

Riikliku programmi “Põllumajanduslikud  
rakendusuringud ja arendustegevus  
aastatel 2009–2014” lisa 4

Eesti Maaülikool

***Campylobacter* spp., *Listeria monocytogenes* ja verotoksilise *Escherichia coli*-ga  
seonduvate toiduohutuse riskide hindamine Eestis**

Projekti juht: Mati Roasto  
Projekti täitjad: Toomas Kramarenko, Kadrin Meremäe, Mihkel Mäesaar, Ari Hörman

Tartu, 2014

## PROJEKTI LÕPPARUANNE<sup>5</sup>

**1. PROJEKTI NIMETUS:** *Campylobacter* spp., *Listeria monocytogenes* ja verotoksilise *Escherichia coli*-ga seonduvate toiduohutuse riskide hindamine Eestis

**2. PROJEKTI NIMETUS INGLISE KEELES:** Food safety risk assessment of *Campylobacter* spp., *Listeria monocytogenes* and verotoxigenic *E. coli* in Estonia

**3. PROJEKTI KESTUS**

**Algus:**  
2013

**Lõpp:**  
2014

### 4. PROJEKTI LÕPPARUANDE LÜHIKOKKUVÕTE:

**Projekti põhieesmärgiks** oli teostada *Campylobacter* spp., *Listeria monocytogenes* ja verotoksilise *Escherichia coli*-ga seonduvate toiduohutuse riskide hindamiseks teaduspõhiste andmete kogumine ja nende teaduslik analüüs.

#### **Projekti raames:**

Analüüsiti olemasolevaid *Campylobacter* spp., *L. monocytogenes* ja verotoksilise *E. coli* teadusandmeid;

Teostati täiendavad laboratoorsed analüüsid verotoksiliste *E. coli* O-gruppide ning nende toksigeensusmustrite määramiseks;

Teostati toidupatogeenide tüvede molekulaarepidemioloogilised ning bioloogiliste omaduste uuringud;

Hinnati *Campylobacter* spp., *L. monocytogenes* ja verotoksilise *E. coli* seonduvaid toiduohutuse riske Eestis.

#### ***Campylobacter* spp.**

Rakendusuringu proovivõtuplaanide koostamisel lähtuti Euroopa toiduohutusameti (EFSA) *Campylobacter* riskihinnangutest ning seetõttu oli põhifookuses Eesti jaekaubanduses müüdav toores/värske broileri linnuliha. Tuvastamise meetodile täiendavalt kampülobakterite loendamise meetodi rakendamine linnuliha analüüsimisel on väga oluline kuna kampülobakterite kõrge levimus ning arvukused suurendavad oluliselt inimeste kampülobakterioosi haigestumise riski. Risk haigestuda kampülobakterioosi esineb eelkõige siis, kui kampülobakterite arvukus ühes grammis toorlihas on suurem kui tuhat bakterit. Juhuproovide võtmisel lähtuti Eesti, Leedu ja Läti päritolu toodete müügiosaalust Eesti jaekaubanduses. Linnuliha proovid koguti Eesti suuremate kaubanduskettide poodidest, millest tingituna kajastavad uurimistööde andmed objektiivselt *Campylobacter* tegelikku levimust Eestis müüdavas toores linnulihas, mis on põhiline *Campylobacter* infektsioonide põhjustaja Euroopa Liidus (EL) ning maailmas tervikuna.

*Campylobacter* levimuse uurimuse raames koguti ning analüüsiti 606 jahutatud linnuliha proovi (jaemüügi tasand) ning 380 umbsoolesisaldise proovi (farmi/tapamaja tasand). Ühtekokku koguti ning analüüsiti termofiilsete kampülobakteritega seonduvate toiduohutuse riskide hindamiseks 986 proovi. Kuna rahvatervise riskid sõltuvad ka haigustekitaja bioloogilistest omadustest nt resistentsusprofiilist, siis teostati täiendavalt 98-st *Campylobacter* isolaadist koosneva valimi antibiootikumidele resistentsuse määramine. Molekulaarsel testil põhineval *Campylobacter* liigilise kuuluvuse määramisel selgus, et 98-st *Campylobacter* isolaadist 87 (88.8%) olid *C. jejuni*-d ning 11 (11,2%) *C. coli*-d. Antud uuringus töödeldi statistiliselt nii *Campylobacter* levimuse kui arvukuse tulemusi erinevat päritolu linnuliha toodetes ning võttes arvesse mõlema uurimuse kogu valimit (n=606) leiti, et Eesti toodete saastumine termofiilsete kampülobakteritega oli Läti ja Leedu toodetega võrreldes statistiliselt oluliselt väiksem nii levimuses kui arvukuses ( $p < 0,001$ ).

Antibiootikumidele resistentsuse uuringus leidsime, et ühe või enama antibiootikumi suhtes osutusid resistentseks 63,3% (n = 62) broilerilihas isoleeritud *Campylobacter* tüve. Tulemused näitasid, et 45,9% (n = 45) broilerilihas pärinevatest isolaatidest olid resistentsed ühe antibiootikumi suhtes; 12,2% (n = 12) *Campylobacter* isolaati olid resistentsed kahe erineva antibiootikumi suhtes; 4,1% (n = 4) isolaatidest olid resistentsed kolme erineva antibiootikumi suhtes ning üks isolaat (1,0%) oli resistentne koguni nelja erineva antibiootikumi suhtes. Kõikidele antibiootikumidele tundlikuks osutus ühtekokku 36,7% (n = 36) *Campylobacter* isolaatidest. Kõrge resistentsus tehti kindlaks fluorokinolonide suhtes kuna tsiprofloksatsiini ja nalidiksiinhappe suhtes osutusid resistentseks koguni 60,2% ja 59,2% Eesti jaekaubandusest hangitud kana-broilerilihas pärinevatest kampülobakterite tüvedest. Sarnane resistentsus määrati ka Eesti päritolu *Campylobacter* inimtüvedele millest 71,4% (n = 20) osutusid fluorokinolonide suhtes resistentseteks. Multiresistentseteks osutusid 5,1% (n = 5) broilerilihas isoleeritud ning 7,1% (n = 2) inimpäritolu *Campylobacter* tüve. Meie uuringute tulemused osutavad asjaolule, et Eesti inimestelt isoleeritud kampülobakterite tüved pärinevad ka muudest allikatest kui Eesti kana-broileriliha. Seda näitab Eesti inimpäritolu tüvede märkimisväärselt kõrgem resistentsus fluorokinolonidele (67,9%) võrreldes Eesti kana-broileriliha päritolu tüvedega (19,4%). Teades asjaolu, et meie uuringutes osutusid Läti ja Leedu päritolu värsked kana-broileriliha tooted statistiliselt oluliselt (p < 0.001) suuremal määral (positiivsete proportsioon + arvukus) kampülobakteritest saastunuks ning teades, et linnuliha põhjustab arenenud riikides enim kampülobakterioosi juhtumeid, võib oletada, et imporditud värsked kana-broileriliha omab Eesti inimeste kampülobakterioosi haigestumisel suuremat rolli kui Eesti päritolu kana-broileriliha. *Campylobacter* antibiootikumidele tundlikkuse uuringute alusel võib kokkuvõtlikult öelda, et võimalikud rahvatervise riskid seonduvad kampülobakterite kõrge resistentsusega fluorokinolonide suhtes ning seda eelkõige Läti ja Leedu päritolu kampülobakterite puhul. Mõlema uurimuse andmeid analüüsid võime väita, et kampülobakterioosi haigestumise risk on Eestis kõrgem juhtudel, kus käideldakse või tarbitakse Läti või Leedu päritolu värsket kanabroileriliha. *Campylobacter* spp. levimus Eesti broilerilihas oli väike ning arvukus madal, mis annab alust eeldada, et tarbides kodumaist linnuliha on tarbijate kampülobakterioosi haigestumise risk väike.

### ***Listeria monocytogenes***

Uurimisfookuses olid üksnes Eesti suuremates jaekaubanduskettides esindatud olevad Eesti tootjad ning nende potentsiaalsed riskitooted, milleks on pika säilimisajaga vaakumpakendatud (VP) ning modifitseeritud gaasikeskkonda pakendatud (MAP) söömiseks valmis (RTE) liha- ja kalatooted. Proovivõtuplaan keskendus seega kõrgendatud riski kategooriasse kuuluvatele toodetele ning analüüsid teostati kõlblik kuni viimasel päeval, mil saastunud toodete *L. monocytogenes* arvukus on kõrgeim ning seega ka inimesele avalduv potentsiaalne risk suurim. Kuupõhiselt kogutud 370 söömiseks valmis kala- ja lihatoode jagati töötlemisprotsessi põhiselt FAO soovitusi arvesse võttes vastavalt 5-de ja 4-ja kategooriasse. RTE kalatooted jagati järgmistesse kategooriatesse: külmsuitsu, graavikala, kuumsuitsu, preservid ja soolatud kalatooted. RTE lihatoode jagati järgmistesse kategooriatesse: külmsuitsu, kuumtöödeldud, fermenteeritud ja kuumsuitsu lihatoode.

Analüüsi tulemustest selgus, et RTE kalatoodetest esines enim *L. monocytogenes* saastumist soolatud kalatoodete kategoorias, kus analüüsitud 69 proovist osutus positiivseks 22 (31,9%), järgnesid preservide ja külmsuitsu tootegrupid vastavalt 4 (9,5%) ning 4 (6,1%) positiivse prooviga. Kõrgeimate *L. monocytogenes* arvukustega saastumist esines soolatud kalatoodete tootegrupis, kus üks proov ületas ka Euroopa Liidu seadusandlusega kehtestatud piirmäära. Teistes tootegruppides, kus esines *L. monocytogenes* saastumist vähem, jäid positiivsete proovide *L. monocytogenes* arvukused alla kehtestatud 100 pmü/g piirmäära.

Analüüsitud 185 RTE lihaproovi osutusid *L. monocytogenes* poolt saastunuks järgnevalt: 73-st külmsuitsu lihatoote proovist osutus positiivseks 7 (9,6%); 20-st fermenteeritud tootest tuvastati *L. monocytogenes* vaid ühel (5,0%) juhul; 73-st kuumsuitsu lihatootest tuvastati nimetatud patogeeni kolmel (4,1%) korral ning kuumtöödeldud tootegrupi kuuluvast 18-st proovist *L. monocytogenes* positiivseid tulemusi ei leitud. Analüüsitud söömiseks valmis lihatoodetes jäid *L. monocytogenes* arvukused kõigis tootekategooriates alla Euroopas Liidus kehtestatud piirmäära. Analüüside tulemuste põhjal saab järeldada, et võrreldes RTE lihatoodetega on *L. monocytogenes* levimus suurem RTE kalatoodetes, vastavalt 6,0% (CI 95% 3,4%-10,3%) ja 16,8% (CI 95% 12,1%-22,8%). Sellegipoolest olid positiivsete proovide *L. monocytogenes* arvukused madalad, vaid ühes RTE kalaproovis osutus arvukus kehtestatud kriteeriumist (100 pmü/g) suuremaks. Võttes arvesse toika, et toidu analüüsid teostati "kõlblik kuni" viimase päeval ning teadmist, et risk rahvatervisele esineb juhtudel, kus tooted sisaldavad *L. monocytogenes*'t üle 100 pmü/g/ml kohta võib järeldada, et risk haigestuda listerioosi tarbides Eesti päritolu RTE kala- ja lihatooteid on väga madal kuni madal.

Suhteliselt headest tulemustest hoolimata tuleb Eesti tootjatel toidu käitlemise tasandil järjepidevalt efektiivselt rakendada HACCP põhimõtteid ning eeltingimusprogramme ning tagada kehtestatud protsesside ning süsteemide kasutuskohasus (valideerimine) ja nõuetekohasus (verifitseerimine). Tuleb meeles pidada, et *L. monocytogenes* on väga vastupidav erinevatele keskkonnaningimustele; on laialdaselt levinud looduskeskkonnas ning tootmishügieeni probleemidest tingituna võib kergesti sattuda toidu töötlemise ning tarbimise ahelasse.

### **Verotoksiline *E. coli***

Rakendusuringu raames teostati pilootuuring 5 levinuma verotoksilise *E. coli* serogrupi (O157, O103, O111, O145, O26) ning kahe põhilise virulentsusmarkeri esinemise kindlakstegemiseks. Kasutades molekulaarset sõelmeetodit, tuvastati aastal 2013 ühtekokku 120 veise nahapinnaproovis esmalt verotoksiini geenide olemasolu või puudumine ning seejärel geenid, mis viitavad konkreetsele O-serogrupile. Lisauuringuna määrati positiivsetes proovides intimiini kodeeriva geeni *eae* olemasolu. Uuringute põhjal saab väita, et verotoksilise *E. coli* levimus veise nahapinnaproovides on kõrge: 64% proovidest tuvastati verotoksiinigeenide olemasolu, kusjuures 37 juhul tuvastati proovidest *vtx2* ning 38 juhul *vtx1/vtx2* geenide olemasolu. 91% proovides tuvastati samuti *eae* geeni olemasolu. Murettekitavaks on ka asjaolu, et 75% positiivsetest nahapinnaproovidest tuvastati enam kui ühe verotoksilise serogrupi olemasolu. Molekulaarse serotüpeerimise tulemusel selgus, et levinumaks O-serogrupiks uuritud 77 proovis oli O145 (74%), millele järgnesid O157 (57%), O103 (55%), O26 (47%). Serogrupile O111 viitava geeni esinemine määrati vaid 8 (10%) proovis. Riikliku zoonoosete haigustekitajate seire käigus 3 aasta jooksul isoleeritud *E. coli* O157 tüvedega (33) viidi läbi täiendavad epidemioloogilised uuringud. Uuringute tulemusel selgus, et kõik isolaadid kuuluvad serotüüpi O157:H7 ning omavad kolme põhilist virulentsusfaktorit: verotoksiine, intimiini ja enterohemolüsiini. Verotoksiini geenikombinatsioonidest olid esindatud 2: *vtx2* ja *vtx1/vtx2*.

Rakendusuringu raames teostati ka ravim tundlikkuse uuringud aastatel 2011 – 2013 riikliku zoonoosete haigustekitajate seire raames isoleeritud *E. coli* O157:H7 serotüüpi kuuluvate tüvedega. Tundlikkus erinevate antimikroobsete ainete suhtes määrati kvantitatiivselt minimaalse kontsentratsiooni meetodit (MIC) kasutades ning tulemuste tõlgendamisel lähtuti EUCAST'i poolt aprillis 2013 kehtestatud epidemioloogilistest piirarvudest. Kaheksateist (18) isolaati osutusid tundlikuks kõigi 14 uuritud toimeaine suhtes, resistentsus ühe preparaadi suhtes (treptomütsiin või sulfametoksasool) tuvastati 4 isolaadil. Ülejäänud 8 isolaadil oli välja kujunenud multiresistentsus, kusjuures üks neist osutus resistentseks koguni 5 preparaadile: ampitsilliinile, streptomütsiinile, tetratsükliinile, sulfametoksasoolile ja kanamütsiinile. ESBL (laiendatud toimespektriga beeta-laktamaasi tootvaid) tüvesid ei tuvastatud. Enamik multiresistentseid tüvesid pärinesid 2011. ja 2012. aastal võetud proovidest.

Täiendavalt 2013. aasta uuringutele, mida kirjeldasime eelnevalt teostati 2014 aastal täiendavad molekulaarsed sõeluuringud viie enamlevinud VTEC serogrupi kindlakstegemiseks tapamaja tasandil abrasiivse käsna meetodil võetud veiserümbe pinnaproovidest ning lihalõikuse tasandil pärit proovidest. Perioodil jaanuar – september 2014 uuriti kokku 98 veise rümbaproovi, mis pärinesid 24 erinevast tapamajast üle Eesti. Uuritud proovidest 33 (34%, CI<sub>95</sub> 25% – 44%) osutusid toksiinigeenide osas positiivseteks. Toksiinigeenide *stx1* ja *stx2* esinemissageduses statistilist erinevust ei täheldatud: *stx1* tuvastati 17 ning *stx2* 30 proovis ( $p = 0,14$ ), kusjuures 15 juhul oli tegu mõlema geeni koosesinemisega. Olgugi, et toksiinigeenide esinemine oli sagedasem noortelt veistelt isoleeritud proovides (40%), pole kahe vanuserühma võrdluses toksiinigeenide esinemises statistilist erinevust ( $p = 0,063$ ). Intimiini kodeeriva geeni *eae* olemasolu tuvastati vähem kui pooltes proovides (15 juhul). Kui serogrupide O103, O157, O145 ja O26 esinemissagedustes statistilist erinevust märgata ei ole, siis serogrupi O111 liigituvat *E. coli* bakterit uuritud proovides ei tuvastatud. Enimlevinumaks serogrupiks osutus O103 (11 proovi), järgnesid O157, O145 ja O26. Nimetatud viiele serogrupile iseloomulikke geene ei tuvastatud 16 toksiinigeene omavas proovis (16%, CI<sub>95</sub> 10% - 25%). Käesoleva rakendusuringu raames teostati täiendavalt uuringud viie olulisema VTEC serogrupi olemasolu kindlakstegemiseks lihalõikuse etapis. Uuringusse kaasati riikliku zoonoosete haigustekitajate seire raames lihalõikusettevõtetes võetavad veiste lihaseproovid. Proovid võeti järelevalveinspektorite poolt lihalõikuse ajal otse konveierilt või lõikuse töökohas. Proovid pärinesid 22 erinevast lihalõikusettevõttest üle Eesti. Perioodil jaanuar – september 2014 uuriti kokku 41 veise lihaseproovi, millest 2 (4,9%, CI<sub>95</sub> 1,4% – 16,1%) osutusid toksiinigeenide osas positiivseteks. Mõlemal juhul tuvastati proovis *stx2* geeni esinemine. Serogrupidest olid esindatud O103 ja O145. Kokkuvõtvalt on erinevatelt tootmistasandidelt võetud proovides verotoksilise *E. coli* presumptiivsele esinemisele viitavate toksiinigeenide esinemissagedustes märgatav statistiliselt oluline erinevus ( $p < 0,05$ ). Kõige sagedamini tuvastati proovides geeniperekonna *stx2* esinemine.

Väikesemahuline molekulaarne sõeluuring jahilukite rümpadelt võetud pinnaproovidest näitas toksiinigeenide esinemist 19% proovides (CI<sub>95</sub> 8% - 37%), kusjuures 4 juhul viiest oli tuvastatud vaid *stx2* esinemine. Serogrupp O145 olemasolu tuvastati neljal, serogrupp O157 kahel ning serogrupp O103 ühel korral. Kolmel juhul viiest oli tegu kahe serogrupi koosesinemisega.

Ulatusliku kirjanduse analüüsi, rakendusuringuprojekti analüüsitulemuste ning andmebaaside põhjal on koostatud *Campylobacter* spp., *Listeria monocytogenes* ja Shiga-toksiini tootva *Escherichia coli*-ga seonduvad toiduohutuse riskiprofiilid, milles on esitatud hinnangud ka võimalikest rahvatervise riskidest Eestis. Dokument esitatakse Põllumajandusministeeriumile 2015. aasta jaanuarikuus.

Antud uuringu raames valmivas riskiprofiilis esitatakse põhjalik *Campylobacter* spp. *Listeria monocytogenes* ning Shiga-toksiine tootva *Escherichia coli* toiduohutuse riskidega seonduv probleemide arutelu, käsitletakse võimalikke ohje meetmeid ning tehakse ettepanekuid probleemide minimeerimiseks.

Antud uuring lähtus püstitatud eesmärkidest, mis said projekti meeskonna poolt enamasti täidetud. Enamasti seetõttu, et mõningad molekulaarsed uuringud veel jätkuvad ning nende tulemused avaldatakse nii eesti keelsetes populaarteaduslikes ning teadusajakirjades kui ka rahvusvahelistes üldtuntud teadusajakirjades.

Projekti meeskond on tulemusi väga edukalt ette kandnud nii eesti kui rahvusvahelistel konverentsidel. Samuti on tulemusi tutvustatud erinevatel teabepäevadel mille osalejateks on olnud toidu algtootjad, töötledajad ning riiklikud järelevalveametnikud.

Projekti võib pidada igati õnnestunuks ning seda kinnitavad ka projektijuhi ja põhitäitjate poolt avaldatud artiklid ning teostatud temaatilised suulised ettekanded. Projektis teostatud analüüside andmeid saab kasutada ka järgnevat riskihinnangute algandmetena ning molekulaaruuringute tulemusi liitumisel rahvusvaheliste andmebaasidega. Projekti tulemused on kasulikud nii toidu tootjatele, riiklikule toidu kontrollile kui toidu tarbijatele. Projekt aitas kaasa toiduohutusega seonduvate rahvatervise riskide tuvastamisele ning nende minimeerimisele Eesti toidu tootmise, töötlemise ning tarbimise ahelas.

## 5. LÜHIKOKKUVÕTE INGLISE KEELES:

### ***Campylobacter* spp.**

*Campylobacters* in poultry and in poultry meat at retail level were studied in two surveys during the twelve months period in Estonia. Data of these two surveys was combined and analysed partially together in order to get a more comprehensive estimate on the prevalence and possible seasonality of campylobacters in poultry and in poultry meat products in Estonia. Mostly Estonian, Lithuanian and Latvian products, representing the most typical origins of poultry products on the Estonian retail market, were sampled and analysed in these surveys. First survey organized by the Estonian Veterinary and Food Board focused on the *Campylobacter* prevalence in poultry meat at retail level. The second survey was performed by the Estonian University of Life Sciences to determine prevalence and bacterial counts of *Campylobacter* spp. in fresh broiler chicken meat at retail level. Additionally, caecal samples were collected at Estonian slaughterhouse level for estimation of *Campylobacter* contamination seasonal variation. Altogether, 606 poultry meat samples at retail level and 380 caecal samples at Estonian poultry slaughterhouse level were collected and analysed in these surveys. Altogether 986 raw poultry meat and fecal samples were collected and analyzed at retail and farm/slaughterhouse level respectively for *Campylobacter* studies. A total of 20.8% of the poultry meat and 39.2% of the caecal samples were found positive to *Campylobacter* spp. The mean number of *Campylobacters* in fresh broiler chicken meat in the enumeration positive samples was determined  $1.6 \times 10^3$  (1600) CFU/g. A seasonal variation on the prevalence of the *Campylobacter* contamination in broiler chicken meat was observed having peaks during the warm summer period in Estonia. We found high *Campylobacter* counts on fresh broiler chicken meat of Latvian and Lithuanian origin at Estonian retail level, respectively  $2.6 \times 10^3$  (2600) CFU/g and  $1.6 \times 10^3$  (1600) CFU/g. For Estonian origin broiler chicken products which were positive in enumeration studies the average *Campylobacter* count was  $6.6 \times 10^2$  (660) CFU/g. *Campylobacter* prevalence in fresh broiler chicken meat of Estonian origin was lower compared to most EU-countries, but notably higher than officially reported to EFSA. Seasonal peak in *Campylobacter* contamination of poultry meat was in summer. Slaughterhouse level studies and broiler chicken caecal material analyses confirmed the presence of distinct seasonal variation in *Campylobacter* contamination in Estonia because the proportion of *Campylobacter* positive caecal samples was 0%, 39%, 92%, 45% and 0%, respectively in June, July, August, September and October. Correlation in *Campylobacter* contamination between broiler chicken meat and caecal material in Estonia was observed. The results of the *Campylobacter* prevalence and enumeration studies showed distinct seasonal variation in *Campylobacter* contamination at Estonian farm and retail level with contamination peaks in warm summer months. Imported poultry meat from Latvia and Lithuania presented higher *Campylobacter* risks for consumers compare to domestic poultry products.

### ***Listeria monocytogenes***

During 24 months in total 340 high risk category RTE food samples have been collected and analyzed for *Listeria monocytogenes* prevalence and enumeration. Only company packaged food samples were collected. High risk category RTE meat and fish products of Estonian origin were grouped according to FAO suggestions and used technological processes into the 4 to 5 food categories as described by following.

RTE fish products were grouped as cold-smoked, gravled fish, hot-smoked, preserves and salted fish products.

RTE meat products were grouped as cold-smoked, hot-smoked, fermented and cooked meat products.

Among RTE fish products the prevalence of *L. monocytogenes* was highest among salted fish products (31.9%)

followed by preserves (9.5%) and cold-smoked fish products (6.1%). The highest counts were obtained from salted fish products but generally the numbers of *L. monocytogenes* in positive RTE fish products were less than 10 cfu/g at the end of product self-life. Only one RTE fish product (salted fish) exceeded the official criteria laid down for *L. monocytogenes* in RTE foods.

Among the RTE meat products the prevalence of *L. monocytogenes* was highest among cold-smoked meat products (9.6%) followed by fermented meat products (5.0%) and hot-smoked meat products (4.1%). *L. monocytogenes* was not detected from RTE cooked meat products. The counts of *L. monocytogenes* positive RTE meat products remained below the official criteria (100 cfu/g) at the end of the product self-life.

In summary, we may conclude that compare to RTE meat products the *L. monocytogenes* prevalence was higher in RTE fish products of Estonian origin, respectively 6.0% (CI 95% 3.4%-10.3%) ja 16.8% (CI 95% 12.1%-22.8%).

Taking into account the prevalence and counts of *L. monocytogenes* in analysed products it is possible to declare that there is very low to low risk of listeriosis while consuming Estonian origin RTE fish and meat products.

Despite of previously presented results Estonian food producers should keep in mind that *L. monocytogenes* contamination should be avoided as much as possible through validation of the processes and verification of the self-control programs established in food enterprises. *L. monocytogenes* is present in natural environment and often in raw materials; therefore the contamination risk of the products will remain high.

### **Shiga toxin-producing *E. coli***

During the period of April till November 2013 77 bovine hide samples out of the 120 turned out positive for verotoxin 1 or/and verotoxin 2 gene. The most common *E. coli* serogroup is O145 following O157, O103, O26 and O111. The study revealed that 75% of positive samples contained more than one O-serogroup specific coding genes. The *eae* gene coding the intimin protein was detected in most of the samples. All *E. coli* O157 isolates belonged to the serotype O157:H7 and expressed all three virulence factors: verotoxins, intimin and enterohaemolysin. The additional studies on verotoxin genes showed, that three different patterns of toxin subtypes (*vtx1a*, *vtx2a* and *vtx2c*) are represented in particular *E. coli* O157 isolates.

At the beginning of 2014 the antimicrobial susceptibility patterns of *E. coli* O157:H7 isolates was performed with minimal inhibitory concentration (MIC) test according to EUCAST epidemiological cut-off values specified in April 2013. Susceptibility was determined against 14 antimicrobials. Eighteen isolates were susceptible to all tested antimicrobials; 4 isolates were resistant against one antimicrobial, remaining 8 isolates were multiresistant with one isolate resistant against 5 antimicrobial (ampicillin, streptomycin, tetracycline, sulfamethoxazole and kanamycin).

Extended spectrum beta-lactamase producing (ESBL) *E. coli* O157:H7 strains were not detected in present study. Most of the resistant strains were associated with the samples collected from 2011 and 2012 at the frame of state monitoring program for zoonosis.

Continuously the STEC serogroups were determined for cattle carcass samples and fresh meat obtained from Estonian slaughterhouses and associated meat industries. Altogether 98 carcass samples obtained from 24 slaughter points all-over the Estonia were analysed.

From the analysed samples 33 (34%, CI<sub>95</sub> 25% – 44%) were positive for STEC toxin genes. There were not statistically important differences ( $p = 0.14$ ) between the prevalence of *stx1* and *stx2* genes. *Stx1* gene was determined in 17 samples and *stx2* gene was determined in 30 samples. In 15 samples both genes were determined to be present. Toxin genes were more prevalent for younger cattle's (40%) but there was no statistically important differences in two age groups ( $p = 0,063$ ). Intimin coding gene *eae* was detected less than half of the samples in 15 samples. Most prevalent serogroup was O103 (in 11 samples), followed by O157, O145 and O26. The genes determining previously mentioned STEC serogroups were not detected in 16 samples in which the toxin genes were found to be present (16%, CI<sub>95</sub> 10% - 25%).

Small scale molecular screening was performed for hunted large game (wild boars mostly) carcasses in one collection centre in Estonia. The carcass surface samples were positive for STEC toxin genes in 19% of cases (CI<sub>95</sub> 8% - 37%). Mostly *stx2* gene was detected. Serogroup O145, O157 and O103 was detected in four, two and one cases with three cases in total five two different serogroups were determined to be present in the sample.

STEC prevalence studies will continue in all December 2014, therefore the data presented here should be handled as presumptive. Additionally, we will perform *E. coli* O157:H7 isolates of Estonian origin molecular genotyping at the beginning of the year 2015 in Rome, EU reference laboratory. Joint research article with rough headline "Phenotypic characterization of *E. coli* O157:H7 isolates from Estonian domestic bovines" will be published in 2015.

Risk profiles for *Campylobacter* spp, *L. monocytogenes* and Shiga-toxin producing *E. coli* food hazards with risk estimates towards public health in Estonia is composed and will be published in January 2015.

## **6. TEEMA RAAMES ILMUNUD PUBLIKATSIOONID:**

### **AASTA 2013**

Kovalenko, K., Roasto, M., Liepinš, E., Mäesaar, M., Hörman, A. 2013. High occurrence of *Campylobacter* spp.

in Latvian broiler chicken production. *Food Control*, **29**, 188-191.

**Kramarenko, T., Roasto, M., Meremäe, K.,** Kuningas, M., Põltsama, P., Elias, T. 2013. *Listeria monocytogenes* prevalence and serotype diversity in various foods. *Food Control*, **30**, 24-29.

**Roasto, M., Mäesaar, M., Muutra, K., Meremäe, K., Kovalenko, K.,** Kramarenko, T. *Campylobacter* spp. and *Listeria monocytogenes* prevalence in 2012. FOODBALT 2013. ISBN: 978-9949-430-63-5, lk. 60-61.

Muutra, K., Mäesaar, M., Roasto, M., Meremäe, K., Kramarenko, T. 2013. *Campylobacter* spp. levimus ja arvukus aastal 2012. Terve Loom. Eesti Maaülikool. Tartu 2013, Pajoprint. ISBN 978-9949-484-78-2. lk. 113-120.

**Mäesaar, M., Roasto, M., Meremäe, K.,** Muutra, K., **Kramarenko, T.** 2013. *Listeria monocytogenes* levimus ja arvukus Eesti Toiduainetes aastal 2012. Terve Loom. Eesti Maaülikool. Tartu 2013, Pajoprint. ISBN 978-9949-484-78-2. lk. 121-126.

Kovalenko K., **Roasto M., Mäesaar M., Meremäe K., Kramarenko T.** 2013. *Campylobacter* spp. and *Listeria monocytogenes* prevalence study in 2012. IAFP European Symposium on Food Safety proceedings, Marseille, France, p. 57.

**Meremäe, K., Roasto, M.,** Kalmus, P., Viltrop, A., **Kramarenko, T.** 2013. Toorpiima ohutusest põhjalikumalt. *Eesti Loomaarstlik Ringvaade*, 1, 22-29.

**Roasto, M., Kramarenko, T.** 2013. Shiga-toksiini tootev *E. coli* (STEC) toidupatogeenina. *Eesti Loomaarstlik Ringvaade*, 2, 18-22.

#### **Kaitstud magistritöö:**

Kaisa Muutra. 2013. Juhendajad prof. **Mati Roasto** ja prof. Priit Elias. Magistritöö "*Listeria monocytogenes* e ja *Campylobacter* spp. levimus ning arvukus liha- ja kalatoodetes Eestis". Eesti Maaülikool, Veterinaarmeditsiini ja loomakasvatuse instituut.

#### **Kaitstud doktoritöö:**

Kaspars Kovalenko. 2013. Juhendajad: prof. **Mati Roasto** ja dotsent Edgras Liepinš. **Doktoritöö** "Thermophilic *Campylobacter* in broiler chicken meat production chain in Latvia". Läti Põllumajandusülikool.

#### **AASTA 2014**

Kovalenko, K., **Roasto, M.,** Šantare, S., Bērziņš, A., **Hörman, A.** 2014. *Campylobacter* species and their antimicrobial resistance in Latvian broiler chicken production. *Food Control*, **46**, 86-90.

**Mäesaar, M.,** Praakle, K., **Meremäe, K., Kramarenko, T.,** Sögel, J., Viltrop, A., Muutra, K., Kovalenko, K., Matt, D., **Hörman, A.,** Hänninen, M-L., **Roasto, M.** 2014. Prevalence and counts of *Campylobacter* spp. in poultry meat at retail level in Estonia. *Food Control*, **44**, 72-77.

**Roasto, M., Meremäe, K.,** Kalmus, P. 2014. Ülevaade toorpiima ohutuse alastest uuringutest ning toorpiimaga seonduvatest terviseriskidest. Terve Loom ja Tervislik Toit. Eesti Maaülikool, Paar OÜ, ISBN 978-9949-536-17-7. Lk. 119-129.

**Roasto, M., Mäesaar, M., Meremäe, K., Kramarenko, T.,** Muutra, K. 2014. Termofiilsed kampülobakterid toidupatogeenina, seonduvad riskifaktorid ning Eestis teostatud uuringud. Terve Loom ja Tervislik Toit. Eesti Maaülikool, Paar OÜ, ISBN 978-9949-536-17-7. Lk. 109-118.

**Mäesaar, M., Roasto, M., Kramarenko, T.** 2014. *Listeria monocytogenes* toidupatogeenina, seonduvad riskifaktorid ning Eestis teostatud uuringud. Terve Loom ja Tervislik Toit. Eesti Maaülikool, Paar OÜ, ISBN 978-9949-536-17-7. Lk. 92-97.

**Roasto, M., Mäesaar, M., Meremäe, K.** 2014. *Listeria monocytogenes* ga seonduvad toiduohutusriskid. *Eesti Loomaarstlik Ringvaade*, 1, 9-14.

**Roasto, M.** 2014. Termofiilsete kampülobakteritega seonduvad toiduriskid. *Eesti Loomaarstlik Ringvaade*, 4, 18-23.

**Rahvusvahelisse eelretsenseeritavasse ajakirja (kategooria 1.1.) saadetud teadusartiklite käsikirjad:**

Antimicrobial resistance patterns in *Campylobacter* spp. isolated from Estonian, Latvian and Lithuanian origin broiler chicken meat and from Estonian patients with severe enteric infections, Zoonoses and Public Health

**Juhendamisel doktoritööd:**

Kristi Praakle, *Campylobacter* spp. ja *Listeria monocytogenes* linnulihatoodetes Eestis, juhendaja **prof. Mati Roasto** (Eesti Maaülikool), prof. Hannu Korkeala (Helsingi Ülikool) ja prof. Marja-Liisa Hänninen (Helsingi Ülikool). Kaitsmine planeeritud 2015. aasta kevadel.

**Mihkel Mäesaar**, *Listeria monocytogenes* ja *Campylobacter jejuni* molekulaarepidemioloogia ning kontroll Eesti toiduahelas, juhendaja **prof. Mati Roasto** (Eesti Maaülikool) ja prof. Marja-Liisa Hänninen (Helsingi Ülikool). Kaitsmine planeeritud aastasse 2016.

**Toomas Kramarenko**, Verotoksiline *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* ja *Listeria monocytogenes* Eesti toiduahelas, juhendaja **prof. Mati Roasto** (Eesti Maaülikool), **prof. Ari Hörman** (Helsingi Ülikool) ja **dotsent Kadrin Meremäe** (Eesti Maaülikool). Kaitsmine planeeritud aastasse 2017.

<b>Projekti juht (ees- ja perekonnanimi):</b> Mati Roasto	<b>Allkiri:</b>	<b>Kuupäev:</b>
<b>Taotleja esindaja kinnitus aruande õigsuse kohta (ees- ja perekonnanimi):</b> Andres Aland	<b>Allkiri:</b>	<b>Kuupäev:</b>

Projekti lõpparuande täitmise juhend on kättesaadav Põllumajandusministeeriumi koduleheküljel

<http://www.agri.ee>