

EURL-AR WORKHOP 2013

Aika: 4.-5.4.13, Lyngby, Tanska
Järjestäjä: DTU food (EURL-AR)

EU:n antibiootiresistenssireferenssilaboratorion järjestämään vuosittaiseen kokoukseen osallistui asiantuntijoita 31 maasta. Workshopin toinen päivä oli yhteinen FWD (Food and Waterborne Diseases) -networkin kanssa ja osallistujina oli useita humaanipuolen laboratorioden ja ECDC:n edustajia. Suomesta mukana oli Antti Hakanen.

Rene Hendriksen ja **Frank Aarestrup** kertoivat aloituspuheenvuoroissaan mm. EURL:n viimeisimmät kuulumiset ja muutamia kommentteja edellisen workshopin tiimoilta nousseisiin ehdotuksiin. Näihin ehdotuksiin kuuluivat mm. seuraeläinten eläinpatogeenien resistenssimäärityksiin liittyvät hankaluudet (mm. raja-arvojen puute). EURL kuitenkin totesi, että eläinpatogeenihin keskittyminen ei ole EU-rahoituksella mahdollista ja kannustivat enemmän jäsenmaiden välisiin projekteihin. EURL toivoi myös enemmän yhteydenottoja koskien mm. epätavallisia laboratoriolöydöksiä. Eläin- ja ihmispuolen yhteistyön tärkeys nostettiin esille.

Pierre-Alexandre Beloeil EFSAsta esitteli vuoden 2011 EU Summary Reportin tuloksia ja uusia analysointimenetelmiä. Esiin nostettiin Salmonella-kantojen siprofloksasiini- ja kefotaksiimiresistenssi sekä huoli joissakin maissa esiintyvistä moniresistenteistä kannoista. Siprofloksasiiniresistenssi vaihtelee suuresti maiden välillä, mutta on joissakin maissa erittäin yleistä. Kefotaksiimiresistenssi on yleisesti onneksi vielä matalalla tasolla. Kampylobakteereilla siprofloksasiiniresistenssi yleisesti todella korkea, mutta jälleen jäsenmaiden välillä on suuria eroja. Lisäksi vertailtiin salmonellan ja indikaattori-*E. coli* -bakteerien kefotaksiimiresistenssiä: resistenssi yleensä vähäistä, siipikarjalla yleisintä.

Beloeil esitteli myös lyhyesti, mitä julkaisuja EFSA:lta on viime vuonna tullut koskien resistenssiasioita, ja kertoi yhteistyöstä humaanipuolen kanssa. Tavoitteena on EFSA:n, ECDC:n ja EMA:n tietojen yhdistäminen kattavammin ja datan vertailukelpoisuuden parantaminen. Tätä varten perustettu yhteistyöryhmä, jonka työ on alkuvaiheessa.

Viime vuoden **EQAS-tuloksia** esittelivät poikkeuksellisesti eri maista kootut vapaaehtoiset. MRSA-seulontanäytteisiin oli vuonna 2012 lisätty uudentyyppinen MRSA-kanta (*mecC*-positiivinen). MRSA-ympyrien määrää oli myös lisätty edellisvuoteen verrattuna ja kierros menikin nyt paremmin. Enterokokkien, stafylokokkien, *E. coli* -bakteerien, salmonellojen ja kampylobakteerien vertailukierrokset menivät yleisesti hyvin. Salmonellakantojen joukossa oli tällä kertaa kaksi kantaa, joilla oli epätyypillinen fenotyyppi ja ESBL/AmpC-kantojen tunnistamisessa olikin jälleen osalla laboratorioista vaikeuksia: Salmonella S-7.1 oli herkkyysmäärityksessä kefoksitiiniresistentti (eli viittaa AmpC-kantaan), mutta kyseisellä kannalla ei kuitenkaan ollut plasmidivälitteisiä geenejä; Salmonella S-7.6 oli puolestaan bla_{ACC-1}-positiivinen (pAmpC), mikä ei välttämättä tule fenotyyppisesti esille kaksoiskiekkotestillä (klavulaanihappoinhibiitorilla) vaan ainoa indikaattori on kefoksitiiniresistenssi.

EQAS-kierrokseen tulee vuonna 2013 seuraavia muutoksia. MRS-kantojen karakterisointi kesäkuun kierrokseen (ei MRSA-seulontaa). Enterokokkien ja mahdollisesti myös kampyloiden lajitunnistus. Keskusteltiin myös ESBL-kantojen genotyyppityksen muuttamista pakolliseksi. Lisäksi toivottiin laboratoriokohtaista pidemmän aikavälin seurantaa (esim. 3 v), etenkin niiden laboratorioden osalta, joilla ollut poikkeamia >5 %. Keskusteltiin poikkeamien tavoitetason alentamista 4 %:iin.

Pierre-Alexandre Beloeil EFSAsta esitteli seuraavaksi komissiolta tulleen uuden harmonisoidun resistenssiseurannan luonnoksen ja etenkin sen MRSA-seurantaa koskevat osiot. Yleisesti ottaen tulevan lain tarkoitus on harmonoida testattavat antibiootit ja niiden testattavat pitoisuusalueet sekä yhtenäisten ja mahdollisimman ajantasaisen raja-arvojen käyttö. Erityisesti MRSA-seurannan tavoitteena olisi määrittää MRSA-prevalenssi ja diversiteetti eri tuotantoeläimillä kaikissa jäsenmaissa. Eläinlajit kiertäisivät vuorovuosin ja MRSA-kantoja tulisi kerätä 170/eläinlaji. MRSA-seulontamenetelmän ja genotyyppitysten tulee olla EURL-AR:n suosittemat. MRSA-seuranta on luonnoksessa osin ehdotettu toteutettavaksi teurastamonäytteistä, mitä jotkut vastustivat, sillä se ei anna oikeaa kuvaa maan MRSA-prevalenssista. Beloeil kuitenkin puolusti teurastamonäytteenottoa toteutettavaksi etenkin niissä maissa, missä MRSA-seurantaa ei ole vielä laajalti tehty, sillä se antaisi parhaimman kuvan maassa esiintyvistä MRSA-tyypeistä. Keskustelua herätti myös pienten jäsenmaiden mahdollisuudet toteuttaa näin laaja seuranta. Lisäksi kysyttiin olisiko karbapenemaasituottajia tarpeen seuloa erityisellä maljalla.

Yvonne Agero esitteli Tanskan viime vuosina tehdyt muutokset maan resistenssin seurantaohjelmaan. Näihin kuului ESBL- ja MRSA-seulonnat, geneettiset analysoinnit, enterokokkien herkkyysseurannan rajoittaminen vain elintarvikkeisiin sekä *E. faecalis* -kantojen eristämiseen broilereista ja sioista sekä *C. coli* -kantojen seurannan vähentäminen sioista ja sianlihasta. ESBL-seulonnassa esirikastus on katsottu paremmaksi kuin suora viljely. MRSA-seulonnan tuloksista huomattiin MRSA:n esiintyvyyden nousu tanskalaisessa lihassa. MRSA-seulontaa laajennetaan Tanskassa lähitulevaisuudessa mm. raakamaitoon.

Tämän jälkeen eri maiden asiantuntijat esittelivät lakiluonnoksessa olevat herkkyyspaneelit (enterokokit, stafylokokit, gram-negatiiviset, ESBL). Keskustelua herätti etenkin luonnoksessa pakolliseksi esitetty 2. ESBL-paneeli, joka ei sovi tavalliseen 96-kuoppalevyyn sellaisenaan. Lisäksi stafylokokkipaneelissa on tällä hetkellä tyhjiä kuoppia 96-kuoppalevyä ajatellen, kysyttiin millä perusteella antibiootit valitaan näihin jäljellä oleviin kuoppiin. Myös gram-neg-paneelia oli muutettu EFSA:n työryhmän suosittelemasta. Komission luonnoksesta on tulossa uusi versio ehkä jo kevään aikana ja Beloeil toivoi labrapuolelta kommentteja.

Päivän loppuksi kuulumme Unkarin, Slovenian ja Norjan maakohtaiset esitykset. **Szilárd Jánosi** kertoi Unkarin NRL:n kokemuksia nestelaimennusmenetelmään siirtymisestä kampakylobakterien osalta. Ongelmia olivat erityisesti aiheuttaneet väärin inkubointiaikojen/lämpötilojen käyttäminen ja kasvatusalustojen erilaisuus.

Irina Zdovc kertoi Slovenian NRL-työstä. Hän kertoi mielenkiintoisesta MRSA-tutkimuksesta, joka oli tehty kahdella sikatilalla. Toisella tilalla, joka oli suostunut ihmisten näytteenottoon, myös työntekijöillä todettiin MRSA. Molemmilla sikatiloilla näytteitä ottaneilla eläinlääkäreillä todettiin myös MRSA. MRSA-kantajuus näytteenottajilla oli kuitenkin vain väliaikaista. Näytteenottajat eivät käyttäneet suusuojaimia.

Marianne Sunde kertoi Norjan NRL:n tehtävistä. Norjassa on todettu yhden kerran (v 2011) MRSA CC398 (t034) sioissa. Kyse oli teurastamolla otetuista näytteistä, mutta kyseisen tilan näytteistä ei ole myöhemmin todettu MRSA:ta. Kattavat teurastamon sisältä otetut näytteet osoittivat, että MRSA on kontaminoinut teurastamon tehokkaasti eikä edes suuret puhdistustoimenpiteet ole auttaneet. Broilereissa ESBL-kantoja todettiin ensimmäisen kerran 2006. Vuoden 2011 ESBL-seulonnassa 42 % broilereista todettiin positiivisiksi (pAmpC, CMY-2). Koirien MRSP-tapaukset ovat Norjassa olleet enimmäkseen tyyppiä ST106, eli eri tyyppiä kuin yleisimpänä moniresistenttinä MRSP-tyyppinä tunnettu ST71. Ensimmäinen MRSP-löydös on vuodelta 2008. Kalapatogeenien resistenssistä ei Norjalla tällä hetkellä ole juurikaan tietoa, sillä yleisimmät kaloilla esiintyvät taudit ovat virusperäisiä.

Workshopin toinen päivä oli yhteinen FWD-networkin kanssa.

Therese Westrell, ECDC, kertoi ECDC:n ja FWD:n työstä saada harmonoitu resistenssiseuranta humaanipuolelle. Ensi vaiheessa seuranta koskee salmonelloja ja kampakylobakteereita. Tarkoituksena on saada mahdollisimman vertailukelpoista dataa eläinpuolen kanssa. Harmonoitu seuranta tulee sisältämään testattavat antibiootit, käytettävät menetelmät, ESBL-ohjeistuksen, geno-/fenotyyppitysten käytön, tulkinnot (rajat) ja raportointimuodon. Salmonella- ja kampakylobakteeripaneeleista on jo ensimmäiset versiot. Menetelminä tulee olemaan nestelaimennus ja kiekkoherkkyys (EUCAST). ESBL/AmpC/CPE-kantojen osalta seulonnan varmistukset tullevat perustumaan fenotyyppisiin testauksiin, mutta testattavat antibiootit ovat kutakuinkin samat kuin eläinpuolella.

P-A Beloieil:n katsauksessa mm. verrattiin eläin- ja humaanipuolen paneeleita ja antibioottivalinnoista käytiinkin keskustelua. Pääasiassa humaanipuolen paneeleissa antibioottivalikoima oli suppeampi, mutta muutamia mielenkiintoisia yksityiskohtia oli. Esimerkiksi kolistiinin testausta ei ollut humaanipuolen ensimmäisessä versiossa lainkaan mukana, mutta esimerkiksi **Robert Skov** (EUCAST) piti tärkeänä, että se on mukana eläinpuolen paneelissa. Kolistiini on myös käytössä eläinpuolen lääkinnässä, joten sen pitäminen mukana on perusteltua. Streptomysiinin testauksesta gram-negatiivisten osalta oltiin myös aavistuksen eri mieltä lähinnä sen luotettavuuden puutteen takia. Eläinpuolella sitä kuitenkin pidettiin tärkeänä moniresistenssimarkkerina.

Paneelikeskustelussa tämän jälkeen oli mahdollista esittää eläin- ja humaanipuolen edustajille kysymyksiä resistenssin seurantaohjelmiin liittyen. Paneelissa olivat **P-A Beloieil** EFSA, **Dominique Monnet** ECDC, **Therese Westrell** ECDC, **Robert Skov** EUCAST ja **Frank Aarestrup** EURL-AR. Keskustelun pääkohdat: (i) kiekkoherkkyys- ja nestelaimennusmenetelmillä saatuja tuloksia ei pitäisi olla mahdotonta vertailla keskenään, kun laboratorioiden systeemit toimivat ja käytetään yhteisesti hyväksytyjä raja-arvoja, (ii) yhteisiä vertailututkimuksia tulee järjestää, (iii) eläinpuolella herkkyystestaukseen tulevien isolaattien määrä on suositeltu olevan 170, onko pienten ja isojen maiden 170 kannan tulokset vertailukelpoisia? humaanipuolella koko datan käyttö järkevämpää, (iv) komissio tulee noin 3-4 vuoden välein tarkistamaan eläinpuolen lain liitteet koskien mm. raja-arvoja.

Simon Le Hello Pasteur-instituutista ja **Dariusz Wasyl** Puolasta kertoivat moniresistenttien *Salmonella* Kentucky ST198 -kantojen esiintymisestä ihmisillä ja eläimillä. 2000-luvulla *Salmonella* Kentucky yleistynyt Ranskassa rajusti, kannat usein moniresistenttejä ja yhä useammin löytyy siprofloksasiinille ja/tai kefalosporiineille resistenttejä kantoja, myös karbapeneemeille resistenttejä kantoja todettu. Kantojen alkuperä on Afrikka tai Aasia (erilaisia pulssilla). Eläimillä *Salmonella* Kentucky -kantoja on todettu enimmäkseen kalkkunoilla ja broilereilla. Osa kannoista on moniresistenttejä. Matelijoiden kannat ovat erilaisia, pääasiassa herkkiä. **Dominique Monnet** ECDC:stä oli huolestunut etenkin, kun humaanipuolella on jo todettu erittäin resistenttejä, "extensively drug resistant", *Salmonella* Kentucky -kantoja ja toivoi riskianalyysiä.

Beatriz Guerra kertoi eläimillä todetuista karbapenemaasia tuottavista löydöksistä Saksassa. Tähän mennessä maassa on todettu 3 *Salmonella*- ja 2 *E. coli*-kantaa, kaikki VIM-1. Kannat ovat peräisin kolmelta tilalta (1 siipikarjatilalla, 2 sikatilaa). Muita eläimillä todettuja karbapenemaasituottajia on todettu tähän mennessä Ranskassa naudalla ja Belgiassa hevosella (molemmat *Acinetobacter*, OXA-23) sekä Saksassa kotkalla (*Salmonella*, NDM-1).

P-A Beloieil ja **R Skov** kertoivat ESBL/AmpC/CPE-seulonnan ohjeistuksesta eläin- ja humaanipuolella. Suurimmat erot olivat mahdollisten seulontakantojen varmistusmenetelmissä: humaanipuolella ohjeistus nojaa pitkälti fenotyyppisiin testauksiin. Humaanipuolen ohjeistus EUCAST:n laatima.

Kees Veldman ja **R Skov** vertailivat omissa esityksissään kiekkoherkkyysmenetelmän hyviä ja huonoja puolia. Kiekkoherkkyuden suurin ongelma on, ettei se sovi kaikille antibiootti-

bakteeriyhdistelmille, nestelaimennusmenetelmällä huonoa mm. testausalueen rajallisuus.
Kiekkoherkkyysmenetelmän toistettavuudesta ja siten luotettavuudesta esitelmöijät olivat eri mieltä.

Susanne Karlsmose esitteli NRL-AR- ja ECDC-FWD-networkien tulokset yhteisestä vertailututkimuskierroksesta, joka järjestettiin nyt toisen kerran. Ongelmat olivat pääasiassa samoja kuin edellisellä kerralla, humaanipuolen (kiekkoherkkyys)tulokset perustuvat laboratorioden omiin tulkintoihin kliinisten raja-arvojen perusteella ja siten esimerkiksi siprofloksasiini tulkitaan usein väärin. Ongelmia aiheuttivat myös sulfa, kefotaksiimi ja keftatsidiimi.

Luentomateriaalit on lähiaikoina saatavilla EURL-AR:n nettisivuilta:

<http://www.crl-ar.eu/146-presentations.htm>