

EURL-AR WORKHOP 2016

Aika: 14.-15.4.15, Lyngby, Tanska
Järjestäjä: DTU food (EURL-AR)

EU:n antibioottiresistenssireferenssilaboratorion järjestämään vuosittaiseen workshopiin osallistui asiantuntijoita 32 maasta sekä edustajat EFSA:sta, Euroopan komissiosta, ECDC:stä, FVO:sta ja FVE:stä.

Rene Hendriksen (EURL-AR) kertoi aloituspuheenvuorossaan EU-antibioottiresistenssi-referenssilaboratorion (EURL-AR) viimeisimmät kuulumiset. Esitys oli pitkälti sama kuin vuoden 2015 marraskuussa EFSA:ssa pidetty esitys, jossa hän kertoi EURL:n yhteistyökumppani- ja asiantuntijaverkostotahoista sekä EURL:n tärkeimmästä tehtävästä, vertailulaboratoriotoiminnasta, johon kuuluu mm. kansallisten laboratoriodien ohjaaminen ja maavierailut, vertailututkimuskierrosten järjestäminen, kantakokoelman ylläpito sekä netin välityksellä toimiva Coursera-koulutusjärjestelmä.

Javier Tellechea-Vertiz (FVO, EC) kertoi Komission viisivuotissuunnitelman (5 year Action Plan) tavoitteiden etenemisestä ja joistain saavutuksista, joita tällä saralla on tehty, kuten hallitun ml-käytön ohjeistus (20105/C299/04), animal health law, resistenssiseurannan vahvistaminen (harmonoitu seurantaohjelma 2013/652/EU, JIACRA, ESVAC-yhteistyö). Lisäksi hän kertoi lyhyesti resistenssiseurannan FVO-auditoinneista, jotka alkoivat vuonna 2015. Vuoden 2016 loppuun mennessä auditointi on tehty yhteensä 8 maassa. Auditoinneissa auditoinneina on ollut myös eri maista kutsuttuja asiantuntijoita. Auditoinnin yhteenvedo havaintoineen, hyvine kokemuksineen ja käytäntöineen julkaistaan vuoden 2017 alkupuolella. Jatkosuunnitelmaa (mahdollisista seuraavista auditoinneista ei vielä ole.

Pierre-Alexandre Beloeil EFSAsta kertoi vuoden 2014 EU-resistenssiraportin (EU summary report, EUSR) päätuloksista ja vuoden 2015 datan raportoinnin aikataulusta. EUSR 2014 julkaistiin aiotusta aikataulustaan hieman myöhemmin, jotta mukaan saatiin myös kolistiiniresistenssitulosten varmistukset sekä näiden tulosten analyysi. EMA on päivittämässä suosituksia kolistiinin käytöstä todettujen kolistiiniresistenssilöydösten takia. Vuoden 2015 resistenssiaineistossa esiintyvien mielenkiintoisten ja erikoisten fenotyyppien varmistuksia tullaan jälleen tekemään raportointikauden päättymisen jälkeen: EFSA ja EURL valitsevat kesäkuussa 2016 150-200 isolaattia, jotka pyydetään lähettämään Tanskaan EURL-laboratorioon fenotyyppien ja genotyyppien varmistusta varten. EURL:n fenotyyppitulokset saatavilla syyskuussa 2016 ja WGS-tulokset marraskuussa 2016. Lisäksi Pierre-Alexandre kertoi EFSA:n järjestämistä koulutuksista koskien raportointia, web-koulutusta edelleen mahdollista saada.

Vuoden 2015 datan raportointi: alkoi 1.4.
päättyy 31.5.
taulukot tarkistettavaksi 3.6.
Feedback letter 13.6.
data lukitaan 4.7.

Vuoden 2015 **EQAS-tuloksia** esittelivät eri maiden asiantuntijat. Vuonna 2015 kaikki laboratoriot onnistuivat *E. coli* – ja salmonellakierroksilla, kaikilla tuloksia oikein vähintään 95 %. Salmonelloista yhden kannan imipeneemi ja *E. coli* -kannoista yhden kannan meropeneemi aiheuttivat eniten virhetuloksia. Pääasiassa ESBL/AmpC-kannat tulkittiin oikein, eniten haasteita OXA-48:n

tunnistamisessa. Epäiltiin osin myös, että yksi *E. coli* OXA-48 -kanta ei olisi ollut kuljetuksen aikana pysynyt stabiilina. Enterokokkien tunnistus ei tuottanut ongelmia, mutta kolmessa tapauksessa herkkyystulosten määrittämisessä virheitä esiintyi niin merkittävästi, että tulokset jouduttiin poistamaan raportista; antibiootit olivat tigesykliini (kanta 9.3), daptomysiini (kanta 9.4) ja kinupristiini-dalfopristiini (Q/D, kanta 9.4). Tigesykliini ja daptomysiini ovat ns. uusia antibiootteja resistenssiseurannassa. Mielenkiintoista oli kuulla Latvian NRL:n kokemuksia VetMIC-paneelilla tehtyjen enterokokkikantojen liian korkeista ampisilliinituloksista, koska samainen antibiootti aiheutti AMBIssakin vuoden 2015 kierroksella ongelmia. Syyksi AMBIssa epäiltiin liian vanhoja paneeleja (kolmen vuoden käyttöikä oli juuri tulossa umpeen), joten lienee mahdollista, että ampisilliini ei säily paneeleissa niin kauan tarpeeksi stabiilina. Stafylokokeilla vääriä tuloksia esiintyi eniten Q/D:lla, klindamysiinillä, erytromysiinillä ja trimetopriimillä. Kampylobakteereilla yhden kannan tetrasykliinimääritys tuotti myös niin paljon virhetuloksia, että se jouduttiin poistamaan raportista.

Tuloksista keskusteltaessa esiin nousi gram-positiivisten bakteerien tailing effect: joidenkin antibiootien (Cli, Ery, Chl, Lz, Tet) kohdalla herkkyyspaneelin luku voi olla vaikeaa, jos testibakteerin kasvu ei täysin inhiboidu missään pitoisuudessa tai kasvu heikkenee vähitellen. CLSI M07-A10 antaa ohjeita tulosten lukemiseen (s. 30-31).

EQAS-kierroksiin tuli vuonna 2015 mukaan ESBL/AmpC-bakteerien eristys matriisista (naudanliha ja sian umpisuolen sisältö). Umpisuolinäytteet osoittautuivat haastavammaksi matriisiksi, myös järjestäjille, sillä kaikki ympätyt kannat eivät säilyneet näytteissä. Lisäksi yksi luonnollisesti kontaminoitunut näyte aiheutti hyvin paljon virhenegatiivia tuloksia. Kuitenkin ensimmäiseksi kierrokseksi tulokset olivat kutakuinkin hyviä: negatiivista näytteistä 97,7 % oli oikein, positiivisista näytteistä tyypillistä kasvua (joka varmistettiin *E. coli* -bakteeriksi) maljalla oli 82,1 % tapauksista (yhteensä kaikki näytteet huomioiden maljatuloksista oikein oli 87,9 %). Suurin osa poikkeamista osui luonnollisesti kontaminoituneen näytteen (M-1.8) kohdalle (myös AMBI). Kierroksella ei kuitenkaan arvioitu eristettyjen *E. coli* -kantojen herkkyystuloksia, joten em. prosentit eivät täysin vastaa onnistumista ESBL/AmpC-bakteerien eristämisessä ja tunnistamisessa (jotkin labrat olivat eristäneet *E. colin*, mutta herkkyystulokset olivat hyvin poikkeavat odotetusta). Herkkyystuloksissa huomattiin ongelmia eniten ertapeneemin kanssa. Tosin ertapeneemi on hyvin herkkä antamaan ”vääriä positiivisia”. Toisaalta, ko. antibiootin tarkoitus onkin enemmän olla seulonta-antibiootti kuin osoittaa kannan karbapenemaasituottoa.

Javier Tellechea-Vertiz kertoi FVO-auditoinneista. Tärkeitä auditoinnissa seurattavia kohteita ovat:

- teurastamonäytteenotto: stratifikaatio, satunnaistaminen, näytteenoton ohjeistus, teuraserät ja niiden valikoituminen
- näytteitä tutkivat laboratoriot, menetelmien akkreditointi
- isolaattien valinta salmonellavalvontaohjelmasta ja Reg. 2073/2005:n mukaisen näytteenoton kantojen sisällyttäminen resistenssiseurantaan
- elintarvikenäytteenotto: stratifikaatio, näytteenottoon valikoidut kauppaketjut
- laboratorion menestyminen vertailututkimuksissa
- käytetyt menetelmät ja miten mahdollisesti poikkeavat standardeista tai EURL:n ohjeesta, muutosten validointi
- laadunvarmistusmenettelyt, mm. pipetit, laitteet, käytetyt agarit jne.
- raportointi: kantojen varmistus, isolation date, kuka raportoi ja kenelle, raportoijan uskottavuus ml. tekstiosioiden raportointi, tulosten välittäminen myös teurastamoille
- miten maa käyttää saatua tietoa hyväkseen

Havaittuja ongelmia:

- satunnaistaminen, 48 h sääntö tutkimuksen aloittamisesta, 2073/2005-näytteet, menetelmään tehtyjen muutosten validointi

Annette Nygaard (Tanskan NRL) kertoi kokemuksista FVO-auditoinnista. Seuraavia asioita Tanska joutui parantamaan:

- laadunvarmistus
- ohjeista poikkeaminen (esim. ennen herkkyystestausta kannat olivat kasvaneet >24 h → validointi puutteellinen)
- teknisten ja tutkijoiden koulutussuunnitelma
- vertailututkimusten poikkeamien käsittely
- resistenssitulosten analyysit, trendit, lähdeanalyysi

Vasiliki Christodoulou (Kyproksen NRL) kertoi EURL:n tekemästä maavierailusta.

Parannusehdotukset, joita EURL teki, liittyivät mm. laitteiden ja pipettien toimivuuden varmistamiseen ja laadunhallintaan, yleiseen laboratorion laadunvarmistukseen standardien mukaisesti, toimivien laboratoriotilojen käytännön asioihin (siivous, henkilökulku jne) sekä tulosten tulkintaan.

BREAK-OUT GROUPS: Ensimmäisen päivän päätteeksi keskusteltiin resistenssiseurannan kokemuksista ja toimintatavoista, pohjana oli EURL:n laatima kysymyslomake:

1. FBO-näytteet salmonelloilla: yksityisten labrojen eristämät salmonellat on monissa maissa vaikea saada mukaan, ilmeistä ratkaisua ei ole
2. 48 h aikarajoitus näytteen tutkimisen aloittamisessa: ei toteudu kaikilla jäsenmailla, osa työskentelee myös lauantaisin. Viikon viimeisinä päivinä (to-pe) ei usein oteta näytteitä (joissain maissa salmonellapositiiviset erät teurastetaan viikon lopulla), vaikutusta herkkyystuloksiin ei pidetty kovin merkittävänä, mutta toki sillä saattaa joissain maissa olla merkitystä.
3. Herkkyystestaus yli 24 h viljelmistä: ilmeisesti ei yleisesti tehdä vanhemmista, Tanska oli validoinut ja käytti jopa 3 vrkn:n ikäisiä viljelmiä, mutta FVO:n mielestä validointi ei ollut riittävä.
4. Enterokokkien ja kamylobakteerien tunnistusmenetelmien harmonisointi: ei katsottu tarpeelliseksi.
5. MacConkey+CTX-maljojen validointi: EURL:n: ohjeen mukaisesti malja tulisi validoida ennen jokaisen erän käyttöönottoa. Ilmeisesti suurin osa labroista käyttää maljoja viikon ja testaa erän vain kertaalleen, epäselväksi jäi tehtiinkö testaus yleensä ennen näytteiden tutkimista vai ei.
- 6-7. AMR in public health sector, yhteistyö: hyvin harvalla maalla yhteisraportteja humanipuolen kanssa. Yhteistyötä muulla tavoin enemmän.
8. Genotyyppinen varmistus: moni maa varmistaa erityisesti salmonella- ja *E. coli* -kantoja myös genotyyppisesti mielenkiintoisten resistenssigeenien varalta. Yhteistyötä humanipuolen välillä.
9. Miten uusi res-seuranta on muuttanut toimintatapoja: taustadataa joudutaan keräämään paikallislaboroista, ohjeistusta on tehty paikallistasolla, menetelmiin on tullut muutoksia, kansallisena vertailulabrana toimiminen vahvistunut, tiedonkeruutapoja on jouduttu kehittämään
10. Mitkä asiat toisivat lisäarvoa res-seurannalle: tuontielintarv., muut eläinlajit (kuten kalat), tilatason näytteenotto, lemmikit

Rene Hendriksen (EURL-AR) kertoi EFSA:n referenssitestauksesta (reference testing) eli varmistustesteistä, joita tehtiin erikoisten fenotyyppien varmistamiseksi. EFSA valitsee kannat. Varmistusta halutaan tehdä, jotta EUSR:ssa julkaistavat tulokset olisivat mahdollisimman luotettavia. Aina tehdään kantojen luovutus sopimus jäsenmaan ja EURL:n välillä. Kantoja valitaan sekä fenotyyppistä että genotyyppistä varmistusta varten, WGS:iin valitaan lopulta noin 100 kantaa. Kantojen varmistustulokset luovutetaan myös EFSA:lle ja EC:lle. EURL ei julkaise tuloksia. Vuoden 2014 kannoista saatua genomidataa toivotaan voivan hyödyntää mm. ENGAGE-projektissa.

Beatriz Guerra (EFSA) kertoi ESBL/AmpC- ja karbapenemaasia tuottavien bakteerien fenotyyppien määrittämisen kriteereistä, joita EUSR:ssa käytetään. Raportoinnissa ja kantojen jatkotutkimuksiin valitsemisessa tulee käyttää ECOFFeja. Esim. *E. coli* ECOFFit ovat kefotaksiimille $>0,25$ ja keftatsiimille $>0,5$ (meropeneemi $>0,12$). EUSR:ssa kantojen luokitteluun käytetään kuitenkin EUCASTin seulontarajoja (*E. coli* kefotaksiimi ja keftatsidiimi >1 , meropeneemi $>0,12$). Esimerkiksi, jos *E. coli* -kannan MIC-arvo kefotaksiimille on 0,5 (sekä herkkä myös kefoksitiinille ja karbapeneemeille), kanta tulkitaan muuksi fenotyyppiä. Kefepiimiä ei enää käytetä tulosten tulkinnaissa lainkaan.

Lina Cavaco (EURL-AR) kertoi projektista, jossa selvitettiin temosilliinin raja-arvoa. Mukana oli myös kaksi muuta laboratoriota. Temosilliinia käytetään joissain maissa ihmisten lääkinnässä. OXA-48-kannat ovat tyypillisesti tälle antibiootille R. Tällä hetkellä raportoinnissa käytetään arvoa >32 . Projektissa testattiin 112 *E. coli* - ja 104 salmonellakantaa. *E. coli* ATCC 25922:n MIC-arvot osuivat välille 8...32. Yleisesti ottaen ESBL/AmpC-kannoilla MIC-arvot olivat korkeintaan 32 ja OXA-ryhmän kannoilla >32 . Muilla kuin OXA-ryhmän CPE-kannoilla arvoja vaihtelivat suuresti. Tulokset tullaan luovuttamaan EUCAST:n käyttöön.

Lina Cavaco ja Michel Rapallini (Alankomaat) kertoivat tigesykliiniherkkyyden testaamisen haasteista. Tigesykliinin on huomattu EQAS-vertailumittauskierroksilla antavan joskus liian korkeita MIC-arvoja, erityisesti enterokokeilla. Poikkeamien syitä selvitettiin aluksi herkkyyspaneeli- ja liemierätietoja vertailemalla (EURL, jotkin NRL:t). Näistä ei löytynyt selitystä, joten muita mahdollisia selityksiä ovat: paneelien altistuminen valolle ja ilmalle (oksidatio), liian pitkä inkubaatioaika, "liian vanhat" liemet (tigesykliini herkkä, jos liemierä ei ole tarpeeksi tuoretta) ja pipetointivirheet. Michel esitti havaintojaan omasta labrasta, jossa hän havainnollisti minkälaisessa työskentelytilassa (erittäin valoisa huone, jossa suuret ikkunat) ja miten kauan avatut paneelipaketit seisovat pöydällä; heidän tulokset paranivat, kun nämä asiat otettiin huomioon.

Sophie Granier (Ranskan NRL) kertoi kolistiiniresistenssistä. Kolistiinia on käytetty ihmisten lääkinnässä toistaiseksi suhteellisen vähän sen toksisuuden takia. Kuitenkin WHO luokitteli sen 2012 yhdeksi kriittisen tärkeäksi antibiootiksi ihmisten lääkinnässä. Ensimmäiset raportit hankitusta resistenssistä tehtiin vuonna 2010; tunnetut mekanismit olivat viime vuoden lopulle asti kromosomaalisissa geeneissä. Kolistiinia on käytetty Ranskassa runsaasti eläinten lääkinnässä ja viime vuoden loppupuolella, hieman ennen plasmidivälitteisestä *mcr-1*-geenistä tullutta kiinalaisten julkaisua, kolistiinin käytöstä käytiin keskustelua, mutta sen käyttöön ei tehty rajoituksia Ranskassa. ANSES oli jo aiemmin tehnyt WGS:a omille kannoilleen, joiden kolistiini-MIC-arvot olivat selvästi kohonneet, ja todettiin, että resistenssimekanismit eivät ole kromosomaalisissa geeneissä. Kiinalaisten julkaisun jälkeen nämä kannat tutkittiin uudelleen ja osalla niistä todettiin *mcr-1*, tosin erilaisissa plasmideissa kuin Kiinan löydökset. Tämä viittaa, että resistenssigeeni on levittäytynyt jo laajasti ja esiintyy erilaisissa liikkuvissa elementeissä eri maissa. Sitten plasmidivälitteisestä kolistiiniresistenssigeenistä on tullut julkaisuja jo useita kymmeniä ja

ensimmäinen [yhteenvedo](#) 3 kk kiinalaisten jutun jälkeen kokosi siihen mennessä tehdyt löydökset. EUCAST on julkaissut suositukset 22.3.2016 [kolistiinin MIC-testauksesta](#).

Daniela Ceccarelli (Alankomeiden NRL) kertoi *Shewanella* OXA-48 -löydöksistä. Alankomaat on tehnyt karbapenemaasia tuottavien kantojen seulontaa vuodesta 2013 erilaisissa projekteissa, mm. kaloista, tuotantoeläimistä ja vesistä. Seulonta perustuu RT-PCR-menetelmään. Useita kymmeniä näytteitä on ollut bla_{OXA-48}-positiivisia, eniten vesinäytteet. Sekvensointi on osoittanut, että positiivisissa näytteissä on esiintynyt useita OXA-48-alityyppejä, eniten OXA-48b. PCR-positiivisista näytteistä on yritetty eristää kantoja CARBA- ja OXA-maljojen avulla, vaikka maljat eivät ole optimoitu vesinäytteiden tutkimiseen. Noin 20 näytteestä eristettiin *Shewanella* spp. (tunnistus Maldi-Tofilla). OXA-48-tyypin geenit eivät sijaitse plasmideissa vaan kromosomissa. Näiden kantojen MIC-arvot karbapeneemeille olivat vain osittain R. *Shewanella* on osoittautunut olevan ympäristöperäinen OXA-48-geenin reservuaari, mutta niitä ei pidetä riskinä ihmisten terveydelle.

Antonio Battisti (Italian NRL) kertoi moniresistenteistä (MDR) *Salmonella* Infantis ESBL -kannoista Italiassa. *S. Infantis* -serotyypin yleisyys ihmisillä Euroopassa on ollut noin 2,5 %, samoin Italiassa. Se on myös yleisin serotyyppi Euroopassa kanoilla broilerinlihassa ja kalkkunoissa. Italiassa *S. Infantis* on äärimmäisen resistenssi ihmisillä tällä hetkellä. Resistenssi broilereilla on Italiassa noussut vuosina 2009-2014. Esimerkiksi vuonna 2014 kefotaksiimiresistenssi tällä serotyypillä oli ihmisistä eristetyillä kannoilla 65 % ja broilereista eristetyillä 55 %. Eri lähteistä peräisin olevia kantoja vertailtiin PFGE:lla: kannat kuuluivat kahteen pääryhmään, I-ryhmään kuului 70 kaikista kannoista ja ne olivat pääasiassa MDR, II-ryhmään kuului loput noin 30 % kannoista. Kefotaksiimiresistenssi johtui yhtä kantaa lukuunottamatta CTX-M-1-ryhmän geeneistä, kannat resistenttejä myös vähintään tetrasykliinille, sulfalle, trimetopriimille, nalidiksiinihapolle ja siprofloksasiinille. Kaikilla MDR-kannoilla on IncP-megaplasmidi, kooltaan 280-320 kB. Kyseinen kloni on yleistynyt koko ketjussa ja syrjäyttänyt aiemmat kloonit. Kloonilla on useiden resistenssitekijöiden lisäksi virulenssitekijöitä ja parantunut fitness. *S. Infantis* -serotyyppi on yksi merkittävä uhka Euroopassa, etenkin kun kannat ovat resistenttejä myös fluorokinoleille.

Ea Zankarin (EURL-AR) esitystä ei workshopissa kuultu, mm. aikataulullisista syistä, mutta materiaali jaettiin ja se tulee myöhemmin myös EURL:n nettisivuille.

Päivän ja kokouksen päätteeksi Rene Hendriksen kertoi kokogenomisekvensointiin liittyvistä hankkeista ja siitä miten resistenssiseurannasta saatuja kantoja ja niiden kokogenomidataa voitaisiin jatkossa hyödyntää. ENGAGE on yksi projekteista, joka jakaa yhteisen työtilan COMPARE-projektin kanssa. Näiden tarkoitus on mm. jakaa maiden sekvenssidataa muiden maiden kanssa ja vertailla kantoja eri lähteistä. Jos ei jo ole mukana projektissa, niihin voisi liittyä ns. ulkopuoliena käyttäjänä saaden oikeuden mm. yhteisiin tietokantoihin ja mahdollisuuden osallistua yhteisiin koulutuksiin (omalla rahoituksella). Vaikka kokogenomidatat ovatkin tässä yhteisesti käytössä, niiden hyödyntäminen julkaisuissa vaatii kuitenkin aina kaikkien osapuolten kirjallisen hyväksynnän.

Luentomateriaalit on lähiaikoina saatavilla EURL-AR:n nettisivuilta:
<http://www.crl-ar.eu/146-presentations.htm>