

## **EURL-CAMPYLOBACTER 13TH WORKSHOP**

Aika: 9.-10.10.2018, Clarion Hotel Gillet, Uppsala, Ruotsi

Järjestäjä: EURL-CAMPYLOBACTER

Esitykset vapaasti saatavissa: <https://www.sva.se/en/service-and-products/eurl-campylobacter/workshops/workshop-2018>

---

### **1. päivä**

#### **Tervetuloa ja kokouksen ohjelma / Jens Mattson & Hanna Skarin, SVA**

Kokoukseen osallistui 54 henkilöä 27 EU-jäsenmaasta. Osallistujia oli kansallisten vertailulaboratorioiden lisäksi seuraavista elimistä: DG SANTE, ECDC, EFSA, ANSES, EURL-*Campylobacter*.

Hanna Skarin kertoi, että EURL-*Campylobacter* on sitten viime vuoden kokouksen järjestänyt kaksi kurssia MLST:stä, kaksi vertailunäytekierrosta, kyselyn kampylobakteerin tutkimisesta maidossa sekä tehnyt menetelmäkehitystä (esim. *C. upsaliensis* ja *C. helveticus* erottaminen sekä kampylobakteerien selviäminen kanannahassa eri lämpötiloissa) ja ISO/CEN yhteistyötä.

#### **DG SANTE:n kuulumiset / Angela Bolufer de Gea, DG SANTE**

DG SANTE:n edustaja esitteli joulukuussa 2017 julkaistussa [Mitigation measures in place for Campylobacter spp. in poultry](#) -raportissa esiteltyjä havaintoja. Raportin taustatyönä oli vierailtu viidessä EU- ja EFTA-maassa tutustumassa niissä sovelletuihin käytäntöihin kampylobakteerien torjumiseksi siipikarjassa. Raportissa on eritelty havaittuja hyviä ja huonoja käytäntöjä tilatasolla, prosessoinnissa ja vähittäismyynnissä. Raportissa käsiteltiin myös kampylobakteerien seurantaa ja raportointia

EFSA:ta on pyydetty tieteellistä näkemystä alkutuotannon broilerin kampylobakteeritartunnoissa. [EFSA:n 2011 näkemyksen](#) mukaan kampylobakteerien torjuminen alkutuotannossa on kustannustehokkaampaa kuin elintarvikeketjun myöhemmissä vaiheissa. Tarkoitus on päivittää näkemystä etenkin seuraavilta osin: 1) tunnistetaan ja rankataan alkutuotannon torjuntatoimet, 2) arvioidaan niiden hyödyt ja haitat sekä 3) arvioidaan niistä niiden yhdistelmien synergiaedut. DL arvioinnille on tammikuun lopussa 2020.

#### **Kampylobakteeri-infektiot EU:ssa ja AMR / Therese Westrell, ECDC**

ECDC:n edustaja kertoi EU:n kampylobakteeritilanteesta. Vuonna 2016 EU:ssa raportoitiin lähes 250 000 laboratoriovarmistettua kampylobakteeritartuntaa. Kampylobakteriooseissa oli nouseva trendi 2008–2016, minkä jälkeen tilanne on pysynyt tasaisena. EU on julkaissut uuden tautitapausmääritelmän (Komission täytäntöönpanopäätös 2018/945/EU).

ECDC:n edustaja kertoi USAn kampylobakteeriepideemiasta 2016–2018, jossa WGS:a hyödynnettiin. Epidemiaan liittyi 118 kampylobakteeritapausta 18 osavaltiossa. Tartunnanlähde paljastui, kun sama wgMLST-tyyppi todettiin potilaista ja eläinkaupan pennuista.

Kampylobakteereilla esiintyy paljon resistenssiä fluorokinoloneille. Eläinten mikrobilääkekäytön yhteys ihmisiltä ja eläimiltä eristettyjen kampylobakteerien resistenssiin on havaittu fluorokinoloneilla,

tetrasykliineillä ja makrolideilla (toinen JIACRA-raportti). Siipikarjan ohella naudat ja naudanliha vaikuttavat olevan merkittävä ihmisten kampylobakteeritartuntojen lähde, ja niitä tulisi ehkä seurata enemmän.

#### **Kampylobakteerien antibioottiresistenssin testaamisen harmonisointi / Pierre-Alexandre Beloeil, EFSA**

Komissio on pyytänyt EFSAlta apua kampylobakteerien AMR-testauksen harmonisoinnin kehittämiseksi. Tätä varten on perustettu työryhmä, joka on kartoittanut jäsenmaiden välisiä eroja kampylobakteerien eristysmenetelmissä resistenssiseuranta varten kyselytutkimuksella. Vaihtelua todettiin mm. menetelmissä, alustoissa ja isolaattien määrässä, minkä johdosta on tunnistettu tarve harmonisoida eristysmenetelmiä resistenssiseurantaan. Seuraavaksi konsultoidaan jäsenmaita ja aiheesta keskustellaan EFSAn AMR-seurantakokouksessa marraskuussa. Kommentteja antaa myös EURL-AR, EURL-Campylobacter ja ECDC. *C. jejuni* -bakteerin lisäksi myös *C. coli* tulee olemaan mukana, sillä joissain jäsenmaissa sitä esiintyy yleisemmin kuin *C. jejuni* -bakteeria. Lisäksi sillä esiintyy yleisemmin resistenssiä ja moniresistenssiä. Espanjassa on havaittu, että *C. coli* vaikuttaa selviytyvän kuljetuksesta paremmin kuin *C. jejuni*. Tämä saattaa selittää sitä, että joskus paikallislaboratorio lähettää *C. jejuni* -kannan, mutta NRL:ssä se tunnistetaan *C. coli* -bakteeriksi. Tällöin kyseessä lienee ollut sekaviljelmä, josta *C. jejuni* on kuollut kuljetuksen aikana. Kommentoitiin myös, että resistenssitutkimuksiin vaadittujen isolaattien määrä tulisi mitoittaa kunkin maan kampylobakteeriprevalenssiin. Ongelmia muodostuu monissa maissa, jos harmonisoidut olosuhteet (mm. kuljetusolosuhteet ja hyväksytyt viive analyysien aloittamiseen) eroavat paljon kansallisen kampylobakteeriseurannan vastaavista. Monissa maissa resistenssitestaukseen otetaan kannat kampyloseurannasta, ja jos ne täytyisi harmonisoinnista johtuen kerätä erikseen, kustannukset kasvaisivat merkittävästi.

#### **Vuoden 2018 vertailunäytetulokset ja keskustelua vuoden 2019 vertailunäytteistä / Helena Höök & Hanna Skarin / EURL-CAMPYLOBACTER**

Vuoden 2018 vertailunäyttekierroksella 37 laboratoriota osallistui määrittämiseen (PT 21) ja 31 osoittamiseen ja lajitunnistukseen (PT 22).

PT 21 -osio sisälsi pakollisen kampylobakteerien määrityksen sekä vapaaehtoisen osoituksen ja lajitunnistuksen kannanahasta. Suurin osa laboratorioista (31/37) käytti suositeltua menetelmää (ISO 10272:2017).

PT 22 -osio sisälsi 18 pakollista näytettä ja 4 vapaaehtoista broilerin ulostenäytettä, jotka tutkittiin kampylobakteerien osoitusmenetelmällä sekä tunnistusmenetelmällä. Suositeltua menetelmää ISO 10272:2017 käytti 27/31 laboratoriota; menetelmää ei spesifioitu tarkemmin. Toteamisherkkyyks oli korkeampi niillä laboratorioilla, jotka käyttivät sekä rikastusta että suoraviljelyä kuin niillä, jotka käyttivät vain toista.

Suurin osa laboratorioista suoriutui hyvin tai erinomaisesti molemmista PT-kierroksista. Koulutusnäytteiden tuloksia ei sisällytetty arviointiin.

Ensi vuodelle suunnitteilla kolme vertailunäyttekierrosta: PT 23) määritys kananlihasta (sekä vapaaehtoinen osoitus ja tunnistus), PT 24) osoittaminen ja tunnistaminen kenkäsukkanäytteistä ja PT 25) tyyppitys kuvitteellisen raakamaitoepidemian kampylobakteerikannoille (MLST ja/tai WGS), johon osallistuminen on todennäköisesti vapaaehtoista.

#### ***C. upsaliensis* ja *C. helveticus* -bakteerien tunnistaminen / Sevinc Ferrari, EURL-CAMPYLOBACTER**

*C. upsaliensis* ja *C. helveticus* ovat kaksi eri lajia, mutta muistuttavat geneettisesti toisiaan. Molempia esiintyy yleisesti kissoilla ja koirilla. PT 22:n koulutusosiossa osa MALDI-TOFia käyttävistä laboratorioista oli tunnistanut *C. upsaliensis* -bakteerin väärin *C. helveticus* -bakteeriksi. SVA:n mukaan MALDI-TOF score  $\geq 2$  on korkea ja katsotaan luotettavaksi. SVA oli vertailut MALDI-TOFilla saatuja lajituloksia kokogenomisekvensointiin ja havainnut, että MALDI-TOF tunnisti *C. helveticus* -kantoja väärin *C. upsaliensis*

-kannoiksi. Ilmeni myös, että yksi Brukerin tietokannassa olevista *C. upsaliensis* ja *C. helveticus* -referenssikannoista oli väärin tunnistettu. SVA on ollut virheestä yhteydessä Brukeriin.

#### **Kvantitatiivisen referenssimateriaalin valmistaminen / Britta Kraushaar, NRL-DE**

Saksan edustaja esitteli pakastetun, kvantitatiivisen referenssimateriaalin valmistamista käytettäväksi esim. kamylobakteerialustojen laadunvarmistuksessa sekä siirrostetuissa vertailunäytteissä. Kriittinen kohtia valmistuksessa on optimaalisten kasvatusolojen varmistaminen. Referenssimateriaalit pakastettiin pitämällä niitä ensin vähintään pari tuntia jäissä, minkä jälkeen ne jäädettiin nestemäisessä työssä ja lopuksi varastoitettiin -80 °C:een pakastimeen, jossa niiden on todettu säilyvän stabiilina vähintään 1,5 vuotta. Referenssimateriaalit sulatettiin huoneenlämmössä 30 min, mutta *C. jejuni* -bakteerimateriaalia on suositeltavaa pitää vielä jäissä 30 minuuttia sulatuksen jälkeen.

#### **Uudet laboratoriot esittäytyvät: NRL-Albania ja NRL-Kreikka / Renis Maci, NRL-AL & Ioanna Apostolou NRL-GR**

Albanian ja Kreikan kansalliset vertailulaboratoriot esittelivät toimintaansa.

#### **Kamylobakteerin selviytyminen lannan mädätysprosessissa / Elisabeth Reperant, NRL-FR**

Tilatasolla tehtävällä lannan mädätyksellä tavoitellaan mm. energiantuottoa sekä lannan lannoitusominaisuuksien parantamista. Ranskan edustajan esittelemä tutkimus oli osa suurempaa hanketta, jossa tutkittiin taudinaiheuttajien, muidenkin kuin kamylobakteerin, selviytymistä lannan mädätysprosessista. Ranskassa suurin osa biokaasulaitoksista toimii mesofiilisessa lämpötilassa +35–40°C. Lämpökestoiset kamylobakteerit olivat herkkiä mesofiiliselle mädätykselle, mutta eivät tuhoutuneet täysin.

#### ***C. jejuni/coli* tutkimukset sveitsiläisestä vähittäismyynnin broilerinlihasta qPCR-menetelmällä / Gudrun Overesch, NRL-CH**

Sveitsissä tutkittiin 301 tuoretta broilerinlihanäytettä vähittäismyynnistä vuosina 2016–2017. ISO 10272-2-menetelmällä vain kahdessa näytteessä (1 %) todettiin kamylobakteereita yli 10 pmy/g. Sen sijaan qPCR-menetelmällä 22 näytettä todettiin positiivisiksi (7 %); neljässätoista näytteestä tosin ilmeni inhibitiota.

#### **ISO/CEN kuulumiset / Hanna Skarin, EURL-CAMPYLOBACTER**

Hanna Skarin esitteli seuraavien, päivityksessä olevien standardien kuulumiset.

- ISO 16149 Protocol for the validation of alternative methods: osat 1-2 on jo julkaistu; osat 3-6 ovat ohittaneet DIS-äänesvaiheen ja valmistunevat vuoden 2019 aikana.
- ISO 10272:2017 Microbiology of food and animal feeding stuffs -- Protocol for the validation of alternative methods: tulossa liite lajitunnistuksesta PCR:llä (perinteinen ja reaaliaika) molempiin osiin.

Lisäksi ISO/WG25:ssä tullaan tekemään uusi standardi otsikolla "Whole-genome sequencing for typing and genomic characterization".

#### **Cj/Cc-hybridien erottaminen NGS-analyysillä / Kerstin Stingl, NRL-DE**

Saksassa tutkittu *C. jejuni/C. coli* -hybridien erottamista kokogenomisekvensoinnin keinoin. Sekvensointi tehtiin MiSeqilla.

#### **Kokogenomisekvensointia ja PulseNetia käsittelevän EURL-työryhmän aktiviteetit / Joakim Skarin, EURL-CAMPYLOBACTER**

On perustettu EURL-työryhmä, jonka tehtävänä on edistää NGS-sovellusten käyttöönottoa EURL-verkostoissa. Työryhmä työskentelee seuraavien aiheiden parissa: vertailunäytekerrokset, NGS-menetelmäohjeet, bioinformatiikkatyökalut, klusterianalyysi, toimintatapojen vertailu, koulutukset sekä varmistustestien käyttö.

## **WGS:n käyttöönotto kansallisessa referenssilaboratoriossa / Craig Swift, NRL-UK**

Public Health England on ottanut käyttöön ja validoinut kokogenomisekvenssoinnin mm. salmonellalle, kamylobakteerille ja listerialle. PHE:n edustaja kuvasi työvuon laboratorioon saapuvasta bakteerikannasta sekvenssianalyyysiin asti. Isolaatit tulevat sairaalalaboratorioista eristettyinä kuljetusputkissa. PHE:ssa ne viljellään verelle, niiden puhtaus tarkistetaan ja DNA-eristetään robotilla. DNA-eristysten onnistumista tarkkaillaan satunnaistarkastuksilla 96-kuoppalevyiltä. Eristetyt DNA:t sekvensoidaan Illumina HiSeqilla. Sekvenssianalyyseissä tehdään lajitunnistus (Kmer), 7-loci MLST-tyypitys (MOST), antibioottiresistenssigeenien etsintä (in-house työkalu GeneFinderilla) ja SNP-analyysi. Heidän kokemuksensa mukaan kamylobakteerilla antibioottiresistenssin osalta geno- ja fenotyypit vastaavat hyvin toisiaan.

---

## **2. päivä**

### **Kollaboratiivinen tutkimus kamylobakteerien toteamisesta maidossa / Hanna Skarin, EURL-CAMPYLOBACTER**

Kamylobakteerin prevalenssi raakamaitonäytteissä on 0,4-12 %. Toteamisraja on kuitenkin korkeampi kuin muilla matriiseilla. Syy voi olla menetelmässä, kamylobakteerin huonossa selviytymisessä tai siinä, että se menee tilaan, jossa se on elossa, mutta ei todettavissa viljelymenetelmin. Maidon pH:lla voi olla merkitystä selviytymiseen ja ISO 6887-5 -standardin mukaan pH tulee säätää neutraaliksi. EURL-Campylobacterin jäsenmaille järjestämän kyselyn mukaan yksikään maitoa tutkivista laboratorioista (13/33) ei säädä pH:ta. Suurin osa vastaajista tutki viljelemällä ja yleisimmin käytetty rikastusliemi oli Bolton. EURL haluaisi tutkia kollaboratiivisella tutkimuksella, onko pH:n säätämällä vaikutusta kamylobakteerin toteamiseen maidosta viljelymenetelmin sekä miten hyvin kamylobakteeri selviää maidossa. EURL lähettää jäsenmaille tutkimussuunnitelman ja tiedustelee osallistumishalukkuutta kollaboratiiviseen tutkimukseen.

### **Mittausepävarmuusstandardin ISO/TS 19036 päivitys / Bertrand Lombard, ANSES**

Päivityksen projektinjohtajana toimii Basil Jarvis (UK), WG2 Statistics -työryhmässä. ISO/DIS äänestys päättyi 08/2018. Lopullinen ISO/CEN äänestys on touko-kesäkuussa 2019. Päivitetyssä standardissa mittausepävarmuutta arvioidaan puoliglobaalisti ja se koostuu teknisestä osasta, matriisiepävarmuudesta ja jakaumaepävarmuudesta. Lombardin mukaan tämä mahdollistaa jo aiemmin arvioitujen mittausepävarmuuden osa-alueiden hyödyntämisen. Mittausepävarmuus on arvioitava uudelleen, jos kriittistä tekijää muokataan (esim. reagenssit, tekijä ym.). Mittausepävarmuuden voi ilmoittaa tutkimustodistuksella joko vain teknisenä epävarmuutena (joka merkittävin tekijä) tai sisältäen myös matriisi- ja jakaumaepävarmuudet. Tuloksiin lisätyn mittausepävarmuuden sovittaminen lainsäädännön vaatimuksiin ei ole yksiselitteistä ja vaatii keskustelua sekä tapauskohtaista arviointia.

Ryhmätöissä keskusteltiin laboratorioiden käytännöistä mittausepävarmuuden laskemiseen ja ilmoittamiseen liittyen.

### **VETPOD-pikamenetelmän validointi / Helena Höök, NRL-SE**

VIVALDI on Horisontti 2020 -projekti (2018–2020), jota DTU johtaa. Projektissa validoidaan VETPOD sirua kamylobakteerin lisäksi salmonellalle ja lintuinfluenssalle. VETPOD on amplifikaatioon perustuva menetelmä, joka on nopeampi ja halvempi kuin PCR, sillä siinä reagenssit ovat valmiiksi ladattuna sirulle. EURL kutsuu kymmenen kansallista vertailulaboratoriota osallistumaan validointikierrokselle, joka järjestetään vuoden 2020 alussa.

### **Kokouksen päättäminen / Hanna Skarin, EURL-CAMPYLOBACTER**

Workshop 2019 pidetään Ruotsissa 7-9.10.2019, ja sitä pidennetään kahteen kokonaiseen päivään. Ensimmäinen päivä on työpajaa ja toinen päivä jaettu kurssi/työpaja. Kokogenomisekvenssoinnista on tulossa kurssi 2020.