

LABRA/Mikrobiologia

Kokousraportti VTEC workshop 2021

16th Annual Workshop of the National Reference Laboratories for *E. coli* in the EU 18th-19th October, 2021

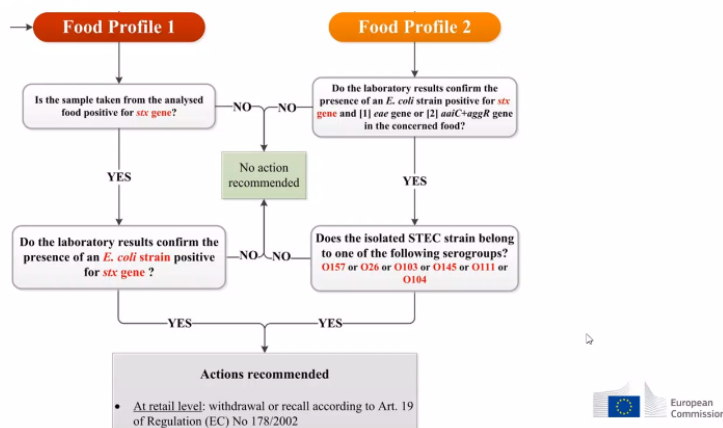
Kokous toteutettiin etäkokouksena Teamsin välityksellä (osallistujalista ei toimitettu)

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 discussion on STEC at the EC level (Martial Plantady, EC)

Komission edustaja Martial Plantady totesi, että useat EU-maat käyttävät epävirallisesti keskeneräiseksi jäänyttä komission shigatoksiinia tuottavan *E. coli* bakteerin (STEC/VTEC) riskinarviointiohjeistusta (asetus (EY) N:o 178/2002, 14 artiklan tulkinta elintarvikkeiden turvallisuusvaatimuksista STECin osalta). Elintarvikkeet jaetaan siinä käyttötarkoituksen mukaan profiileihin 1 (sellaisenaan syötävät) ja lämpökäsittelyn jälkeen syötävät (profiili 2)

Step 2: recommendation for risk management (retail level)



Plantady kertoi tilanteesta tällä hetkellä: Jäsenvaltiot keräävät kokemuksia STEC tulkinnoista, EFSA:n riskinarviointi (2020) toteaa kaikki serotyypit potentiaalisesti patogeenisiksi ja Codex jatkaa STEC ohjeistusten valmistelutyötä WHO/FAO raportin pohjalta. Komissio selvittää lähitulevaisuudessa jäsenvaltioiden halua jatkaa työtä riskinarviointiohjeen parissa (elintarvikkeiprofiili 2:n osalta tarvitaan todennäköisesti päivitystä). Seuraavassa mikrobikriteeriryhmän kokouksessa (tämän vuoden lopussa/ensimmäisen vuoden alussa?) asia otetaan käsittelyyn ja mahdollisesti lähdetään työstämään tiekarttaa (jos jäsenvaltioilla on halua edetä). Esityksen jälkeen kysyttiin serotyyppien poistamisesta mikrobikriteeriasetuksen itujen STEC vaatimuksista, mutta komission edustaja ei osannut vastata avataanko asia. Kysyttiin myös, miten komissio pysyttelee ajan tasalla STEC-tiedon suhteen. Viitattiin JEMRA-raporttiin, ja siihen että idut ovat edelleen lainsäädännössä, vaikka uusin tieto osoittaa esim. naudanlihan ja maidon riskialttiimmiksi elintarvikeryhmiksi. Lainsäädännön pitäisi reagoida nopeammin muuttuvaan tietoon. Esimerkiksi otettiin myös patogeenisuusominaisuuksia yhdistelevät hybridi-*E. coli*t, jotka muuttavat riskinäköymää nopeammin kuin lainsäädäntö ehtii reagoida.

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

EFSA esitteli STEC-infektioiden esiintymistä vuonna 2019, jolloin ihmisten infektioiden määrä oli 7 775 tapausta. Esiintyvyys ihmisillä on noususuhdanteinen poiketen muiden zoonoottisten infektioiden esiintymisen trendistä. Irlanti, Malta, Tanska ja Ruotsi



LABRA/Mikrobiologia

Kokousraportti VTEC workshop 2021

raportoivat suurimmat STEC esiintyvyyksiluvut. Viisi jäsenmaata (Itävalta, Tanska, Suomi, Malta ja Puola) raportoivat merkittävästä noususta esiintyvyydessä. STECin esiintyvyys tutkituissa elintarvikenäytteissä (20 395 kpl) oli noussut hieman (2,8 %) verrattuna vuoteen 2018 (2,4 %). Tutkituista 331 virallisesta itunäytteestä ei tänäkään vuonna raportoitu positiivisia löydöksiä. STEC-löydöksiä tehtiin eniten lihasta (4,1 %) ja maidosta ja maitotuotteista (2,1 %) hedelmien ja vihannesten ollessa vähiten kontaminoitunut tuoteryhmä (0,1 %). Erilaisista sellaisenaan syötävistä elintarvikkeista (6 297 kpl) 0,6 % oli STEC positiivisia. Yleisimmät seroryhmät ihmisten infektioissa olivat O157, O26, NT (tyypittymätön), O146, O103, O91, O145, O128, O80 ja O111. Elintarvikkeista eristetyistä tyypitetyistä kannoista (212 kpl) 21 % kuului top-5 seroryhmiin (O157, O26, O103, O111 ja O145), loput 79 % jakautuivat 53 eri O-seroryhmään. Tästä jälkimmäisestä joukosta noin puolet edustivat kuitenkin ihmisten infektioiden top-20 seroryhmiä (vuosilta 2015–2018). Seroryhmät O80, O5 ja O76 löytyivät ainoastaan elintarvikenäytteistä. Eläinnäytteiden tutkiminen ei ollut kattavaa (9 jäsenmaata tutki 2 588 kpl näytteitä).

EFSA activities for molecular typing data collection for food and animal isolates (Mirko Rossi, EFSA)

EFSan tyypitysjärjestelmän tarkoituksena on kerätä cgMLST alleeliprofiileita ja niihin liittyvää epidemiologista tietoa (elintarvike, rehu, eläin ja ympäristömatriiseista). ECDC voi tehdä tiedonhakuja cgMLST profiileista etsiäkseen ihmiskantoihin yhdistyviä profiileja. Tarkoituksena on tarjota palvelua jäsenmaille cgMLST profiilien tuottamiseksi sekvensoinnin raakadatan. Jäsenmaille tarjotaan myös mahdollisuus lähettää cgMLST profiileja tietokantaan ilman vaatimusta raakadatan lähettämisestä. Tarkoituksena on tarjota käyttäjäystävälliset palvelut tietojen lähettämiseen ja analysoimiseen.

ECDC ja EFSA ovat tehneet sopimuksen tietojen hyödyntämisestä: vain cgMLST tietoja ja rajoitettua epidemiologista taustatietoa (näytteen matriisiluokka, näytteenottovuosi, maatiieto) jaetaan. Näytteen maatiieto näkyy vain ECDC:lle, ei jäsenmaiden terveydenhuollon yksiköille. EFSAn järjestelmän käyttäjille tulee automaattisesti tieto, jos ECDC löytää vastaavuuksia tietokannastaan. Esiteltiin tarkemmin myös EFSAn One Health nextflow järjestelmää sekvenssitiedon käsittelemiseksi. Esityksen jälkeen Mirko Rossi tarkensi, että kyseessä ei ole uusi työväline/pipeline, vaan järjestelmä yhdistää olemassa olevia (vapaasti saatavilla olevia) sekvenssidatan käsittelymenetelmiä. Järjestelmässä käytetään chewbbaca.online -palvelussa jaettuja cgMLST skeemoja: *Salmonella* ja *E. coli* (INNUENDO), sekä *L. monocytogenes* (Pasteur-instituutti). Datan näkyvyyden asetuksista eri tahoille annettiin myös tietoa: maakohtainen viranomaisnäkökulma näkyy kaikien ko. jäsenmaassa kerätyn datan (mutta ei pääse muuttamaan sitä), EURL näkyy bakteerilajikohtaiset tiedot kaikista jäsenmaista, EFSA koko datasetin kaikkien lajien osalta. Alkuperäinen datan tuottaja jäsenmaassa omistaa kuitenkin lähetetyn datan järjestelmässä ja säilyttää oikeutensa poistaa sen järjestelmästä. Datan tuottaja jäsenmaassa voi etsiä tietokannasta vastaavuuksia, lähettää järjestelmän kautta pyynnön ECDC:lle etsiä vastaavuuksia ja visualisoida niitä itse GrapeTree-ohjelmalla. Maan CVO (chief veterinary officer) nimeää COU (country officer user), joka puolestaan nimeää tarpeelliseksi katsotun määrän datan tuottajia (data provider users). Tiedon lähettäminen järjestelmään on vapaaehtoista, mutta jäsenmaat ovat velvollisia tuottamaan tietoa epidemianselvitysten tueksi (nimeäminen tästä syystä pakolliseksi). Järjestelmää on testattu vuonna 2021 ja käyttöönotto on suunniteltu kesällä 2022.

ECDC:n puheenvuorossa (Margot Einoder-Moreno) kerrottiin EpiPulse järjestelmästä, jonka käyttöönotto tänä vuonna tulee korvaamaan EPIS ja TESSy järjestelmät. WGS tyypitystiedon raportoiminen on ollut jo mahdollista vapaaehtoisesti TESSy järjestelmään.



LABRA/Mikrobiologia

Kokousraportti VTEC workshop 2021

EpiPulse: the European surveillance portal for infectious diseases

ecdc

EpiPulse

TESSy and Molecular typing

EPIS

ECDC Threat tracking tool

EWRS
Early Warning and Response System

The European Surveillance System (TESSy) - Functionalities remain unchanged, just new entry point
Epidemic Intelligence Information System (EPIS) - Upgraded and new functionalities added

EpiPulse tapahtumat (EPIS) keskittyvät riskinarviointiin ja EWRS riskin hallintaan. Ilmoittaminen EpiPulseen on vapaaehtoista ja EWRS:ään pakollista. EpiPulsen käyttäjät ovat epidemiologeja ja mikrobiologeja, EWRS:n viranomaistahoja. Lisäksi esiteltiin ECDC:n tulevaisuuden suunnitelmia molekyylylityypityksen sisällyttämisestä epidemianselvityksiin:

<https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/ecdc-strategic-framework-integration-molecular-and-genomic-typing-european>.

Update on the annual reporting of STEC infections (Taina Niskanen) osuudessa esiteltiin ihmisten STEC infektiotilastoja vuodelta 2020, jota leimasi sekä Covid-19 tilanne että Brexit. Kamylobakteeri ja Salmonella olivat edelleen tilastojen ykköset, seuraavana poikkeuksellisesti vuoteen 2019 verrattuna tulivat yersiniat ennen STEC-tartuntoja. STEC oli siis palannut ”normaalille” paikalleen neljänneksi merkittävämmäksi zoonoosiksi. Vuonna 2020 esiintyvyys laski (1,6/100 000) verrattuna vuoteen 2019 (2,2/100 000). Koronavuonna 2020 infektioista 75 % saatiin EU:n sisällä, eli kotoperäisten infektioiden määrät kasvoivat. Serotyypeistä yleisimmät O26, NT, O157 ja O103 kattoivat yhteensä 55 % ihmisten infektioista. Yleisin serotyyppi on O26, ja serotyypin O157 osuus on laskenut voimakkaasti. stx2 ja eae ja stx1, stx2 ja eae tyypit kattoivat yhdessä 55 % sairaalahoitoa vaatineista tapauksista ja 62 % veriripulitapauksista.

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 raportti STEC in food (attribution, characterization and monitoring). Työryhmä kokoontui vuonna 2020 työstämään STEC riskinarviota liha- ja maitotuotteissa (sekä L. monocytogenes -riskiä sellaisenaan syötävissä tuotteissa). Vuonna 2021 teemana ovat olleet mikrobiologiset riskit kalastus- ja meijerituotteiden valmistuksessa käytettävässä vedessä sekä tuoreissa hedelmissä ja vihanneksissa. Riskinarviointiraportteja on julkaistu hiljattain mm. Vibrioiden ja trikiinin osalta. STEC riskien työryhmä pohtii tällä hetkellä mm. vihannesviljelyn ja eläintilojen välisiä suojaetäisyyksiä ja vihannesten testaamissuosituksia (mitä testattaisiin, indikaattorit voivat jäädä negatiiviseksi, vaikka patogeenejä esiintyisikin). Tänä syksynä työryhmä edistää työtä vielä tuorekasvien ja itujen suositusten osalta.

Update from the inter EURL working group on NGS (Valeria Michelacci)

EURL VTEC koordinoi EURL:in työtä WGS tyyppitysmenetelmien kapasiteetin ja yhteistyön lisäämiseksi EU:ssa. Ryhmä kokoontuu kahdesti vuodessa ja jokainen EURL on julkaissut nettisivuillaan materiaalia aiheesta (EURL VTEC: <https://www.iss.it/web/iss-en/-/e-coli-genomics-1>). Esimerkkejä eri EURL:ien vastualueilla tuotetuista dokumenteista:

- WGS referenssikokoelma: Salmonella EURL
- NGS laboratoriomenetelmät: EURL parasiiitit
- Bioinformatiikkatyökalut NGS data-analyysiin: EURL VTEC
- Opas WGS klusterianalyysiin: EURL kamylobakteerit



LABRA/Mikrobiologia

Kokousraportti VTEC workshop 2021

Vertailukokoelma sisältää useita anaonymisoituja sekvensseja STEC O26, Salmonella Typhimurium ja Campylobacter jejuni ja C. coli kannoista, jotka ovat olleet analysoitavina PT kierroksilla. Vertailumateriaalin saa pyytämällä EURL VTEC:istä. NGS on noussut keskeiseksi tyypitystekniikaksi elintarvikepatogeeneille, vaikka kapasiteetti- ja resurssiongelmia esiintyy. Laboratorioissa esiintyy myös epävarmuutta sekvenssitietojen jakamista kohtaan (lainsäädännössä selvittämistä).

Proficiency testing for STEC in the human sector (Flemming Scheutz)

Humaanilaboratorioiden EQA-9 laadunvarmistuskierrokselle osallistui 24 jäsenmaata vuonna 2020. Useat laboratoriot ovat siirtyneet WGS tyypitykseen O- ja H-serotyypityksessä. Laboratorioiden osaaminen on hyvällä tasolla stx-geenien tunnistamisessa ja alatyypityksessä. Stx2 alatyyppeihin on hiljattain lisätty alatyypit h, i, j, k ja l, sekä uunituoreet m, n ja o (ei vielä julkaistu). Stx1 - alatyypeissä ei ole tapahtunut muutoksia. WGS:n klusterianalysissä vain yksi laboratorioista epäonnistui klusterien tunnistamisessa. ExPEC kantojen iss-geenit esiintyvät useissa STEC kannoissa ja niiden esiintymisen todenmukaisuutta epäiltiin (sama koski lpfA-geeniä). Serotyypien osalta todettiin mm. O187 ristireagoivan muiden serotyypien kanssa perinteisillä tyypitysmenetelmillä ja jäävän toteamatta PCR:llä.

Update on the revision of the ISO 13136 (Rosangela Tozzoli, EURL-VTEC)

STEC menetelmästandardin EN ISO/WD 13136-1 Microbiology of the food chain -Detection, Isolation and Characterization of Shiga-toxin-producing Escherichia coli (STEC) - part 1: Horizontal method for the detection and isolation of Shiga-toxin-producing Escherichia coli (STEC) ensimmäinen luonnosversio lähetettiin CEN:iin huhtikuussa 2021.

EN ISO/WD 13136-2 Microbiology of the food chain -Detection, Isolation and Characterization of Shiga-toxin-producing Escherichia coli (STEC) - part 2: Horizontal method for the characterization of Shiga-toxin-producing Escherichia coli (STEC) isolates. Osan rakenteesta työstettiin vuokaavio CEN:iin joulukuussa 2020.

Osa 2 koostuu Stx geenien alatyypityksestä, kolonisaatiofaktoreista (geenit eae ja aggR) ja seroryhmien tunnistamisesta. Kaikissa osuuksissa vaihtoehtona on käyttää WGS analytiikkaa. Osaa työstetään työryhmässä loppuvuodesta 2021.

Results of the inter-laboratory study on the characterization and typing of Shiga toxin-producing E. coli (PT28) (Valeria Michellacci)

Vertailukoe vuonna 2020 sisälsi STEC –bakteerien tunnistamisen bakteerikannoista ja klusterianalysin. Kantoja lähetettiin 8 kpl. EURL edellytti seuraavaa tasoa tunnistukseen:

- 1) STEC/EPEC bakteerien päävirulenssigeenien tunnistus (stx- ja eae-geenit)
- 2) Merkittävien STEC -seroryhmien tunnistus (vähintään 13 seroryhmää)
- 3) stx-geenien alatyypitys
- 4) Klusterianalyysi (cgMLST tai SNP)

”Ylimääräisten” virulenssigeenien tunnistuksessa oikeana vastauksena käytettiin EURL:n saamia tuloksia. Laboratorioista suurin osa (20/24) käytti pelkästään WGS:ää virulenssigeenien tunnistamiseen. Virheet serotyypityksessä tulivat perinteisellä agglutinaatiomenetelmällä, virheitä ei raportoitu WGS:illä. Vastaavasti stx-alatyypityksessä esiintyneet virheet olivat pääasiassa peräisin PCR-menetelmästä. Laboratoriot tulkitsivat klusterit itse ja 75 % laboratorioista onnistui määrittelyssä. Laboratoriot suoriutuivat kierroksesta yleisesti ottaen hyvin.

Results of the inter-laboratory study on the detection of STEC in herbs (PT27) (Federica Gigliucci)

Kierrokselle osallistui 23 laboratoriota. Laboratoriot eristivät yleisesti ottaen onnistuneesti basilikaan lisätyn STEC O88 stx1+, stx2+, eae- kannan, tosin vain harva raportoi serotyyppiä (serotyyppi O88 ei kuulu ISO/TS 13136 standardin sovellusalueeseen). Matalammalla lisäyktasolla menetelmän sensitiivisyydeksi saatiin 96 %, joka osoitti hyvää menestymistä. Covid-19 tilanteen vuoksi kierrokselle oli vähemmän osallistujia kuin tavallisesti.



LABRA/Mikrobiologia

Kokousraportti VTEC workshop 2021

Inter-laboratory study on the Enumeration of E. coli in LBM (PT29) (Margherita Montalbano)

EURL *E. coli* toiminta-alueeseen sisällytettiin muutama vuosi sitten entisen EURL LBM vertailulaboratorion tehtävistä *E. coli* MPN määrittymenettelyn vertailulaboratoriovastuu (ISO 16649-3). Kierrokselle osallistui 30 NRL:ää (28 EU maata). Suomi ei ole osallistunut kierroksille EURL vertailulaboratorion toiminnan päätyttyä. Tulokset palauttaneista laboratorioista 25/29 raportoi tulokset oikeassa vaihteluvälissä, joten menestyminen oli hyvää.

The online training program of the EURL for E. coli in the years 2020-2021 (Rosangela Tozzoli)

Koulutusohjelmassa ei voitu järjestää käytännön koulutuksia koronatilanteen vuoksi. Osa kursseista järjestettiin verkkokurssina, osa eräänlaisella "hybridimallilla". Osallistujille lähetettiin mm. ympättävät bakteerikannat ja reagenssit etukäteen. Lisäksi lähetettiin opastavia videoita. Mm. vertailututkimusten järjestämisen kurssi ja reaaliaikaisen PCR:n kurssi järjestettiin tällä tavoin, jälkimmäisessä oli ennätysmäärä osallistujia (38 laboratoriota). Epidemianselvityskurssilla oli 24 osallistujaa. EURL oli saanut hyvää palautetta kursseista.

Invited talk: Bacteriophages of Shiga Toxin-Producing Escherichia coli and Their Contribution to Pathogenicity (Maite Muniesa)

Maite Muniensa veti yhteen uusimpia tutkimustuloksista koskien shigatoksiinin tuottamiseen liittyviä Stx-faageja. Faagin stx-geenialueisiin liittyvät Q antiterminaattorivariantit vastaavat shigatoksiinin tuottamisen tasosta, joka voi vaihdella huomattavasti ja vaikuttaa siten potilaan oireiden vakavuuteen. Faagit vaihtavat geenimateriaalia *E. coli* kannassa, eivätkä blokkaa uusien faagien sisääntuloa bakteerikantaan (kuten muilla faagityypeillä on yleensä tapana) – eli faagi-immuniteettiä ei esiinny *E. coli* sx-faageilla. Tämä selittää useiden eri stx-tyyppien faagien yhtäaikaisen läsnäolon samassa kannassa, lisäksi ilmiöllä on vaikutusta toksiinituottoon. Faagit etsivät myös joustavasti vaihtoehtoisen insertiokohdan genomissa, jos ensisijainen on varattuna. Materiaalia voi esiintyä solun ulkopuolella eri muodoissa (haasteita PCR pohjaiselle analytiikalle): irtonaisina Stx-faageina, Stx-toksiinina, membraanivesikkeleinä, joissa sisällä on faageja tai Stx-toksiinia.

Stx1-faagilla on stx2-faagista poiketen vaihtoehtoinen reitti toksiinin tuottoon: lyyttisen syklin induktion lisäksi tuotto voi käynnistyä myös raudanpuutteesta. Stx2 voi ekspressoitua ainoastaan faagin induktiolla. Tietty osuus faageista, jonka ei tarvitse lisääntymistä varten hajoittaa isäntäsolua, toimii ikään kuin geneettisenä "muistivarastona" faagi-DNA:lle. Samaan aikaan lyyttisen syklin käynnistävät faagit toimivat geenienmateriaalin levittäjänä ja aiheuttavat vakavimmat oireet. Irtonaisia faageja löytyy myös ihmisten ulostenäytteistä, joista ei ole löydettävissä STEC bakteereita. Irtofaagien merkitystä ei vielä ymmärretä (ovat harmittomia, kunhan eivät pääse vaikuttamaan *E. coli* solujen kautta), mutta tiedolla on merkitystä kliinisen puolen diagnostiikkaan. Kliinisessä diagnostiikassa olisi hyvä varmistaa viljelemällä elävien solujen esiintyminen näytteissä (tai varmistaa toisella, kromosomaalisella geenillä elävien STEC-bakteerien läsnäolo). Tämä voisi olla tärkeää esim. ennen päätöstä potilaiden karanteenitoimista. Stx2 faagien uudet muunnokset on löydetty (terveistä) murmeleista Kiinassa (stx2h), katkaravuista ja simpukoista (stx2i) ja ihmisistä, eläimistä ja raa'asta lihasta Kiinassa (hybridi STEC/ETEC?, stx2k). Lisäksi on kuvattu stx2j.

Eri maiden NRL:ien kuulumisia

STEC in dough and batter (André Goehler NRL Germany)

Saksan NRL:ssä oli tehty tutkimusta STECin esiintymisestä ja säilymisestä jauhoissa ja taikinassa. STEC-bakteerit pystyvät säilymään hengissä optimikasvun takaavaan veden aktiivisuutta ($a_w > 0,95$) kuivemmissa olosuhteissa. STECin on myös tutkimuksissa osoitettu säilyvän useissa kuivissa elintarvikematriiseissa (kuivaliha, viljatuotteet, maitojauhe, jauho). Keski-Euroopassa STEC -bakteereita on todettu (viljelyvarmistettu) jauhoissa viidessä eri Saksassa, Itävallassa ja Sveitsissä vuosina 2014–2018 tehdyssä tutkimuksessa 9–19 % näytteistä. Näytemäärät tutkimuksissa ovat vaihdelleet 31–238 näytteen välillä. Vuonna 2020 Saksassa kansallisen zoonoosiseurannan puitteissa tehdyssä tutkimuksessa 9 % näytteistä todettiin positiiviseksi (242 näytettä). Taikina ja jauhot ovat esiintyneet myös epidemian aiheuttajina viime vuosina. Raaka pikkuleipätaikina aiheutti vuosina 2009, 2015–2016 ja 2021 neljä serotyyppien O157:H7, O26 tai O121 epidemiaa USA:ssa, joissa sairastui yhteensä n. 170 ihmistä. Jauhoon liittyviä STEC serotyypin O26 ja O121:H19 epidemioita esiintyi vuosina 2016–2017 ja 2019 Kanadassa ja USA:ssa, ja näissä sairastui n. 50 ihmistä.



LABRA/Mikrobiologia

Kokousraportti VTEC workshop 2021

Nyt raportoitavassa tutkimuksessa selvitettiin STECin esiintymistä, kontaminaatiotasoa ja säilymistä jauhoissa ja taikinoissa. Merkittävää löydös oli, että STEC:t säilyivät jopa uunissa, jossa taikinan lämpötila kävi 150 °C:ssa (10 min paiston aikana). Näytemäärä oli kriittinen – standardissa kuvatulla 25 g:n näytteellä STEC:tä ei ollut todettavissa, mutta isommalla näytemäärällä (tässä 333 g) STEC oli todettavissa ja määrä määritettävissä. Näytteistä 13,6 % oli STEC positiivisia (3/22) ja positiiviset löydökset ajoittuivat tiettyyn valmistaikinan valmistusprosessin ajanhetkeen. STEC pitoisuus oli hyvin pieni (0-0,36 MPN/100 g). Enteropatoogeenisia *E. coli*-bakteereita (EPEC) löytyi runsaammin (63,6 % positiivisia, 14/22). STEC määrät pysyivät stabiilina jääkaappilämpötilassa säilytetyssä valmistaikinaassa 4 viikkoa ja STEC oli todettavissa vielä 6 kk:n säilytyksen jälkeen. Kuivissa jauhosekoituksissa STEC säilyi yli 70 vrk. Todettiin kuitenkin, että normaalit kotona tehtävät paistomenettelyt ovat riittäviä tuhoamaan taikinan STEC bakteerit, jos taikinan kontaminaatio on pieni, bakteeri tasaisesti jakautunut taikinaan ja kypsennys uunissa on riittävän pitkä. Loppukeskustelussa kehoitettiin jäsenmaita selvittämään ja seuraamaan STEC tilannetta jauhomatriiseissa. Suomessa STEC:in esiintymistä jauhoissa ei ole selvitetty.

STEC in wild animals and pork meat (Gro S. Johannessen NRL Norja)

OH-EJP hankkeeseen kuuluvassa DiSCoVer projektissa tutkittiin STECin esiintymistä norjalaisissa villieläimissä. Projektissa tutkittiin poro-, hirvi-, metsäkauris- ja peuranäytteitä (á 100 kpl). STEC esiintyvyys (PCR skreenaus) oli korkeinta peuroissa (81/100 näytteistä positiivisia) ja metsäkauriissa (41/100), sen jälkeen laskevassa järjestyksessä hirvissä (28/100) ja poroissa (11/100). Viljelyvarmistukset pakastetuista rikasteliemistä olivat vielä osin kesken (näytteiden rikastusliemet säilöttiin 20–25% glyserolilisällä -80 °C:een projektin aikana). Skreenauksessa peuranäytteistä suurin osa oli stx2-positiivisia, kun jakauma oli tasaisempi stx1 ja stx2 välillä metsäkaurinäytteissä. Tutkimusta oli lisäksi tehty STECin esiintyvyydestä 157 jauhelihanäytteessä (sianliha). STEC esiintyvyys PCR-skreenauksessa oli korkea (n. 30 %), mutta yhtään STEC:tä ei varmistunut viljelyllä.

Development and validation of a multiplex real-time PCR assay with Taqman® technology for detection of *Escherichia coli* O80:H2 (MAZUY-CRUCHAUDET Christine, NRL Ranska)

Korkeapatogeenisen STEC serotyypin O80:H2 (ST 301) esiintyvyys jatkaa nousuaan Ranskassa (ja muualla Euroopassa) ja on tällä hetkellä tilastoissa merkittävä HUS-oireiden aiheuttaja. Kantatyyppillä on EHECin ja ExPECin virulenssiominaisuuksia. O80:H2 ST 301 sekvenssityypin kannat ovat melibioosipositiivisia. Serotyypispesifisen wzy80 geenin ja melibioosin käyttöön liittyvän geenin (70mel) avulla on kehitetty PCR, jossa havaitaan ensin O80:H2 ja O55:H9 STEC:t (70mel), jotka tarkennetaan serotyyppiin O80:H2 (wzy80). PCR-menetelmän kehittämisessä ja optimoinnissa oli saavutettu herkkyystaso 100–1000 pmy:tä rikastamisen jälkeen, kun menetelmää testattiin eri elintarvikkeissa (mm. maitotuotematriiseissa).

Internalization of STEC into protozoa: Impact on the food testing? Margherita Montalbano, NRL Italy

Alkueläimet toimivat bakteereiden ”kuljetuskapseleina” esim. vesiympäristöissä. Kystamuodossa olevat alkueläimet ovat erittäin kestäviä vaihtelevissa ympäristöolosuhteissa, joten ne säilyttävät myös sisälleen ottamansa bakteerit paremmin. *Acanthamoeba* ameeban kykyä säilyttää STECin patogeenisia (O157:H7) ja ei-patogeenisia kantoja tutkittiin tarkemmin. Kannat säilyivät elinkykyisinä ameeban sisällä testatut 25 päivää. Tutkimus vahvisti aiempia havaintoja, että alkueläimet voivat säilyttää patogeenisia *E. coli* kantoja ja antaa niille merkittävää etua selviytymisessä erilaisissa ympäristöoloissa. Lisäksi tällaiset bakteerit ovat diagnostiikan tavoittamattomissa: ne eivät näy PCR:ssä, tai tule esiin viljelyllä.

Stefano Morabito loppuyhteenvedossa tuotiin esiin mm. STECin patogeenisuuden koko ajan muuttuvan määrittely, joka haastaa lainsäädännön kehittämisen. Nykyinen lainsäädäntö EU:ssa perustuu EFSA:n riskinarviointiin vuodelta 2013, ja on aika tehdä päivityksiä vuoden 2020 uuden riskinarvioinnin ja FAO WHO:n vuoden 2018 raportin pohjalta. Ensi vuoden uusista aloitteista nostettiin esiin EFSA:n tyyppitystietokanta ja WGS tyyppitysdatan tiedonkeruun laajeneminen vähitellen koskemaan myös STEC-kantoja.