannan arsenaaliin kuuluu LEE, pO157-kaltainen plasmidi (espP, ehxA), stx2 geenit (pääasiassa stx2d). Tämän lisäksi kannoilla on mm. suoliston ulkopuoliseen virulenssiin liittyviä tekijöitä (mm. hlyF) ja AMR kasetti (jälkimmäiset mosaiikkiplasmidissa). Kahdellekymmenelle Italiassa eristetyille kannalle tehdyn genomianalyysin perusteella STEC-ExPEC O80 hybridikanta on kiertänyt Italiassa jo vuodesta 2007 ja sillä on yhtäläisyyksiä Ranskan vastaavaan kantaan. Kannat ovat erittäin virulenteja, ja niiden evoluutiota ja patofysiologiaa on syytä tutkia tarkemmin.

Stefano Morabiton yhteenvedossa tuotiin esiin mm. ExPEC tilanne (mm. lisääntyminen humaanitapauksissa Tanskassa) ja mahdollinen siirtyminen elintarvikkeisiin. Menetelmä standardointia elintarvikenäytteiden tutkimukseen tarvitaan myös muille patogeenisille *E. coli*-bakteereille kuin STEC:ille. Tästä aiotaan ehdottaa uutta työkohdetta CEN:issä. Uusista elintarvikevälittäjistä jauhojen merkitystä ei pidä vähätellä, ja tutkimustietoa Euroopasta tarvitaan lisää. Näytteenoton harmonisointi voisi parantaa STEC tiedonkeruun laatua (EFSA:lle toimitettava tieto), nyt kun analyysimenetelmä on saatu Euroopan tasolla harmonisoitua. Tässä toivotaan suosituksia komissiolta. EFSA:n työryhmä päivittää STEC:in patogeenisuusarviota ja sen jälkeen on toivottavaa, että keskustelu STEC tulosten tulkinnasta jatkuu EU-tasolla.

ECDC on työskennellyt paljon Listerian parissa, seuraako tämän jälkeen STEC:in vuoro? Humaanilaboratoriot suoriutuvat jo hyvin STEC kantojen tyyppityksissä vertailututkimusten perusteella. Epidemiologisessa tyyppityksessä PFGE on jo hylätty, mutta WGS klusterointi tarvitsee vielä keskustelua (mm. sekvenssien laatu, burst sizes). Elintarvikelaboratorioiden tyyppityskierroksilla havaittiin WGS-päteväksi toteamaan STEC geenejä (jopa stx-alityyppejä, joissa erot ovat minimaalisia), mutta muiden virulenssigeenien toteamisessa voi esiintyä huomattavia vaikeuksia. Tulevaisuuden haasteena on saada laboratorioverkosto kulkemaan samaa tahtia WGS analytiikan kehityksessä (koskien kaikkia EURL-verkostoja). Mainittiin lisäksi, että MedVetNet verkoston puitteissa järjestetään workshop WGS analytiikan ympärillä (ensi maaliskuu).