

Sofia Seittenranta-Vekkele

ESBL-kantojen genotyyppien kartoitus multiplex PCR:llä

Metropolia Ammattikorkeakoulu
Sosiaali- ja terveysala
Bioanalytiikan koulutusohjelma
Opinnäytetyö
4.6.2012

Tekijä Otsikko Sivumäärä Aika	Sofia Seittenranta-Vekkel ESBL-kantojen genotyyppien kartoitus multiplex PCR:llä 37 sivua + 4 liitettä 4.6.2012
Tutkinto	Bioanalytiikka (AMK)
Koulutusohjelma	Bioanalytiikka
Suuntautumisvaihtoehto	Bioanalytiikka
Ohjaajat	laboratoriohoitaja Jaana Valve kliinisen mikrobiologian erikoislääkäri Juha Kirveskari lehtori Terttu-Liisa Lindell
<p>ESBL (extended spectrum β-lactamases) -entsyymien tuotto aiheuttaa <i>Enterobacteriaceae</i>-heimon bakteereissa antibioottiresistenssiä laajakirjoisia β-laktaamiantibiootteja kohtaan. ESBL-löydösten määrä on jatkuvasti kasvanut 2000-luvun alusta. Plasmidivälitteisiä ESBL-geenejä tunnetaan satoja, näistä yleisimmät kuuluvat CTX-M-geeniryhmään.</p> <p>Opinnäytetyöni tarkoituksena oli kartoittaa ESBL-kannoilla esiintyviä laajakirjoisia β-laktamaasigeenejä ja saada yleiskuva siitä, millaisia geenejä ja geeniyhdistelmiä Helsingin ja Uudenmaan sairaanhoitopiiriin (HUS) alueella ESBL-kannoissa ilmenee tutkittuna ajanjaksona. Vertasin myös saatuja genotyyppisiä kantojen antibioottiherkkyysmääritysten tuloksiin. Keräsin aineiston kolmen viikon aikana ESBLVi-tutkimuspyynnöllä HUSLAB:n bakteriologian laboratorioon tulleista näytteistä. Kannat oli tunnistettu antibioottikielloherkkyyksimääritysten perusteella ESBL-entsyymien tuottajiksi tai kolmannen polven kefalosporiineille resistentiksi. Analysoin kantojen genotyypit käyttäen perinteistä PCR-menetelmää neljällä multiplex-aluepariseoksella ja yhdellä simplex-alueparilla. Käytetyt alukkeet tunnistivat kaikki yleisimmät ESBL-geenit. Antibioottiherkkyysmääritysten tulokset saatiin kiekkoherkkyyksimenetelmällä määritettyinä estorenkain halkaisijoina.</p> <p>Analysoin tulokset ESBL <i>Escherichia coli</i> -kantojen osalta (n=33). Tulosten perusteella suurimmalla osalla (90,9 %, n=30) tutkittuja ESBL <i>E. coli</i> -kantoja oli jokin CTX-M-geeniperheen geeni joko yksin tai yhdessä jonkin muun ESBL-geenin kanssa. Eniten esiintyi CTX-M-1-ryhmän geenejä (78,8 %, n=26). Kaikki havaitut geenit kuuluivat viiteen eri geeniryhmään (<i>bla</i>_{TEM}, <i>bla</i>_{CTX-M-1}, <i>bla</i>_{CTX-M-9}, <i>bla</i>_{OXA-1} ja <i>bla</i>_{CTT}) ja esiintyivät yhdeksänä eri yhdistelmänä. Havaittu genotyyppien jakauma vastasi muissa tutkimuksissa saatuja jakaumia. Vertailin toisiinsa <i>E. coli</i> osalta <i>bla</i>_{CTX-M-1} ja <i>bla</i>_{CTX-M-9} -geeniryhmien antibioottiherkkyksiä. Tulosten perusteella ryhmien välillä oli eroja antibioottiherkkyksissä keftatsidiimin, β-laktami-β-laktamaasi-inhibiittori-yhdistelmien ja tobramysiinin osalta. Tutkitut CTX-M-9-ryhmän kannat olivat <i>in vitro</i> herkempiä edellä mainittuja antibiootteja kohtaan. Myös muissa tutkimuksissa oli havaittu vastaavia eroja.</p>	
Avainsanat	ESBL, genotyyppi, antibioottiresistenssi, multiplex PCR

Author Title	Sofia Seittenranta-Vekkieli Charting ESBL-Genotypes by Using Multiplex PCR Assays
Number of Pages Date	37 pages + 4 appendices 4 June 2012
Degree	Bachelor of Health Care
Degree Programme	Biomedical Laboratory Science
Specialisation	Biomedical Laboratory Science
Instructors	Jaana Valve, Biomedical Laboratory Technologist Juha Kirveskari, M.D. Specialist in Clinical Microbiology Terttu-Liisa Lindell, Senior Lecturer
<p>ESBL (extended spectrum β-lactamases) producing bacteria in <i>Enterobacteriaceae</i> family are resistant to extended spectrum β-lactam antibiotics. Hundreds of plasmid encoded ESBL genes are known, the most common genes belonging to the CTX-M group. Infections caused by ESBL-producing strains have constantly increased since the beginning of 21th century.</p> <p>The purpose of my study was to define the genotypes of ESBL-producing strains and to find out which ESBL-genes and gene combinations were found in the Hospital District of Helsinki and Uusimaa, Finland. I also compared the genotypes to known antibiotic susceptibility results of the strains.</p> <p>The strains were collected in three weeks from the samples analyzed in the HUSLAB Department of Bacteriology. The strains were recognized as ESBL-producers, or resistant to third generation cephalosporins, by antibiotic susceptibility tests conducted with the disk diffusion method. I analyzed the genotypes using traditional PCR with four sets of multiplex primers and one pair of simplex primers. The primers used detected the most common ESBL-genes. Antibiotic susceptibility results were given in zone diameters.</p> <p>I analyzed the results of 33 ESBL <i>Escherichia coli</i> strains. The results showed that most of the strains (90.9%, n=30) carried some of the CTX-M genes alone, or they were in combination with other ESBL-genes. Most often the gene detected belonged to the CTX-M group 1 (78.8%, n=26). In all ESBL <i>E. coli</i> strains the genes found belonged to five different groups (<i>bla</i>_{TEM}, <i>bla</i>_{CTX-M-1}, <i>bla</i>_{CTX-M-9}, <i>bla</i>_{OXA-1} and <i>bla</i>_{CTT}) and nine different combinations were detected. The distribution of the genotypes detected was in line with the previous studies. I also compared the susceptibility results and genotypes of CTX-M ESBL <i>E. coli</i> strains. The results indicated difference in susceptibility between CTX-M groups 1 and 9. The strains carrying <i>bla</i>_{CTX-M-9} gene appeared more susceptible <i>in vitro</i> to ceftazidime, β-lactam/β-lactamase-inhibitor combinations and tobramycin. These results were also in line with previous studies.</p>	
Keywords	ESBL, genotype, antimicrobial resistance, multiplex PCR

Sisällys

1	Johdanto	1
2	Antibiootit ja antibioottiresistenssi	2
2.1	Antimikrobiset lääkkeet	2
2.2	Antibioottiresistenssin mekanismeja	3
2.3	Resistenssi- eli R-plasmidit	3
2.4	Geenien siirtyminen bakteerien välillä	4
2.5	Antibioottiherkkyyismäärittäminen	5
2.6	Antibioottiresistenssin hallinta	5
3	ESBL-entsyymien aiheuttama antibioottiresistenssi	6
3.1	<i>Enterobacteriaceae</i> -heimo	7
3.2	β -laktaamiantibiootit ja β -laktamaasit	8
3.3	ESBL-entsyymit	10
3.4	Tunnistus antibioottikielkkoherkkyyssmenetelmällä	11
3.5	Esiintyminen Suomessa ja muualla	13
3.6	ESBL-infektioiden hoito	14
4	Työssä käytetyt menetelmät	15
4.1	DNA:n eristys	16
4.2	Polymeraasiketjureaktio	16
4.3	Agaroosigeelielektroforeesi	19
4.4	Multiplex PCR	19
4.5	Kontaminaatio PCR:n virhelähteenä	20
5	Tutkimusasetelma	21
5.1	Työtä ohjaavat kysymykset	21
5.2	Projektin muut tavoitteet	22
5.3	Aikaisemmat tutkimukset	22

6	Työn suoritus	23
6.1	Aineiston keruu	24
6.2	PCR:n teko	24
6.3	Käytetyt multiplex PCR-alukkeet ja kontrollit	25
6.4	Tulosten tulkinta ja käsittely	27
7	Tulokset	28
7.1	Kantojen genotyyppien jakauma	28
7.2	Genotyyppien vertailu fenotyyppiin	31
8	Johtopäätökset	33
8.1	Vertailu aiemmin tutkittuihin genotyyppijakaumiin	33
8.2	Antibioottiherkkyysien ja genotyyppien korrelaatio	34
	Pohdinta	34
8.3	Tulosten hyödynnettävyys	34
8.4	Tulosten luotettavuuden arviointia	35
8.5	Työn eettisyyden arviointia	36
8.6	Opinnäytetyöprosessin arviointia	36
8.7	Jatkotutkimuskohteita	37
	Lähteet	38
	Liitteet	
	Liite 1. β -laktaamiantibioottien ja muiden työssä käytettyjen antibioottien herkkyysrajat enterobakteereille	
	Liite 2. Pipetointikaavio	
	Liite 3. Käytettyjen multiplex-alukkeiden sekvenssit	
	Liite 4. Opinnäytetyön tulokset	

Työssä käytettyjä lyhenteitä

AmpC	luokan C β -laktamaasit
<i>bla</i>	β -laktamaasia koodaava geeni
bp	base pair, emäspari
CLSI	Clinical Laboratory Standards Institute
CMY	kefamysiiniä hydrolysoiva β -laktamaasi
CTX-M	kefotaksiimia hydrolysoiva β -laktamaasi, alun perin eristetty Münchenissä
EARSS	European Antimicrobial Resistance Surveillance System
ESBL	extended spectrum β -lactamase, laajakirjoinen β -laktamaasientsyymi
EUCAST	European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
GES	Guiana extended spectrum
<i>in vitro</i>	elävän organismin ulkopuolella, laboratorio-olosuhteissa
<i>in vivo</i>	elävässä organismissa kuten potilaassa
MIC	minimal inhibitory concentration, pienin organismin kasvua estävä bakteerilääkepitoisuus
OXA	oksasilliinia hydrolysoiva entsyymi
PBP	penicillin binding protein, penisilliiniä sitova proteiini
PCR	polymerase chain reaction, polymeerasiketjureaktio
SHV	sulfhydryl variable β -laktamaasi
spp.	species, lajit
TEM	Temoneira-nimisen potilaan mukaan nimetty β -laktamaasi

1 Johdanto

ESBL (extended spectrum β -lactamases) -entsyymiä tuottavat *Enterobacteriaceae*-heimon bakteerit ovat antibioottiresistenttejä patogeenejä. Niiden aiheuttamat infektiot ovat tasaisesti lisääntyneet 2000-luvun alun muutamista tapauksista satoihin tapauksiin vuodessa (Hulkko ym. 2010). ESBL-infektiot ovat yleensä ns. sairaalainfektioita. Suomessa ESBL-infektioista on avoterveydenhuollon puolella vain pieni osa tapauksista. (Forssten 2010: 65.)

Antibioottiresistenssi on vakavasti otettava uhka, sillä täysin uusia antibiootteja tulee kliiniseen käyttöön erittäin harvoin. Markkinoille ei ole lähivuosina tulossa uusia antimikrobisia lääkkeitä gramnegatiivisia patogeenejä vastaan. (Lee – Bae - Lee 2012.) Pelkona on niin sanottujen panresistenttien kantojen syntyminen, jotka ovat resistenttejä kaikille tunnetuille antibiooteille. Bakteeri on resistentti, jos se sietää merkittävästi korkeampia antibioottilääkepitoisuuksia kuin saman lajin edustajat yleensä. (Männistö – Tuominen 2007a; Nissinen 2009.) ESBL-kannat ovat resistenttejä laajakirjoisille β -laktaamiantibiooteille eli kaikille kolmannen sukupolven kefalosporiineille, penisilliineille ja monobaktaameille, mutta eivät yleensä karbapeneemeille. (Livermore 2008.)

Teen opinnäytetyöni HUSLAB:n kliinisen mikrobiologian vastualueen bakteriologian osaston toimeksiannosta. Opinnäytetyöni ohjaajina työelämän puolelta ovat laboratoriohoitaja Jaana Valve ja kliinisen mikrobiologian erikoislääkäri Juha Kirveskari. Opettajaohjaajanani on lehtori Terttu-Liisa Lindell. Opinnäytetyönäni teen kartoittavaa tutkimusta osana laboratorion omaa projektia, joka käyttää samaa näytemateriaalia reaaliaikaisen PCR-menetelmän kehittelyyn, jolla ESBL-geenejä voidaan tunnistaa kasvatettujen kantojen lisäksi myös suoraan näytteestä. Käyttämäni perinteistä PCR-menetelmää käytetään kehittäessä referenssi- eli vertailumenetelmänä.

Opinnäytetyöni tarkoituksena on kartoittaa, millaisia geenejä tai niiden yhdistelmiä (genotyyppejä) esiintyy Helsingin ja Uudenmaan sairaanhoitopiirin (HUS) alueelle tutkittavaksi tulevista näytteistä eristetyillä ESBL-kannoilla. Työssäni tutkin ESBLVi-tutkimuspyynnöllä laboratorioon tulleita näytteitä tietyinä ajanjaksona. Analysoin

kantojen genotyypit yleisimmät ESBL-geenit tunnistavalla perinteisellä multiplex PCR:llä (polymerase chain reaction, polymeerasiketjureaktio). Tulokseksi saan eri geenien esiintymisfrekvenssit tutkituissa kannoissa. Saan käyttööni myös kantojen antibioottilherkkyyismääritysten tulokset, joihin vertailen PCR:llä saatuja genotyypppejä. Saatuja tuloksia voidaan hyödyntää uusien menetelmien kehittämissä ja epidemiaselvityksissä.

2 Antibiootit ja antibioottiresistenssi

Ensimmäisten antibioottien keksimisestä lähtien on havaittu antibioottiresistenssiä. Nykyään uskotaankin, että antibioottiresistenssiä on ollut jo ennen antibiootihoidon keksimistä. Antibiootteja tuottavia mikrobeja on luonnostaan olemassa ja nämä mikrobit joutuvat kestävänsä omia antibioottejaan. (Madigan ym. 2009: 802–806.)

Antibioottiresistenssi voi syntyä joko kromosomissa tapahtuneen mutaation seurauksena tai genomien ulkopuolisen resistenssitekijän takia. Sen syntyyn kromosomaalisena riittää usein pistemutaatio juuri antibiootin vaikutuskohdassa. Genomien ulkopuolisen tekijänä voi olla esimerkiksi plasmidi (resistenssi- eli R-plasmidi) tai transposoni. Resistenssi kanta saa kilpailuedun, kun kyseisiä antibiootteja käytetään ja mutaatio yleistyy. (Skurnik 2010: 41–55.)

2.1 Antimikrobiset lääkkeet

Antibiootit ovat mikrobilääkkeiden alaryhmä, johon kuuluu määritelmän mukaisesti mikrobien tuottamia aineita, jotka estävät toisten mikrobien kasvua. Antibiootti voi olla bakteriostaattinen eli se estää bakteerien lisääntymisen tai bakteriosidinen eli se tappaa bakteereita. Niiden kliininen käyttö perustuu prokaryoottien ominaisuuksiin, joihin vaikuttamisesta ei aiheudu haittaa isännän, kuten ihmisen, eukaryoottisoluille. Antibiooteilla vaikutetaan soluseinämään, solukalvoon (kuten steroleihin ja lipidisynteesiin), metaboliaan (kuten foolihapon synteesiin), nukleiinihappoihin (kuten RNA-polymeraasin tai DNA-gyraasin esto) tai proteiinisynteesiin (kuten ribosomien toiminnan esto). Useimmat antibiootit toimivat vain aktiiviseen elävään soluun. (Männistö – Tuominen 2007a.)

2.2 Antibioottiresistenssin mekanismeja

Antibioottiresistenssi voi johtua monista syistä. Bakterista voi puuttua antibiootin kohderakenne, esimerkiksi soluseinättömiltä mykoplasmoilta puuttuu penisilliinin vaikutuskohta, tai antibiootti ei alun perinkään pääse bakteeriin, esimerkiksi penisilliini G ei pääse monen gramnegatiivisen bakteerin sisälle. Bakteri voi muokata antibioottia inaktiiviseksi (esimerkiksi β -laktamaaseilla) tai antibiootin kohderakennetta, kuten ribosomia (yleisin resistenssimekanismi). Jotkin bakteerit kehittävät biokemiallisen resistenssin, jolla kiertävät antibiootin vaikutuksen niiden metaboliaan, esimerkiksi sulfaresistentit mikrobit käyttävät eri reittiä foolihapon saantiin. Jotkin bakteerit voivat myös pumpata antibiootin ulos (efflux-ilmiö). (Madigan ym. 2009: 802–806.)

2.3 Resistenssi- eli R-plasmidit

Plasmidit ovat genomien ulkopuolista perimäainesta, joka on bakterisoluisissa kaksijuosteisena itsestään replikoituvana DNA-renkaana. Plasmidien koodaamat tuotteet (proteiinit, entsyymit) eivät ole välttämättömiä bakteerin kasvuun, mutta voivat poikkeusolosuhteissa antaa kilpailuedun. Tällaisia plasmidivälitteisiä ominaisuuksia ovat muun muassa monet antibioottiresistenssit. Plasmidilla voi olla konjugatiivinen ominaisuus eli se voi siirtyä solusta toiseen. (Skurnik 2010: 41–55.)

Ensimmäiset resistenssiplasmidit (R-plasmidit) löydettiin Japanissa 50-luvulla sulfonamidiresistentiltä enterobakteerilta. Resistenssiplasmidien esiintyvyys korreloi vahvasti resistenssin kohteena olevan antibiootin käyttöön. Niiden avulla resistenti kanta voi siirtää resistenssiä herkille kannoille, esimerkiksi R100-plasmidi konjugoituu enterobakteerien välillä. Monet resistenssiplasmideista ilmenevät etenkin maaperässä, jossa bakteerit ovat joutuneet sietämään antibiootteja tuottavia mikrobeja. Plasmidivälitteisiä resistenssigeenejä on havaittu uusimpia antibiootteja vastaan myös ennen niiden käyttöönottoa taltioituissa kannoissa. (Madigan ym. 2009: 802–806.)

Resistenssiplasmidit jaetaan Inc (incompatible) -ryhmiin niiden sekvenssien perusteella. Yhdellä bakteerilla voi olla vain yksi saman Inc-ryhmän plasmidi. (Madigan ym. 2009:

802–806.) Enterobakteerien R100-plasmidi kuuluu IncFII-plasmideihin (Cantón – Coque 2006).

2.4 Geenien siirtyminen bakteerien välillä

Plasmidivälitteinen resistenssi voi siirtyä transduktion, konjugaation tai transformaation avulla bakteerista toiseen. Jos resistenssigeeni sijaitsee transposonissa, se voi insertiosekvenssiensä avulla siirtyä uudessa isäntäsolussa esimerkiksi toiseen plasmidiin tai kromosomiin. (Skurnik 2010: 41–55.) Geenien siirtymistä kromosomistossa bakteerin sisällä tai bakteerien välillä kutsutaan transpositioksi. Geenien siirtyessä bakteereilta ja bakteerilajeilta toisille evoluutiopuuhun nähden poikittaissuunnassa puhutaan horisontaalisesta geenisiirtymästä, joka on bakteereille ominainen tapa muokata perimäänsä. (Madigan 2009: 282–284.)

Monet gramnegatiivisten bakteerien antibioottiresistenssigeeneistä sijaitsevat niin sanotuissa geenikaseteissa, jotka voivat sisältää yhden tai useampia geenejä. Niiden toiminta edellyttää geenikasetin sitoutumista integroniin ja integroniin kuuluva promoottori saa aikaan geenien ilmentymisen. Integroni liittyy bakteerin perimässä kromosomin, plasmidin tai transposonin tiettyyn sekvenssiin. Transposoituvan elementin (insertiosekvenssit, transposonit) tai plasmidin osana geenit voivat siirtyä bakteerista toiseen. (Mazel 2006.)

Konjugaatiossa plasmidi tai muu konjugatiivinen perimäaine (esimerkiksi transposoni) siirtyy toisiaan lähellä olevien bakteerien välillä konjugatiivista pilusta pitkin. Konjugaation edellytyksenä on, että sen on oltava ominaista niin plasmidin luovuttajalle (donorille) kuin vastaanottajalle (presipientille). Tämä on ominaista monille gramnegatiivisille bakteereille. Transformaatioissa taas bakteeri ottaa sisäänsä ympäristössä vapaana olevaa perimäainesta. Edellytyksenä on, että perimä on riittävän pieninä molekyyleinä ja bakteeri on transformoituva eli kompetentti. Tällaisia lajeja on sekä grampositiivisissa että -negatiivisissa bakteereissa, mutta ei enterobakteereissa. Transduktiossa perimää siirtyy bakteerista toiseen bakteriofagien eli bakteereita infektioivien virusten välityksellä, kun bakteeria infektoivaan bakteriofagiin on vahingossa pakkautunut ensimmäiseksi infektoidun bakteerin perimäainesta.

Transduktio on ominaista useille bakteerilajeille, kuten *Escherichialle* ja *Salmonellalle*. (Skurnik 2010: 41–55; Madigan 2009: 297–300.)

2.5 Antibioottiherkkyysmäärittäminen

Antibioottiherkkyysmäärittämisellä pyritään selvittämään, kuinka hyvin bakteeri kasvaa missäkin antibioottipitoisuuksissa *in vitro* eli eristettynä laboratorio-olosuhteissa. Herkkyysmäärittäykset eivät suoraan kerro antibiootin tehoa *in vivo* eli elävässä organismissa kuten potilaassa. (Männistö – Tuominen 2007a.)

Yleisin määrittämenetelmä on agardiffuusiomenetelmä, jossa tunnetun määrän antibioottia sisältävistä imupaperikiekoista imeytyy lääkettä inkuboinnin aikana tasaisesti agariin. Standardin mukaisesti menetelmässä levitetään gramnegatiivisille sauvabakteereille 0,5 McFarlandin vahvuinen bakteerisuspensio tasaisesti yleensä dreijaamalla agarille, jolle antibioottikiekot asetetaan. Tällöin on tärkeää, että muodostuu jatkuva ja tarpeeksi ohut bakteerikerros, jossa pesäkkeet ovat kiinni toisissaan ja herkkyysalueiden reunat ovat tasaiset. (Nissinen 2009.)

Agardiffuusiomäärittäminen jakaa bakteerit antibiootin suhteen herkiksi (S, susceptible) tai resistenteiksi (R, resistant). Näiden väliin jää yleensä korkeintaan 5 mm alue, jolla herkkyys voi olla lievästi heikentynyt (I, intermediate), jonka tarkoitus on pienentää menetelmän virhelähteitä ja vähentää vääriä S/R-tulkintoja. (Nissinen 2009.)

Etestillä (Epsilon-test) saadaan samalla periaatteella määritettyä helposti bakteerin MIC (minimal inhibitory concentration, pienin organismin kasvua estävä bakteerilääkepitoisuus) kyseistä antibioottia kohtaan. Siinä testiliuskan ympärille diffundoituu liuskan asteikkoa vastaava pitoisuusgradientti ja MIC-arvo saadaan luettua asteikolta. (Nissinen 2009.)

2.6 Antibioottiresistenssin hallinta

Tärkein keino resistenssien kehittymisen ja laajenemisen estämiseen on vähentää valintapainetta eli pyrkiä tehokkaaseen ja järkevään antibioottien käyttöön. Uusien antibioottien kehittämiseen ei ole voitu 80-luvulta lähtien nojata (Huovinen – Hakanen

2011). Antibioottihoidon epätavoitteenmukainen liikkäyttö on suurin syy resistenssigeenien yleistymiseen. Esimerkiksi *Neisseria gonorrhoeae* -bakteerien penisilliiniresistenssi 80-luvulta alkaen johtui penisilliinin käytöstä ensisijaisena antibioottina. (Madigan ym. 2009: 802–806.)

Antibioottihoito tulee tehdä mikrobin, herkkyysmäärittelyn ja tuoreimpien suositusten mukaan. Kontaminaatiota tai kolonisaatiota ei pidä hoitaa, vaan näytteenoton on oltava laadukas. Antibioottina tulisi suosia mahdollisimman kapeakirjoista tehoavaa antibioottia, jonka vaikutusta on seurattava. Turha antibioottihoito tulee keskeyttää (esimerkiksi virusinfektion kohdalla). Resistentin bakteerin aiheuttaman infektion sattuessa tartuntalähde tulee voida eristää. (Madigan ym. 2009: 790–791.)

Normaalitilanteessa ympäristössä esiintyvien resistenttien kantojen on havaittu häviävän kasvu- ja elinkyvyssään herkille kannoille melko pian antibioottien poistuttua niiden ympäristöstä. Tämän on ajateltu johtuvan siitä, että resistenssin hankkiminen käyttää solun resursseja. (Purcell 2011.) Antarktiksella tehdyssä tutkimuksessa on kuitenkin havaittu tutkimusasemien ympäristössä ESBL *E. coli* -kantoja, jotka ovat säilyttäneet resistenssigeeninsä ympäristössä pitkään niitä erittävän ihmislähteen poistuttua (MacKenzie 2012).

3 ESBL-entsyymien aiheuttama antibioottiresistenssi

ESBL (extended-spectrum- β -lactamases) -entsyymien tuotto antaa *Enterobacteriaceae*-heimon patogeeneille resistenssin kaikkia penisilliinejä, kolmannen polven kefalosporiineja ja monobaktaameja kohtaan. Määritelmän mukaan entsyymit estyvät β -laktamaasi-inhibiittoreilla, kuten klavulaanilahdolla. Eri ESBL-entsyymejä tunnetaan yli 20:sta eri geeniperheestä yhteensä useita satoja (Lahey Clinic. 2012). Käytän opinnäytetyössäni ESBL-entsyymeistä myös suomenkielistä termiä laajakirjoiset β -laktamaasit.

Nimeän entsyymejä tuottavat bakteerit Livermoren (2008) artikkelin ohjeistuksen mukaisesti sen mukaan, mitä entsyymiä ne tuottavat. Esimerkiksi TEM ESBL *E. coli* tarkoittaa TEM-tyypin ESBL-entsyymiä tuottavaa *Escherichia coli* -kanta. Sen sijaan

esimerkiksi merkinnällä *bla*_{CTX-M-1} viitataan CTX-M-1-ryhmän ESBL-entsyymiä koodittavaan geeniin, jossa *bla* tarkoittaa β -laktamaasigeeniä. ESBL-entsyymiä tuottavista kannoista käytän termiä ESBL-kannat.

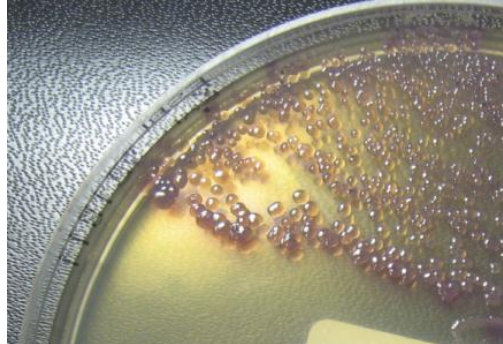
3.1 *Enterobacteriaceae*-heimo

Enterobacteriaceae-heimoon kuuluu homogeeninen ryhmä fakultatiivisesti anaerobeja gramnegatiivisia itiöttömiä sauvabakteereita. Ne ovat kaikki laboratoriotesteissä oksidaasinegatiivisia ja fermentoivat erilaisia sokereita. Enterobakteerien perinteinen lajinmääritys perustuu suurelta osin sokerien fermentaatioon erilaisiksi lopputuotteiksi, joita voidaan havainnoida esimerkiksi sokerisarjassa erilaisilla biokemiallisilla värireaktioilla. *Enterobacteriaceae*-heimon bakteerit ovat ravintovaatimuksiltaan vaatimattomia, joten ne kasvavat useimmilla laboratorioissa viljelyyn käytetyillä agarmaljoilla. Niiden joukossa on useita patogeeneja. Heimoon kuuluvia sukuja ovat muun muassa *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Serratia*, *Salmonella* ja *Proteus*. (Madigan ym. 2009: 419–420.)

Escherichia coli on heimon parhaiten tunnettu laji, jota käytetään gramnegatiivisten bakteerien malliorganismina. Opinnäytteeni tutkii lähinnä ESBL *E. coli* -kantoja. *E. coli* kuuluu ihmisen suoliston normaaliflooraan, jossa sillä on tärkeä rooli K-vitamiinin syntetisoinnissa. (Madigan ym. 2009: 419–420.) *E. coli* aiheuttaa opportunistisena patogeenina yleisimmin virtsatieinfektioita, jolloin tartunta on yleensä peräisin oman suoliston normaalifloorasta. *E. coli* -lajiin kuuluu joukko taudinaiheuttamiskyvyltään erilaisia kantoja. Tunnettuja suolistoinfektioiden aiheuttajia ovat muun muassa ETEC (enterotoksigeeniset) ja EHEC (enterohemorragiset) -kannat. (Siitonen – Vaara 2010.)

E. coli voidaan tunnistaa muista enterobakteereista esimerkiksi kromogeenisellä agarmaljalla sen β -glukuronidaasientsyymien tuotosta. Kromogeenisellä kasvualustalla entsyymi vapauttaa agarista kromogeenisen värin, joka värjää pesäkkeen. Agariin voidaan lisätä myös antibiootteja, jolloin maljasta saadaan selektiivinen tietyille antibiootille resistenttejä bakteereita kohtaan. ESBL-kantojen kohdalla käytetään yleisesti kefpodoksiimia, joka estää sille herkempien mikrobien kasvun. Lisäksi pyritään poistamaan sille luontaisesti resistenttien ei-tutkittavien kantojen kasvu muilla antibiooteilla, kuten vankomysiinillä ja sieniantibiootilla, jotta näytteestä löydetään

lähinnä haluttuja *Enterobacteriaceae*-heimon resistenttejä kantoja. (Paterson – Bonomo 2005.) Kuviossa 1 on esitetty ESBL *E. coli* -bakteerin kasvu eräällä selektiivisellä kromogeenisellä maljalla.



Kuvio 1. ESBL *E. coli* kasvu selektiivisellä kromogeenisellä viljelymaljalla malvanpunaisina pesäkkeinä.

3.2 β -laktaamiantibiootit ja β -laktamaasit

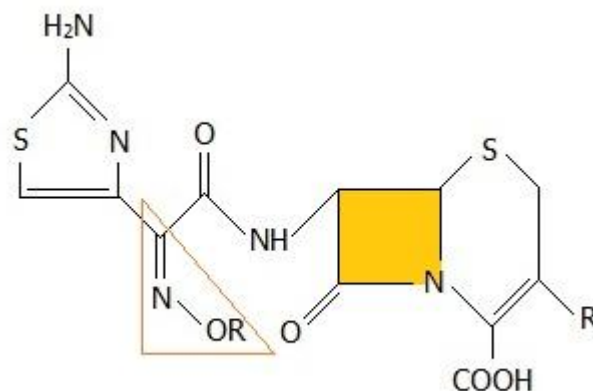
β -laktaamiantibioottien vaikutus perustuu bakteerien soluseinän peptidoglykaanin synteesin estoon. β -laktaamit muistuttavat rakenteeltaan peptidoglykaanisynteesissä tärkeiden entsyymien (transpeptidaasien) substraatteja ja sitoutuessaan niihin estävät soluseinän synteesin. Tämän vuoksi transpeptidaaseja kutsutaan penisilliiniä sitoviksi proteiineiksi (PBPs, penicillin binding proteins). Transpeptidaasien ansiosta peptidoglykaaniketjut liittyvät ristikkäin yhteen muodostaen vahvan soluseinän. β -laktaamien vaikutuksesta transpeptidaasien toiminta inhiboituu ja muodostuva soluseinä heikkenee. Antibiootti-PBP-kompleksi aktivoi autolysiinejä, jotka hajottavat soluseinää. Lopulta osmoottinen paine rikkoo solun. β -laktaamiantibiooteilla on hyvin vähän haittavaikutuksia, sillä niiden kohderakennetta (peptidoglykaania) ei ole ollenkaan eukaryoottisoluissa. (Madigan ym. 2009: 794–796.)

Penisilliini on ensimmäinen käyttöönotettu β -laktaamiantibiootti (otettu käyttöön 1942) ja pian sen jälkeen kehitettiin sen johdoksina kefalosporiinit. β -laktamaasi-inhibiittori klavulaanihappo keksittiin vasta 1977 ja monobaktaamit (kuten atstreonaami) 1981. Kefalosporiineista kefalotiini on ensimmäisen polven kefalosporiini, kefuroksiimi toisen polven ja kefotaksiimi, kefpodoksiimi ja keftatsidiimi kolmannen polven kefalosporiineja eli näistä niin sanotusti kehittyneimpiä antibiootteja. Kefepiimi voidaan luokitella

neljännen polven kefalosporiiniiksi. (Pharmaca Fennica. 2011.) Karbapeneemit ovat laajakirjoisimpia β -laktaamiantibiootteja, joista kliinisesti tärkeimpiä ovat ertapeneemi ja doripeneemi (Männistö – Tuominen 2007b; Kirveskari 2012).

Penisilliinin perusrakenne eristetään edelleen *Penicillium*-suvun homeista, joista se on alun perin löydetty, esimerkiksi *P. chrysogenum* -viljelmistä, jota muokataan synteettisesti. Sen syntetisoiminen kokonaan on viljelyä kalliimpaa. Kefalosporiinien perusrakenne taas saadaan eristettyä *Cephalosporium acremonium* -homeesta, joten myös ne ovat puolisynteettisiä antibiootteja. (Männistö – Tuominen 2007b.)

Kuviossa 2 on esitetty β -laktaamiantibiootin perusrakenne, jota noudattelevat kaikki (oksyimino)kefalosporiinit, kuten kefuroksiimi, kefotaksiimi, keftriaksoni ja keftatsidiimi. β -laktaamirengas on antibiootin vaikuttava kohta, jota mikrobien tuottamat β -laktamaasientsyymit hydrolysoivat. Laajakirjoiset β -laktamaasit heikentävät β -laktaamirengasta suojaavaa oksyiminoryhmää (C=N-OR), joka estää kapeakirjoisempien β -laktamaasien β -laktaamirengasta hydrolysoivan vaikutuksen. Penisilliineiltä tämä ryhmä puuttuu, joten ne ovat altimpia β -laktamaaseille. (Livermore 2008.)



Kuvio 2. β -laktaamiantibiootin perusrakenne, jossa vaikuttava β -laktaamirengas merkittynä oranssilla ja sitä suojaava C=N-OR -ryhmä rajattuna kolmiolla. (Livermoren (2008) artikkelin pohjalta.)

β -laktamaasit luokitellaan Amblerin luokituksen mukaan entsyymin aktiivisen kohdan perusteella luokkiin A–D (Hall – Barlow 2005). Näiden substraattiprofiili eli aktiivisuus eri β -laktaamiantibiootteja kohtaan vaihtelee. Suurin osa ESBL-entsyymeistä kuuluu

luokkaan A (kuten ryhmät TEM-1, SHV-1 ja CTX-M) ja entsyymien aktiivisessa kohdassa on seriiniaminohappo. AmpC-tyyppiset β -laktamaasit ovat C-luokan β -laktamaaseja ja D-luokkaan kuuluu OXA-tyypin entsyymeitä (oksaillinaaseja), joilla on myös aktiivisessa kohdassa seriini. Luokkaan B kuuluvat metallo- β -laktamaasit, joiden aktiivisessa kohdassa on sinkkimolekyyli. Kaikki B-luokan entsyymit ja A-luokan KCP ovat karbapenemaaseja. (FiRe. 2009b.) Myös osa muista A-luokan ja D-luokan entsyymeistä (kuten OXA-48) hydrolysoivat karbapeneemejä (Kirveskari 2012).

3.3 ESBL-entsyymit

ESBL-termillä voidaan kuvata monenlaisia laajakirjoisia β -laktamaaseja. Käytän työssäni yleisesti käytettyä määritelmää, jonka mukaan ESBL:t ovat entsyymejä, jotka hydrolysoivat penisilliinejä, kolmannen polven kefalosporiineja ja monobaktaameja, mutteivät yleensä karbapeneemejä, ja jotka inhiboituvat β -laktamaasi-inhibiittorilla, kuten klavulaanilahapolla. (Paterson - Bonomo 2005.)

Määritelmän mukaisesti ESBL:t ovat yleensä plamidivälitteisesti hankittuja entsyymejä, jotka ovat usein mutatoituneet kapeakirjoisemmasta muodoistaan (SHV, TEM, OXA). Tällaista kapeakirjoisempaa muotoa ei ole kuitenkaan havaittu olevan CTX-M-geeniperheellä (kefotaksiimia hydrolysoiva β -laktamaasi, alun perin eristetty Münchenissä), johon kuuluvat nykyisin yleisimmät ESBL-geenit. Lisäksi otan määritelmään mukaan muitakin sen rajoja rikkovia entsyymeitä, kuten GES-ryhmän (Guiana extended spectrum), joka voi hydrolysoida myös hitaasti karbapeneemejä. (Livermore 2008.)

Määritelmään on esitetty yhdistettävän omaksi ryhmäkseen myös ESBL-karbapenemaasit, johon kuuluisivat myös luokan B β -laktamaasit (metallo- β -laktamaasit) (Lee – Bae – Lee 2012). Samassa artikkelissa esiteltiin myös suppeampi määritelmä, johon kuuluisivat vain TEM- ja SHV-tyypeistä kehittyneet variantit β -laktamaasit ja *Klebsiella oxytogan* kromosomaalinen K1- β -laktamaasi.

ESBL-termiä käytettiin ensimmäisen kerran 1987 kuvaamaan oksyiminokefalosporiineja hydrolysoivia SHV- ja TEM-tyyppien entsyymeitä. Plamidivälitteiset SHV- ja TEM-geeniryhmien koodaamat β -laktamaasit olivat ensimmäisinä havaittuja laajakirjoisia β -

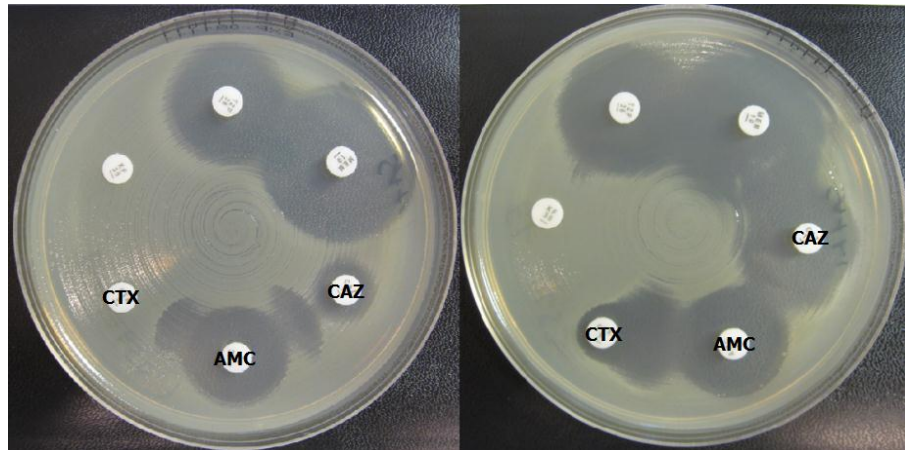
laktaamiantibiootteja hydrolysoivia entsyymejä. Termin määritelmään lisättiin pian myös laktamaasin estyminen klavulaanihapolla. Plasmidivälitteisten laajakirjoisten β -laktamaasien lisäksi siihen sisällytettiin *K. oxytoca*n kromosomaalinen K1- β -laktamaasi. (Livermore 2008.)

Oksyminokefalosporiineja hydrolysoivat TEM- ja SHV-mutantit, joiden toiminta estyy klavulaanihapolla, eivät kuitenkaan riittäneet ESBL:n määritelmäksi, sillä uusia samoja antibiootteja hydrolysoivia ja klavulaanihapolla estyviä entsyymeitä löydettiin erilaisella evolutiivisella taustalla. Näistä tärkeimpiä ovat CTX-M-, PER- ja VEB-ryhmät. VEB-geeniperhe on tärkeä etenkin Kaukoidässä. (Livermore 2008.)

SHV-1-geenin (sulfhydryl variable) alkuperänä pidetään *Klebsiella pneumoniae* -bakteerin kromosomaalista β -laktamaasia, mutta TEM-geenin varianttien tausta on edelleen selvittämättä. CTX-M-geeniperheen entsyymit ovat alun perin peräisin *Kluyvera*-suvun enterobakteerien kromosomaalisista geeneistä. (Lee – Bae – Lee 2012.)

3.4 Tunnistus antibioottikiikkoherkkyyssmenetelmällä

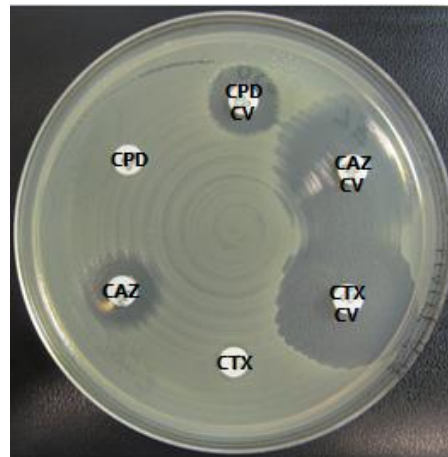
ESBL-kantojen tunnistus perustuu suurelta osin antibioottiherkkyyssmäärytyksiin, jossa tutkitaan kannan fenotyyppiä eli ilmiänsua. Klassiset ESBL-kannat tunnistetaan niiden antibioottikiikkoherkkyyssmäärytyksessä muodostamasta niin sanotusta ”pöllökuviosta” (clavulanate effect, klavulaanihappoinhibitio), joka perustuu klavulaanihappoantibiootin klassisia ESBL-entsyymejä inhiboivaan vaikutukseen. ESBL-bakteerin kasvu estyy amoksisilliini-klavulaanihappokiekon (AMC) lähellä, vaikka se muuten onkin resistentti keftatsidiimille (CAZ) ja kefotaksiimille (CTX). Kasvu estyy molempien kiekkojen yhteisellä vaikutusalueella, jossa klavulaanihappo inhiboi ESBL-entsyymin toiminnan. Ilmiö on esitetty kuviossa 3, jossa näkyy kaksi erilaista ESBL-substraattiprofiilia. Molemmissa näkyy entsyymin inhibitio klavulaanihapon vaikutusalueella.



Kuvio 3. Esimerkkejä ESBL-kannoille ominaisista "pöllökuvioista" AMC-antibiottikiekon ympärillä antibioottilherkkyysmäärityksessä. Kantojen herkkyyksissä kolmannen polven kefalosporiineille (kefotaksiimi, CTX ja keftatsidiimi, CAZ) näkyy myös eroja.

Vaihteleva *in vivo* -herkkyys on ongelmallista niiden ESBL-kantojen suhteen, jotka näyttävät olevan *in vitro* herkkiä joillekin β -laktaameille. Suomessa käytettävän EUCASTin (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) ohjeen mukaan ESBL-kannat tulee vastata herkkyysien mukaan tietyin poikkeuksin, mutta sairaalahygienisesti merkittävänä löydöksinä (EUCAST. 2012). Esimerkiksi HUSLABissa ESBL-kannat vastataan herkkyysmäärityksistä riippumatta resistentteinä (tai herkkyydeltään alentuneina) kaikille penisilliineille, kefalosporiineille ja monobaktaameille, koska hoitotulokset ovat kirjallisuuden perusteella usein huonoja *in vitro* -herkkyystestistä huolimatta (Kirveskari 2012).

EUCAST-standardiin ei kuulu ESBL-varmistustestejä ja tämän vuoksi sen herkkyysrajat ovat aiemmin käytössä olleita CLSI:n (Clinical Laboratory Standards Institute) standardin rajoja matalammat. Suomessa käytetään edelleen CLSI:n suosittelemaa kaksoiskiekkotestausta (tai kaksois-Etestiä) varmistustestinä epidemiologiseen seurantaan ja kantojen leviämisen estämiseen. (Kirveskari 2012.) Kaksoiskiekkotestissä ESBL-kantojen erotus perustuu siihen, että plasmidivälitteiset entsyymit inhiboituvat β -laktamaasi-inhibiittoreilla (klavulaanihapolla tai tatsobaktaamilla). Testillä saadaan selville, mikäli alentunut herkkyys kolmannen polven kefalosporiineille tai atsreonaamille johtuu klassisista ESBL-entsyymeistä. Bakteerin herkkyys kefotaksiimi- tai keftatsidiimi-klavulaanihappoyhdistelmille tulee olla standardin mukaan 5 mm suurempi kuin ilman klavulaanihappoa, kuten kuviossa 4.



Kuvio 4. Esimerkki ESBL-kannan herkkyyksistä kefpodoksiimille (CPD), keftatsidiimille (CAZ) ja kefotaksiimille (CTX) sekä niiden klavulaanihappoyhdistelmille (CV).

Terveyden ja hyvinvoinnin laitoksen (THL, 2011.) mukaan antibioottiherkkyysiin perustuvat ESBL-testit soveltuvat *E. coli*, *K. pneumoniae*, *K. oxytoca* ja *Proteus mirabilis* -kannoille ja myös salmonellakannoille (*Salmonella enterica* -bakteerin serotyypit), joilla tämän hetkisen tiedon perusteella ei ole kromosomaalista *ampC*-geeniä.

AmpC-tyyppinen β -laktamaasi ei inhiboidu klavulaanihapolla ja hydrolysoi myös kefoksitiinia, muttei kefepiimiä. Kromosomaalisena se ei aiheuta resistenssiä, mutta voi vapautua ja yliekspressoitua. Myös plasmidivälitteisenä sen tuotanto on runsasta, mistä seuraa resistenssiä. Inhiboitumattomien β -laktamaasien, kuten AmpC:n tuotto, voi peittää klassisen entsyymin tuoton alleen yhdistelmäkiekkotestissä. *Enterobacter*, *Citrobacter* ja *Serratia* spp. -lajien kromosomaalinen *ampC* voi vapautua ja hoidon edetessä alkaa aiheuttaa resistenssiä. (FiRe. 2009c; Kirveskari 2012.)

3.5 Esiintyminen Suomessa ja muualla

Kolmannen sukupolven kefalosporiineille herkkyydeltään alentuneet (I, intermediate) tai resistentit (R, resistant) *Escherichia coli* ja *Klebsiella pneumoniae* -löydökset on kirjattu tartuntatautirekisteriin vasta vuodesta 2008. Näistä suurin osa tuottaa ESBL-entsyymejä. (Hulkko ym. 2010.)

EARSS:n (European Antimicrobial Resistance Surveillance System) tilastojen mukaan kolmannen polven kefalosporiineille resistenttien kantojen osuus tutkituista *E. coli* -kannoista on kaikissa Euroopan maissa monikertaistunut vuodesta 2001. Keski- ja Etelä-Euroopassa monissa maissa yli 10 % tutkituista *E. coli* kannoista on kyseisille antibiooteille resistentti. (EARSS.) Näissä maissa ESBL-kantoja esiintyy endeemisenä, kuten useimmissa Euroopan, Aasian ja Etelä-Amerikan maissa. Esimerkiksi Yhdisvalloissa ESBL sen sijaan esiintyy satunnaisesti (sporadisena). (Cantón – Coque 2006.)

Yleisimmin maailmanlaajuisesti havaitut ESBL-entsyymit kuuluvat CTX-M-1-ryhmään, CTX-M-9-ryhmä (etenkin CTX-M-14) on yleinen Etelä-Euroopassa ja CTX-M-2-ryhmää esiintyy esimerkiksi Etelä-Amerikassa. (Cantón – Coque 2006.)

Suomessa ESBL-löydösten osuus näytteistä tutkituista kannoista kasvoi yli yhden prosentin vasta vuonna 2004. Salmonelloissa ei ilmennyt yhtään ESBL-tapausta vuonna 2000 ja vuonna 2009 lähes prosentti salmonelloista tuotti ESBL-entsyymejä (Hulkko ym. 2010). Uusia ESBL-löydöksiä oli vuonna 2010 HUS:n alueella 912. Vuonna 2009 sama luku oli 769. Suurin osa löydöksistä oli virtsanäytteistä, yleisimmin yli 65-vuotiailta ja naisilta. (Hulkko ym. 2011.)

Forsstenin (2010.) väitöskirjaan viittaavan THL:n raportin mukaan *E. coliella* etenkin tyyppin 1 CTX-M ja TEM-1 - β -laktamaasigeenien yhdistelmät ovat yleisiä Suomessa. Vain harvoilla *E. coliella* ilmeni tutkimuksen mukaan SHV-geenejä. Sen sijaan *K. pneumoniaella* SHV-tyyppejä oli noin 50 %:lla. Aiempaan verrattuna havaittiin muutosta lähinnä *K. pneumoniaen* geenipoolissa CTX-M-ryhmän suhteellisen määrän kasvuna. (Hulkko ym. 2011.)

3.6 ESBL-infektioiden hoito

ESBL-kantojen aiheuttamien infektioiden hoitoon käytetään karbapeneemejä, joita pidetään niin sanottuna viimeisenä oljenkortena. ESBL-kannoilla esiintyy usein resistenssiä β -laktamien lisäksi useille muille antibiooteille, kuten aminoglykosideille, tetrasykliineille ja sulfonamideille. Resistenssi leviää osin samojen R-plasmidien avulla. (Cantón – Coque 2006.)

ESBL-kantojen aiheuttamien infektioiden hoitoon voidaan käyttää antibioottiherkkyyسمääritysten mukaisesti tigesykliiniä, aminoglykosideja (kuten tobramysiini tai gentamisiini) tai sulfa-trimetopriimiä. Hoitoon on käytetty myös fluorokinoloneja (kuten siprofloksasiini, levofloksasiini), mutta näitäkin kohtaan esiintyy usein resistenssiä. Aiemman fluorokinolonihoidon on myös havaittu lisäävän riskiä saada ESBL-infektio. Virtsatieinfektioiden hoidossa voidaan käyttää esimerkiksi nitrofurantoiinia tai fosfomysiiniä. (Cantón – Coque 2006.)

On ehdotettu, että esimerkiksi bla_{CTX-M-9}-geenin ollessa kyseessä voitaisiin käyttää hoitona jotakin β -laktaamiantibioottia, jolle kanta on herkkä *in vitro* (Tärnberg ym. 2011; Winslow 2012). Molemmat viittaavat raportteihin tällaisista onnistuneista hoidoista ja Winslow:n koosteen mukaan kuolleisuudessa ei ole merkittävästi eroa hoidettaessa infektiota β -laktaami- β -laktamaasi-inhibiittori-yhdistelmällä tai karbapeneemeillä. Tutkimusten tulokset ovat kuitenkin ristiriitaisia, eikä käytännössä käytetä β -laktaamiantibiootteja ESBL-infektioiden hoidossa. Henkeä uhkaavissa infektioissa ei edellä mainittujen tutkimustenkaan mukaan ole järkevää lähteä kokeilemaan β -laktaami- β -laktamaasi-inhibiittori-yhdistelmää.

Eräässä tutkimuksessa (Ripoll ym. 2011.) oli saatu CTX-M ESBL-kanta *in vitro* mutatoitumaan resistentiksi β -laktamaasi-inhibiittoria kohtaan altistamalla sitä amoksisilliini-klavulaanihappoyhdistelmälle. Tutkimus antaa viitteitä siitä, että ESBL-kantojen altistaminen β -laktamaasi-inhibiittori- β -laktaamiyhdistelmälle voi saada ne kehittämään resistenssiä inhibiittoria kohtaan, jolloin antibioottihoito epäonnistuu.

Suomessa tilanne on toistaiseksi hyvä ja ESBL-infektioiden hoitoon löytyy yleensä toimiva antibiootti. Suun kautta otettavista antibiooteista ei ole tosin aina löytynyt sopivaa vaan on jouduttu turvautumaan suonensisäisiin antibiootteihin. (THL. 2011.)

4 Työssä käytetyt menetelmät

PCR (polymerase chain reaction) eli polymeerasiketjureaktio on yli 20 vuotta sitten kehitetty molekyylibiologian menetelmä, jolla saadaan syklisesti monistettua spesifisten

alukkeiden ja polymeerasientsyymien avulla haluttu geenisekvenssi (James 2010). Menetelmän avulla saadaan muutamassa tunnissa jopa miljardikertaistettua tutkitun sekvenssin määrä eristetystä DNA:sta (deoxyribonucleic acid, deoksiribonukleiinihappo) (Madigan ym. 2009: 324–326). Opinnäytetyössäni käytän perinteistä PCR:ää bakteerikantojen resistenssigeenien selvittämiseen eli niiden genotyypin kartoittamiseen tutkittujen geenien suhteen.

4.1 DNA:n eristys

PCR:n teko alkaa nukleiinihappojen eristyksellä tutkittavasta näytteestä. DNA voidaan eristää monella tavalla (silikageeli, kaupalliset eristyspaketit, automatisoidut järjestelmät, mekaaninen tai kemiallinen solujen hajotus). Menetelmä valitaan halutun nukleiinihapon (RNA, DNA) perusteella siten, että tuote voidaan suoraan monistaa PCR:llä. Menetelmän on oltava nopea ja yksinkertainen ja vähentää PCR:ää inhiboivien tekijöiden vaikutusta (hisonit, lipidit, surfaktantit, sappihapot, hemi- ja muut proteiinit). Eristettyä DNA:ta tulee säilyttää alle -20 °C:ssa hieman emäksisissä oloissa (kuten TE-puskurissa), sillä hapan ympäristö voi hydrolysoida sitä. (Carter – Halliday – Sloots 2010.)

Viljeltyjen bakteerikantojen kohdalla käytetään yleensä yksinkertaisesti niin sanottua keittämistä. Menetelmässä bakteerimassaa siirrostetaan aseptisesti yhdestä pesäkkeestä puskuriin (esimerkiksi TE, Tris-EDTA) ja suspensiota kuumennetaan lämpöhauteessa 10–15 minuuttia 100 °C:ssa. Suspensio sentrifugoidaan, jolloin DNA jää supernatanttiin ja hajonneet bakteerisolut painuvat pohjalle. Gramnegatiivisilla sauvabakteereilla yhden pesäkkeen oletetaan muodostuneen alkujaan vain yhdestä jakautuneesta bakteerisolusta, joten suspensioon saadaan geneettisesti identtisiä bakteerisoluja. Menetelmän etuna on helppouden lisäksi myös se, että se inaktivoi patogeenejä. Keittämällä saadun DNA:n puhtausaste ja määrä vaihtelevat. (Carter ym. 2010.)

4.2 Polymeerasiketjureaktio

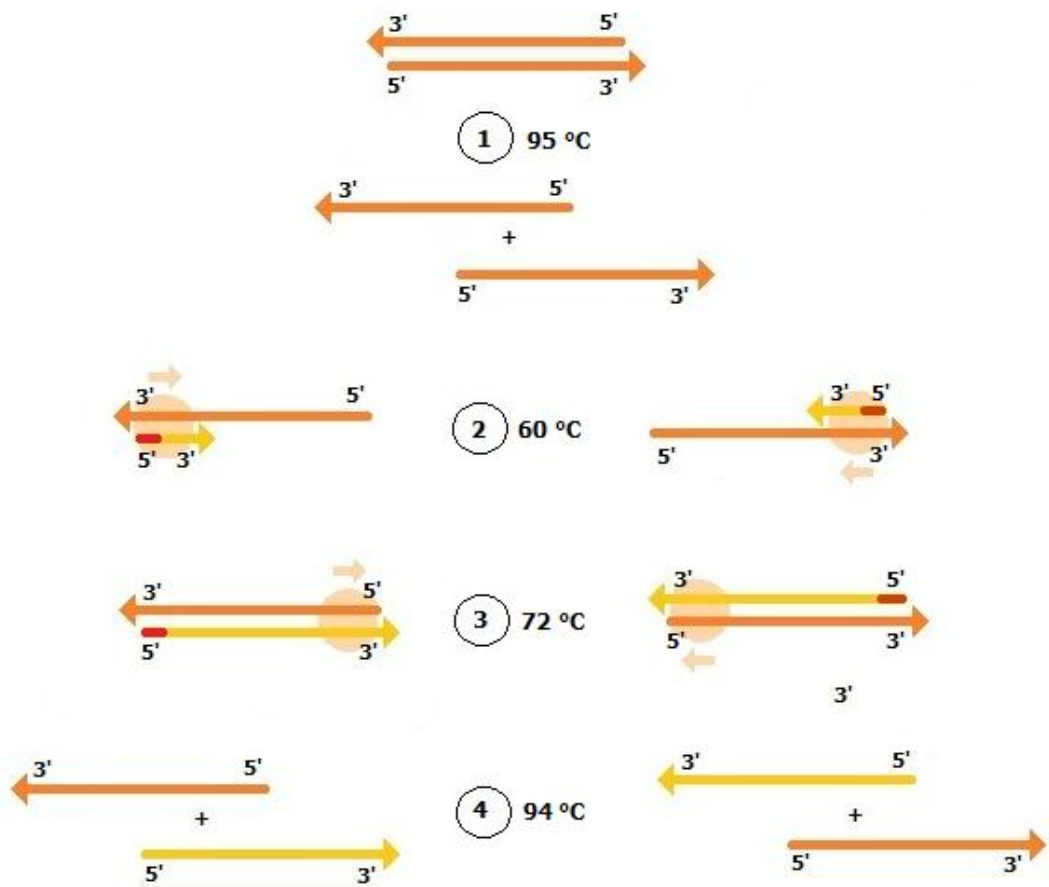
PCR-menetelmässä tutkittavan geenisekvenssin monistamista kutsutaan amplifikaatioksi. Näytteestä eristetty kaksijuosteinen DNA denaturoidaan

yksijuosteiseksi (alkudenaturaatio) ja komplementaariset alukkeet (*forward* ja *reverse*) kiinnittyvät syntyneisiin juosteisiin rajaamaan monistettavaa aluetta (liittymis- eli annealing-vaihe). Alukkeiden välinen etäisyys kohdegeenissä määrittää monistustuotteen pituuden emäspareina (bp). DNA-polymeraasientsyymi alkaa muodostaa reaktioseoksen sisältämistä deoksinukleotideistä (dATP, dCTP, dGTP ja dTTP) komplementaarista juostetta alukkeiden väliin jäävästä sekvenssistä. Polymeraasi etenee 3' → 5' -suuntaan (pidentymis- eli elongaatiovaihe). Eristetyn DNA:n molemmat juosteet toimivat templaattina muodostuvalle DNA:lle. (Madigan ym. 2009: 324–326; Jeffery – Booth – Myint 1999: 17–21; Kirveskari 2012.)

Riittävän inkuboinnin jälkeen muodostuneet DNA-kaksoisjuosteet jälleen denaturoidaan (alkudenaturaatiota lyhyemmän ajan). Alukkeet kiinnittyvät uudelleen komplementaarisesti juosteisiin lämpötilaa laskettaessa ja lämpötilaa nostettaessa polymeraasientsyymi syntetisoi jälleen uudet juosteet. Sykli toistetaan yleensä jopa kymmeniä kertoja, kunnes tuotetta on syntynyt riittävästi tunnistusta varten. Ihanneolosuhteissa templaatti-DNA:n määrä kaksinkertaistuu jokaisella kerralla, sillä muodostunut DNA toimii templaattina seuraavissa sykleissä. Viimeisen syklin inkubaatioaika voi tarvittaessa olla pidempi, jotta kaikki juosteet täydentyvät loppuun asti (loppuelongaatio). (Madigan ym. 2009: 324–326; Jeffery ym. 1999: 17–21.) Kuviossa 5 on esitetty polymeraasiketjureaktion eteneminen kaavamaisesti.

Toistettavien vaiheiden vuoksi PCR-ohjelmien automatisointi on helppoa. Ketjureaktio tapahtuu PCR-monistuslaitteessa (*thermocycler*) pienissä putkissa, joiden lämpötilaa laite säätää Peltier-elementin avulla sähköisesti. PCR-laitteeseen on mahdollista säätää inkubointiaikoja kussakin lämpötilassa. (Madigan ym. 2009: 324–326.)

Ketjureaktio saadaan aikaan lämpötilaoloja muuttamalla, joten polymeraasientsyymien tulee kestää DNA:n denaturaatioon tarvittavia lämpötiloja (jopa 95 °C). Tämän vuoksi yleisesti käytetään *Thermophilus aquaticus* -bakteerista eristettyä hyvin lämpöstabiliia DNA-polymeraasia (*Taq*-polymeraasi), joka kestää käytetyt lämpötilat. Entsyymien toiminnalle optimaalinen lämpötila on 72 °C. (Jeffery ym. 1999: 17–21.) *Taq*-entsyymi tuotetaan nykyisin *E. coli* -bakteereissa, joihin entsyymiä koodaava geeni on kloonattu (Madigan ym. 2009: 324–326).



Kuvio 5. Polymeraasiketjureaktiosyklin yksinkertaistettu periaate: Templaatti-DNA (oranssi) denaturoidaan yksijuosteiseksi (1), jota seuraavan sitoutumisvaiheen aikana alukkeet (punainen ja ruskea) kiinnittyvät siihen spesifisesti (2). Pidennysvaiheen aikana polymeerasientsyymi (vaaleanpunainen ympyrä) alkaa muodostaa komplementaarista vastinjuostetta nuolen suuntaan, jolloin syntyvä juoste on kuvattu keltaisella (3). Seuraavan denaturaatiovaiheen aikana juosteet vapautuvat yksijuosteisiksi (4) ja sykli alkaa kohdasta 2. Myös juuri muodostuneet juosteet toimivat templaattina uusille juosteille. (Madiganin ym. (2009: 342.) ja Jeffery ym. (1999: 19.) mukaan.)

Alukkeiden epäspesifinen sitoutuminen on epätodennäköisempää riittävän korkeissa lämpötiloissa, jolloin tuotteena saadaan puhtaampaa DNA:ta. Korkea lämpötila auttaa myös pitämään templaatin yksijuosteisena. Alukkeita tulee olla ainakin kymmenkertainen ylimäärä suhteessa templaatti-DNA:n määrään, jotta juosteet kiinnittyvät todennäköisemmin niihin kuin toisiinsa viilennettäessä. (Madigan ym. 2009: 324–326.)

4.3 Agaroosigeelielektroforeesi

PCR:llä monistetut geenituotteet erotellaan ja detektoidaan perinteisesti geelielektroforeesilla. Elektroforeesi perustuu negatiivisesti varautuneen DNA:n kulkeutumiseen sähkövirrassa kohti positiivista varausta. Kulkeutumisenopeus riippuu monistustuotteen koosta ja varauksesta siten, että suuremmat ja vähemmän varautuneet kappaleet kulkevat kentässä hitaammin. (Madigan 2009: 315.)

Geelielektroforeesissa monistustuotteet kulkeutuvat huokoisessa agaroosigeelissä, jonka tiheys eli agaroosin määrä valitaan eroteltavien monistustuotteiden koon mukaan. Mitä tiheämpi geeli sitä hitaammin monistustuotteet liikkuvat ja sitä pienempiä monistustuotteita voidaan erotella. DNA havaitaan agariin lisätyn fluorokromin avulla. Esimerkiksi etidiumbromidi sitoutuu kaksijuosteiseen DNA:han ja fluoresoi UV-valossa. Geelistä otetaan kuva UV-valossa tulosten tulkintaa varten. (Lewis 2001.)

Näytteet pipetoidaan geelillä olevaan kuoppariviin eli kaivoihin sekoitettuna latauspuskuriin (*loading buffer*), jonka sisältämän glyserolin ansiosta näyte painuu kaivon pohjalle. Latauspuskurissa on myös väriainetta, joka kulkeutuu virran ollessa päällä DNA:n kanssa samaan suuntaan. Väriaine helpottaa pipetointia ja visualisoi näytteen kulun geelillä elektroforeesin aikana. Geelille pipetoidaan näytteiden ja kontrollien lisäksi molekyylipainomarkkeria. Markkerin sisältämien molekyylien koot tunnetaan ja niihin voidaan verrata tutkittavia monistustuotteita. (Lewis 2001.)

4.4 Multiplex PCR

Multiplex PCR menetelmä on esitelty vuonna 1988 (Chamberlain ym.), jolloin sen käyttökohteena oli sikiödiagnostiikassa useiden mutaatioiden yhtäaikainen tutkiminen rajoitetusta näytemäärästä. Multiplex PCR:n avulla voidaan samasta näytteestä monistaa jopa kymmeniä tutkittavia geenisekvenssejä yhtäaikaaisesti samassa reaktioputkessa käyttämällä useita eri alukkeita (Stanford Office of Technology Licensing 2008). Monistustuotteet on suunniteltava eripituisiksi, jotta ne voidaan erotella geeliagaroosielektroforeesilla (DNA Software). Monistustuotteet voidaan myös sekvensoida, jos niiden koot ovat lähellä toisiaan. (Jeffery ym. 1999: 17–21.)

Sopivien alukkeiden suunnittelu on vaativaa, sillä ne eivät saa hybridisoitua keskenään tai vääriin kohtiin templaatti-DNA:ssa (DNA Software). Mitä enemmän alukkeita samassa reaktiossa käytetään, sitä todennäköisemmin seuraa epäspesifistä monistumista. Toisaalta multiplexin käyttö vähentää reagenssien ja näytteen kulutusta, sillä useita geenejä voidaan tutkia samasta määrästä DNA:ta. (Stanford Office of Technology Licensing 2008.)

4.5 Kontaminaatio PCR:n virhelähteenä

PCR-työn tekemisessä on tärkeää välttää kontaminaatioita näytteeseen kuulumattomalla DNA:lla kaikissa vaiheissa ennen DNA:n monistusta, sillä pienikin määrä vierasta DNA:ta voi monistua PCR:n aikana ja tuottaa virheellisen tuloksen (James 2010). Kontaminaatioilta vältytään käyttämällä suojavaatetusta. Reagenssit pipetoidaan erillisessä puhdashuoneessa, jolloin suojavaatetuksen tarkoituksena on, että mahdollisimmat vähän DNA:ta pääsisi tilaan ja reagenssit pysyisivät puhtaina. Templaattihuoneessa, jossa eristetty DNA lisätään reaktioseokseen, pyritään suojavaatetuksella estämään ympäristöstä tulevien kontaminaatioiden pääsy reaktioseoksiin. Huolellisella pipetoinnilla varmistetaan, että eristetty DNA päätyy oikeaan putkeen.

Suojavaatetuksen käytöllä PCR-monistuksen jälkeen (detektiovaiheessa) pyritään välttämään moninkertaiseksi monistetun DNA:n kulkeutuminen muihin tiloihin ja myös suojaudutaan elektroforeesissa käytetyiltä kemikaaleilta. Etidiumbromidi on terveydelle haitallista nieltynä, erittäin myrkyllistä hengitettynä ja ärsyttää silmiä, hengityselimiä ja ihoa. Se aiheuttaa myös pysyvien vaurioiden vaaran, joten suojavaatetusta ja -käsineitä on käytettävä sitä käsiteltäessä. (Käyttöturvallisuustiedote. 2011.)

5 Tutkimusasetelma

5.1 Työtä ohjaavat kysymykset

Opinnäytetyöni tarkoituksena on kartoittaa ESBL-kannoilla esiintyviä laajakirjoisia β -laktamaasigeenejä ja saada yleiskuva siitä, millaisia geenejä ja geeniyhdistelmiä HUS:n alueella ESBL-kannoissa ilmenee tutkittuna ajanjaksona. Osalla käytetyistä alukkeista on mahdollista havaita myös kapeakirjoisempia β -laktamaaseja tai hitaita karbapenemaaseja koodaavia geenejä. Käytetty menetelmä kattaa tunnetuimmat ESBL-geenit.

Aineistona käytän ESBLVi-tutkimuspyynnöllä HUSLAB:n bakteriologian laboratorioon tiettyinä ajanjaksona tulleista näytteistä eristettyjä ESBL-kantoja. Kannat tunnistetaan viljelydiagnostiikalla, jossa näytteet viljellään kromogeenisille selektiivisille maljoille ja kantojen antibioottiherkkydet määritetään antibioottikielkoherkkyysmenetelmällä. (HUSLAB-tutkimusohjekirja. 2012.) Työssäni selvitän, millaisia genotyyppisiä rutiinidiagnostiikan menetelmillä löytyvillä ESBL-kannoilla on. Tarkastelen työssäni genotyyppien jakaumaa näiden näytteiden osalta ja vertailen saatuja tuloksia muissa tutkimuksissa havaittuihin jakaumiin.

Saan käyttööni kantojen antibioottiherkkydet estorenkain halkaisijoina. Vertailen työssäni eri genotyyppien eroja antibioottiherkkyksissä. Esittelen muissa tutkimuksissa havaittuja eroja ja pyrin oman aineistoni pohjalta tekemään havaintoja genotyyppien ja havaitun antibioottiherkkyden, fenotyyppien, välisestä korrelaatiosta.

Opinnäytteeni pyrkii vastaamaan seuraaviin kysymyksiin:

- I. Millaisia genotyyppisiä rutiinidiagnostiikalla tunnistetuilla ESBL-kannoilla esiintyy tutkimusajankohtana?
- II. Millä tavalla genotyyppien jakauma vastaa muissa tutkimuksissa havaittuja jakaumia?
- III. Havaitaanko genotyyppien ja bakteerin antibioottiherkkyden välillä yhteyksiä?

5.2 Projektin muut tavoitteet

Tein opinnäytetyöni osana laboratorion omaa projektia, jonka yhtenä tavoitteena on kehittää reaaliaikainen CTX-M-ryhmien geenit tunnistava multiplex PCR -menetelmä, jota voidaan mahdollisesti tehdä myös suoraan näytteestä. Opinnäytetyöni tulokset toimivat kehittäessä referenssimateriaalina, sillä eri menetelmillä samasta aineistosta saatuja tuloksia voidaan verrata toisiinsa. Projektissa pyritään arvioimaan myös nestemäisen rikasteputken tuomaa hyötyä viljelymenetelmän osana verrattuna laboratorion käyttämään menetelmään. Osallistun projektin näihin osioihin esikäsittämällä yhteisiä näytteitä ja viljelemällä rikasteputket. Opinnäytetyöni tuloksia voidaan hyödyntää myös epidemiatilanteissa kantojen klonalisuuden selvittämisessä.

5.3 Aikaisemmat tutkimukset

ESBL multiplex PCR:n esitelteen artikkelin (Dallenne ym. 2010) perusteella tuloksena on odotettavissa myös kantoja, joilla on yhtä aikaa useampi ESBL-geeni. Näissä tapauksissa bakteerilla oli artikkelin tutkimuksessa yleensä jokin perinteinen ESBL-geeni, kuten SHV tai CTX-M-1, ja jokin plasmidivälitteinen *ampC*, kuten DHA-1. Toisinaan kannalla saattoi olla jopa kolme ESBL-geeniä. Yleisimmät artikkelissa löydetty geenit kuuluivat CTX-M-1-ryhmään (näistä esiintyi etenkin *bla*_{CTX-M-15}-geeniä). Muut havaitut ESBL-geenit kuuluivat ryhmiin CTX-M-9, TEM, SHV ja harvinaisimpana VEB. Yleisin AmpC β-laktamaasi oli DHA-1.

Artikkelin tutkimus oli tehty Ranskassa, joten tulokset eivät ole suoraan rinnastettavissa, vaikka tutkittujen näytteiden määrät ovat samassa mittaluokassa. Maana Ranska kuuluu korkeamman ESBL-esiintyvyyden alueelle, jolla ESBL-kantojen osuus on yli 5 % (EARSS.), mikä voi näkyä myös geenien jakautumisessa.

Tuoreen väitöskirjan (Forssten 2010: 48.) osatutkimuksessa tutkittiin Helsingin alueella laboratoriossa ESBL-kannoiksi tunnistettuja kantoja vuosina 2000–2004. Tutkimuksessa jokin CTX-M β-laktamaasi oli 94,3 %:lla *E. coli* (n=33) ja TEM-CTX-M-yhdistelmä 69,7 %:lla (n=23). Forsstenin tutkimuksessa CTX-M-kannat jakoutuivat siten, että CTX-M ESBL *E. coli* ryhmään 1 kuului 84,8 % (n=28) ja ryhmään 9 9,1 % (n=3), kun

yhdellä kannalla oli molemmat geenit ja määrittelemättömiä CTX-M-ryhmän geenejä oli 9,1 %:lla (n=3).

Antibioottiherkkyyshmääritysten tuloksien vertailua genotyyppiin on myös tutkittu, mutta tulokset ovat ristiriitaisia. Esimerkiksi Tärnberg ym. (2011) ovat tutkineet laajasti β -laktaamiantibioottien tehokkuutta *in vitro* CTX-M ESBL *E. coli* -kantoihin (n=198). Tutkimuksen perusteella CTX-M-ryhmän 9 kannat olivat herkempiä β -laktaamiantibiooteille kuin CTX-M-ryhmän 1 kannat. Yli 90 % ryhmän 9 kannoista oli herkkiä keftatsidiimille, amoksisilliini-klavulaanihappoyhdistelmälle ja piperasilliini-tatsobaktaamiyhdistelmälle.

Eräessä Kiinassa tehdyssä tutkimuksessa (Wang ym. 2011.) CTX-M-kantojen havaittiin hydrolysoivan yleensä paremmin kefotaksiimia ja keftriaksonia ja huonommin keftatsidiimia. Australialaisessa tutkimuksessa (Ellem – Patridge – Iredell 2011.) havaittiin, että genotyypistä voidaan päätellä paljon kannan fenotyypistä. Myös tässä havaittiin ryhmän 9 CTX-M-kannat herkemmäksi. Ne eivät juurikaan hydrolysoineet keftatsidiimia ja olivat myös tobramysiinin suhteen herkempiä (57 % herkkiä, n=54). CTX-M-1-ryhmän kannat olivat resistenttejä keftatsidiimille ja vain 24,9 % (n=62) oli herkkiä tobramysiinille.

6 Työn suoritus

Kantojen ESBL-geenit tunnistettiin multiplex PCR:llä mukaillen Dallennen ym. (2010) artikkelissa kuvailmaa menetelmää. Käytetyillä multiplex PCR-alukkeilla voitiin tunnistaa yleisimpien laajakirjoisten ja kapeakirjoisempien β -laktamaasien sekä joidenkin karbapenemaasien geenit. Jokaisesta näytteestä geenit tutkittiin viidellä PCR-reaktiolla, käyttäen neljää multiplex-alukepariseosta ja yhtä simplex-alukeparia. Geenien monistus tehtiin käyttäen perinteistä PCR:ää ja monistustuotteiden detektointi käyttäen agarosigeelielektroforeesia.

6.1 Aineiston keruu

Tutkittavat kannat kerättiin viikkojen 45–47 aikana ESBLVi-tutkimuspyynnöllä HUSLABin bakteriologian laboratorioon tulleista näytteistä. Kaikki herkkyysmääritysten perusteella ESBL-entsyymin tuottajiksi tai kolmannen polven kefalosporiineille resistenteiksi tunnistetut kannat otettiin analysoitaviksi kuitenkin siten, että saman potilaan samana päivänä otetuista näytteistä otettiin huomioon vain yksi. Kolmen viikon aikana näytteitä kertyi yhteensä noin 360, joista löytyi kaikkiaan 38 ESBL-kantaa.

Kannat tunnistettiin ESBL-kannoiksi EUCAST-standardin mukaan sovelletulla antibioottikielloherkkyysmenetelmällä ja tarvittaessa kaksoiskiellotestauksella. Kantojen lajinmääritys perustui *E. coli*-kantojen osalta HUSLABin omiin sokerisarjoihin, muut kannat tunnistettiin joko VITEK2-laitteen GN-kortilla tai tarvittaessa API-testeillä.

6.2 PCR:n teko

Kannoista tehtiin suspensio yhdestä pesäkkeestä 100ul:aan TE-puskuria, jota kuumennettiin 15 minuuttia lämpöhauteella (100 °C). Suspensio sentrifugoitiin 13 000 rpm kahden minuutin ajan, jonka jälkeen 50 µl supernatanttia pipetoitiin uuteen putkeen. Pipetointeja varten täytin pipetointikaavion, jonka avulla reagenssien määrät laskettiin ja näytteiden järjestys säilyi myös työn myöhemmissä vaiheissa, vaikka putkiin ei enää voitukaan merkitä näytenumeroita. Käyttämäni pipetointikaavion pohja on esitelty liitteessä 2.

PCR-reaktioseokset pipetoitiin puhdashuoneessa pipetointikaavioon laskettujen määrien mukaisesti ja jaettiin reaktioputkiin (24 µl/putki). PCR:ssä käytettiin Qiagenin 2x Quantitect® Multiplex PCR NoROX Mastermixiä, joka sisältää polymeerasiketjureaktiossa tarvittavat deoksinukleotidit (dNTP), polymeerasientsyymien (HotStarTaq DNA Polymerase) ja muut reaktiossa tarvittavat aineet (puskurin ja Mg²⁺-kationit). (Qiagen. 2011.)

Templaatti-DNA:ta (näytteistä eristettyjä kantoja ja kontrollikantoja) lisättiin reaktioputkiin 1µl templaattihuoneessa pipetointikaavion mukaisesti. Templaatti-

reaktioseos-putket siirrettiin monistuslaitteeseen (Tetrad 2 tai MJ Research PTL-200, Peltier thermal cycler), jossa DNA:n monistuminen tapahtuu ohjelmoidusti (2h 15 min). Käytetty PCR-ohjelma on esitetty taulukossa 1.

Taulukko 1. Multiplex PCR-monistusohjelma.

Vaihe	Lämpötila (°C)	Aika
1. Alkudenaturaatio	95	14 min
2. Denaturaatio	94	1 min
3. Annealing	60	15 s
4. Elongaatio	72	1 min 25 s
5. 29 sykliä vaiheita 2–4		
6. Loppuelongaatio	72	7 min
Kokonaiskesto		2 h 15 min

Monistustuotteet eroteltiin tehdasvalmiissa 12+1-kaivoisissa Lonza FlashGel™ DNA Cassette (2,2 %) -agaroosigeelissä ja detektoitiin geelin sisältämän väriaineen avulla (etidumbromidi). Käytetty geeli erottelee 10 bp – 1 kbp -kokoisia monistustuotteita (Lonza. 2011b). Geelistä otettiin kuva UV-valossa ja tulokset analysoitiin kuvasta. Ennen pipetointia geelille 4 µl monistustuotetta sekoitettiin 1 µl:aan latauspuskuriä (FlashGel™ Loading Dye). Monistustuote-latauspuskuri-seosta pipetoitiin kuhunkin kaivoon 2 µl. Geelin ensimmäiseen kaivoon pipetoitiin 1 µl tunnettua molekyylipainomarkkeria (FlashGel™ DNA Marker, 50–1500 bp). Elektroforeesin asetukset näkyvät pipetointikaavion lopussa (liite 2).

6.3 Käytetyt multiplex PCR-alukkeet ja kontrollit

Käytin työssäni neljää multiplex PCR-reaktiota ja yhtä simplex-alukeparia eli yhteensä 15 eri alukeparia. Niiden avulla voitiin tunnistaa yhdestä näytteestä viidellä reaktiolla yhteensä 74 eri geeniä. Esimerkiksi CIT-alukkeilla saadaan monistettua LAT, BIL ja CMY -geeniperheiden geenejä. Taulukossa 2 on kuvattu kaikki käytetyt alukkeet, niiden tunnistamat geenit geeniperheittäin ja niillä saatavien monistustuotteiden koot. Käytettyjen alukkeiden tarkat sekvenssit löytyvät liitteestä 3.

Työssäni genotyypit kartoitettiin geeniryhmien tasolle, vaikka joillakin alukkeilla oli mahdollista tunnistaa tutkittu geeni yksittäisen geenin tasolle. Esimerkiksi TSO-S-alukkeilla monistuu ainoastaan *bla*_{SHV-1}-geeni. Sen sijaan CTX-M-1-ryhmän alukkeet monistavat *bla*_{CTX-M-1}, *bla*_{CTX-M-3} ja *bla*_{CTX-M-15} -geenejä, joten niillä saatavasta monistustuotteesta ei voitu suoraan tietää kannalla todella ollutta geeniä.

Taulukko 2. Työssä käytetyt PCR-reaktiot (multiplexit) ja niillä monistuvien tuotteiden koot (Dallenne ym. 2010).

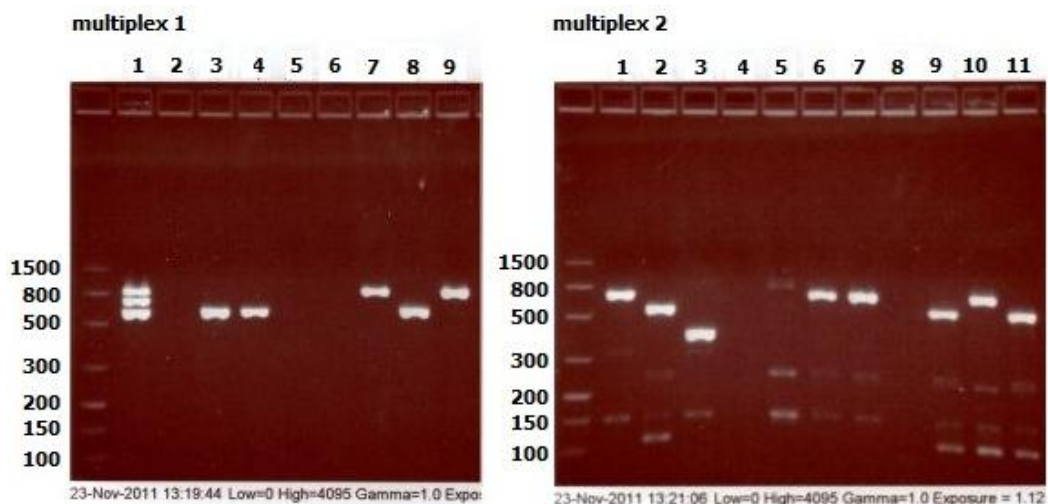
Alukkeet	Monistuvat geenit	Koko (bp)	
Multiplex 1	TSO-T	TEM-1/2	800
	TSO-S	SHV-1	713
	TSO-O	OXA-1/4/30	564
Multiplex 2	CTXMGp1	CTX-M-1/3/15	688
	CTXMGp2	CTX-M-2	404
	CTXMGp9	CTX-M-9/14	561
Simplex	CTXMGp 8/25	CTX-M-8/25/26/39...41	326
Multiplex 3	ACC	ACC-1/2	346
	FOX	FOX-1...5	162
	MOX	MOX-1/2, CMY-1, CMY-8...11, CMY-19	895
	DHA	DHA-1/2	997
	CIT	LAT-1...3, BIL-1, CMY-2...7, CMY-12...18, CMY-21...23	538
	EBC	ACT-1, MIR-1	683
	Multiplex 4	GES	GES-1...9/11
PER		OXA-48	281
VEB		VEB-1...6	648

Kuviossa 6 on esitetty eräs käytetyllä multiplex PCR -menetelmällä saatu viivajakaumakuviokuva. Näytteille saadaan tulokset vertailemalla niistä saatuja monistustuotteita kontrollikantojen tuloksiin. Käytössä oli kontrollit seuraaville alukkeille: TEM, SHV, OXA-1, CTX-M-ryhmät 1, 9, 2 ja 8, DHA, CIT, GES, VEB ja PER. Taulukossa 3 on esitetty käytetyt kontrollikannat.

Taulukko 3. Työssä käytetyt kontrollikannat.

Bakteeri	β-laktamaasigeenit
<i>K. pneumoniae</i>	TEM, SHV, OXA-1, CTX-M-1 -ryhmä
<i>E. coli</i>	CTX-M-9 -ryhmä
<i>K. pneumoniae</i>	CTX-M-2 -ryhmä
<i>K. pneumoniae</i>	CTX-M-8 -ryhmä
<i>E. coli</i>	DHA, CIT
<i>K. pneumoniae</i>	GES
<i>P. aeruginosa</i>	VEB
<i>Acinetobacter baumannii</i>	PER

Koska kaikille alukkeilla monistuville sekvensseille ei ole kontrollia, jouduttiin muissa kohdissa näkyvien monistustuotteiden kokoja vertaamaan odotettuihin monistustuotteiden kokoihin molekyylipainomarkkerin avulla. Molekyylipainomarkkeri (FlashGel™ DNA Marker) sisältää kahdeksan erikokoista molekyyliä, joiden koot olivat 50, 100, 150, 200, 300, 500, 800 ja 1500 bp (Lonza. 2011a).



Kuvio 6. Esimerkki multiplex-PCR geielektroforeesin geelikuvasta. Multiplex 1: näytteet 3, 4 ja 8 OXA-positiivisia *E. coli* -kantoja, näytteet 7 ja 9 TEM-positiivisia *E. coli* -kantoja. Multiplex 2: näytteet 6, 7 ja 10 CTX-M-1-positiivisia *E. coli* -kantoja ja näytteet 9 ja 11 CTX-M-9-positiivisia *E. coli* -kantoja. Positiiviset kontrollit 1 (MP1) ja 1-3 (MP2). Negatiivinen vesikontrolli kohdissa 2 (MP1) ja 4 (MP2). Vasemmanpuolimmaisina molemmissa geeleissä nähdään DNA-molekyylipainomarkkeri, koot emäspareja (bp).

Vesi- eli nollakontrollilla kontrolloidaan reagenssien ja työprosessin puhtautta. PCR-reaktion aikana siinä ei tule monistua mitään DNA:ta. Positiivisia kontrollikantoja käsiteltiin näytteiden tavoin ja niiden avulla saadaan varmistettua koko PCR:n ja alukkeiden toimivuus. Positiiviset kontrollikannat pipetoitiin aina viimeisenä reaktioputkiin, jotta välttyttiin vääriä positiivisilta tuloksilta tutkittavissa näytteissä. ESBL multiplex -menetelmän alukkeet ovat hyvin spesifisiä, joten se ei ole muuten herkkä ympäristön kontaminaatioille.

6.4 Tulosten tulkinta ja käsittely

Tulokset olivat kunkin geenin osalta yksiselitteiset, joko kannalla on geeni tai ei ole sitä, joten kyse on luokitteluasteikollisista muuttujista. Tulosten tulkinnassa jouduin

luopumaan ajatuksesta tehdä tuloksille tilastollista käsittelyä, sillä tilastollisten testien vaatimukset eivät täytyneet. Luokitteluasteikollisille muuttujille tehtävien testien edellytyksenä on esimerkiksi yli 50 havaintoyksikön otoskoko. (Kankkunen – Vehviläinen-Julkunen. 2009: 112–116). Käytin työssäni ristiintaulukointia määrien vertailuun. Ristiintaulukoimalla sain helpoiten selville, millaisia geeniyhdistelmiä tuloksissa esiintyy ja millä frekvensseillä.

Kantojen antibioottiherkkydet annetaan kunkin antibiootin osalta estoreenkaan halkaisijana millimetreissä eli jatkuvana muuttujana. Luokittelin tulokset kuitenkin vertailtavuuden vuoksi HUSLABin käyttämien antibioottiherkkyysrajojen avulla kolmeen ryhmään (S, I ja R). Antibioottiherkkyysmäärittelyksen rajat on taulukoitu liitteessä 1. Vertailin antibiogrammoja lähinnä kahden merkittävimmän geeniryhmän (*bla*_{CTX-M-1} ja *bla*_{CTX-M-9}) kesken keskiarvojen ja eri luokkien frekvenssien avulla. Lopulliset tulokset muodostuivat osin kvalitatiivisen arvioinnin pohjalta, etenkin sellaisten geeniryhmien osalta, joissa esiintyi vain yksittäisiä havaintoja. Käytin tulosten analysoinnissa PASW 18 -tilasto-ohjelmaa ristiintaulukointiin ja Excel-taulukkolaskentaohjelmaa frekvenssien ja muiden tunnuslukujen laskemiseen. Kaikki tulokset on esitetty liitteessä 4.

7 Tulokset

7.1 Kantojen genotyyppien jakauma

Käsittelin kolmen viikon aikana yhteensä 360 näytettä 213:sta eri potilaasta. Näistä ESBL-kanta löytyi 35 potilaan näytteistä (16,4 %). Näiden potilaiden keskimääräinen ikä oli 64 vuotta (mediaani=66 vuotta, n=35). Potilaista 77 % oli naisia (n=27), joiden ikä oli keskimäärin 66 vuotta. Potilaiden taustatiedot on kuvattu taulukossa 4, josta nähdään miesten pienempi osuus kantajissa ja keskimäärin nuorempi ikä. Aineiston keräysajankohtana ESBL-viljelyssä positiivisista näytteistä noin 70 % oli ulostenäytteitä (n=27). Virtsa- ja rektumnäytteitä oli molempia noin 15 % (n=6) ESBL-viljelyssä positiivisista näytteistä.

Taulukko 4. Taustatiedot (ikä ja sukupuoli) potilaista, joiden ESBLVi-pyynnöllä keräyksen aikana HUSLABn bakteriologian laboratorioon tullut bakteeriviljelynäyte oli ESBL-viljelyssä positiivinen.

Sukupuoli	Frekvenssi	%	Ikä (vuosina) keskiarvo	Ikä (vuosina) mediaani
Naiset	27	77,1	65,8	66
Miehet	8	22,9	59,3	58
Kaikki	35	100,0	64,3	66

Yhteensä 33 erilaista ESBL *E. coli* -kantaa löytyi 32 potilaalta ja yhteensä 38 ESBL *E. colin* genotyypit analysoitiin. Analysoiduista viisi kantaa oli saman potilaan eri päivänä otetusta näytteestä tehtyjä löydöksiä, joilla oli myös sama genotyyppi kuin muilla saman potilaan näytteistä eristetyillä kannoilla. Tuloksissa olen ottanut huomioon kunkin potilaan löydöksistä vain yhden ESBL-kannan, jos niiden genotyypit ovat olleet identtiset.

Muita ESBL-enterobakteereja löytyi neljä, joista kahdella *K. pneumoniae* -kannalla havaittiin TEM, SHV ja CTX-M-1 -ryhmien geenit. Muista löydöksistä toinen kuului *Proteus*-sukuun ja toinen *K. oxytoca* -lajiin, mutta näillä ei havaittu mitään tutkituista ESBL-geeneistä. Löydökset oli kuitenkin luokiteltu ESBL-kannoiksi antibioottikielloherkkymäärittysten perusteella.

ESBL *E. coli* -kannoista löytyi tutkituista geeniryhmistä viidellä eri alukeparilla (TEM, CTX-M-1, CTX-M-9, OXA-1 ja CIT) monistuvia geenejä yhdeksänä erilaisena yhdistelmänä. Yleisimmin kannoilla esiintyi CTX-M-1-ryhmän geenejä erilaisina yhdistelminä tai yksin. Kaikista kannoista 79 %:lla (n=26) oli CTX-M-1-ryhmän geeni joko yksin tai yhdistelmässä jonkin muun ESBL-geenin kanssa. Yleisin yhdistelmä oli CTX-M-1- ja OXA-1 -ryhmien geenien yhdistelmä (42,2 %, n=14). CTX-M-9 -ryhmän geeni oli yksin tai yhdistelmässä 15,2 %:lla kantoja (n=5). Eri yhdistelmät ja niiden frekvenssit on kuvattu tarkemmin taulukossa 5.

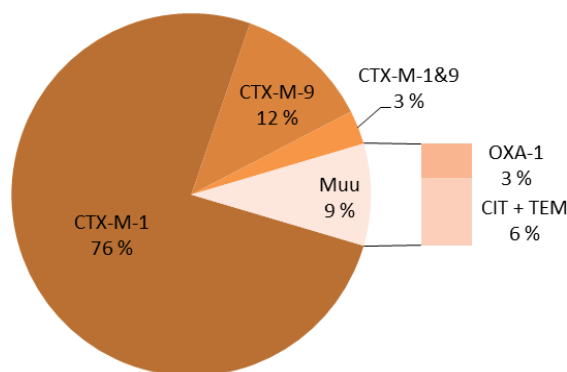
Kaksi *E. coli* kantaa monistui multiplex 3:ssa CIT-alukkeella. Monistustuotteen koon perusteella geeni oli jokin CIT-alukkeilla monistettavista geeneistä. CIT-alukkeet monistavat useita eri plasmidivälitteisiä geenejä, kuten olen aiemmin kuvannut. Monistustuote sekvensoitiin ja sen perusteella geenien tunnistettiin kuuluvan CMY-ryhmään (kefamysiiniä hydrolysoiva β -laktamaasi).

OXA-1-geeniä esiintyi yksin tai yhdessä jonkin CTX-M-geenin kanssa 63,6 %:lla kantoja (n=21). Multiplexillä monistuvaa TEM-geeniä oli 42,4 %:lla kantoja (n=14) yhdessä jonkun muun geenin kanssa. Menetelmä ei erottele ESBL-TEM-kantoja muista TEM-tyyppisistä β -laktamaaseista.

Taulukko 5. Eri ESBL *E. coli* -kannoilla havaitut geeniyhdistelmät eriteltynä ja niiden suhteelliset osuudet kaikista löydöksistä.

Geeniyhdistelmä	Frekvenssi	%
OXA1 + CTX-M-1	14	42,4
OXA1 + TEM + CTX-M-1	6	18,2
CTX-M-1	3	9,1
TEM + CTX-M-9	3	9,1
TEM + CMY	2	6,1
TEM + CTX-M-1	2	6,1
CTX-M-9	1	3,0
OXA-1	1	3,0
TEM + CTX-M-1 & 9	1	3,0
Yhteensä	33	100,0

Jokin CTX-M-ryhmän geeni oli yli 90 %:lla kantoja (n=30), kuten voidaan havaita kuviosta 7. Kuviossa näkyy, että CTX-M-1-geeni oli yksin tai yhdessä jonkin muun geenin kanssa 79 %:lla (n=26) tutkittuja ESBL *E. coli*. CTX-M-geenit jakautuivat siten, että ryhmän 1 CTX-M-geeni oli 86,7 %:lla (n=26) ja ryhmän 9 geeni 16,7 %:lla (n=5) CTX-M ESBL *E. coli*.



Kuvio 7. CTX-M-geeniperheeseen kuuluvien geenien ilmeneminen tutkituilla ESBL *E. coli* -kannoilla. Useimmilla kannoilla on CTX-M-geenin lisäksi myös muita geenejä. 9 %:lla kantoja ei ilmennyt mitään CTX-M-geeniperheen geeniä, näillä esiintyneet geenit on eritelty kuviossa.

Kaikilta kannoilta tutkittiin myös karbapenemaasigeenien mahdollisuus omalla PCR:llään. Kannat osoittautuivat karbapenemaasien suhteen negatiivisiksi.

7.2 Genotyyppien vertailu fenotyyppiin

Vertasin kaikkien 33 ESBL *E. coli* -kantojen antibioottikielloherkkyyssmäärittämissä saatuja halkaisijoita (millimetreinä) HUSLABin käyttämiin sovellettuihin EUCAST-standardin mukaisiin herkkyysrajoihin (Tarkka 2011.) ja eri genotyyppien tuloksia toisiinsa. Vertasin toisiinsa etenkin CTX-M-ryhmän ESBL-kantoja (n=29). Vertailussa ei huomioitu yhtä ESBL *E. coli* -kantaa, jolla oli sekä CTX-M-1 että CTX-M-9 -ryhmiin kuuluvat ESBL-geenit.

Kaikkien kantojen (n=33) fenotyypeille oli yhteistä *in vitro* -resistenssi ampicilliinille, kefalotiinille, kefotaksiimille ja kefuroksiimille. Kaikki olivat herkkiä meropeneemille ja ertapeneemille. Noin kaksi kolmasosaa tutkituista kannoista oli resistenttejä tai herkkyydeltään alentuneita tobramysiinille (66,7 %, n=22) ja sulfa-trimetopriimille (69,7 %, n=23). Nämä jakautuivat sattumanvaraisesti eri genotyypeihin. Taulukossa 6 on esitetty tutkittujen CTX-M ESBL *E. coli* -kantojen antibioottiherkkyyssmäärittäysten tulokset niiden antibioottien osalta, joissa kantojen välillä syntyi eroa.

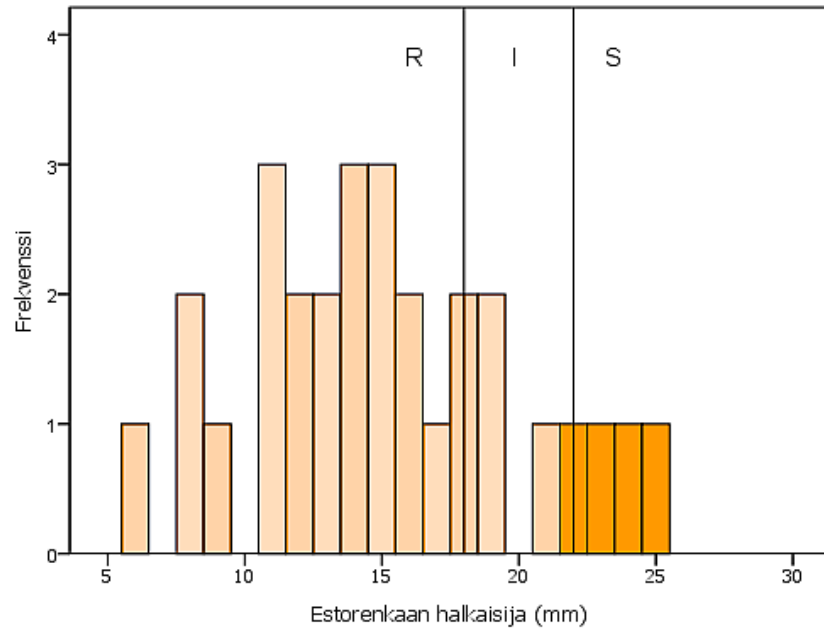
Taulukko 6. CTX-M-ryhmien 1 ja 9 vertailu eri antibioottien suhteen. S, I ja R -arvot HUSLABin käyttäminen rajojen mukaisesti (liite 1).

Geeni	Amoksisilliini-klavulaanihappo		Keftatsidiimi		Levofloksasiini		Piperasilliini-tatsobaktaami		Tobramysiini	
	S	R	S	R/I	S	R/I	S	R/I	S	R/I
CTX-M-1 (n=25)	24 %	76 %	0 %	100 %	20 %	80 %	80 %	20 %	24 %	76 %
CTX-M-9 (n=4)	100 %	0 %	100 %	0 %	0 %	100 %	100 %	0 %	75 %	25 %

Suuri osa tutkituista kannoista (78,8 %, n=26) oli *in vitro* käytetyillä rajoilla herkkiä piperasilliini-tatsobaktaamiyhdistelmälle. Levofloksasiinille herkkiä kantoja oli kaikista kannoista 15,1 % (n=5) ja ne kaikki kuuluivat CTX-M-1-geeniperheeseen. Muuten CTX-M-1-ryhmän ESBL-kannat olivat resistentimpiä verrattuna CTX-M-9-ryhmän kantoihin. Tutkitut CTX-M-9-ryhmän ESBL *E. coli* -kannat (n=4) olivat *in vitro* herkkiä amoksisilliini-klavulaanihappoyhdistelmälle estorenkään halkaisijan ollessa vähintään 17 millimetriä. Sen sijaan 25 tutkitusta CTX-M-1-ryhmän kannasta alle neljäsosa (24 %, n=6) oli herkkä samalle antibioottiyhdistelmälle.

Keftatsidiimin osalta kaikki tutkitut CTX-M-1-ryhmään kuuluvat kannat olivat sille resistenttejä tai herkkydeltään alentuneita, kun taas CTX-M-9-ryhmän kannoista kaikki neljä olivat sille herkkiä *in vitro*. Kuviossa kahdeksan havaitaan kantojen ero estorenkään halkaisijoissa keftatsidiimin osalta.

Kaksi *E. coli* -kanta, joilla havaittiin CMY-ryhmän plasmidivälitteinen AmpC- β -laktamaasi, myös poikkesivat fenotyypeiltään klassisesta ESBL-kannasta. ESBL-kaksoiskiekkotestauksessa kummallakaan ei syntynyt eroa klavulaanihapolla ja molemmat olikin vastattu sairaalahygienisesti merkittävänä kolmannen polven kefalosporiineille resistentteinä kantoina. Yksi AmpC-tyyppinen β -laktamaasi OXA-1 kannan ainoana löydöksenä oli saanut aikaan resistenssin ampisilliinille ja ensimmäisen polven kefalosporiineille (kefalotiini).



Kuvio 8. Tutkittujen CTX-M-1 ja CTX-M-9 ESBL-kantojen keftatsidiimiherkkydet (n=29). Oranssilla kuvattujen CTX-M-9-ryhmän kantojen (n=4) estorenkaan halkaisija on vähintään 22 mm. S, I ja R -arvot HUSLABin ohjeen mukaisesti (liite 1).

8 Johtopäätökset

8.1 Vertailu aiemmin tutkittuihin genotyyppijakaumiin

Opinnäytetyössäni eri *bla*_{CTX-M}-geenejä tai näiden yhdistelmiä oli noin 91 %:lla tutkimiani ESBL *E. coli* -kantoja (n=30), mikä vastaa Forsstenin väitöskirjan osatutkimuksen (2010: 48.) tuloksia. Myös CTX-M-ryhmän geenien jakautuminen vastasi tutkimuksen tuloksia soveltuvin osin. Tutkimissani kannoissa ryhmän 1 CTX-M-geeni oli 86,7 %:lla (n=26) ja ryhmän 9 geeni 16,7 %:lla (n=5) CTX-M ESBL *E. coli* -kantoja. Muita yhdistelmiä ja geenejä sattui otokseeni selvästi enemmän, mutta tulokset vastaavat hyvin toisiaan ja otokset ovat varmasti riittävän hyvin rinnastettavissa.

Opinnäytteeni tuloksissa ei havaittu DHA-1-tyyppisiä AmpC β -laktamaaseja, mutta sen sijaan *bla*_{OXA-1} esiintyi yhteensä 63,6 %:lla kantoja (n=21) toisin kuin Dallennen ym. (2010.) tutkimuksessa. Opinnäytteeni tutkituilla ESBL *K. pneumoniae* -kannoilla oli molemmilla sekä SHV, TEM että CTX-M-1 -tyypin β -laktamaasigeenit. SHV-geenin

esiintyminen kannoilla vastasi aiempia tutkimustuloksia, joiden mukaan *K. pneumoniae*-kannoissa esiintyy myös lisääntyvässä määrin CTX-M-ryhmien geenejä (Hulkko ym. 2011).

8.2 Antibioottiherkkyksien ja genotyyppien korrelaatio

CTX-M-1-ryhmän kannat (n=25) olivat *in vitro* resistentimpiä kuin CTX-M-9-kannat (n=4). Opinnäytetyössäni tutkituista CTX-M-9-ryhmän kannoista kaikki olivat *in vitro* herkkiä amoksisilliini-klavulaanihappoyhdistelmälle, piperasilliini-tatsobaktaamiyhdistelmälle ja keftatsidiimille, mikä vastasi Tärnbergin ym. (2011) tutkimuksen tuloksia.

Omassa opinnäytteessäni CTX-M-9-ryhmän β -laktamaaseja oli vain neljä, joten niiden vertailun perusteella ei voida tehdä johtopäätöksiä. Tobramysiinin suhteen näistä kolme neljästä oli *in vitro* herkkiä, kun taas CTX-M-1-ryhmän kannoista vain 24 % (n=6) oli herkkiä. Tämä sopii aiempien tutkimusten tuloksiin (Ellem ym. 2011; Wang ym. 2011). Yksikään CTX-M-1-ryhmän kannoista ei ollut herkkä keftatsidiimille. CTX-M-kannat hydrolysoivat oletusten mukaisesti paremmin kefotaksiimia kuin keftatsidiimia.

Pohdinta

8.3 Tulosten hyödynnettävyys

Jatkuvasti lisääntyvä ja monipuolistuva resistenssi laajakirjoisia β -laktaamiantibiootteja kohtaan on edelleen huonosti tunnettu, joten tilanteen kartoittamiselle on tarvetta. Opinnäytetyöni esittelee kuvan ESBL-geenien ilmenemisen nykytilanteesta HUS:n alueella. Samoista näytteistä tehty karbapenemaasi-PCR oli kaikkien kantojen osalta negatiivinen, mikä kertoo siitä, että karbapenemaasigeenit eivät ole ainakaan vielä kovin yleisiä ESBL-kannoilla. Geenien plasmidi- ja transposonivälitteisyys lisää riskiä, että samaan mikrobiin pääsee useita resistenssigeenejä, mistä voi seurata moniresistenttejä kantoja. Oli jo tiedossa, että kannalla voi olla useita useita β -laktamaasigeenejä.

Saamani tulokset viittaavat aiempien tutkimustulosten kanssa siihen, että eri CTX-M-geotyypit antavat erilaiset antibioottilherkkyysofiilit (fenotyypin). Tulosteni perusteella herkkyseroja syntyi lähinnä β -laktamaasien amoksisilliini-klavulaanihappoyhdistelmän ja keftatsidiimin kohdalla, jotka vastataan joka tapauksessa ESBL-kannoilla resistentiksi tai herkkydeltään alentuneiksi. Tulosteni vertailtavuus muiden vastaavien tutkimustulosten kanssa kertoo lähinnä tulosten luotettavuudesta. Fenotyypin ennustaminen genotyypin perusteella ei tuo lisäarvoa diagnostiikkaan, jossa olennaisinta on saada selville mahdollinen ESBL-kantajuus. Fenotyyppiin vaikuttavat lopulta kannan kaikki mahdolliset resistenssitekijät, mikä taas vaikeuttaa genotyypin ennustamista antibioottilherkkyyksien perusteella.

Tulosten vertailtavuus reaaliaikaisen CTX-M multiplex PCR:n tuloksiin on auttanut menetelmän kehittämisessä. Sen avulla voidaan CTX-M-geenit tunnistaa mahdollisesti suoraan näytteestä, mikä nopeuttaa diagnoosin saantia. Hoitavan lääkärin on tärkeää saada tietää mahdollisesta ESBL-infektiosta riippumatta kannan fenotyyppistä. Tulokset voivat siis osaltaan auttaa sairaalainfektioiden hallinnassa. Tuloksia voidaan hyödyntää epidemiatilanteissa, sillä niiden perusteella tiedetään genotyyppien jakauma nykyhetkellä.

8.4 Tulosten luotettavuuden arviointia

Tuloksissani potilaiden ikä- ja sukupuolijakauma vastaavat ESBL-kantajien yleistä jakaumaa. Tuloksia voidaan pitää melko pienestä otoksesta huolimatta luotettavina, sillä ne vastaavat aiempien tutkimusten tuloksia. Tulokset antavat riittävästi viitteitä siitä, millaisia geenejä ja niiden yhdistelmiä HUS:n alueella on liikkeellä. Kartoituksen perusteella on mahdollista saada tukea aiemmille tutkimuksille myös genotyypin ilmenemisestä erilaisina antibioottilherkkyyksinä. Tulokset vastaavat hyvin tutkimuskysymyksiin, mikä kertoo hyvästä validiteetista eli pätevydestä.

Sain käyttööni samoista näytteistä tehdyn reaaliaikaisen PCR:n tulokset, joista pystyin tarkistamaan CTX-M-geeniperheen osalta saamani tulokset. Tulokset vastasivat toisiaan, mikä puhuu vahvan reliabiliteetin eli toistettavuuden puolesta. Vesikontrollissa ei monistunut millään alukkeella monistustuotteita, mutta kaikki positiiviset kontrollit monistuivat. Määritykset on siis tehty teknisesti oikein ja huolellisesti, esimerkiksi

sekoittamatta PCR-vaiheessa näytteitä keskenään. Rinnakkaisia määryksiä ei ollut tarpeen tehdä, sillä toistettavuus on ollut perinteisellä PCR:llä hyvä. Se olisi ollut myös tarpeetonta resurssien käyttöä, sillä yhden kannan tutkimiseksi tarvitaan kaikki viisi multiplex-reaktioseosta.

Joku muu olisi voinut tehdä tulosten tulkinnan eri tavoin, esimerkiksi erilaisten tutkimustulosten valossa. Sen sijaan geelikuvien tulkinta oli useimmiten yksiselitteistä, sillä kaikille löydetyille geeneille oli käytössä positiiviset kontrollit. Toistettavuutta rajoittaa se, että näytteet on kerätty vain tietyltä ajanjaksolta ja eri aikaan tehdyllä keräyksellä voidaan saada erilaiset tulokset. Pienessä otoksessa harvinaisempia geenejä ilmenee satunnaisesti, joten ainakin niissä voisi olla eroja. Uskon, että eroja syntyisi lähinnä geenien suhteellisissa osuuksissa ja näin pienen otoksen kohdalla jopa prosentuaalisten osuuksien vertailu tuntuu turhan tarkalta.

Fenotyyppien vertailu genotyyppiin olisi vaatinut suuremman otoksen erityisesti CTX-M-9-ryhmän kantoja. Vertailu olisi myös luotettavampi, jos käytössä olisi ollut kantojen MIC-arvot, sillä niitä on käytetty aiemmissa tutkimuksissa vertailuun. Jos työn pääpaino olisi ollut fenotyyppien arvioinnissa, olisi aineiston keruu voitu kohdentaa siten, että eri genotyypeistä saadaan riittävät otokset. Toisaalta nyt tutkittu otos oli opinnäytteeksi riittävän suuri ja tulokset suuntaa antavia.

8.5 Työn eettisyyden arviointia

Vaikka opinnäytteeni tutkimus ei kohdistunutkaan potilaisiin tai omaisiin, olen soveltuvien osin pyrkinyt huomioimaan potilasturvallisuuden vaatimukset. Sain käyttöni tutkimuksen kannalta olennaista materiaalia, jota käsiteltiin vaarantamatta potilaiden yksityisyydensuojaa. Sain tietooni potilaiden perustiedoista iän ja sukupuolen, joita käytin vertailussa ESBL-kantajiin yleensä. Analysoitavia kantoja käsittelin koko ajan näytenumeroilla potilaiden yksityisyyden suojaamiseksi ja yksinkertaisuuden vuoksi.

8.6 Opinnäytetyöprosessin arviointia

Minusta oli hienoa olla osana projektia ja tunnen, että työlläni on merkitystä. Aihe itsessään oli haastava, mutta kiinnostava ja koen oppineeni paljon. Toisaalta opin vasta

loppuvaiheessa, kuinka paljon asioita minulta jäi selvittämättä. Etenkin tiedonhankinnassa voisin vielä parantaa taitojani. Koen kuitenkin, että osaisin nyt suunnitella ja toteuttaa vastaavanlaisen työn itsenäisesti, mistä on minulle hyötyä tulevaisuudessa opinnoissani. Erityisesti tulosten raportoinnin osaisin nyt suunnitella paremmin. Uskon, että työstä saamani palaute auttaa minua entisestään kehittämään taitojani.

Opinnäytetyön raportoinnissa olen pyrkinyt opinnäytetyölle riittävään tasoon. Jälkikäteen ajateltuna olisin mielelläni syventänyt osaamistani molekyyli-genetiikan tasolla, jolloin voisin tuntea ymmärtäväni koko kokonaisuuden paremmin. Olen pitänyt pääpainon pitkälti mikrobiologian näkökulmassa esitellen myös perusmenetelmiä. Uskon, että saisin tiivistettyä raporttia sujuvammaksi kokonaisuudeksi, jos tekisin sen uudelleen. Työn toteutus ja toteutuksen aikataulutus sujuivat hyvin. Olisi toisaalta ollut hyödyllistä, jos olisin joutunut toteutusvaiheessa enemmän miettimään virhelähteitä myös käytännön kautta.

Aineiston keräysvaiheessa olisin voinut karsia pois yhtä lukuun ottamatta kaikki saman potilaan näytteistä löytyneet kannat, mikä olisi helpottanut tulosten analysointia. Toisaalta keräystä olisi täytynyt jatkaa pidempään riittävän näytemäärän saamiseksi. Yhden potilaan näytteissä oli myös genotyybiltään kahta erilaista *E. coli* -kantaa, jotka olisi tällöin jäänyt huomaamatta. Vaihtoehtoisesti olisin voinut ottaa mukaan kaikki ESBL-kannat riippumatta potilaasta, näin kaikki mahdollisuudet olisi huomioitu.

8.7 Jatkotutkimuskohteita

ESBL-kantojen ympärillä riittää tutkittavaa. ESBL-geenien levinneisyys ja leviämisreitit ovat edelleen melko tuntemattomia (tutkimuskohteina matkailijat, elintarvikkeet, avoterveydenhuolto). Uuden reaaliaikaisen CTX-M multiplex PCR -menetelmän validoinnista ei luultavasti tarvita opinnäytettä, sillä laboratorio hoitaa sen itse. Sen sijaan voisi olla mielekästä tutkia näytteitä eri lähteistä (elintarvikkeet, jätevedet). Myös fenotyyppien korrelaation arviointia varten tarvittaisiin suurempi otos eri genotyypejä. Nämä ovat kuitenkin opinnäytteenä turhan laajoja aiheita. Eri lähteissä ilmenevien ESBL-kantojen genotyypejä voisi kuitenkin opinnäytetyötäni vastaavassa laajuudessa tutkia, jos jättää esimerkiksi fenotyyppiulottuvuuden pois.

Lähteet

Cantón, Rafael – Coque, Teresa 2006. The CTX-M β -lactamase pandemic. *Current Opinion in Microbiology* 9. 466–475.

Carter, Ian – Halliday, Catriona – Sloots, Theo 2010. PCR Methodology. Teoksessa: Carter, Ian – Schuller, Margret – James, Gregory – Sloots, Theo – Halliday, Catriona (toim.) 2010. PCR for Clinical Microbiology. 11–18, 19–21, 31–36. Springer.

Chamberlain, Jeffrey – Gibbs, Richard – Ranier, Joel – Nguyen, Phi Nga – Caskey, Thomas 1988. Deletion screening of the Duchenne muscular dystrophy locus via multiplex DNA amplification. *Nucleic Acids Research* 16(23). Luettavissa myös sähköisesti osoitteessa
<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC339001/pdf/nar00165-0194.pdf>>.

Dallenne, Caroline – Da Costa, Anelle – Decré, Dominique – Favier, Christine – Arlet, Guillaume 2010. Development of a set of multiplex PCR assays for the detection of genes encoding important β -lactamases in *Enterobacteriaceae*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 65. 490–495.

DNA Software. Multiplex PCR. Verkkodokumentti.
<<http://dnasoftware.com/MultiplexPCR/tabid/143/Default.aspx>>. Luettu 16.3.2012.

EARSS (European Antimicrobial Resistance Surveillance System). Interactive database.
<www.rivm.nl/earss/>. Luettu 27.10.2011.

Ellem, Justin – Partridge, Sally – Iredell, Jonathan 2011. Efficient direct ESBL detection by multiplex real-time PCR: Accurate assignment of phenotype using a limited set of genetic markers. *Journal of Clinical Microbiology*. Luettavissa myös sähköisesti osoitteessa <<http://jcm.asm.org/content/early/2011/05/25/JCM.02647-10.full.pdf>>.

EUCAST. 2012. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Verkkodokumentti. Päivitetty 1.1.2012. <http://www.eucast.org/clinical_breakpoints/>. Luettu 15.3.2012.

FiRe. 2009a. Kiekkomenetelmän SIR-tulkintarajat (estoreenkaan halkaisija, mm) Mueller-Hinton- ja HTM-elatusaineella. Liite 3a.
<http://www.finres.fi/fileadmin/files/standardi/liite_3a_erh_sir_taulukko.pdf>.

FiRe. 2009b. Bakteriryhmäkohtaiset kommentit. Liite 5. 1–4.
<http://www.finres.fi/fileadmin/files/standardi/liite_5_bakteerikohtaiset_kommentit.pdf>.

FiRe. 2009c. Kiekkomenetelmää täydentävät menetelmät. Liite 6. 5–6.
<http://www.finres.fi/fileadmin/files/standardi/liite_6_taydentavat_menetelmat.pdf>.

- Forssten, Sofia 2009. Genetic basis and diagnostics of extended-spectrum β -lactamases among *Enterobacteriaceae* in Finland. Turun yliopisto. Väitöskirja. Luettavissa sähköisesti osoitteessa <<http://www.doria.fi/bitstream/handle/10024/47615/AnnalesD875Forssten.pdf?sequence=1>>.
- Hall, Barry – Barlow, Miriam 2005. Revised Ambler classification of beta-lactamases. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 55 (6). 1050–1051.
- Hulkko, Terhi – Lyytikäinen, Outi – Jaakola, Sari – Kuusi, Markku – Puumala, Jani – Ruutu, Petri (toim.) 2011. Tartuntataudit Suomessa 2010. Terveyden ja hyvinvoinnin laitos. Raportti 17/2011. 27,29.
- Hulkko, Terhi – Lyytikäinen, Outi – Kuusi, Markku – Seppälä, Säde – Ruutu, Petri (toim.) 2010. Tartuntataudit Suomessa 1995–2009. Terveyden ja hyvinvoinnin laitos. Raportti 17/2010. 43–46.
- Huovinen, P. – Tuominen, R. K. 2007. Bakteeri-infektioiden rationaalinen hoito. Luku 55. Teoksessa: Koulu, Markku – Tuomisto, Jouko (toim.): Farmakologia ja toksikologia. <http://www.medicina.fi/index.php?option=com_content&view=article&id=68&Itemid=78>.
- HUSLAB-tutkimusohjekirja. 2012. ESBL, viljely (-Extended spectrum betalactamase). Päivitetty 24.1.2012. Verkkodokumentti. <http://huslab.fi/cgi-bin/ohjekirja/tt_show.exe?assay=4817&terms=esbl>. Luettu 13.3.2012.
- James, Gregory 2010. PCR basics. Teoksessa: Carter, Ian – Schuller, Margret – James, Gregory – Sloots, Theo – Halliday, Catriona (toim.) 2010. PCR for Clinical Microbiology. Springer.
- Jeffery, S. – Booth, J. – Myint, S. 1999. Molecular Diagnosis. 17–21. BIOS Scientific.
- Kankkunen, Päivi – Vehviläinen-Julkunen, Katri. 2009. Tutkimus hoitotieteessä. WSOYpro. 112–116.
- Kirveskari, Juha 2012. LT, kliinisen mikrobiologian erikoislääkäri. HUSLAB, kliininen mikrobiologia. Ohjauskeskustelut 2011–2012.
- Lahey Clinic 2012. β -Lactamase Classification and Amino Acid Sequences for TEM, SHV and OXA Extended-Spectrum and Inhibitor Resistant Enzymes. Päivitetty 5.4.2012. <<http://www.lahey.org/Studies/other.asp#table1>>. Luettu 9.4.2012.
- Lee, Jung Hun – Bae, Il Kwon – Lee, Sang Hee 2012. New definitions of extended-spectrum- β -lactamase conferring worldwide emerging antibiotic resistance. *Medicinal Research Reviews*. 32 (1). 216–232. Luettavissa myös sähköisesti osoitteessa <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/med.20210/full>>.
- Lewis, Matt 2001. Agarose gel electrophoresis (basic method). Verkkodokumentti. <<http://www.methodbook.net/dna/agarogel.html>>. Luettu 15.3.2012.

Livermore, D.M. 2008. Defining an extended-spectrum β -lactamase. *Clinical Microbiology and Infection* 14. 3–10. Luettavissa myös sähköisesti osoitteessa <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1469-0691.2007.01857.x/pdf>>.

Lonza 2011a. FlashGel™ dye and markers. Verkkodokumentti. <http://bio.lonza.com/uploads/tx_mwaxmarketingmaterial/Lonza_ManualsProductInstructions_FlashGel_Dye__Marker_-_Protocol.pdf>. Luettu 15.3.2012.

Lonza 2011b. FlashGel™ System. Verkkodokumentti. <http://bio.lonza.com/uploads/tx_mwaxmarketingmaterial/Lonza_ManualsProductInstructions_FlashGel_System_-_Protocol.pdf>. Luettu 15.3.2012.

Mackenzie, Debora 2012. Superbugs spied off the Antarctic coast. *New Scientist* 26.1.2012. <<http://www.newscientist.com/article/mg21328494.200-superbugs-spied-off-the-antarctic-coast.html>>.

Madigan, M. T. – Martinko, J. M. – Dunlap, P.V. – Clark, D. P. 2009. Brock Biology of microorganisms. Microbial Growth Control. 282–284, 419–421, 790–791, 795–796, 802–806. Pearson International Edition.

Mazel, Didier 2006. Integrons: agents of bacterial evolution. *Nature Reviews Microbiology* 4. 608–620.

Männistö, P. T. – Tuominen, R. K. 2007a. Yleistä mikrobilääkkeistä. Luku 51. Teoksessa: Koulu, Markku – Tuomisto, Jouko (toim.): Farmakologia ja toksikologia. <http://www.medicina.fi/index.php?option=com_content&view=article&id=68&Itemid=78>.

Männistö, P. T. – Tuominen, R. K. 2007b. Soluseinämää heikentävät bakteerilääkkeet. Luku 52. Teoksessa: Koulu, Markku – Tuomisto, Jouko (toim.): Farmakologia ja toksikologia. <http://www.medicina.fi/index.php?option=com_content&view=article&id=68&Itemid=78>.

Nissinen, Antti 2009. Bakteerin lääkeherkkyyden määrittäminen kiekkomenetelmällä. Versio 6. FiRe. <<http://www.finres.fi/fileadmin/files/standardi/kiekkomenetelma.pdf>>.

Paterson, David – Bonomo, Robert 2005. Extended-spectrum β -lactamases: a clinical update. *Clinical Microbiology Reviews* 18(4). 657–686.

Wang, Peng - Hu, Fupin - ZXiong, Zizhong – Ye, Xinyu – Zhu, Demei – Wang, Yun – Wang, Mingui 2011. Susceptibility of Extended-Spectrum- β -Lactamase-producing Enterobacteriaceae according to the New CLSI Breakpoints. *Journal of Clinical Microbiology* 49 (9). 3127-3131.

Pharmaca Fennica. 2011. Bakteerilääkkeet. Sähköinen aineisto. Lääketietokeskus.

Purcell, Andrew 2011. Superbugs may be here to stay. *New Scientist* 29.7.2011. <<http://www.newscientist.com/article/dn20749-superbugs-may-be-here-to-stay.html>>.

Qiagen. 2011. Quantitect® Multiplex PCR Handbook. Verkkodokumentti.
<<http://www.qiagen.com/products/pcr/quantitectpcrsystems/quantitectmultiplexpcrkit.aspx#Tabs=t2>>. Luettu 23.3.2012.

Ripoll, Aida – Baquero, Fernando – Novais, Angela – Rodriguez-Dominguez, Mario J. – Turrientes, Maria-Carmen – Canton, Rafael – Galan, Juan-Carlos 2011. *In vitro* selection of variants resistant to beta-lactams plus beta-lactamase inhibitors in CTX-M beta-lactamases: Predicting the in vivo scenario? *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 55 (10). 4530–4536.

Siitonen, Anja – Vaara, Martti 2010. *Escherichia, Salmonella, Shigella* ja *Yersinia*. Teoksessa: Hedman ym. (toim.): *Mikrobiologia. Mikrobiologia, immunologia ja infektiosairaudet*. Duodecim. 177–180.

Skurnik, Mikael 2010. Bakterigenetiikka. Teoksessa: Hedman ym. (toim.): *Mikrobiologia. Mikrobiologia, immunologia ja infektiosairaudet*. Duodecim. 41–55.

Stanford Office of Technology Licensing 2008. Multiplex DNA Amplification. Verkkodokumentti.
<http://techfinder.stanford.edu/technology_detail.php?ID%3D24705>.

Tarkka, Eveliina 2011. Kiekotuspaneelit EUCAST v. 1.3/CLSI:n mukaan. HUSLAB. Työohje. Päivitetty 7.12.2011.

THL 2011. Laajakirjoiset β -laktamaasit eli ESBL:t. Päivitetty 31.8.2011.
<www.ktl.fi/portal/17223>. Luettu 13.10.2011.

Tärnberg, Maria – Östholm-Balkhed, Åse – Monstein, Hans-Jürg – Hällgren, Anita – Hanberger, Håkan – Nilsson, Lennart 2011. *In vitro* activity of beta-lactam antibiotics against CTX-M-producing *Escherichia coli*. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* 30 (8). 981–987.

Winslow, Dean 2012. β -lactam/ β -lactamase inhibitors for treatment of bacteremia due to ESBL-producing *E. coli*. *Infectious Disease Alert* 31 (4). 43–44.

β -laktaamiantibioottien ja muiden työssä käytettyjen antibioottien herkkyysrajat enterobakteereille

Antibiootti, lyhenne, määrä (μg)	Estoreenkaan halkaisija (mm)	
	R \leq	S \geq
Penisilliinit		
Ampisilliini, AMP, 10	13	14
β-laktaami-β-laktamaasi-inhibiittoriyhdistelmät		
Amoksisilliini-klavulaanihappo, AMC, 20/10	16	17
Piperasilliini-tatsobaktaami, TZP, 30/6	14	18
Kefalosporiinit		
Kefotaksiimi, CTX, 5	17	21
Kefpodoksiimi, CPD, 10 ¹	21	
Keftatsidiimi, CAZ, 10	18	22
Keftriaksoni, CRO, 30 ¹	20	23
Kefuroksiimi, CXM, 30	17	18
Kefalotiini, KF, 30	14	18
Kefoksitiini, FOX, 30 ¹	19	
Karbapeneemit		
Imipeneemi, IPM, 10 ¹	16	22
Meropeneemi, MEM, 10	15	22
Ertapeneemi, ERT, 10 ¹	22	25
Monobaktaamit		
Atstreonaami, ATM, 30 ¹	24	27
Fluorokinolonit		
Levofloksasiini, LEV, 5	18	22
Aminoglykosidit		
Tobramysiini, TOB, 10	12	16
Muut		
Sulfatrimetopriimi, SXT, 23.75/1.25	12	16
(Tarkka 2011.) ¹ (EUCAST. 2012.)		

Pipetointikaavio

ESBL Multiplex PCR / Perinteinen PCR

Pvm:

Multiplex 1	REAKTIOMIX	KÄYTTÖMIX
	1 x	0
H2O	5,5 µl	0 µl
2x Quantitect NoROX mix	12,5 µl	0 µl
primermix (10uM)	6 µl	0 µl
	24 µl	0 µl

OHJELMA: JAANA/ESBL-MP

1. 95°C 14min
2. 94°C 1min
3. 60°C 15s
4. 72°C 1min 25s
5. 2-4 x 29 sykliä
6. 72°C 7min
7. 4°C forever

Multiplex 2	REAKTIOMIX	KÄYTTÖMIX
	1 x	0
H2O	7 µl	0 µl
2x Quantitect NoROX mix	12,5 µl	0 µl
primermix (10uM)	4,5 µl	0 µl
	24 µl	0 µl

Kesto: 2h 15min

CTX-M Group 8/25	REAKTIOMIX	KÄYTTÖMIX
	1 x	0
H2O	9,5 µl	0 µl
2x Quantitect NoROX mix	12,5 µl	0 µl
primermix (10uM)	2 µl	0 µl
	24 µl	0 µl

Multiplex 3	REAKTIOMIX	KÄYTTÖMIX
	1 x	0
H2O	2,5 µl	0 µl
2x Quantitect NoROX mix	12,5 µl	0 µl
primermix (10uM)	9 µl	0 µl
	24 µl	0 µl

Multiplex 4	REAKTIOMIX	KÄYTTÖMIX
	1 x	0
H2O	7 µl	0 µl
2x Quantitect NoROX mix	12,5 µl	0 µl
primermix (10uM)	4,5 µl	0 µl
	24 µl	0 µl

Kokonaismix 25ul: **24ul + 1ul** templaattia

MULTIPLEX 1

	Flashgel DNA marker	
1.	T-104022 (TEM,SHV,OXA1)	
2.	H2O	
3.		
4.		
5.		
6.		
7.		
8.		
9.		
10.		
11.		
12.		

MULTIPLEX 3

	Flashgel DNA marker	
1.	T-110216 (DHA,CIT)	
2.	H2O	
3.		
4.		
5.		
6.		
7.		
8.		
9.		
10.		
11.		
12.		

MULTIPLEX 2

	Flashgel DNA marker	
1.	T-104022 (CTX-M group1)	
2.	T-104134 (CTX-M group9)	
3.	T-104567 (CTX-M group2)	
4.	H2O	
5.		
6.		
7.		
8.		
9.		
10.		
11.		
12.		

MULTIPLEX 4

	Flashgel DNA marker	
1.	T-106902 (GES)	
2.	T-108805 (VEB)	
3.	T-109615 (PER)	
4.	H2O	
5.		
6.		
7.		
8.		
9.		
10.		
11.		
12.		

CTX-M GROUP 8/25

	Flashgel DNA marker	
1.	T-79558 (CTX-M group8)	
2.	H2O	
3.		
4.		
5.		
6.		
7.		
8.		
9.		
10.		
11.		
12.		

4µl + 1µl näytepuskuria (Flashgel Loading Dye). Näytteet ajetaan 2,2%:een 12+1 paikkaiseen flashgeeliin. Ajoasetukset: 150V, 50mA ja 15W. Ajoaika n. 20min.

Käytettyjen multiplex-alukkeiden sekvenssit

Alukkeet		Sekvenssi (5' → 3')		Koko (bp)	
Multiplex 1	TSO-T	for	CATTTCCGTGTCGCCCTTATTC	22	
		rev	CGTTCATCCATAGTTGCCTGAC	22	
	TSO-S	for	AGCCGCTTGAGCAAATTAAC	21	
		rev	ATCCCGCAGATAAATCACCAC	21	
	TSO-O	for	GGCACCAGATTCAACTTTCAAG	22	
		rev	GACCCCAAGTTTCTCTGTAAGTG	22	
Multiplex 2	CTXMGp1	for	TAGGAARTGTGCCGCTGYA*	20	
	CTXMGp2	for	CGTTAACGGCACGATGAC	18	
	CTXMGp1-2	rev	CGATATCGTTGGTGGTRCCAT*	21	
	CTXMGp9	for	TCAAGCCTGCCGATCTGGT	19	
		rev	TGATTCTCGCCGCTGAAG	18	
Simplex	CTXMGp 8/25	for	AACRCRCAGACGCTCTAC*	18	
		rev	TCGAGCCGGAASGTGYAT*	19	
Multiplex 3	ACC	for	CACCTCCAGCGACTTGTTAC	20	
		rev	GTTAGCCAGCATCACGATCC	20	
	FOX	for	CTACAGTGCGGGTGGTTT	18	
		rev	CTATTTGCGGCCAGGTGA	18	
	MOX	for	GCAACAACGACAATCCATCCT	21	
		rev	GGGATAGGCGTAACTCTCCCAA	22	
	DHA	for	TGATGGCACAGCAGGATATTC	21	
		rev	GCTTTGACTCTTTGCGTATTCG	22	
	CIT	for	CGAAGAGGCAATGACCAGAC	20	
		rev	ACGGACAGGGTTAGGATAGY*	20	
	EBC	for	CGGTAAAGCCGATGTTGCG	19	
		rev	AGCCTAACCCTGATACA	18	
	Multiplex 4	GES	for	AGTCGGCTAGACCGGAAAG	19
			rev	TTTGTCCGTGCTCAGGAT	18
PER		for	GCTCCGATAATGAAAGCGT	19	
		rev	TTCGGCTTGACTCGGCTGA	19	
VEB		for	CATTTCCCGATGCAAAGCGT	20	
		rev	CGAAGTTTCTTTGACTCTG	20	
*Y= T/C, R= A/G, S=G/C, D=A/G/T (Dallenne ym. 2010)					

Opinnäytetyön tulokset

Taulukko 1. Kaikki ESBL *E. coli* -kannoista löydettyt geenit ristiintaulukoituna (esimerkiksi oranssilla merkitty solu tarkoittaa, että tuloksissa on kolme sellaista kantaa, joilla on *bla*_{TEM} ja *bla*_{CTX-M-9} -geenit, mutta ei *bla*_{CMY}, *bla*_{OXA} eikä *bla*_{CTX-M-1} -geenejä).

blaCTX-M-9 * blaCTX-M-1 * blaTEM * blaOXA1 * blaCIT						
blaCMY	blaOXA1	blaTEM			blaCTX-M-1	
					ei	kyllä
ei	ei	ei	blaCTX-M-9	ei	0	3
				kyllä	1	0
		kyllä	blaCTX-M-9	ei	0	2
				kyllä	3	0
	kyllä	ei	blaCTX-M-9	ei	1	14
		kyllä	blaCTX-M-9	ei	-	6
kyllä	ei	kyllä	blaCTX-M-9	ei	2	-

Taulukko 2. Kerätty ja analysoitu aineisto. Taulukoituna vain yksi kanta kultakin potilaalta, jos niiden genotyypit olivat samat (amoksisilliini-klavulaanihappo = AMC, ampicilliini = AMP, ertapeneemi = ERT, kefalotiini = KF, kefotaksiimi = CTX, keftatsidiimi = CAZ, kefuroksiimi = CXM, levofloksasiini = LEV, meropeneemi = MEM, piperasilliini-tatsobaktaami = TZP, tobramysiini = TOB ja sulfatrimetopriimi = SXT).

nro	ikä	suku-puoli	ESBL	AMC	AMP	ERT	KF	CTX	CAZ	CXM	LEV	MEM	TZP	TOB	SXT
E. coli															
165	66	N	CTX-M-1	18	6	30	6	6	11	6	13	32	22	22	6
285	80	N	CTX-M-1	15	6	31	6	6	17	6	35	34	23	23	25
452	70	M	CTX-M-1	15	6	34	6	6	15	6	8	34	22	9	24
151	26	N	CTX-M-1 + OXA1	10	6	30	6	6	8	6	6	31	15	6	6
155	65	N	CTX-M-1 + OXA1	12	6	29	6	6	12	6	6	30	18	6	5
181	97	N	CTX-M-1 + OXA1	18	6	34	6	8	19	6	8	34	26	23	6
190	48	M	CTX-M-1 + OXA1	10	6	31	6	12	18	6	6	30	17	8	6
203	66	N (myös 204)	CTX-M-1 + OXA1	13	6	35	6	15	19	6	8	34	19	8	6
226	60	M	CTX-M-1 + OXA1	21	6	30	6	6	16	6	25	30	24	14	6
232	82	N	CTX-M-1 + OXA1	12	6	34	9	19	21	8	8	34	18	8	6
270	87	N	CTX-M-1 + OXA1	14	6	33	6	6	14	6	9	35	19	11	6

nro	ikä	suku- puoli	ESBL	AMC	AMP	ERT	KF	CTX	CAZ	CXM	LEV	MEM	TZP	TOB	SXT
335	85	M	CTX-M-1 + OXA1	13	6	31	6	6	12	6	6	35	19	10	6
398	76	N	CTX-M-1 + OXA1	15	6	29	6	6	16	6	8	30	20	8	23
399	85	N	CTX-M-1 + OXA1	14	6	32	6	6	14	6	8	32	20	8	5
455	80	N	CTX-M-1 + OXA1	11	6	35	6	6	15	6	9	35	17	8	6
460	56	M	CTX-M-1 + OXA1	14	6	34	6	6	15	6	6	35	22	6	25
475	74	N	CTX-M-1 + OXA1	16	6	35	6	6	14	6	8	34	21	9	27
142	58	N	CTX-M-1 + OXA1 + TEM	10	6	29	6	6	11	6	6	30	19	6	6
147	48	M	CTX-M-1 + OXA1 + TEM	10	6	24	6	6	6	6	6	28	15	6	6
170	62	N	CTX-M-1 + OXA1 + TEM	12	6	29	6	6	9	6	6	30	18	6	5
183	66	M	CTX-M-1 + OXA1 + TEM	14	6	26	6	6	8	6	6	31	18	10	6
246	52	N	CTX-M-1 + OXA1 + TEM	23	6	34	6	6	13	6	29	35	25	24	6
443	66	N	CTX-M-1 + OXA1 + TEM	10	6	34	6	6	18	6	6	34	12	6	6
148	41	M	CTX-M-1 + TEM	18	6	30	6	6	11	6	21	31	23	21	6
203	66	N (myös 203)	CTX-M-1 + TEM	20	6	32	6	6	13	6	23	34	25	23	6
keskiarvo				14,3	6	31,4	6,1	7,2	13,8	6,1	11,2	32,5	19,9	11,6	10, 3
pienin arvo				10	6	24	6	6	6	6	6	28	12	6	6
suurin arvo				23	6	35	9	19	21	8	35	35	26	24	27
140	1	N	CTX-M-9	18	6	31	6	6	22	6	9	31	23	21	6
217	27	N	CTX-M-9 + TEM	20	6	32	6	8	24	6	8	32	25	22	25
239	55	N	CTX-M-9 + TEM	20	6	33	6	6	23	6	6	33	26	23	6
322	91	N	CTX-M-9 + TEM	18	6	38	6	6	25	6	6	38	32	6	6
keskiarvo				19	6	33,5	6	6,5	23,5	6	7,3	33,5	26,5	18	10, 8
pienin arvo				18	6	31	6	6	22	6	6	31	23	6	6
suurin arvo				20	6	38	6	8	25	6	6	38	32	23	25
267	68	N	OXA1	6	6	32	9	15	25	6	6	36	6	6	6
168	64	N	TEM + CMY	6	6	30	6	6	6	10	S	35	21	S	6
220	84	N	TEM + CMY	6	6	28	6	6	6	6	6	30	14	23	6

nro	ikä	suku- puoli	ESBL	AMC	AMP	ERT	KF	CTX	CAZ	CXM	LEV	MEM	TZP	TOB	SXT
362. 1	35	N	CTX-M- 1&9 + TEM	17	6	31	6	6	12	6	6	32	25	15	S
K. pneumoniae															
362. 2	35	N	TEM + SHV + CTX-M-1	19	6	S	6	6	13	6	27	26	23	21	24
376	64	N	TEM + SHV + CTX-M-1	17	6	26	6	6	6	6	12	28	19	11	6
Proteus															
310	77	N	-	14	6	31	6	8	22	6	35	32	27	24	6
K. oxytoca															
482	89	N	-	20	6	S	S	17	27	6	S	35	13	21	25

Taulukko 3. ESBL-kaksoiskiekkotestin tulokset niiden kantojen osalta, joille se on tehty (kefpodoksiimi = CPD, keftatsidiimi = CAZ, kefoksitiimi = CTX ja klavulaanihappo = CV).

nro	havaitut ESBL-geenit	CAZ-CLAV	CAZ30	CPD-CV	CPD10	CTX-CLAV	CTX30
455	CTX-M-1 + OXA1	29	18	23	6	30	6
142	CTX-M-1 + OXA1 + TEM	25	15	10	6	26	6
183	CTX-M-1 + OXA1 + TEM	25	11	18	6	25	6
246	CTX-M-1 + OXA1 + TEM	29	17	18	6	29	8
267	OXA1	31	29	12	11	26	18
168	TEM + CMY	13	10	6	6	15	15
220	TEM + CMY	6	6	6	6	6	6
362.2	TEM + SHV + CTX-M-1	25	15	22	6	28	6
376	TEM + SHV + CTX-M-1	24	6	20	6	27	6
310	-	29	29	24	12	31	21
482	-	29	28	21	13	31	22