

EURL-AR Training Course: New legislation on AMR monitoring and preparedness for future genomic techniques**26.-29.11.2013, Lyngby, Tanska**

EU:n antibioottiresistenssivertailulaboratorio järjesti kurssin, jonka aiheina olivat uusi EU-lainsäädäntö koskien tuotantoeläimistä eristettyjen indikaattori- ja zoonosibakteerien resistenssiseurantaa sekä next-generation sequencing (NGS). Kurssi koostui luennoista, käytännön laboratoriotöistä ja sekvenssianalyseista.

Luennot tulevat saataville myös EURL-AR:n internet-sivuille: <http://www.crl-ar.eu/147-events.htm>

Luentojen yhteenvedo tärkeimmistä asioista ja keskusteluissa esiin nousseita asioita:

Susanne Karlsmose (EURL-AR, Tanska) kertoi laadunvarmistukseen (ISO 17025:2005, ISO 15189:2007) ja mikrobilääkeherkkyystestaukseen (ISO 20776-1, CLSI M07-A9, CLSI VET01-A4 ja VET01-S2, M100-S23) liittyvistä kansainvälisistä standardeista (standards) ja ohjeista (guidelines). EUCAST:lla ei ole standardeja, ainoastaan ohjeita, CLSI:llä molempia. Huomattava standardin ja ohjeen ero: standardia noudatettava tai ilmoitettava, jos standardin ohjeista on poikettu. Lisäksi Susanne kertoi laatujärjestelmän, akkreditoinnin ja sertifiointin merkityksestä laboratoriolle.

Lars Bogo Jensen (DTU, Tanska) luennoi enterokokkien lajintunnistuksesta ja epidemiologiasta. Enterokokkeja pidetään hyvinä indikaattoribakteereina, koska ne varastoivat resistenssitekijöitä (geenejä) hyvin. Lars esitti vanhoja tutkimustuloksia mm. eri lähteistä eristettyjen vankomysiinille resistenttien enterokokkikantojen (VRE) vertailusta. Broilereilla todettiin useita VRE-klooneja, mutta sioista eristetyt VRE-isolaatit olivat selvästi enemmän samankaltaisia keskenään. Eläinkannat myös erosivat pääasiassa ihmiskannoista; vain kerran samanlainen PFGE-profiili todettiin sekä ihmis- että eläinkannalla (sika).

Jaap Wagenaar (Alankomaat) piti interaktiivisen luennon kamylobakteereista. Teemana oli kysyä luennon edetessä eri maiden näkökulmia ja selityksiä mm. kamylobakteerien prevalenssiin ja resistenssitilanteeseen, jotka vaihtelevat eri maiden välillä hyvin paljon. Kamylobakteeritapaukset Euroopassa ovat lievässä nousussa. Jaap esitti EU-baseline-tutkimuksen tulokset kamylobakteerien prevalenssista vuodelta 2008, esiin nousi mm. Pohjoismaiden alhaisemmat luvut. Pohjoismaiden sijaintia (mm. kylmyys, kosteus) pidettiin tärkeimpänä syynä eikä esimerkiksi tuotanto-olosuhteet saaneet kovin suurta painoarvoa. Kamylobakteeritartunta on siipikarjalla yleensä elinikäinen. Siprofloksasiiniresistenssi broilereiden indikaattori-*E. coli* -bakteereilla Euroopassa oli vuonna 2011 keskimäärin noin 50 % (vaihtelut maiden välillä 0-90 %), muissa maanosissa resistenssi vielä yleisempää. Eri maiden resistenssilukujen erosta käytiin keskustelua ja suurimmaksi asiaksi nousi eri maiden antibioottien käyttö, muina syinä mm. eri tuotantoeläintilojen sijainti ja etäisyydet toisistaan. Keskusteluissa esiin nousi myös, että (i) hippuraattitestiä tehdään vielä joissain maissa, vaikka Jaap sanoi sen olevan käyttökeltoton, (ii) MLST:n tulisi olla laajemmin käytössä myös epidemiologisissa selvityksissä.

Rosa Peran (EU) kertoi uuden AMR-seurantalain etenemisprosessista. Laki hyväksyttiin syksyllä kaikissa jäsenmaissa ja tarkoitus on mennä lain esittämällä, eri eläinlajeja vuorovuosin seuraavalla systeemillä vuoteen 2020 asti. Lakia ei käyty yksityiskohtaisesti läpi, mutta muutamia yksityiskohtia nostettiin esiin: (i) Salmonella-isolaatit resistenssiseurantaan saadaan kansallisten valvontaohjelmien kautta (kuten tähänkin asti), mutta jäsenmaa voi halutessaan sisällyttää testattaviin isolaatteihin elintarvikealan toimijoiden keräämät isolaatit, kunhan toimijat ovat saaneet isolaatit Reg. 2073/2005 mukaan. Optio on tarkoitettu niille jäsenmaille, joissa Salmonella-prevalenssi tai teuraserien määrä on liian pieni vaaditun (tai tavoitellun) 170 isolaatin/eläinlaji keräämiseksi. EU korvaa osan uuden lain vaatimista näytteenotto-, eristys-,

serotyypin/lajinvarmistus- ja herkkyystestauskustannuksista. Vuonna 2014 EURL-AR järjestää ESBL-kurssin, ennen kuin pakollinen ESBL/AmpC-seuranta alkaa vuonna 2015.

Frank Beloel (EFSA) kertoi näytemäärien optimaalisesta määrittämisestä prevalenssin ja resistenssiosuuksien muutosten havainnoimiseksi. Frank esitti erittäin pikaisesti taulukon, jossa oli suositukset näytteiden otolle teurastamo- ja elintarvikenäytteiden osalta, mutta konkreettiset esimerkit jäivät puuttumaan.

Valentina Rizzi (EFSA) esitteli uutta, vielä julkaisematonta, SSD2-tiedonkeruujärjestelmää. SSD2 on samankaltainen kuin isolated-based AMR-tulosten datankeruu DCF:n kautta. SSD2 poikkeaa ensimmäisestä SSD-versiosta siten, että siihen on mm. sisällytetty resistenssidatan keruuseen tarvittavat dokumentit. Lisäksi SSD2 on FoodEx2-yhteensopiva eikä aggregaattidataa enää hyväksytä. Lopullinen siirtyminen SSD2:een on vielä avoin. Ohjeita löytyy EFSA:n internet-sivuilta.

Erika Matuschek (EUCAST) esitteli mm. EUCAST:n toimintaa, internet-sivuja ja raja-arvojen asettamista. EUCAST:n uutiset ja viimeisimmät päivitykset (lähinnä kliinisiin raja-arvoihin liittyvät dokumentit) voi tilata omaan sähköpostiin EUCAST:n sivuilta (RSS-feedin kautta). EUCAST:lta on vuonna 2014 tulossa suositukset kliinisesti merkittävien resistenssien testaukseen ja skriinaukseen (ml. ESBL/AmpC, karbapenemaasit, MRSA, VRE).

Poimintoja:

- (i) EUCAST aloittanut kiekkoherkkyys (DD) -jakaumien tekemisen omalla aineistolla, testejä tehty aina useamman valmistajan alustoilla
- (ii) Salmonellalle tulossa päivitetty siprofloksasiinin rajat 2014
- (iii) Salmonellalle annettu kefotaksiimin ECOFF <20 mm (>0,5 mg/l), jonka tarkoitus detektoida 3. polven kefalosporiiniresistenssiä
- (iv) toivottiin, että EUCAST julkaisisi ECOFF-arvojen muutoksista, nykyään aina tarkistettava kaikki taulukot antibiootti kerrallaan
- (v) uusi linkki jakaumataulukoihin, ollut voimassa jo jonkin aikaa: <http://mic.eucast.org/Eucast2/> (vanhakin ”toimii” vielä toistaiseksi, mutta taulukot eivät päivitettyjä!)
- (vi) wild type/non-wild type -termeistä keskusteltiin: niistä ei pidetä, voitaisiinko puhua mikrobiologisesta resistenssistä (erona kliiniseen resistenssiin)? Erika ei osannut ottaa tähän kantaa.
- (vii) Vuoden alussa tulee aina uudet päivitettyt kliiniset raja-arvotaulukot. Tämän jälkeen voidaan silti tehdä muutoksia päivitettyihin, joten kannattaa tilata sähköpostiin uutiset, jolloin saa aina viimeisimmän tiedon.
- (viii) Karbapeneemien rajoja ei tulla lähiaikoina EUCAST:ssa muuttamaan, vaikka niissä on puutteita ja tarvetta tiukemmille kriteereille.
- (ix) EUCAST ja CLSI käyttävät eri kontrollikantoja (johtuen mm. kiekkojen erilaisista antibioottimääristä). Muistettava käyttää oikeata kontrollikantaa!

Laurent Poirel (Ranska) kertoi ESBL/AmpC- ja karbapenemaaseja tuottavista bakteereista, niiden epidemiologiasta ja levinneisyydestä sekä diagnostiikasta. Laajakirjoisia betalaktamaaseja tuottavat bakteerit eivät ole vain yhden kloonin leviämisenä tuloksena syntynyt ongelma vaan taustalla on useamman resistenssitekijän siirtyminen ja adaptoituminen toisistaan riippumatta. Sekä ihmisillä että eläimillä voidaan kuitenkin todeta hyvin leviäviä ja/tai hyvin tiettyihin ekologisiin ympäristöihin sopeutuneita resistenssitekijöitä. Ihmisillä yleisimmin esiintyvän ESBL-geenin CTX-M-15 ajatellaan olevan lähtöisin Intiasta. Nykyisin sitä esiintyy paljon Intiassa, Euroopassa ja Afrikassa. CTX-M-14 puolestaan on yleisin Aasiassa ja erityisesti Kiinassa. Humaanipuolella diagnostiikka perustuu vahvasti kiekkoherkkyysmäärittäykseen ja Laurent esitteli joidenkin tiettyjen genotyyppien osalta fenotyyppitestauksen haasteet. Karbapenemaasituottajien nopeaksi detektoimiseksi he ovat kehittäneet Carba NP -testin, joka tulee

kaupalliseksi valmisteeksi luultavasti vuonna 2014. MALDI-TOF:lle on myös kehitelty protokollia, mutta ne eivät ole laajamittaisessa käytössä.

Laboratorio-osuuksissa käytiin läpi enterokokkipesäkkeiden valinta Slanetz-Bartley-maljalta ja kampylobakteerien kasvu mCCD-maljalla sekä näiden bakteerien tunnistus PCR-menetelmällä. Lisäksi tehtiin enterokokkien, salmonellojen ja kampylobakteerien herkkyysmäärittämiä sekä opittiin tunnistamaan tyypillisiä ESBL/AmpC/karbapenemaasi-fenotyyppisiä herkkyystulosten perusteella. Mielenkiintoista oli, että kampylobakteerien testauksessa luotettiin McFarland-mittaukseen ympin tiheyden määrittämisessä.

Kyselin kurssin aikana myös eri maiden kansallisten referenssilaboratorioiden MALDI-TOF-tilannetta ja kokemuksia käytöstä. Osalla laboratorioista on MALDI-TOF ja tarkoituksena on käyttää sitä mm. kampylobakteerien ja enterokokkien tunnistukseen.

Kurssin viimeisenä päivänä tutustuttiin NGS-menetelmään (WGS), sen vaatimuksiin (mm. DNA:n eristys ja laatu) sekä sekvenssitulosten analysointiin. **Henrik Hasman (DTU, Tanska)** esitteli työn eri vaiheet ja kertoi EURL:n kokemuksia Illuminan MiSeq- ja Ion Torrentin PGM-laitteista. Sekvenssianalyysit tehtiin hyödyntäen EURL:n ylläpitämiä tietovarantoja (databaset), jotka ovat kaikkien saatavilla internetissä. Tietovarannot auttavat tulkitsemaan kokogenomisekvenssidataa mm. lajinmäärittämisessä, resistenssi- ja virulenssigeenien määrittämisessä sekä MLST- ja pMLST-analyysissä. Kokogenomidatan assemblyssä DTU käyttää CLCbion Genomic Workbench-moduulia ja Henrikin sanojen mukaan käyttö on helppoa.