

## **8th EURL-AR Workshop 2014**

Aika: 7.-8.4.2014, Lyngby, Tanska  
Järjestäjä: DTU Food (EURL-AR)

EU:n mikrobilääkeresistenssireferenssilaboratorion workshop järjestettiin kahdeksannen kerran. Workshop oli tarkoitettu EU-alueen kansallisten laboratorioden asiantuntijoille, mutta mukana oli myös edustajat mm. Norjasta, Islannista, Sveitsistä ja Balkanin niemimaan maista.

Tervetulo puheenvuoron piti **Henrik Wegener (DTU, Tanska)**, minkä jälkeen **Rene Hendriksen (EURL-AR)** kertoi referenssilaboratorion kuulumisia viimeisimmän vuoden ajalta. EU-laajuinen uusi harmonoitu resistenssiseuranta käynnistyi vuoden 2014 alusta. Lainsäädännöstä tuli heidän mielestään hyvä ja mm. testattavien mikrobilääkkeiden valikoimaan on oltu tyytyväisiä. EURL on ollut yhteydessä yhteensä neljään yritykseen, joilla olisi valmiuksia tehdä herkkyyspaneelita, mutta tällä hetkellä TREK Diagnostics on valitettavasti ainoa herkkyyspaneelien valmistaja. SVA:lla on ollut ongelmia uusien antibioottien säilyvyydessä ja on epävarmaa, tulevatko he panostamaan uusiin monitorointipaneelisiin. Kaksi muuta yritystä eivät olleet vastanneet EURL:n yhteydenottoihin. Lisäksi Rene kertoi, että ResFinderia yritetään kehittää tunnistamaan hankittujen resistenssigeenien lisäksi myös resistenssiin liittyviä pistemutaatioita. Työ on alussa ja tällä hetkellä työn alla on kampylobakteerien kinoloniresistenssiin johtavat mutaatiot. Tutkimuspuolelta Rene nosti esiin kampylobakteerien epätyypilliset kinoloniresistenssin fenotyypit, joiden geneettistä taustaa pyritään selvittämään.

**Rosa Peran (Euroopan komissio)** kertoi omassa puheenvuorossaan komission 5 vuoden toimintasuunnitelmasta (Action plan). Toimintasuunnitelman toteutumisesta on tulossa väliraportti tämän vuoden puolivälissä (Progress report on the implementation of the 5 years action plan). Yksittäisiin toimintoihin eläinpuolella kuuluu mm. antibioottien hallitun käytön lisääminen, uusi eläintautilaki, uusien eläimille tarkoitettujen mikrobilääkkeiden tarpeen arvioiminen, mikrobilääkeresistenssin ja mikrobilääkkeiden kulutuksen seuranta sekä kansainvälinen yhteistyö OIE:n, WHO:n, Kiinan ja USA:n kanssa.

**EFSA:n** kuulumisista kertoi **Pierre-Alexandre Beloeil**. Hän esitteli lyhyesti vuoden 2012 resistenssiseurantaraportin päätuloksia. Lisäksi EFSA valmistelee ohjetta satunnaisnäytteenotosta. Ohjeessa on pyritty yksinkertaiseen sekä helposti toteutettavaan näytteenottostrategiaan ja lisäksi siihen tulee käytännönläheisiä esimerkkejä. ECDC, EFSA ja EMA julkaisevat tänä vuonna yhteisraportin mikrobilääkkeiden kulutuksesta sekä mikrobilääkeresistenssistä ihmisillä ja eläimillä. Yhteisraporttia tullaan myös tulevaisuudessa tekemään, mutta se ei tule korvaamaan kolmen instituution omia raportteja.

EURL-AR:n järjestämien laaduntarkkailukierrosten tulosten esittämiseen oli jälleen pyydetty eri maiden edustajia. Enterokokki-, stafylokokki- ja kampylobakteerikierrokset menivät kaiken kaikkiaan hyvin. Myös MRSA:n varmistaminen ja tyypittäminen eivät tuottaneet suuria ongelmia laboratorioille. Eniten virheitä aiheutti ESBL:n, plasmidivälitteisen AmpC:n ja karbapenemaasituottajien määrittäminen. Lisäksi kierroksilla oli mukana yksi epätyypillisen fenotyypin aiheuttanut Salmonella, jonka useat laboratoriot olivat nimenneet ESBL-tuottajaksi, pääasiassa genotyyppituloksen perusteella. Tässä tapauksessa molemmat vaihtoehdot

hyväksyttiin, mutta keskustelua aiheutti se, pitääkö tällainen kanta ilmoittaa fenotyyppin mukaan. EU-seurannassa tällaisen tuloksen esittäminen tulisi olla kaikkien maiden osalta johdonmukainen. EQAS-kierroksella oli mukana ensimmäistä kertaa myös karbapenemaasia tuottava *Salmonella* (VIM-2), jonka osalta meropeneemiherkkyyden tulkinnassa oli suurta vaihtelua. Sen lisäksi että laboratoriot käyttivät hyvin erilaisia menetelmiä herkkyysmäärittämiseksi (meropeneemi ei vuonna 2013 kuulunut vakiona kaikkiin herkkyyspaneeliin), samaakin menetelmää käyttäneet laboratoriot saattoivat tulkita tuloksia eri tavoin. Keskustelussa pohdittiin tulisiko kyseinen kanta esille EU-seurannassa ja lainsäädännössä määritellyillä paneeleilla? Kahdeksan laboratoriota osallistui vapaaehtoiseen genotyyppauskierrokseen, jossa tarkoituksena oli määrittää 3. polven kefalosporiiniresistenttien salmonellojen geneettiset mekanismit. Nämä tunnistettiin geenitasolla pääasiassa hyvin.

Vuoden 2013 workshopissa ehdotettiin, että EQAS-kierrosten tuloksia analysoidaisiin MIC-arvoihin perustuen (eikä S/R-kategorioihin), sillä nestelaimennusmenetelmän tarkkuus on +/- 1 laimennos ja jos MIC on juuri rajalla, useat laboratoriot saattavat saada väärän tuloksen, vaikka olisivat saaneet MIC-arvon hyväksyttävällä tarkkuudella. **Susanne Karlsmose (EURL)** esitti vuoden 2013 EQAS-tulokset tähän perustuen ja vertaili niitä perinteiseen S/R-kategorioihin luokiteltuihin tuloksiin. Vertailun tuloksena todettiin, että virheet lisääntyivät merkittävästi. Esimerkiksi kampsylobakteerien herkkyystulosten osalta lähes jokainen laboratorio olisi saanut enemmän virheitä kuin sallittu 5 %. Tulosten analysoinnissa ei toisaalta otettu huomioon kaikkien laboratorioden MIC-jakaumaa, eli sitä, että EURL:n odotettu tulos ei välttämättä vastaa kaikkien maiden yhteenlaskettua keskiarvotulosta. Asiaa luvattiin tutkia uudelleen. Lisäksi Susanne esitteli laboratorioden kolmen vuoden menestymistä EQAS-kierroksilla. *Salmonellan* osalta todettiin, että usein ongelmia esiintyy menetelmän käyttöönotossa, mutta tulokset paranevat vuosi vuodelta. Kampsylobakteerien osalta vastaavaa ei todettu ja huomionarvoista olikin, että vuonna 2013 usealla laboratoriollla oli ainakin yksi virhe, vaikka pysyttiin sallitun 5 % -virherajan alapuolella.

Maanantai-iltapäivän paneelikeskustelussa aiheena olivat uuden lainsäädännön tuomat huolet ja kysymykset seurantaan ja tulosten raportoimiseen liittyen. Paneelissa kysymyksiin oli vastaamassa **P-A Beloeil, R. Peran, Henrik Hasman (EURL) ja Yvonne Agerso (EURL)**. Poimintoja keskustelusta:

- (i) Vaikka isolaatteja herkkyystutkimuksiin on saatavilla alle 170, silti vain 1 isolaatti/serovaari yhtä epidemiologista yksikköä kohti.
- (ii) Elintarvikenäytteitä ei saa valikoida alkuperämaan mukaan.
- (iii) Elintarvikenäytteenotossa neljännesvuosittain tasainen näytteenotto, huomioitava alueellinen kattavuus väestömäärän mukaan, vain tuore liha.
- (iv) ESBL-paneelia (EUVSEC2) ei voi korvata muilla menetelmillä (mm. molekyylibiologisilla), EU ei korvaa muiden menetelmien kustannuksia.
- (v) Voidaanko kampsylobakteerien herkkyystestauksessa käyttää sekä hevosen- että lampaanverta? TREK ei ota kantaa, sillä TREK ei takaa paneelien toimivuutta laboratorion itsensä valmistamilla liuoksilla.
- (vi) EQAS-kierrokset tulevaisuudessa uuden lainsäädännön mukaisia, kuitenkin ESBL-seulontakierroksesta ei ole toistaiseksi suunnitelmia.
- (vii) Jos EUCAST:n ECOFF:t muuttuvat, rajoja voidaan muuttaa toimeenpanopäätöksen liitteeseen. Muutosta ei kuitenkaan tehdä vain yksittäisen raja-muutoksen takia eikä useammin kuin kerran vuodessa.

- (viii) Eristettyjä kantoja voidaan lähettää toiseen laboratorioon testattavaksi, kunhan se on uuden lainsäädännön mukaista.
- (ix) Vuoden 2015 rahoituskompensaatiosta tulossa uusi kysely. Koskee lähinnä alkavan ESBL-seulonnan kustannuksia.

Ensimmäisen päivän loppuun kuulumme vielä Irlannin ja Luxemburgin kansallisten referenssilaboratorioiden toiminnasta sekä Espanjan kokemuksista kampylobakteerien herkkyystestauksen standardoinnista.

Toisena päivänä epidemiologi **Hajo Grundmann (Alankomaat)** luennoi karbapenemaasia tuottavista enterobakteereista (CPE) Euroopassa. Karbapeneemiresistenssin leviäminen huolestuttaa sillä karbapeneemit ovat tällä hetkellä tärkeä mikrobilääkeryhmä esimerkiksi ESBL-tartuntojen hoidossa. Hajo esitti Puolassa tapahtuneen KPC-kannan leviämistä kahden vuoden ajanjaksolla. Hän kertoi humaanipuolen EuSCAPE-projektista, jossa tutkitaan karbapeneemiresistenssin esiintyvyyttä ja leviämistä Euroopassa. Suomesta mukana THL. Tutkimuksessa on todettu, että karbapeneemeille resistenttejä kantoja tuodaan jatkuvasti ulkomailta, mutta myös Euroopan sisällä tapahtuu leviämistä maasta toiseen. CPE-esiintyvyyden osalta pahin tilanne on Kreikassa, Italiassa ja Maltassa, seuraavina Irlanti ja Unkari. Islanti on ainut maa, jossa yhtään CPE-bakteeria ei ole todettu. Suomessa tilanne on toistaiseksi vielä hyvä, vain yksittäinen sairaalaepidemia. Keskustelussa ehdotettiin eläinten liikkumiseen perustuvaa mallintamista resistenttien bakteerien leviämisen arvioimiseksi, tavoitteena selvittää mm. riskejä tuotantoeläimillä esiintyvien CPE-bakteerien leviämiseksi. Lisätietoa tuloksista mm. täältä: <http://www.ecdc.europa.eu/en/eaad/Documents/EuSCAPE-summary-CPE-CRA.pdf>

**Henrik Hasman ja Beatrix Guerra-Roman (Saksa)** esittelivät ESBL/pAmpC/CPE-bakteerien seulontamenetelmien kehitys- ja validointityötä, jotta vuoden 2015 alusta saadaan yhteinen menetelmä uuden lainsäädännön vaatimalle elintarvikkeiden seurannalle. Työ on vielä kesken, mutta tällä hetkellä ehdotus protokollaksi ESBL/pAmpC/CPE-bakteerien eristämiseksi on: 25 g lihaa + 225 ml puskuroitu peptonivesi (ilman ab) 37 °C 18-24 h, josta siirrostus kefotaksiimia (1 µg/ml) sisältävälle MacConkey-maljalle 44 °C ja ChromID CARBA SMART -maljalle 37 °C. Epäilyttävistä pesäkkeistä lajinmääritys ja herkkyys EUVSEC- ja EUVSEC2-paneeleilla. CPE-kantojen varmistukseen suositellaan muita joko fenotyyppi- tai genotyyppisiä menetelmiä. Lainsäädännössä on vaatimuksena vain *E. coli* -bakteerien eristys, mutta menetelmä sopii myös muiden enterobakteerien, kuten salmonellojen, eristämiseen. Keskustelussa tuotiin esille NRL-laboratorioiden tarve kontrollikannoille ja eri lihalajien/-matriisien huomioiminen seulontamenetelmän validoinnissa.

**Bruno Gonzalez-Zorn (Espanja)** antoi yleiskatsauksen aminoglykosideihin ja niiden resistenssimekanismeihin. Lisäksi hän kertoi uudemmissa resistenssimekanismeista, 16S rRNA metylaaseista (esim. ArmA, RmtF). Merkittävää tälle resistenssimekanismille on se, että se aiheuttaa korkea-asteisen resistenssin kaikille tärkeille aminoglykosideille (amikasiini, tobramysiini, kanamysiini, gentamysiini, neltimisiini). Kyseisten mekanismien on todettu olevan yleisiä Intiassa. Huomionarvoista on myös se, että nämä eivät aiheuta bakteerin kasvun heikentymistä (fitness cost).

Workshopin loppuun kuulumme vielä PCR:n perusteista **Valeria Bortolaialta (DTU)** ja metagenomiikasta **Frank Aarestrupilta (DTU)**. DTU on mukana WGS:n lisäksi myös

metagenomiikka-projekteissa ja suurena visiona on saada metagenomiikka-datan analysoimiseksi uusia ja parempia sovelluksia. Frank myös toivoi, että tulevaisuudessa genomidataa voitaisiin joustavasti tuottaa ”sekvensointikeskuksissa”. Lopuksi hän kysyi miten kuulijat arvioivat WGS:n sovellusten mahdollisuuksia kuulijoiden omassa työssä. Koko-genomisekvensointia ei pidetty mahdottomana, mutta datan käsittelyä ja oleellisten tulosten selvittämistä pidettiin vielä liian työläänä.

Workshopissa pidetyt esitykset tullaan lisäämään EURL:n internet-sivuille: <http://www.crl-ar.eu/146-presentations.htm>. Syyskuussa 2014 on tarkoitus pitää kolmen päivän koulutus koskien uuden lainsäädännön mukaista, vuonna 2015 alkavaa ESBL/AmpC/CPE-seulontaa.