

Opinnäytetyö (AMK)

Bioanalytiikka

Mikrobiologia

2013

Iina Karttunen

# AMPC- JA ESBL-TESTIN EVALUAATIO



TURUN AMMATTIKORKEAKOULU  
TURKU UNIVERSITY OF APPLIED SCIENCES

lina Karttunen

# AMPC- JA ESBL-TESTIN EVALUAATIO

ESBL ja AmpC ovat bakteerien tuottamia entsyymejä, jotka antavat bakteerille vastustuskyvyn tiettyjä antibiootteja kohtaan. Tällaisten bakteerien aiheuttamien infektioiden hoitaminen on sopivien lääkkeiden puuttuessa haasteellista. ESBL tarkoittaa laajakirjoista beetalaktamaasientsyymiä, joka tekee bakteerin resistentiksi kefalosporiineille, penisilliineille ja monobaktaameille. ESBL-geenit liikkuvat bakteerien välillä plasmidien välityksellä. ESBL-geenejä esiintyy yleisimmin *Escherichia coli*lla ja *Klebsiella*-lajeilla.

AmpC-geeni esiintyy kromosomaalisena usealla enterobakteerilla. Geenien sääntelyn purkautuminen tekee bakteerikannan resistentiksi kefalosporiineille, penisilliineille ja monobaktaameille. AmpC voi olla myös plasmidivälitteinen ja liikkua eri bakteerilajien välillä. Plasmidivälitteisen ampC-geenin omaavat kannat, joilla ei luonnostaan ole AmpC:tä, voivat aiheuttaa sairaalaepeidemiaita ja tällöin niiden merkitys on sama kuin ESBL:n.

Mikrobiologian laboratorioilta puuttuu yhtenäinen AmpC:n tunnistusmenetelmä. Tässä opinnäytetyössä verrattiin tavallista ESBL-testiä ja uutta sekä AmpC:n että ESBL:n tunnistavaa yhdistelmätestiä. Testeissä määritetään bakteerien läikeherkkyys kiekkomenetelmällä. Bakteerien läikeherkkyksiä määritetään, jotta voidaan selvittää, onko bakteeri herkkydeltään normaali vai onko sen sietokyky bakteerilääkettä kohtaan merkittävästi korkeampi. Jos bakteerin sietokyky on merkittävästi normaalia korkeampi, kutsutaan bakteeria resistentiksi.

Testit tehtiin 26 eri bakteerikannalle. Kaikista tutkituista *Enterobacter cloacae* kannoista löytyi ESBL yhtä hyvin sekä tavallisella ESBL-testillä että AmpC-ESBL-testillä. *Klebsiella pneumoniae*sta löytyi AmpC hyvin yhdistelmätestin avulla.

## ASIASANAT:

ESBL, AmpC, antibioottiresistenssi, kiekkotesti

BACHELOR'S THESIS | ABSTRACT

TURKU UNIVERSITY OF APPLIED SCIENCES

Degree programme in Biomedical Laboratory Science | Microbiology

2013 | 41 + 3 pages

Seija Kirkko-Jaakkola, Kaisu Rantakokko-Jalava

Iina Karttunen

## EVALUATION OF AMPC- AND ESBL -TEST

ESBL (Extended Spectrum Beta-Lactamase) and AmpC are bacterial enzymes that make the bacteria resistant to certain antibiotics. If an infection is caused by this kind of bacterium, it is challenging to treat in the lack of proper medicine. ESBL makes the bacteria resistant to cephalosporins, penicillins and monobactams. ESBL-genes in plasmids can be transmitted from one bacterium to another via gene transfer. ESBL-genes are most commonly found in *Escherichia coli* and *Klebsiella*-species.

AmpC-gene occurs chromosomally in many enterobacteria. The eruption of gene regulation causes the bacterial strain to be resistant to cephalosporins, penicillins and monobactams. AmpC-gene can also be in the plasmid of a bacterium and may be transmitted between different bacterial species. The bacterial strains that have a plasmid-mediated AmpC-gene but do not naturally have AmpC can cause nosocomial outbreaks, and thus are as significant as ESBL.

The microbiology laboratories are lacking a standardized AmpC detection method. In this Bachelor's thesis a normal ESBL-test was compared with a new AmpC-ESBL-combination test. Both tests use a disk diffusion test to determine bacteria's susceptibility to antibiotics. Bacteria's susceptibility to antibiotics is determined in order to find out whether their sensitivity level is normal or significantly higher. If the latter is true, the bacterium is said to be resistant.

The tests were run for 26 different bacterial strains. ESBL was found from all examined *Enterobacter cloacae* strains equally well with both tests. In *Klebsiella pneumoniae*, AmpC was found well with the AmpC-ESBL-combination test.

KEYWORDS:

ESBL, AmpC, antibiotic resistance, disk diffusion test

# SISÄLTÖ

<b>1 JOHDANTO</b>	<b>6</b>
<b>2 TUTKIMUKSEN TEOREETTINEN TAUSTA</b>	<b>7</b>
2.1 Bakterisolun rakenne	7
2.2 Bakterilääkkeet ja antibioottiresistenssi	8
2.3 Bakteerien lääkeherkkyyden määrittäminen kiekkomenetelmällä	9
2.4 Geenien siirtyminen bakteerista toiseen plasmidin välityksellä	11
2.5 ESBL	11
2.6 AmpC	13
2.7 ESBL-testin ja AmpC-ESBL-testin periaate	14
2.8 <i>Escherichia colin</i> aiheuttamat infektiot ja luonnollinen resistenssi	15
2.9 <i>Klebsiella pneumoniaen</i> aiheuttamat infektiot ja luonnollinen resistenssi	17
2.10 <i>Enterobacter</i> -lajien aiheuttamat infektiot ja luonnollinen resistenssi	18
2.11 Aikaisempia tutkimuksia	20
<b>3 OPINNÄYTETYÖN TARKOITUS, TAVOITE JA TUTKIMUSONGELMAT</b>	<b>22</b>
<b>4 OPINNÄYTETYÖN KÄYTÄNNÖN TOTEUTUS</b>	<b>23</b>
4.1 Opinnäytetyön aineiston keruu ja toteutus	23
4.2 Metodologiset lähtökohdat	27
4.3 Opinnäytetyön eettisten näkökohtien tarkastelu	28
<b>5 TULOKSET JA NIIDEN TARKASTELU</b>	<b>30</b>
<b>6 POHDINTA</b>	<b>37</b>
6.1 Johtopäätökset	37
6.2 Tutkimuksen luotettavuuden ja eettisyyden arviointi	39
<b>LÄHTEET</b>	<b>40</b>

## LIITTEET

- Liite 1. Tutkimuslupahakemus.
- Liite 2. Ensimmäisen tekokerran mittaustulokset.
- Liite 3. Toisen tekokerran mittaustulokset.

## KUVAT

- Kuva 1. Kanta 2: *E. coli*, herkkä bakteerikanta. 31
- Kuva 2. Kanta 11: *E. coli*, ESBL-positiivinen, AmpC-negatiivinen. 33
- Kuva 3. Kanta 13: *K. pneumoniae*, moniresistentti, ESBL-negatiivinen, AmpC-positiivinen. 33
- Kuva 4. Kanta 14: *K. pneumoniae*, moniresistentti, ESBL-negatiivinen, karbapenemaasia tuottava kanta. 34

## TAULUKOT

- Taulukko 1. Pakkausselosteessa suositellut kontrollikannat. 23
- Taulukko 2. Kaikki testattavat kannat. 24
- Taulukko 3. Bakteerisuspensioiden McFarland-standardia vastaavat tiheydet. 36

# 1 JOHDANTO

Beetalaktaamirakenteiset antibiootit (mm. penisilliini ja kefalosporiinit) ovat eniten käytettyjä antibiootteja. Beetalaktamaasit ovat bakteerien tuottamia entsyymejä, jotka kykenevät hajottamaan beetalaktaamirakenteisia antibiootteja. Laajakirjoisten beetalaktaamiantibioottien käyttöönoton seurauksena on kehittynyt myös uusia laajakirjoisia beetalaktamaasientsyymejä (ESBL). (Olsen, Helovuo & Løkken 2002.) Näiden kosketustartuntana leviävien ESBL-kantojen torjunta on haasteellista, sillä ESBL-ominaisuus voi levitä bakteerista toiseen. (THL 2009).

ESBL ja AmpC ovat bakteerien tuottamia entsyymejä, jotka antavat bakteerille vastustuskyvyn tiettyjä antibiootteja kohtaan. Tällaisten bakteerien aiheuttamien infektioiden hoitaminen on sopivien lääkkeiden puuttuessa haasteellista. (THL 2009). Mikrobiologian laboratorioilta puuttuu yhtenäinen AmpC:n tunnistusmenetelmä (Ingram ym. 2011). Opinnäytetyön tarkoituksena on selvittää, onko AmpC-ESBL-yhdistelmäkitti käyttökelpoinen tavallisen ESBL-testin lisänä selvittäessä kolmannen polven kefalosporiineille resistenttien enterobakteerien resistenssimekanismeja. Tavoitteena on saada sekä AmpC:n että ESBL:n tunnistava AmpC-ESBL-yhdistelmäkitti mahdollisesti käyttöön Tykslabin kliinisen mikrobiologian laboratoriossa. (Rantakokko-Jalava, 2012.) Tutkimustuloksista saatava tieto ja uuden yhdistelmäkitin käyttöönotto voivat tulevaisuudessa ehkäistä sairaalahygieenisesti merkittävien bakteerikantojen leviämistä ja estää antibioottiresistenttien bakteerien aiheuttamien sairaalaepidemioiden syntymistä.

## 2 TUTKIMUKSEN TEOREETTINEN TAUSTA

### 2.1 Bakterisolun rakenne

Lähes kaikki bakteerit ovat niin pieniä, että niiden tarkastelussa täytyy käyttää mikroskooppia. Elatusaineella kasvatettuna bakteerit muodostavat paljaalla silmällä havaittavia pesäkkeitä, joissa on satoja miljoonia yksittäisiä bakterisoluja. Bakterien rakenne vaikuttaa bakteerin ominaisuuksiin ja taudinaiheuttamiskykyyn. (Vaara, Skurnik & Sarvas 2010.) Bakteereilla ei ole varsinaista tumaa, vaan DNA on kiinnittynyt solukalvoon. Bakteerin solulimaa ympäröivät solukalvo, soluseinä ja kapseli. Solukalvon rakenteen perusteella bakteerit jaetaan gram-positiivisiin ja gram-negatiivisiin lajeihin. (Solunetti, 2006.)

Taudinaiheuttamiskykyyn vaikuttavat bakteerin tarttumakarvat eli fimbriat, joiden avulla bakteeri voi tarttua esimerkiksi limakalvolle. Liikkumiseen bakteeri käyttää flagelloita, rakenteita, jotka pystyvät tekemään pyörimisliikettä. Bakteerit kykenevät siirtämään DNA:ta solusta toiseen konjugaation eli pariumin avulla. Konjugaatioon bakteerit tarvitsevat siihen erikoistuneita karvoja, piluksia. Ribosomit, joiden pinnalla tapahtuu proteiinisynteesi, sijaitsevat solulimassa. Solulimassa sijaitsevat myös mahdolliset plasmidit. (Heino & Vuento 2010; Vaara ym. 2010.)

Epäedullisissa oloissa selviytymiseen on joillakin bakteereilla kyky muodostaa itiömuotoja. Itiö on bakteerin lepomuoto, jonka avulla se voi selvitä esimerkiksi kuivuudesta. Jos bakteerilla on runsaasti ravintoa saatavilla, se voi kerätä sitä varastoon inkluusiokappaleisiin. (Vaara ym. 2010.) Bakteerit voivat käyttää ravinnokseen melkein mitä vain orgaanista ainetta. Bakterien yksinkertaisesta rakenteesta huolimatta bakterien aineenvaihdunta voi olla hyvin kehittynyt ja erikoistunut. Bakteerit sopeutuvat muuttuneisiin elinoloihin hyvin nopeasti nopean jakautumiskykynsä ansiosta. Esimerkiksi *Escherichia coli* voi jakautua joka 20. minuutti. (Solunetti, 2006.)

## 2.2 Bakterilääkkeet ja antibioottiresistenssi

Bakterilääkkeet ovat tärkeä osa terveydenhuoltoa kaikkialla maailmassa. Ihmisen eliniänodote pidentyi kymmenellä vuodella bakterilääkkeiden käyttöönoton jälkeen. (Hautala 2004.; Järvinen, Vaara, Huovinen, Liippo & Vasankari 2011.) Bakterilääkkeen tärkein ominaisuus on, että se tuhoaa bakteereja tai estää niiden lisääntymistä vahingoittamatta ihmisen elimistöä. Useimmilla bakterilääkkeillä tämä perustuu siihen, että prokaryoottien ja eukaryoottien solut ovat rakenteeltaan ja toiminnaltaan erilaisia. (Järvinen ym. 2011.) Bakterilääkkeet jaetaan bakteriosidisiin ja bakteriostaattisiin lääkkeisiin. Bakteriosidiset mikrobilääkkeet ovat bakteereita tappavia ja bakteriostaattiset bakteerien kasvua estäviä. (Meurman 2007.)

Bakterilääkkeillä on erilaisia vaikutustapoja. Ne joko estävät bakteerin soluseinän peptidoglykaanisynteesiä, bakteerin proteiinisynteesin translaatiovaihetta, bakteerin nukleiinihappojen synteesiä, bakteerin aineenvaihduntaa tai vaurioittavat bakteerin solukalvoa. (Järvinen ym. 2011.)

Beetalaktaamirakenteiset bakterilääkkeet ovat bakteereita tappavia ja ne vaikuttavat pääasiassa kasvaviin soluihin. Bakteerien beetalaktaamiresistenssi voi johtua bakteerilla olevista poikkeavista entsyymeistä, joihin beetalaktaamit eivät voi sitoutua tai bakteerien muodostamista beetalaktamaasientsyymeistä. Beetalaktamaasientsyymit hajottavat beetalaktaamirenkaan ja siten tekevät antibiootin toiminnaltaan kyvyttömäksi. Bakteerin ulkokalvolla voi myös olla kyky estää lääkkeen tunkeutuminen solun sisään. (Järvinen ym. 2011.) Beetalaktamaasientsyymit hajottavat beetalaktaamien bakterilääkeryhmään kuuluvia penisilliinejä, kefalosporiineja ja osa myös karbapeneemejä. (Pastila 2005.)

Antibioottiresistenssi tarkoittaa bakteerin vastustuskykyä antibioottia kohtaan. Bakteerilla voi olla luonnollinen tai hankittu antibioottiresistenssi jotakin mikrobilääkeryhmää kohtaan. Luonnollinen resistenssi on tyypillinen ominaisuus bakteerisuvulle tai lajille. Luonnollisen resistenssin omaava bakteeri on aina vastustuskykyinen tiettyjä mikrobilääkeryhmiä kohtaan. Esimerkiksi

enterokokit ovat vastustuskykyisiä kefalosporiineille ja gramnegatiiviset bakteerit ovat vankomysiiniresistentejä. (Pastila 2005.) Hankittu resistenssi tarkoittaa sitä, että aiemmin herkkä bakteerikanta muuttuu resistentiksi jollekin antibiootille (Evira 2012). Hankittu resistenssi tulee bakteerille, kun sen geneettiset ominaisuudet muuntuvat. Hankittu resistenssiominaisuus sijaitsee kromosomissa tai plasmidissa. Kun bakteeri jakautuu, resistenssimekanismi siirtyy uusiin bakteereihin. (Pastila, 2005; Järvinen ym. 2011.)

Bakteereilla on monenlaisia resistenssimekanismia, ne voivat esimerkiksi tuottaa antibiootteja hajottavia entsyymejä tai bakteerin rakenteessa oleva antibiootin sitoutumiskohta voi muuttua. Jotkin bakteerit pumppaavat antibiootin ulos bakteerin sisältä tai estävät antibiootin pääsyn soluseinän läpi. Puhuttaessa moniresistentistä bakteerista tarkoitetaan sillä bakteerin olevan vastustuskykyinen useammalle eri antibiootille. (Evira 2012.)

Suomessa käytetään antibiootteja enemmän kuin muissa pohjoismaissa. Erityisesti kefalosporiinien käyttö on Suomessa yleisempää. Antibioottiresistentit bakteerit ovat muodostuneet suureksi ongelmaksi ympäri maailman. Suomessa yksi bakteerikanta sadasta luokitellaan resistentiksi jollekin antibiootille. Etelä-Ruotsissa tilanne on vakavampi, siellä vastaava luku on yksi kymmenestä. (Leinikki 2005.)

### 2.3 Bakteerien lääkeherkkyyden määrittäminen kiekkomenetelmällä

Bakteerien lääkeherkkyyksiä määritetään, jotta voidaan selvittää, onko bakteeri herkkyydeltään normaali vai onko sen sietokyky bakteerilääkettä kohtaan merkittävästi korkeampi. Jos bakteerin sietokyky on merkittävästi normaalia korkeampi, kutsutaan bakteeria resistentiksi. (THL 2003.) Bakteerilääkkeen tehon mittana käytetään MIC-arvoa (minimal inhibitory concentration), joka tarkoittaa pienintä lääkepitoisuutta, joka kykenee estämään bakteerin kasvun. Kliiniseen käyttöön on luotu herkkyyssuokitus bakteeripopulaatioiden herkkyyssuokitus ja kudoksissa saavutettavien lääkepitoisuuksien perusteella. Kansainvälisiä herkkyyssuokkia on kolme. Nämä ovat S

(susceptible), I (intermediate) ja R (resistant). S tarkoittaa bakteerin olevan herkkä lääkkeelle ja lääkettä voidaan käyttää infektion hoitoon tavanomaisena annoksena. I tarkoittaa, että bakteerin herkkyys on vähentynyt tai bakteerin herkkyydestä ei ole varmuutta. I-herkkyysluokan tärkein tehtävä on toimia ”puskurialueena” R:n ja S:n välissä ja ehkäistä menetelmän epätarkkuudesta johtuvat väärät R- tai S-tulkinnat. R tarkoittaa, että lääkkeellä ei ole tehoa. (THL 2003; Carlson & Koskela 2011.) Bakteerien todelliseen herkkyyteen ihmisen elimistössä vaikuttavat mm. märkäeritteiden määrä ja kudoksen pH. (Carlson & Koskela 2011.)

Bakteerien aiheuttamien infektioiden hoitoa varten määritetään antibioottilherkkyydet kyseisen infektion hoidossa kyseeseen tuleville lääkkeille. Bakteeri voi olla luonnostaan resistentti jotakin mikrobilääkeryhmää kohtaan, jolloin lääkeherkkyyksien määrittäminen on näitä lääkkeitä kohtaan turhaa. Markkinoilla on myös niin paljon läheisesti toisiaan muistuttavia lääkevalmisteita, että käytännössä ei ole järkevää määrittää herkkyyttä erikseen jokaiselle niistä. Herkkyysmäärittämiin valitaan siis vain osa mahdollisesti tehoavista mikrobilääkkeistä. (Carlson & Koskela 2011.)

Kiekkodiffuusiomenetelmä on yleisimmin käytetty herkkyysmäärittämisessä, koska se on yksinkertainen ja halvin (Carlson & Koskela 2011). Tutkittavasta bakteerikannasta valmistetaan steriiliin 0,9 % keittosuolaan 0,5 McFarland –standardia vastaava suspensio. Viljelysauhalla poimitaan muutama samanlainen pesäke koskettamalla bakteerimassaa yön yli kasvaneelta viljelmältä. Suspension sekoittamiseen käytetään mikseriä. Suspensiota otetaan imeyttämällä sitä steriiliin vanutikkuun, jolla suspensio siirrostetaan huoneenlämpöiseen Müller-Hinton-maljaan. Kun malja on pintakuiva, asetetaan halutut antibioottikiekot. Lääke alkaa diffundoitua kiekoista välittömästi ja bakteeri alkaa kasvaa. Kiekotettuja maljoja inkuboidaan +35 °C lämpökaapissa 18–24 tuntia, minkä jälkeen mitataan estorenkaiden halkaisijat. (Meurman 2012.) Lääkkeen estorengas on sitä suurempi, mitä herkempi bakteerikanta on lääkkeelle (Carlson & Koskela 2011).

## 2.4 Geenien siirtyminen bakteerista toiseen plasmidin välityksellä

Plasmidi esiintyy yleensä genomien ulkopuolisena rengasmaisena kaksisäikeisenä DNA-molekyylinä. Plasmidin DNA-juoste kykenee replikoitumaan itsenäisesti. (Heino & Vuento 2010; Skurnik 2010.) Replikaatio tarkoittaa DNA:n kahdentumista (Solunetti 2006). Yksinkertaisimmillaan kahdentuminen tapahtuu replikaation aloituskohdan ja partitiomekanismin avulla. Partitiomekanismi aiheuttaa sen, että bakteerin jakautuessa molempiin tytärsoluihin tulee kopio plasmidista. Replikaation aloituskohtaan vaikuttavat plasmidigeeneistä peräisin olevat proteiinit. (Skurnik 2010.)

Monissa plasmideissa on lisäksi muitakin geenejä. Plasmidigeenit ovat isäntäbakteerille hyödyksi parantamalla bakteerin selviytymismahdollisuuksia. Antibioottiresistenssi on usein plasmidivälitteinen ominaisuus ja epäonnistuneen antibiootihoidon syynä. Antibioottiresistenssin yleistyminen johtuu siitä, että resistenssigeenit sijaitsevat konjugatiivisessa plasmidissa. Plasmidi on konjugatiivinen, kun sillä on kyky siirtyä bakteerista toiseen. Konjugaatio tarkoittaa yksisuuntaista perinnöllisen aineksen siirtymistä solusta toiseen solukontaktissa. Plasmideista on tunnistettu makromolekyylejä hajottavia entsyymeitä koodittavia geenejä, sekä geenejä, jotka koodittavat antibiootteja ja virulenssitekijöitä. Virulenssitekijät auttavat bakteeria aiheuttamaan infektioitauteja. (Skurnik 2010.)

## 2.5 ESBL

ESBL (Extended Spectrum Beta-Lactamase) tarkoittaa laajakirjoista beetalaktamaasientsyymiä. Tietyt gramnegatiiviset suolistobakteerit erittävät mikrobilääkkeitä pilkkovaa ESBL-entsyymiä. (THL 2009.) ESBL-entsyymejä esiintyy yleisimmin *Enterobacter*- ja *Klebsiella*-lajeilla, mutta myös mm. *Serratia*-lajeilla. Muilla kuin *Enterobacter*- ja *Klebsiella*-lajeilla ESBL-entsyymit ovat harvinaisempia ja vaikeammin osoitettavia (Rantakokko-Jalava, 2013). Beetalaktamaasit eli beetalaktaamirengasta hajottavat entsyymit hajottavat

penisilliinejä, kefalosporiineja ja osa myös karbapeneemejä. (Pastila 2005.) Laajakirjoiset beetalaktamaasit pystyvät hajottamaan kolmannen polven kefalosporiineja ja monobaktaameja. Yleensä ne voivat hajottaa myös penisilliinejä ja ensimmäisen ja toisen polven kefalosporiineja. Tärkeimmät ESBL-geeniperheet ovat nimeltään TEM, SHV ja CTX-M. (THL 2012.) Beetalaktamaasia ilmentävät geenit voivat sijaita joko bakteerikromosomissa tai plasmidissa (Pastila 2005). Bakteeri voi tuottaa beetalaktamaasientsyymiä jatkuvasti tai tuotanto voi indusoitua eli alkaa beetalaktaamilääkityksen aikana. Osa entsyymeistä on estettävissä beetalaktamaasi-inhibiittoreilla. (Pastila 2005.) ESBL:n tuotto voidaan varmistaa yhdistelmäkiekkotestillä, joka perustuu klavulaanihapon kykyyn estää ESBL-entsyymin toiminta (THL 2012).

Suomessa esiintyvien ESBL-entsyymiä tuottavien *E. coli* -kantojen ESBL-entsyymin tyyppi on useimmiten CTX-M. Nämä kannat ovat usein resistenttejä samanaikaisesti myös tobramysiinille, fluorokinoloneille ja sulfatrimetopriimille. ESBL-entsyymiä tuottavien *E. coli* -bakteerien hoidossa ei suositella käytettävän mitään kefalosporiineja, eikä penisilliinien ja beetalaktamaasi-inhibiittorien yhdistelmiä. Tällaisen kannan aiheuttaman virtsarakontulehduksen hoidossa voidaan käyttää nitrofurantoiinia, mutta kaikkia muita vaikeampia tautimuotoja on hoidettava karbapeneemiryhmän antibiooteilla. ESBL-kannat ovat yleensä herkkiä myös tigesykliinille. Pohjois-Amerikassa ja Etelä-Euroopassa on alkanut esiintyä karbapeneemeillekin resistenttejä *E. coli* -kantoja, mutta niitä ei ole tavattu vielä Suomessa. (Siitonen & Vaara 2010.) *K. pneumoniae* ESBL-entsyymin tyyppi on useimmiten CAZ-5 tai SHV-4 (Tissari & Anttila 2010).

Karbapeneemeille resistenttien *E. coli*- ja *K. pneumoniae* -kantojen on huomattu yleistyneen maailmalla nopeasti. Karbapenemaaseja tuottavat kannat ovat yleensä resistenttejä kaikille muillekin käyttökelpoisille bakteerilääkkeille. Bakteerista toiseen voi levitä niin sanottu KQ-elementti, joka sisältää resistenssigeenit kaikille beetalaktaameille, karbapeneemeille, fluorokinoloneille ja monille aminoglykosideille. (Järvinen ym. 2011.)

## 2.6 AmpC

AmpC on geeni, joka voi sijaita joko bakteerin kromosomissa tai plasmidissa. Bakteerin kromosomissa oleva ampC-geeni on yleensä indusoituva, eli sen ilmentyminen on normaalisti vähäistä eikä se aiheuta juurikaan beetalaktaamiresistenssiä. Tietyt antibiootit ja soluseinän komponentit voivat indusoida ampC-geenin ilmentymisen, jolloin sitä tuotetaan normaalia enemmän. Tämä voi vaikuttaa bakteerin beetalaktaamiresistenssiin. Myös mutaatiot voivat aiheuttaa indusoituvan kromosomaalisen ampC-geenin muuttumisen konstituiiviseksi, jolloin bakteerista tulee AmpC-proteiinin hypertuottaja. Tällöin bakteerikanta muuttuu yleensä resistentiksi kefalosporiineille (myös kefamysiineille), penisilliineille ja monobakteameille. (THL 2012.)

AmpC-geenejä voi esiintyä kromosomin lisäksi plasmideissa, jolloin puhutaan plasmidivälitteisestä AmpC:stä. Plasmidissa oleva geeni aiheuttaa bakteerille yleensä samanlaisen antibioottiresistenssin kuin konstituiivisesti ilmentyvä kromosomaalinen ampC-geeni. Plasmidit voivat siirtyä myös sellaisiin bakteerilajeihin, joilla ei ole kromosomaalista ampC-geeniä ja näin ne voivat tulla vastaavasti resistenteiksi kuin sellaiset bakteerilajit, joilla on konstituiivisesti ilmentyvä kromosomaalinen ampC-geeni. (THL 2012.) Plasmidivälitteisen ampC-geenin omaavat kannat, joilla ei luonnostaan ole AmpC:tä, voivat aiheuttaa sairaalaepidemioita ja tällöin niiden merkitys on sama kuin ESBL:n (Philippon, Arlet & Jacoby 2002).

AmpC-luokan beetalaktamaaseja ei yleensä lasketa kuuluvaksi ESBL-entsyymeihin, mutta ne hajottavat kuitenkin beetalaktaameja yhtä laajasti kuin ESBL:t. On myös esitetty, että ne luokiteltaisiin ESBL:n erikoisryhmäksi. (Giske ym. 2009.)

*Enterobacter*-, *Providencia*- ja *Serratia* -lajeilla sekä *Citrobacter freundii*- ja *Morganella morganii* -kannoilla kefalosporiiniresistenssi johtuu yleensä AmpC:n hypertuotosta. Näiden lajien kohdalla on tärkeää tehdä tarkka lajintunnistus, sillä sen perusteella voidaan arvioida mahdollisen resistenssin kehittymistä.

(THL 2012.) Jos *Enterobacter*-infektion hoidossa käytetään 3. polven kefalosporiineja, on 19% riski sille, että kanta muuttuu hoidon aikana resistentiksi (Kaye, Cosgrove, Harris, Eliopoulos & Carmeli 2001.) Niiden lajien kohdalla, joilla ei ole indusoituvaa kromosomaalista ampC-geeniä, plasmidivälitteisen AmpC:n toteaminen on mielekästä. Tällä hetkellä plasmidivälitteisen AmpC:n testaamista suositellaan ainoastaan *Klebsiella*-lajeille. Plasmidivälitteisen ampC-geenin omaavat *K. pneumoniae* -kannat ovat aiheuttaneet sairaalaepidemioita maailmanlaajuisesti. *E. coli* -bakteerin kromosomissa on ampC-geeni, jonka ilmentyminen on hyvin vähäistä. Sen ilmentyminen voi kuitenkin lisääntyä mutaatioiden takia, jolloin *E. coli* voi tulla AmpC:n hypertuottaja. Geneettisestä muutoksesta johtuvaa hypertuottoa ja plasmidivälitteistä AmpC:n tuottoa on mahdotonta erottaa toisistaan fenotyypillisellä testillä. ESBL-geenit ja muut beetalaktamaasit voivat häiritä plasmidivälitteisen AmpC:n toteamista. (THL 2012.)

## 2.7 ESBL-testin ja AmpC-ESBL-testin periaate

ESBL-määritys perustuu beetalaktamaasi-inhibiittoreihin, joilla ESBL:t ovat estettävissä. ESBL-testi tehdään kiekkodiffuusiomenetelmällä. Mast Diagnosticsin ESBL-määrityksessä käytettävien antibiootit ovat kefotaksiimi (CTX30), keftatsidiimi (CAZ30) ja näiden klavulaanihappokompinaatit: kefotaksiimi-klavulaanihappo (CTX/CV) ja keftatsidiimi-klavulaanihappo (CAZ/CV). Jos yhden tai molempien klavulaanihappokombinoitujen kiekkojen estorengas on halkaisijaltaan yli 5 mm suurempi verrattuna kiekkoon, jossa on vastaava antibiootti ilman klavulaanihappoa, kanta tulkitaan ESBL-positiiviseksi. Kefotaksiimi-kefotaksiimiklavulaanihappokiekkoparilla saadaan paremmin esiin CTX-M tyyppiset ESBL:t, joita on suurin osa suomalaisista ESBL-kannoista. Keftatsidiimi-keftatsidiimiklavulaanihappokiekkoparilla saadaan esiin SHV-tyyppiset entsyymit. (Meurman 2012.)

Myös AmpC-ESBL-testi perustuu kiekkodiffuusiomenetelmään. AmpC-ESBL-testi kertoo sekä AmpC:n että ESBL:n tuoton. Kiekkotestillä ei voida erottaa

kromosomaalista ja plasmidivälitteistä AmpC:tä. Mast Diagnosticsin AmpC– ja ESBL-testin antibioottikiekot ovat kefpodoksiimi (A), kefpodoksiimi ja ESBL-inhibiittori (B), kefpodoksiimi ja AmpC-inhibiittori (C) ja kefpodoksiimi ja ESBL sekä AmpC-inhibiittorit (D). Jos kaikkien näiden estorenkaiden halkaisijat ovat 2 mm sisällä toisistaan, kannalla ei ole ESBL- eikä AmpC-aktiivisuutta. Kannan ESBL-aktiivisuus saadaan tietää, kun vähennetään kiekon A estorengas kiekon B estorengaasta ja vähennetään kiekon C estorengas kiekon D estorengaasta ja molempien erotus on 5 mm tai enemmän. Kiekkojen B ja D sekä A ja C väliset erot saavat olla korkeintaan yli 4 mm kumpaankin suuntaan tahansa. Jos kaikki nämä kriteerit täyttyvät, kannalla on vain ESBL-aktiivisuus. (Mast Group 2013.)

AmpC-aktiivisuus saadaan tietää, kun vähennetään kiekon B estorengas kiekon D estorengaasta ja vähennetään kiekon A estorengas kiekon C estorengaasta ja molempien erotus on 5 mm tai enemmän. Kiekkojen A ja B sekä C ja D väliset erot saavat olla korkeintaan 4 mm kumpaankin suuntaan tahansa. Jos kaikki nämä kriteerit täyttyvät, kannalla on vain AmpC-aktiivisuus. Kun kiekosta D vähennetään kiekon C estorengas ja tämä tulos on 5 mm tai enemmän ja kiekkojen A ja B välinen ero on korkeintaan 4 mm, kannalla on sekä ESBL- että AmpC–aktiivisuus. (Rantakokko-Jalava, 2012.)

## 2.8 *Escherichia coli* aiheuttamat infektiot ja luonnollinen resistenssi

*E. coli* kuuluu enterobakteerien heimoon. Se on gramnegatiivinen sauvabakteeri ja muodostaa suurimman osan ihmisen suoliston aerobisesta normaalifloorasta. Kolibakteeri aiheuttaa opportunistisia infektoita, joista yleisimpiä ovat virtsatieinfektiot. *E. coli* –nimeä käytetään suuresta joukosta bakteerikantoja, joilla on samankaltainen aineenvaihdunta, mutta virulenssiltaan ne ovat erilaisia. Jotkin kannat ovat paljon patogeenisempia kuin toiset. Patogeeniset *E. coli* –kannat ovat harvinaisia normaaliflooran joukossa. Enterobakteerit ovat luonnostaan resistenttejä monille antibiooteille, kuten penisilliinille ja erytromysiinille. Luonnollisen resistenssin aiheuttaa tehokas

ulkomembraani. Ihmisen ja eläinten normaaliflooraan kuuluvana bakteerina *E. coli* on isännälleen hyödyllinen, sillä se estää patogeenisempia mikrobeja kolonisoimasta suolistoa. Päästessään elimistössä suoliston ulkopuolelle limakalvojen vastustuskyvyn heikennyttyä tai vamman seurauksena voi *E. coli* aiheuttaa infektion. On myös olemassa ripulia aiheuttavia kantoja. (Siitonen & Vaara 2010.)

Tavallisin *E. coli*n aiheuttama infektio on virtsatieinfektio, joista se aiheuttaa melkein 90% (Siitonen & Vaara 2010). Virtsatieinfektio syntyy, kun välilihan alueella elävät bakteerit pääsevät virtsaputkea pitkin virtsateihin. Virtsatieinfektiot ovat paljon yleisempiä naisilla kuin miehillä. (Tarnanen, Wuorela, Uhari & Kukkonen-Harjula 2011.) *E. colilla* on hyvät kasvumahdollisuudet virtsassa, mikä edistää infektion leviämistä virtsaputkesta rakkoon ja rakosta munuaiseen. Munuaiseen levinnyttä virtsatieinfektiota kutsutaan pyelonefriitiksi. (Siitonen & Vaara 2010.)

*E. coli* aiheuttaa virtsatieinfektioiden lisäksi myös kirurgisia infektioita ja sekainfektioita suolistoalueella. Kirurgisella infektiolla tarkoitetaan kirurgisten toimenpiteiden infektiokomplikaatioita ja tulehduksia, jotka vaativat leikkaushoitoa. Suoliston toimintahäiriön seurauksena normaaliflooran bakteerit pääsevät kudoksiin ja syntyy sekainfektio, esimerkiksi umpilisäkkeen tai sappirakon tulehdus. *E. coli* voi esiintyä myös pinnallisessa sekainfektiossa esimerkiksi säarihaavassa. *E. coli* -infektiosta voi kehittyä bakteremia tai sepsis. Vastasyntyneelle bakteeri voi aiheuttaa vakavan septisen yleisinfektion. *E. coli* on yleisin verenmyrkytyksen aiheuttaja. (Siitonen & Vaara 2010.)

Gramnegatiivisiin bakteereihin tehoavat lääkkeet tehoavat hyvin myös *E. coli*in. Antibioottiherkkyyismäärityksen tekeminen on kuitenkin yleensä tarpeen ennen hoitoa. Sairaaloissa, joissa käytetään paljon bakteerilääkkeitä, on hankittu plasmidiperäinen moniresistenssi yleistä. *E. coli*n ESBL-entsyymiä tuottavat kannat ovat yleistyneet viime aikoina Suomessakin ja joissakin sairaaloissa jopa 10 % *E. coli*-kannoista on ESBL-kantoja. (Siitonen & Vaara 2010).

ESBL-entsyymejä tuottavien kolibakteerikantojen osuus on kasvanut jatkuvasti vuodesta 2007 alkaen. Veriviljelyistä löydettyjen ESBL-entsyymiä tuottavien kantojen osuus kolminkertaistui vuodesta 2007 vuoteen 2010 mennessä. Antibioottien runsas käyttö on aiheuttanut ESBL-entsyymiä tuottavien bakteerikantojen nopean lisääntymisen. Matkailija voi saada ESBL-entsyymiä tuottavan bakteerikannan suolistoonsa maasta, jossa on heikko hygienian taso. Bakteri ei välttämättä aiheuta oireita suolistossa, mutta altistaa vaikeasti hoidettavalle infektiolle. (THL 2012.) *E. colin* aiheuttamassa sairaalainfektiossa kanta on yleensä sairaalasta peräisin, mutta ennen infektiota bakteeri kolonisoii potilaan suoliston ja infektio aiheutuu vasta kolonisaation jälkeen. (Siitonen & Vaara 2010). *E. colin* AmpC-entsyymien tuotto on yleensä kromosomaalisesta geenistä johtuvaa, joten AmpC:tä tuottava *E. coli* -kanta ei yleensä ole sairaalahygieenisesti merkittävä. Joissain tapauksissa AmpC voi kuitenkin olla plasmidivälitteinen. (Rantakokko-Jalava, 2013). ESBL-entsyymien tuotto on aina plasmidiperäistä, jolloin kanta on sairaalahygieenisesti merkittävä (Pastila 2005).

## 2.9 *Klebsiella pneumoniaen* aiheuttamat infektiot ja luonnollinen resistenssi

*Klebsiella*-lajit kuuluvat *E. colin* tapaan ihmisen suoliston normaaliflooraan. Ne aiheuttavat harvoin infektiota perusterveille ihmisille, mutta ovat merkittäviä sairaalainfektioiden aiheuttajia. Yleisin *K. pneumoniaen* aiheuttama infektio on avohoidosta tai sairaalasta alkunsa saanut lohkokeuhkokuume. *K. pneumoniaen* aiheuttama keuhkokuume voi alkaa rajuna tautina, jolloin sen kuolleisuus on suuri. Bakteri on tavallinen löydös myös virtsatieinfektioissa, vatsan alueen kirurgisissa näytteissä ja kirurgisissa haavainfektioissa. (Tissari & Anttila 2010.)

*K. pneumoniae* on tuottamansa beetalaktamaasin takia luonnostaan resistentti ampisilliinille. Se on kuitenkin yleensä herkkä mm. amoksisilliinille ja klavulaanihapon yhdistelmälle, toisen ja kolmannen polven kefalosporiineille, karbapeneemeille, aminoglykosideille ja fluorokinoloneille. (Tissari & Anttila

2010.) *K. pneumoniae* ESBL-entsyimin tuotanto johtuu plasmidissa sijaitsevasta ESBL-geenistä, joka tekee tällaisesta bakteerikannasta sairaalahygieenisesti merkittävän löydöksen (Rantakokko-Jalava 2012). ESBL-entsyymiä tuottavat *K. pneumoniae* -kannat ovat vielä melko harvinaisia Suomessa, verrattuna *E. coli* ESBL-kantoihin. (Tissari & Anttila 2010; Rantakokko-Jalava 2013). Maailmalla *Klebsiellan* ESBL-kantoja oli jo kauan ennen kuin *E. coli* ESBL-kannat yleistyivät (Rantakokko-Jalava 2013).

*K. pneumoniae*- ja *E. coli* -bakteereilla on yleistymässä karbapenemaasia tuottavat kannat eli karbapeneemiryhmän antibiooteille resistentit kannat. Tärkeimpiä ovat KPC-, VIM-, NDM- ja IMP-geeniryhmät. *K. pneumoniae* KPC-karbapenemaasia tuottava kanta vaikuttaa olevan erityisen leviävä. Se on levinnyt nopeasti kaikkialle maailmaan ja Suomessa todettiin ensimmäiset kannat vuonna 2009. (Järvinen ym. 2011.)

## 2.10 *Enterobacter*-lajien aiheuttamat infektiot ja luonnollinen resistenssi

*Enterobacter*-lajien taudinaiheuttamiskyky perustuu opportunistisiin infektioihin. *Enterobacter*-lajin bakteerit kolonisoivat usein sairaalapotilaita ja kolonisaatio edeltää yleensä infektiota. Vakavat perussairaudet, kuten syöpä, diabetes tai palovamma tai mikä tahansa elimistön puolustuskykyä vähentävä sairaus altistavat *Enterobacter*-lajien aiheuttamille sairaalainfektioille. Kliinisissä näytteissä eniten *Enterobacter*-lajeista tavataan *E. cloacae*. *E. cloacae* löytyy tavallisimmin infektioituneista sääri-, palo- ja kirurgisista haavoista. Näissä tapauksissa *E. cloacae* voi esiintyä yksinään tai osana sekainfektiota. Bakteeri on tavanomainen löydös myös virtsatie- ja hengitystieinfektioiden yhteydessä. (Tissari & Anttila 2010.)

*Enterobacter*-lajien aiheuttamalle keuhkokuumeelle altistaa mm. krooninen keuhkoputkia ahtauttava keuhkosairaus, alkoholismi ja diabetes. Myös keuhkonsiirtopotilailla on suurentunut alttius sairastua *Enterobacter*-lajien aiheuttamiin pneumonioihin ja tällaisissa tapauksissa on suurempi kuolleisuusaste kuin muiden gramnegatiivisten bakteerien aiheuttamissa

keuhkokuumeissa. *Enterobacter*-lajit voivat aiheuttaa myös bakteremian. Se on tavallisempi miehillä kuin naisilla ja esiintyy yleensä eniten iäkkäillä ja lapsilla. (Tissari & Anttila 2010.)

*Enterobacter*-lajit ovat yleensä resistenttejä ampicilliinille ja ampicilliinin ja klavulaanihapon yhdistelmälle sekä ensimmäisen polven kefalosporiineille tuottamansa indusoituvan kromosomaalisen beetalaktamaasientsyymin takia. *Enterobacter*-lajit ovat kefalosporiineista herkimpiä uusille laajakirjoisille valmisteille, kuten kefepiimille ja kefpiromille. (Tissari & Anttila 2010.) *Enterobacter*-lajeilla beetalaktamaasia ilmentävät geenit sijaitsevat kromosomissa. Geenissä tapahtuvan mutaation seurauksena beetalaktamaasientsyymin tuotanto muuttuu erittäin suureksi ja sen takia bakteerista tulee resistentti laajakirjoisia penisilliinejä ja kefalosporiineja sekä asteronaamia kohtaan. (Tissari & Anttila 2010.) *Enterobacter*-lajeilla antibioottiresistenssi voi johtua myös plasmidin koodittamista beetalaktamaaseista. *E. cloacaen* beetalaktamaasientsyymin tuotanto on useimmiten kromosomaalista AmpC:n ylituotantoa. ESBL-entsyymit taas ovat plasmidivälitteisiä, jos niitä näillä kannoilla todetaan. (Tissari & Anttila 2010; Rantakokko-Jalava 2013.)

*Enterobacter*-lajien bakteereista voi tulla myös karbapeneemi- ja kefepiimiresistenttejä, kun kromosomaalisissa beetalaktamaasin hypertuottajissa tapahtuu mutaatio, joka muuttaa niiden seinämän läpäisevyyttä. Hypertuottajalle voi myös muodostua kyky tuottaa karbapenemaasientsyymiä, mutta tämä on harvinaisempaa. Resistenssitilanne on erilainen alueittain, joten hoidon tulisi tapahtua aina antibioottiherkkyyismäärityksen pohjalta. Mitä suurempi sairaala, sitä suurempi osuus *Enterobacter*-kannoista on resistenttejä beetalaktaameille, sulfatrimetopriimille ja fluorokinoloneille. Tehohoitoyksiköissä löytyy resistenteimpiä kantoja eri osastojen välillä vertailtuna. (Tissari & Anttila 2010.)

Resistenssi toisen ja kolmannen polven kefalosporiineja kohtaan kehittyi *Enterobacter*-lajeilla helposti jo hoidon aikana, varsinkin, jos mikrobilääkkeenä käytetään laajakirjoista kefalosporiinia. *Enterobacter*-lajien aiheuttamien

infektioiden hoidossa suositellaan käytettäväksi mieluiten beetalaktaamin ja aminoglykosidin kombinaatiota tai karbapeneemejä ja fluorokinoloneja. (Tissari & Anttila 2010; Järvinen ym. 2011.)

## 2.11 Aikaisempia tutkimuksia

Vuonna 2011 tehtiin menetelmävertailututkimus AmpC-beetalaktamaasin löytämiseksi *Enterobacteriaceae*-heimon bakteereilla. Tutkimus tehtiin, koska yhtenäistä AmpC-tunnistusmenetelmää ei ole vielä laboratorioden käytössä ja jotta saataisiin enemmän tietoa AmpC:n merkityksestä. Tutkimuksessa verrattiin AmpC:n fenotyypisten tunnistusmenetelmien herkkyyttä ja tarkkuutta. Otoksena oli 246 *Enterobacteriaceae*-kanta, joilla oli vaihtelevasti kykyä tuottaa beetalaktamaasientsyymiä. (Ingram ym. 2011.)

AmpC:n menetelmävertailututkimus perustui kefamysiinin, keftatsidiimin ja kefepiimin herkkyyksien mittaamiseen. Näitä verrattiin perinteiseen ESBL-tutkimusmenetelmään. Vertailussa oli mukana varmistustesteinä inhibiittoreihin perustuva menetelmä, AmpC:n E-testi ja nopea kromogeeninen määrittäminen. Referenssimenetelminä käytettiin PCR-menetelmää ja kolmiosaista entsyymien erotusmenetelmää. (Ingram ym. 2011.)

AmpC-geeni löytyi 74 bakteerikannalta ja suurin osa näistä oli plasmidivälitteisiä. Tutkimusmenetelmien herkkyyksien oli 47–99% ja tarkkuus 45–95 %. Varmistustestien tulokset vaihtelivat suuresti, herkkyyksien vaihteli välillä 19–97 % ja tarkkuus välillä 88–100 %. Vain Tris-EDTA ja MAST ID D68C -kiekkotestien herkkyyksien ja tarkkuus olivat yli 90 %. Inhibiittoreihin perustuvien menetelmien parantamiseksi tarvitaan vielä lisätutkimuksia, jotta löydetään sopivat entsyymien substraattit, inhibiittoryypit ja sopivat inhibiittoriin määrät. AmpC löytyy tutkimuksen mukaan parhaiten määrittämällä kefoksitiini-herkkyyksien kiekkotestillä ja varmistamalla tämä Tris-EDTA AmpC-kiekkotestillä. Tällöin herkkyyksien on 95 % ja tarkkuus 98 %. (Ingram ym. 2011.)

Marraskuussa 2012 on julkaistu toinen tutkimus, jossa verrattiin indusoituvan ampC-geenin omaavien gramnegatiivisten bakteerien tuottamien laajakirjoisten

beetalaktamaasien erilaisia fenotyyppejä määrittämissä menetelmissä. Tutkimus tehtiin samasta syystä kuin edellinenkin, eli koska laboratorioilta puuttuu yhtenäinen AmpC:n määrittäminen. Tutkimuksessa verrattiin neljää eri fenotyypistä ESBL:n varmistusmenetelmää. Kyseessä oli ESBL:n tuoton toteaminen sellaisilla bakteereilla, joilla on kromosomaalinen AmpC. Tutkimuksen otantana oli 83 *Enterobacteriaceae*-kanta, joilla on indusoitava AmpC-geeni. (Willems, Cartuyvels, Magerman, Raymaekers & Verhaegen 2012.)

Menetelmät olivat ESBL:n E-testit ja yhdistelmäkiekkotestit. Nämä molemmat tehtiin Müller-Hinton-agarille AmpC-inhibiittorilla (kloksasilliini) ja ilman. AmpC-inhibiittoria käytettiin elatusaineen joukossa. Tutkimus osoitti, että kaksoiskiekkotesti kefotaksiimilla ainoana indikaattorikefalosporiinina ei ole luotettava AmpC:n tunnistusmenetelmä, sillä sen herkkyys on vain 52 %. Kloksasilliinin lisääminen elatusaineeseen nosti merkittävästi tarkkuutta kun käytettiin keftatsidiimiä indikaattorina. Tällöin herkkyys oli 92 % ja tarkkuus 93%. Kefepiimi-E-testin herkkyys oli 80 %, mikä oli merkittävästi parempi kuin kefotaksiimi-E-testillä (16 %) ja keftatsidiimi-E-testillä (32 %). Kloksasilliinin lisääminen elatusaineeseen paransi ESBL:n löytymistä jokaisella E-testillä. Tutkimustuloksista pääteltiin, että tehokkain ja edullisin ESBL-määrittäminen indusoivan ampc-geenin omaavilla *Enterobacteriaceae*-kannoilla on kloksasilliinin lisääminen Müller-Hinton-agarin ja keftatsidiimin tai kefepiimin käyttäminen indikaattorikefalosporiinina. (Willems ym. 2012.)

### 3 OPINNÄYTETYÖN TARKOITUS, TAVOITE JA TUTKIMUSONGELMAT

AmpC- ja ESBL-testin evaluaation tarkoituksena on selvittää, onko AmpC-ESBL-yhdistelmätestistä (Mast Diagnostics AmpC&ESBL ID Set) hyötyä tavallisen ESBL-testin lisänä, kun selvitetään kolmannen polven kefalosporiineille resistenttien enterobakteerien resistenssimekanismeja. Tavoitteena on selvittää, voitaisiinko AmpC-ESBL-yhdistelmätesti ottaa Tykslabin kliinisen mikrobiologian laboratorion osaston 938 käyttöön. Kauaskantoisena hyötynä tutkimus voi ehkäistä sairaalahygieenisesti merkittävien bakteerien leviämistä tulevaisuudessa, koska AmpC:n löytäminen auttaa ehkäisemään sairaalahygieenisesti merkittävän bakteerin leviämistä. Tärkeimpinä bakteereina tarkastelussa ovat *E. coli*, *K. pneumoniae* ja *E. Cloacae*.

Tutkimusongelmat:

- Löytyykö ESBL paremmin *E. cloacae* -bakteerista AmpC-ESBL-yhdistelmätestillä vai tavallisella ESBL-testillä?
- Miten hyvin AmpC löydetään *K. pneumoniae* -bakteerista AmpC-ESBL-yhdistelmätestin avulla?

## 4 OPINNÄYTETYÖN KÄYTÄNNÖN TOTEUTUS

### 4.1 Opinnäytetyön aineiston keruu ja toteutus

Tämä opinnäytetyö toteutettiin Tykslabin kliinisen mikrobiologian osastolle 938. Opinnäytetyön aihe saatiin syksyllä 2012, jolloin myös valmisteltiin opinnäytetyön käytännön toteutusta. Tälle opinnäytetyölle haettiin tutkimuslupa Tykslabin ylihoitajalta ja lupa myönnettiin maaliskuussa 2013. Opinnäytetyön teoreettinen viitekehys laadittiin syksyn 2012 ja kevään 2013 aikana. Valmis opinnäytetyö julkaistiin keväällä 2013. Opinnäytetyön käytännön osuuden toteutuksessa käytettiin kliinisen mikrobiologian osaston tarvikkeita ja välineitä.

Opinnäytetyön otantana oli 26 bakteerikantaa, joista seitsemän oli *E. coli* –bakteeria, kuusi oli *K. pneumoniae* –bakteeria ja 12 oli *E. cloacae* –bakteeria. Bakteerikannoista oli joitain ominaisuuksia tiedossa etukäteen, esimerkiksi ovatko ne herkkiä tai onko niillä resistenssiominaisuuksia. Osalta bakteerikannoista oli selvitetty geenitesteillä, onko niillä ESBL- tai AmpC-geenejä. AmpC–ESBL-testin pakkausselosteessa on suositeltu käytettäväksi tiettyjä kontrollikantoja (taulukko 1.) Näitä kaikkia ei kuitenkaan otettu tutkimukseen mukaan, sillä niitä ei ollut saatavilla.

Taulukko 1. Pakkausselosteessa suositellut kontrollikannat.

Laji	Kantatunnus	Kuvaus
<i>E. coli</i>	NCTC 13351	ESBL pos
<i>E. coli</i>	NCTC 13352	ESBL pos
<i>E. coli</i>	NCTC 13353	ESBL pos
<i>E. cloacae</i>	NCTC 13406	AmpC pos
<i>E. coli</i>	ATCC 25922	Negatiivinen

Työhön valittiin lisää kantoja sillä perusteella, että mukaan saatiin pakkausselosteessa mainittuja kantoja vastaavia kantoja. Näin tutkittavana oli sekä ESBL- että AmpC-positiivisia kantoja ja tavallisia herkkiä kantoja (taulukko

2.) Näin saatiin testattua antibioottikiekkojen toimivuus sekä herkkien että ESBL- ja AmpC-positiivisten kantojen löytymiseksi. Tutkimukseen mukaan otetut bakteerikannat valitsi kliinisen mikrobiologian erikoislääkäri Kaisu Rantakokko-Jalava. Kun tutkimus oli tehty ja antibioottiherkkyydet mitattu, nämä tulokset tulkittiin antibioottikiekkojen valmistajan ohjeiden mukaan.

Taulukko 2. Kaikki testattavat kannat.

	Laji	Kantatunnus	Kuvaus
1	<i>E. coli</i>		ESBL (CTX-M-15) (+kontr)
2	<i>E. coli</i>	ATCC 25922	herkkä (-kontr)
3	<i>E. coli</i>	THL 309	pAmpC pos (CIT)
4	<i>K. pneumoniae</i>	THL 219	pAmpC pos (FOX)
5	<i>E. coli</i>	THL 397	pAmpC pos (MOX)
6	<i>E. cloacae</i>	THL ESBL 3263	todennäköisesti derepressoitunut
7	<i>E. cloacae</i>	ATCC 13047	tavallinen herkkyys
8	<i>E. coli</i>	12U315677	moniresistentti pt-kanta, ESBL neg
9	<i>E. coli</i>	12GN02316	moniresistentti pt-kanta, ESBL neg
10	<i>E. coli</i>	12LT00086	UKNeqas 1374 (ESBL)
11	<i>E. coli</i>	12LT00074	UKNeqas 0882 (ESBL)
12	<i>K. pneumoniae</i>	12LT00131	UKNeqas 1057 (ESBL)
13	<i>K. pneumoniae</i>	12M902639	moniresistentti pt-kanta, ESBL neg
14	<i>K. pneumoniae</i>	12LT00125	UKNeqas 1019, moniresistentti,
15	<i>K. pneumoniae</i>	11LT00132	UKNeqas 0555 (KPC+SHV-12)
16	<i>E. cloacae</i>	12U315609	Todennäk. derepressoitunut AmpC
17	<i>E. cloacae</i>	11GN01652	Moniresistentti kanta, myös ESBL?
18	<i>E. cloacae</i>	10M903072	Todennäk. derepressoitunut AmpC
19	<i>K. pneumoniae</i>	11GN02418	pAmpC pos (CIT)
20	<i>E. cloacae</i>	1105	ESBL-kanta
21	<i>E. cloacae</i>	1110	ESBL-kanta
22	<i>E. cloacae</i>	1115	ESBL-kanta
23	<i>E. cloacae</i>	1116	ESBL-kanta
24	<i>E. cloacae</i>	1117	ESBL-kanta
25	<i>E. cloacae</i>	1120	ESBL-kanta
26	<i>E. cloacae</i>	1121	ESBL-kanta

Tutkimus aloitettiin tekemällä puhdasviljelmät tutkittavista 26 kannasta verimaljalle. Verimaljat jätettiin inkuboitumaan +35°C lämpökaappiin yön yli.

Seuraavana aamuna puhdasviljelmistä tehtiin normaali 0,5-0,63 McFarland-standardin mukainen bakteerisuspensio poimimalla viljelysauvalla muutama (1-3 kpl) samanlainen pesäke ja sekoittamalla ne lasiputkessa olevaan 2ml 0,9 % NaCl:iin. Sekoittamiseen käytettiin mikseriä (Vortex Genie 2), jotta suspensiosta tuli tasaista. Suspension tiheys tarkistettiin Densi CHEK Plus -mittarilla. Suspensiota imeytettiin steriiliin vanutikkuun ja tikusta poistettiin ylimääräinen suspensio painamalla tikkua voimakkaasti putken seinämää vasten. Suspensio siirrostettiin dreijaamalla huoneenlämpöiseen pintakuivaan Müller-Hinton-herkkyysmaljaan. Siirrostus tehtiin 15 minuutin kuluessa suspension valmistuksesta. Jokaisesta bakteerikannasta tehtiin yksi bakteerisuspensio, josta tehtiin kaksi Müller-Hinton-herkkyysmaljaa. Toiselle maljalle laitettiin tavalliset ESBL-testin antibioottikiekot ja toiselle maljalle laitettiin AmpC-ESBL-testin antibiootit. Antibioottikiekot asetettiin maljalle Mast Diagnosticsin annostelijalla. Annostelijoiden tulee olla huoneenlämmössä noin 30 minuuttia ennen niiden avaamista. Ennen kiekotusta tulee odottaa hetki, jotta maljat ovat pintakuivia. Puhdasviljelmien, bakteerisuspension ja siirrostuksen teko suoritettiin laminaarikaapissa. (Meurman 2012.)

Kun antibioottikiekot oli asetettu maljoille, inkuboitin maljoja +35 °C lämpökaapissa yön yli. Seuraavana aamuna luettiin estorenkaiden halkaisijat. Estorenkaat luettiin viivoittimen avulla mustaa taustaa vasten. Estorenkaat luettiin kahteen kertaan tutkijan mittausvirheiden poistamiseksi. Kukin kanta testattiin kahtena eri päivänä, jotta nähtiin testin toistettavuus.

Taulukoissa (liite 2. ja liite 3.) on ensin esitetty ESBL-testin antibioottikiekkujen estorenkaiden halkaisijat. Mast Diagnosticsin ESBL-testin antibioottikiekot ovat kefotaksiimi (CTX30), keftatsidiimi (CAZ30) ja näiden klavulaanihappokompinaatit: kefotaksiimi-klavulaanihappo (CTX/CV) ja keftatsidiimi-klavulaanihappo (CAZ/CV). Jos yhden tai molempien klavulaanihappokombinoitujen kiekkujen estorengas on halkaisijaltaan yli 5 mm suurempi verrattuna kiekkoon, jossa on vastaava antibiootti ilman klavulaanihappoa, kanta tulkitaan ESBL-positiiviseksi. (Meurman 2012.) Työohjeeseen perustuen taulukossa on laskettu kefotaksiimi-

klavulaanihappokiekon ja kefotaksiimikiekon erotus ja keftatsidiimi-klavulaanihappokiekon ja keftatsidiimikiekon erotus. Erotusten perusteella taulukkoon on tulkittu kannan bakteerikantojen olevan joko ESBL-positiivisia tai ESBL-negatiivisia.

Kahden eri testin tulosten vertailun helpottamiseksi samassa taulukossa on myös AmpC-ESBL-testin tulokset. AmpC-ESBL-testin antibioottikiekot ovat kefpodoksiimi (A), kefpodoksiimi ja ESBL-inhibiittori (B), kefpodoksiimi ja AmpC-inhibiittori (C) ja kefpodoksiimi ja ESBL sekä AmpC-inhibiittorit (D). Jos kaikkien näiden estorenkaiden halkaisijat ovat 2 mm sisällä toisistaan, kannalla ei ole ESBL- eikä AmpC-aktiivisuutta. Kannan ESBL-aktiivisuus selviää, kun vähennetään kiekon A estorengas kiekon B estorengaasta ja kiekon C estorengas kiekon D estorengaasta ja molempien erotus on 5 mm tai enemmän. Kiekkojen B ja D sekä A ja C väliset erot saavat olla korkeintaan yli 4 mm kumpaankin suuntaan tahansa. Jos nämä kriteerit täyttyvät, kannalla on vain ESBL-aktiivisuus. (Mast Group 2013.)

AmpC-aktiivisuus selviää, kun vähennetään kiekon B estorengas kiekon D estorengaasta ja kiekon A estorengas kiekon C estorengaasta ja molempien erotus on 5 mm tai enemmän. Kiekkojen A ja B sekä C ja D väliset erot saavat olla korkeintaan 4 mm kumpaankin suuntaan tahansa. Kun nämä kriteerit täyttyvät, kannalla on vain AmpC-aktiivisuus. Kun kiekosta D vähennetään kiekon C estorengas ja tämä tulos on 5 mm tai enemmän ja kiekkojen A ja B välinen ero on korkeintaan 4 mm, kannalla on sekä ESBL- että AmpC-aktiivisuus. (Mast Group 2013.) Näiden tulkintaohjeiden perusteella taulukkoon on laskettu haluttujen estorenkaiden erotukset ja tulkinnat siitä, ovatko bakteerikannat ESBL- tai AmpC-aktiivisia. Viimeisessä sarakkeessa on viimeisen tulkintaohjeen mukaan tehty tulkinta siitä, onko kannalla sekä ESBL- että AmpC-aktiivisuus.

## 4.2 Metodologiset lähtökohdat

Opinnäytetyössä toteutettu tutkimus on kvantitatiivinen. Kvantitatiivinen tutkimus tarkoittaa määrällistä tutkimusta. Määrällisen tutkimuksen tunnusomaisia piirteitä ovat mittaaminen, tiedon esittäminen numeroin, suuri otoskoko ja objektiivisuus, eli tutkimustulos on tutkijasta riippumaton. (Vilka 2007.) Määrällinen tutkimus kohdentuu siis muuttujien mittaamiseen ja niiden välisten yhteyksien tarkasteluun (Kankkunen & Vehviläinen-Julkunen 2009). Määrälliseen tutkimukseen liittyy läheisesti myös aiemmat teoriat ja aikaisempien tutkimusten johtopäätökset. Otantasuunnitelma tehdään määrittelemällä perusjoukko, johon tulosten tulee päteä, ja valitsemalla tästä perusjoukosta otos. Kvantitatiivisessa tutkimuksessa kohdetta pyritään tutkimaan niin kokonaisvaltaisesti, kuin on mahdollista. Kohdejoukon valinnassa ei käytetä satunnaisotoksen menetelmää, vaan se valitaan tarkoituksenmukaisesti (Hirsjärvi, Remes & Sajavaara 2010.)

Määrällisessä tutkimuksessa tutkija tulkitsee ja selittää olennaisen numerotiedon sanallisesti. Jos määrällisessä tutkimuksessa käytetään tutkimustulosten analysoinnissa tilastollisia menetelmiä, tulisi havaintoyksiköiden vähimmäismäärä olla 100. (Vilka 2007.) Tämän takia tämän tutkimuksen tuloksia ei käsitellä tilastotieteen menetelmin, sillä se ei olisi näin pienen aineiston kanssa mielekästä. Jokaista tutkittavaa bakteerikantaa arvioidaan tapauskohtaisesti. (Rantakokko-Jalava 2013.) Määrällisessä tutkimuksessa tapauksia voidaan käsitellä ainutlaatuisina ja tulkita aineistoa sen mukaisesti (Hirsjärvi, Remes & Sajavaara 2010).

Tutkimusaineisto kerätään systemaattisella havainnoinnilla, mikä tarkoittaa sitä, että tutkija merkitsee havainnot ennalta suunniteltuun strukturoituun lomakkeeseen. (Vilka 2007.) Systemaattisia havaintoja tehdään tässä tutkimuksessa näköaistin avulla. Tulosten tarkastelussa käytetään tutkijan itse keräämiä tutkimustuloksia primäärinä aineistona. Primäärin eli ensi käden aineiston tarkoitus on vastata suoraan tutkimusongelmaan. Toisen käden aineistona voi olla materiaali, joka on kerätty esimerkiksi tilastosta tai

tietokannasta. (Vilka 2007.) Tässä opinnäytetyössä toisen käden aineistona on luettelo, jossa on kuvattu tutkimuksen kohteena olevien bakteerien ennalta tiedossa olevia ominaisuuksia (Taulukko 2.). Primääriä aineistoa verrataan toisen käden aineistoon ja katsotaan, ovatko primäärin aineiston tulokset vastaavia toisen käden aineiston kanssa.

#### 4.3 Opinnäytetyön eettisten näkökohtien tarkastelu

Tutkimuksessa noudatetaan hyvää tieteellistä käytäntöä. Hyvällä tieteellisellä käytännöllä tarkoitetaan, että tutkimuksen tavoitteet, aineiston hankinta, säilytys ja käsittely eivät loukkaa tutkimuksen kohderyhmää, tiedeyhteisöä eikä hyvää tieteellistä tapaa. Hyvään tieteelliseen tapaan kuuluvat normit ja arvot, kuten yleinen huolellisuus ja rehellisyys tutkimustyössä ja avoimuus tulosten julkaisemisessa. Tutkija on vastuussa omassa tutkimuksessaan tekemistään valinnoista. (Vilka 2007.)

Tutkimuksen teossa käytetään hyvää lähdekritiikkiä, eli käyttävän aineiston laatu arvioidaan ennen kuin lähdettä käytetään tutkimuksessa. Lähteenä olevan aineiston laatu vaikuttaa suoraan tutkimuksen luotettavuuteen. (Vilka 2007.) Tieteelliselle tutkimustyölle asetettuja vaatimuksia ovat myös tutkimusraportin teossa plagioinnin välttäminen, raportointi ei saa olla harhaanjohtavaa tai puutteellista ja tuloksia ei sepitetä tai kaunistella (Hirsjärvi, Remes, Sajavaara 2009).

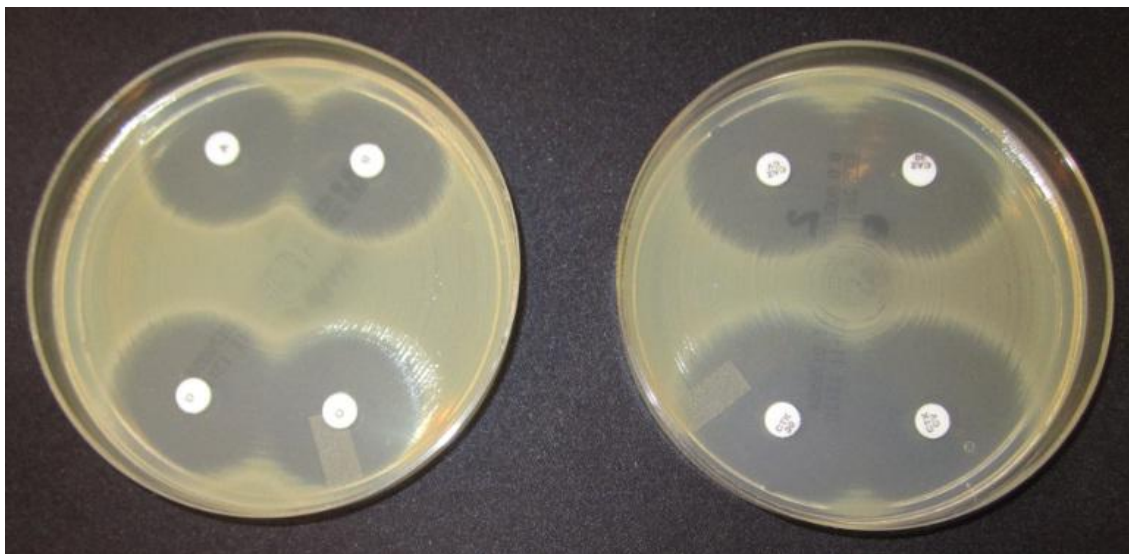
Tässä opinnäytetyössä jokaisesta testattavasta bakteerikannasta tehtiin rinnakkaiset bakteerisuspensiot, joista tehtiin omat herkkyysmaljat kahtena eri tekokertana. Rinnakkaisten maljojen tekemisellä varmistettiin tutkimuksen toistettavuus. Antibioottiherkkydet myös mitattiin kahteen kertaan mittausvirheiden poistamiseksi. Tutkittavissa bakteerikannoissa ei ollut nähtävissä potilastietoja, vaan niitä käsiteltiin bakteerien nimillä, kantatunnuksilla ja juoksevalla numerosarjalla. Tekijä ei ollut missään työn vaiheessa tekemisissä potilastietojen kanssa. Tutkimusta varten ei tarvinnut

ottaa uusia potilasnäytteitä, vaan tutkimuksessa käytiin pakastimeen taltioituja bakteerikantoja.

## 5 TULOKSET JA NIIDEN TARKASTELU

Opinnäytetyöhön valittiin mukaan bakteerikannat sillä perusteella, että saatiin testattua AmpC-ESBL-testin toimivuus ESBL- ja AmpC-kantojen löytymiseksi. Mukaan valittiin myös herkkiä kantoja negatiivisiksi kontrolleiksi. Näin saatiin testattua antibioottikiekkojen toimivuus sekä herkkien että ESBL- ja AmpC-positiivisten kantojen löytymiseksi.

Kanta 1 *E. coli* on ennakkotietojen mukaan ESBL-positiivinen, sillä on CTX-M-15-geeni. Opinnäytetyön molempien testien perusteella kanta on ESBL-positiivinen ja AmpC-negatiivinen, mikä täsmää kannan ennakkotietojen kanssa. Tämä kanta on opinnäytetyössä mukana positiivisena ESBL-kontrollina. Kuvassa 1. on esitetty kanta 2 *E. coli*, joka on ennakkotietojen mukaan herkkä bakteerikanta ja se on opinnäytetyössä mukana negatiivisena kontrollina. Kuvasta nähdään vasemmalla maljalla olevien AmpC-ESBL-testin antibioottikiekkojen estorenkaiden olevan kaikki samankokoisia, mitattuina 28 mm kukin. Näin ollen laskutoimitusten tuloksena kanta on sekä ESBL- että AmpC-negatiivinen, joten tulos täsmää ennakkotietojen kanssa. Kuvassa oikealla olevalla maljalla on tavallisen ESBL-testin antibioottikiekot. CTX-kiekon ja CTX-klavulaanihappokiekon erotus on 1 mm ja CAZ-kiekon ja CAZ-klavulaanihappokiekon erotus on 0 mm, jolloin kanta on ESBL-negatiivinen myös näiden kiekkojen perusteella.



Kuva 1. Kanta 2: *E. coli*, herkkä bakteerikanta.

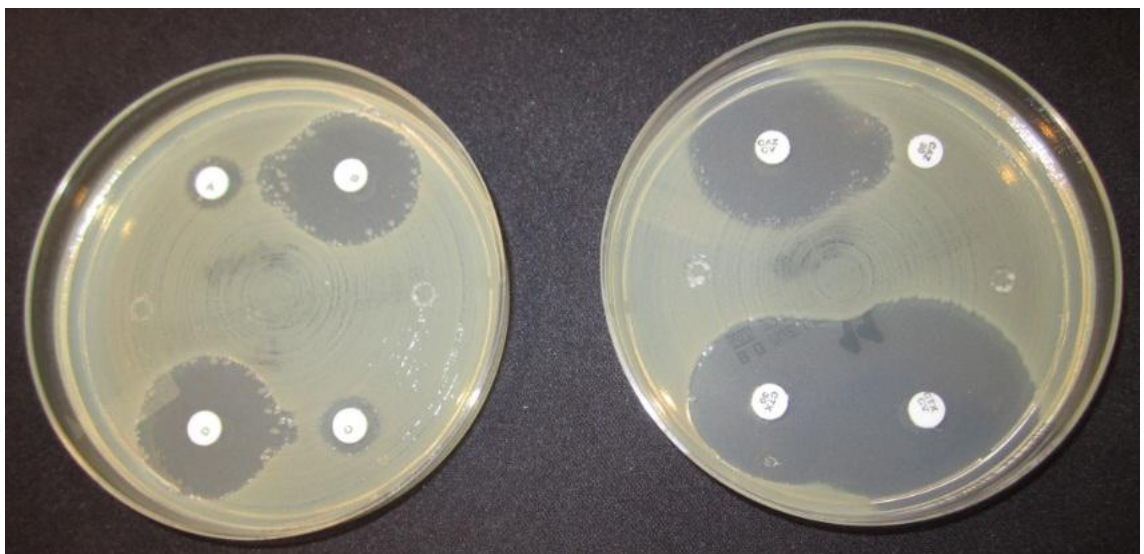
Kanta 3 *E. coli* on ennakkotietojen mukaan AmpC-positiivinen, kannalla on CIT-geeni. Tulosten mukaan kanta on sekä ESBL- että AmpC-negatiivinen. Tulosten ristiriidan vuoksi bakteerikanta tutkittiin uudelleen, ja huomattiin sen olevan acinetobakteeri, eikä *E. coli*, joka sen olisi pitänyt olla. Virhe on tapahtunut todennäköisesti siinä vaiheessa, kun bakteerikantoja on etsitty pakastimesta.

Kanta 4 *K. pneumoniae* on ennakkotietojen mukaan AmpC-positiivinen, sillä on FOX-geeni. Tulosten mukaan se on ESBL-negatiivinen ja AmpC-positiivinen. Tämä löydös on sairaalahygienisesti merkittävä, sillä AmpC on plasmidivälitteinen. Kanta 5 *E. coli* on ennakkotietojen mukaan AmpC-positiivinen, kannalla on MOX-geeni. ESBL-geenitestiä ei ole tehty. Tavallisen ESBL-testin mukaan kanta on ESBL-positiivinen, mutta AmpC-ESBL-testin ensimmäisen ESBL-tulkinnan mukaan ESBL- ja AmpC-negatiivinen. AmpC-ESBL-testin lopullisen tulkinnan mukaan kanta on sekä ESBL- että AmpC-positiivinen.

Kanta 6 *E. cloacaella* on ennakkotietojen mukaan todennäköisesti derepressoitunut AmpC. Tulosten mukaan kanta on ESBL-negatiivinen ja AmpC-positiivinen. Kanta 7 *E. cloacae* on ennakkotietojen mukaan herkkä kanta. Tulosten mukaan kanta on ESBL-negatiivinen, mutta AmpC-positiivinen. Tämän bakteerikannan herkkyudet testattiin AmpC:n löytymisen jälkeen vielä

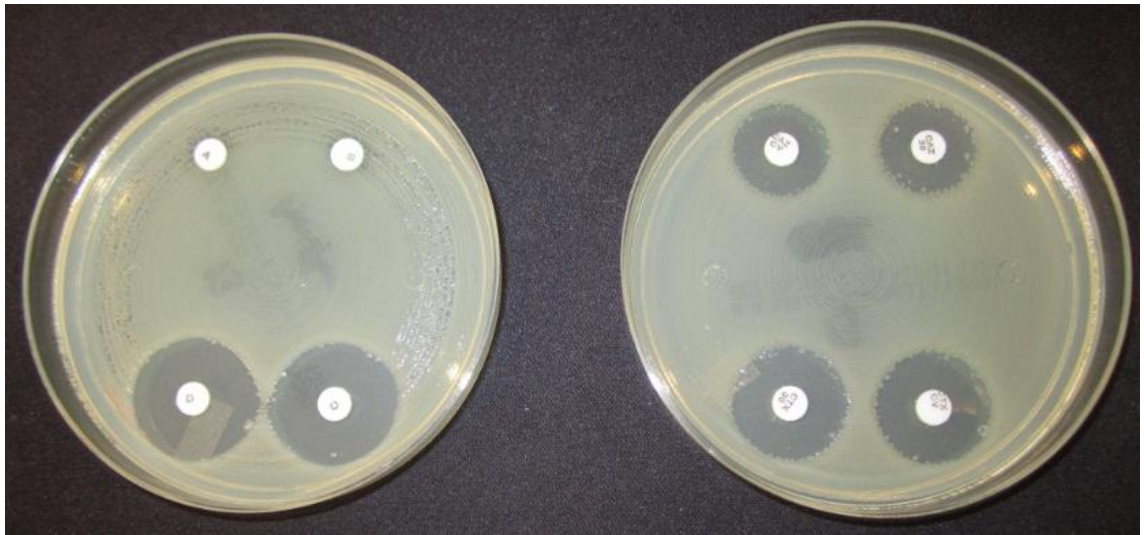
uudelleen, ja kanta todettiin edelleen herkäksi kolmannen polven kefalosporiineille. *E. cloacaella* on kromosomaalinen ampC, joka todennäköisesti ilmentyi yhdistelmäkiekkotestissä, joten yhdistelmätestin tulos on oikein. Koska kanta on herkkä kolmannen polven kefalosporiineille, voidaan päätellä, että AmpC-geenin säätely ei ole pysyvästi purkautunut. Kanta 8 *E.coli* on ennakkotietojen mukaan moniresistentti potilaskanta, mutta ESBL-negatiivinen. Testien mukaan kanta on ESBL-negatiivinen ja AmpC-positiivinen. Bakterikannan AmpC-aktiivisuus tarkastettiin AmpC-ESBL-testin tuloksen takia vielä Terveyden ja hyvinvoinnin laitoksella ja siellä todettiin, että kannalla on TEM-geeni, mutta ei plasmidivälitteistä ampC-geeniä, eli kannan oma ampC-geeni on aktivoitunut.

Kanta 9 *E. coli* on ennakkotietojen mukaan moniresistentti potilaskanta, ESBL-negatiivinen, samoin kuin edellinen kanta 8. Myös tulos on sama kuin edellisessä tapauksessa, eli ESBL-negatiivinen, mutta AmpC-positiivinen. Myös tämä kanta lähetettiin Terveyden ja hyvinvoinnin laitokselle lisätutkimuksiin ja siellä todettiin, että kannalla on CIT-geeni, eli tässä tapauksessa AmpC on plasmidivälitteinen. Kanta 10 *E. coli*, kanta 11 *E. coli* (kuva 2.) ja kanta 12 *K. pneumoniae* ovat ennakkotietojen mukaan ESBL-positiivisia ja myös tulosten molempien testien mukaan kannat ovat ESBL-positiivisia, AmpC-negatiivisia.



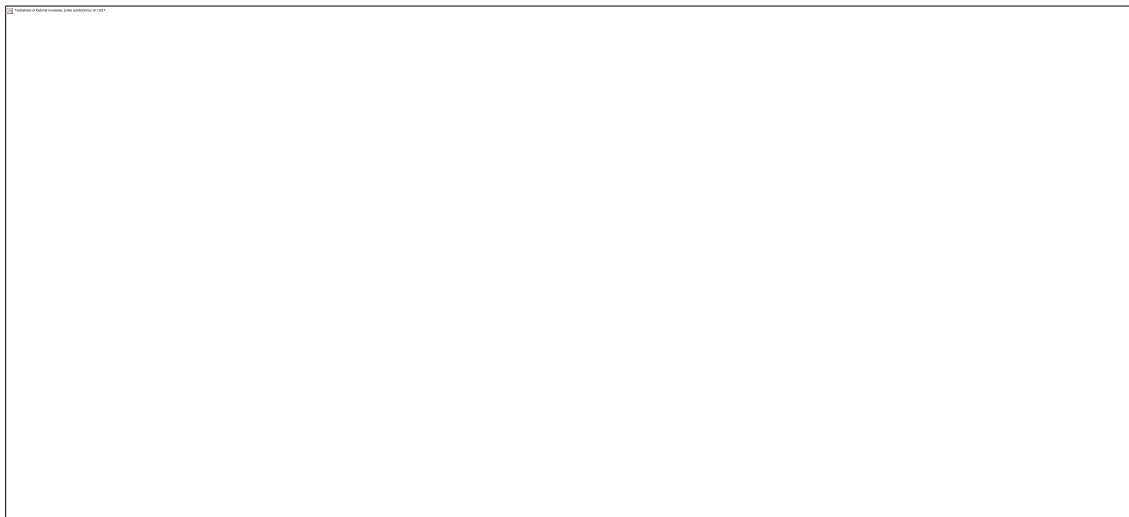
Kuva 2. Kanta 11: *E. coli*, ESBL-positiivinen, AmpC-negatiivinen.

Kanta 13 *K. pneumoniae* (kuva 3.) on ennakkotietojen mukaan moniresistentti potilaskanta, ESBL-negatiivinen. Tulosten mukaan kanta on ESBL-negatiivinen, mutta AmpC-positiivinen. Kanta tarkistettiin Terveyden ja hyvinvoinnin laitoksella ja myös siellä todettiin kannalla olevan fenotyyppinen AmpC, mutta geenitestillä ei löydetty ampC-geeniä. Geenitesti on PCR-tutkimus, joka kattaa kuusi tavallisinta ampC-geeniä. Tällä bakteerikannalla voi mahdollisesti olla joku muu ampC-geeni. Löydös on sairaalahygieenisesti merkittävä.



Kuva 3. Kanta 13: *K. pneumoniae*, moniresistentti, ESBL-negatiivinen, AmpC-positiivinen.

Kanta 14 *K. pneumoniae* (kuva 4.) on ennakkotietojen mukaan ESBL-negatiivinen, moniresistentti, karbapenemaasia tuottava kanta. Tulosten mukaan se on ESBL ja AmpC-negatiivinen. Molempien testien estorenkoot mitataan kuuteen millimetriin, eli bakteeri on resistentti kaikille testien antibiooteille. AmpC-kiekkosarja herättää epäilyjä muustakin resistenssistä.



Kuva 4. Kanta 14: *K. pneumoniae*, moniresistentti, ESBL-negatiivinen, karbapenemaasia tuottava kanta.

Kanta 15 *K. pneumoniae* on ennakkotietojen mukaan ESBL-positiivinen, karbapenemaasia tuottava kanta. Tavallisen ESBL-testin tulos on ESBL-positiivinen, mutta AmpC-ESBL-testin mukaan kanta on sekä ESBL- että AmpC-negatiivinen. Karbapenemaasin tuotanto estää ESBL:n tuoton näkymisen ESBL-AmpC-kiekoilla. Tässäkin tapauksessa AmpC-kiekkosarja herättää epäilyjä muustakin resistenssistä.

Kanta 16 *E. cloacaella* on ennakkotietojen mukaan todennäköisesti derepressoitunut AmpC. Tulosten mukaan kanta on sekä ESBL- että AmpC-negatiivinen. Kanta 17 *E. cloacae* on ennakkotietojen mukaan moniresistentti kanta ja sillä saattaa olla myös ESBL. Tulosten mukaan kanta on ESBL- ja AmpC-negatiivinen. Kannalle tehtiin geenitesti ja sillä on ESBL-geeni CTX-M, joten tuloksen pitäisi olla ESBL-positiivinen ja lisäksi se voisi olla myös AmpC-positiivinen. ESBL jää näkymättä, koska AmpC on resistentti klavulaanilahapolle. Kanta 18 *E. cloacaella* on ennakkotietojen mukaan todennäköisesti derepressoitunut AmpC. Tulosten mukaan se on ESBL-negatiivinen ja AmpC-positiivinen. Kanta 19 *K. pneumoniae* on ennakkotietojen mukaan AmpC-positiivinen ja myös tulosten mukaan se on AmpC-positiivinen ja ESBL-negatiivinen. Tämä on sairaalahygieenisesti merkittävä löydös.

Kannat 20-26 ovat kaikki ESBL-positiivisia *E. cloacae* -kantoja. Kannat on eristetty samasta epidemiasta, joten ne ovat todennäköisesti keskenään identtisiä. Tulosten mukaan kaikki nämä kannat ovat ESBL-positiivisia ja AmpC-negatiivisia.

Kahden eri testin vertailu on helppoa ESBL:n osalta, sillä laskutoimitusten jälkeen nähdään suoraan onko tutkittavalla bakteerikannalla ESBL-aktiivisuutta vai ei. Testien tuloksia verrattiin keskenään toisiinsa sekä myös bakteerikantojen ennakkotietoihin. AmpC-aktiivisuus saatiin selville vain toisella testillä, joten näitä tuloksia voitiin verrata vain bakteerikantojen ennakkotietoihin.

Taulukkoon 3 on koottu bakteerisuspensioiden tiheydet, jotka vastaavat 0,5 McFarland-standardia. Suspensioiden tiheydet mitattiin DensiCHEKPlus -mittarilla. Tiheyden tulee olla välillä 0,5–0,63, jotta se vastaa 0,5 McFarland-standardia. Bakteerisuspensioiden tiheys mitataan, jotta kasvu herkkyysmaljalla ei ole liian tiheää tai harvaa. Jos bakteerisuspensio on liian tiheää, johtaa se estorenkään reunan hämärtymiseen. Liian harva bakteerisuspensio aiheuttaa pesäkkeiden kasvamisen maljalla irti toisistaan. Näin ollen bakteerisuspension vahvuus vaikuttaa estorenkaiden halkaisijoihin ja myös tulkintaan antibiootin herkkydestä. (THL 2003.)

Taulukko 3. Bakteerisuspensioiden McFarland-standardia vastaavat tiheydet.

Laji		Suspension 0,5 McF- standardia vastaava tiheys	
		31.10.2012	6.11.2012
1	<i>E. coli</i>	0,55	0,58
2	<i>E. coli</i>	0,59	0,54
3	<i>E. coli</i>	0,53	0,59
4	<i>K. pneumoniae</i>	0,54	0,52
5	<i>E. coli</i>	0,56	0,50
6	<i>E. cloacae</i>	0,54	0,51
7	<i>E. cloacae</i>	0,50	0,51
8	<i>E. coli</i>	0,56	0,58
9	<i>E. coli</i>	0,61	0,60
10	<i>E. coli</i>	0,52	0,53
11	<i>E. coli</i>	0,60	0,50
12	<i>K. pneumoniae</i>	0,55	0,54
13	<i>K. pneumoniae</i>	0,56	0,53
14	<i>K. pneumoniae</i>	0,52	0,54
15	<i>K. pneumoniae</i>	0,51	0,54
16	<i>E. cloacae</i>	0,56	0,55
17	<i>E. cloacae</i>	0,54	0,52
18	<i>E. cloacae</i>	0,51	0,52
19	<i>K. pneumoniae</i>	0,58	0,51
20	<i>E. cloacae</i>	0,63	0,53
21	<i>E. cloacae</i>	0,56	0,52
22	<i>E. cloacae</i>	0,62	0,61
23	<i>E. cloacae</i>	0,52	0,51
24	<i>E. cloacae</i>	0,52	0,56
25	<i>E. cloacae</i>	0,54	0,63
26	<i>E. cloacae</i>	0,53	0,62

## 6 POHDINTA

### 6.1 Johtopäätökset

Kahden eri tekokerran tulokset vastaavat toisiaan. Kahden eri testin tulokset vastaavat toisiaan yhtä poikkeusta lukuun ottamatta. Kannalla 15 on tavallisen ESBL-testin mukaan ESBL-aktiivisuus, mutta AmpC-ESBL-testin mukaan kanta on ESBL-negatiivinen. Karbapenemaasin tuotanto estää ESBL:n tuoton näkymisen ESBL-AmpC-kiekoilla. (Rantakokko-Jalava 2013.)

Testien tulokset vastaavat bakteerikantojen ennakkotietoja kaikkien muiden, paitsi kolmen bakteerikannan kohdalla. Kannalla 16 olisi ennakkotietojen mukaan pitänyt todennäköisesti olla derepressoitunut AmpC, mutta testin mukaan kanta on AmpC-negatiivinen. Tämän ja 6-kannan perusteella näyttää siltä, että herkkyysmääritysten ja yhdistelmäkiekkotestin tulokset eivät aina mene yksiin. Kannan 17 pitäisi ennakkotiedon mukaan olla sekä ESBL-että AmpC-positiivinen, mutta kumpikaan näistä ei näy testeissä. ESBL ei näy, koska AmpC on resistentti klavulaanilaholle.

Tutkimuksen otoksen pienen määrän vuoksi ei ole mielekästä määrittää tutkimukselle herkkyyttä tai tarkkuutta (Rantakokko-Jalava 2013). Tutkimusongelmana oli selvittää, löytyykö *E. cloacae* bakteerista ESBL-paremmiin AmpC-ESBL-yhdistelmäkitin avulla, kuin tavallisella ESBL-testillä. Tutkimuksessa oli mukana 12 *E. cloacae* -kantaa. Kaikista kannoista löytyi ESBL yhtä hyvin sekä tavallisella ESBL-testillä että AmpC-ESBL-testillä, joista kahdeksalla oli ESBL (kannat 17 ja 20-26). Kannan 17 ESBL-ominaisuus ei tullut esiin kummallakaan testillä, kun taas kantojen 20-26 ESBL-ominaisuus näkyi molemmissa testeissä.

Toisena tutkimusongelmana oli selvittää, löytyykö *K. pneumoniaesta* AmpC yhdistelmäkitin avulla. Tutkimuksessa oli mukana kolme *K. pneumoniae* -kantaa, joilla oli selkeä AmpC-fenotyyppi. Kahdelta löytyi myös geeni. Yhdeltä

ei, mutta silläkin selkeä AmpC-fenotyyppi todettiin myös referenssilaboratoriossa. Näiltä kaikilta löytyi AmpC selkeästi yhdistelmätestillä.

Koska AmpC-ESBL-testin avulla ei saada tietää, onko AmpC plasmidivälitteinen vai kromosomaalinen, *E. colilta* löytyvän AmpC:n merkitystä on vaikea tulkita. Plasmidivälitteisen AmpC:n omaavat kannat ovat periaatteessa sairaalahygieenisesti merkittäviä. AmpC-ESBL-yhdistelmätesti toimii hyvin tässä opinnäytetyössä saatujen tulosten perusteella. Tästä huolimatta todettiin, että testistä ei ole tavallisessa laboratoriossa käytännön hyötyä bakteerien sairaalahygieenisen merkityksen arvioinnin kannalta. Sairalahygieeninen merkitys onkin helpompi määritellä moniresistenssin perusteella. Joissakin tapauksissa testistä on hyötyä saamaan karbapeneemiresistentit kannat kiinni, mutta aina kun epäillään bakteerikannan olevan karbapeneemiresistentti, se voidaan lähettää Terveiden ja hyvinvoinnin laitokselle varmistettavaksi. Testistä on hyötyä *K. pneumoniaen* sairaalahygieenistä merkitystä arvioitaessa, mutta tällaiset bakteerikannat ovat harvinaisia, eikä sen takia ole mielekästä testata kaikkia. Sairalahygieenisesti merkittävää bakteerikantaa epäiltäessä se voidaan lähettää Terveiden ja hyvinvoinnin laitokselle varmistustesteihin. AmpC-ESBL-yhdistelmätestiä ei ainakaan tässä vaiheessa oteta käyttöön Tykslabin kliinisen mikrobiologian laboratoriossa, vaikka testi toimikin halutulla tavalla. (Rantakokko-Jalava 2013.)

Tässä opinnäytetyössä saatuja tutkimustuloksia ei voi verrata aikaisemmin tehtyihin tutkimuksiin, sillä täysin vastaavaa tutkimusta ei ole aikaisemmin tehty. Jatkotutkimusaiheena on toistaa tämä tutkimus suuremmalla otoksella ja käyttää tilastollisia menetelmiä AmpC-ESBL-yhdistelmätestin herkkyuden ja tarkkuuden määrittämiseksi. Tutkimuksen otoksessa tulisi olla suurempi määrä *K. pneumoniae* -bakteerikantoja, jotta saataisiin tätä tutkimusta luotettavampi tulos siitä, kuinka hyvin testi löytää AmpC:n *K. pneumoniae* -bakteerista.

## 6.2 Tutkimuksen luotettavuuden ja eettisyyden arviointi

Tutkimuksen luotettavuutta voidaan arvioida määrittämällä tutkimuksen reliaabelius ja validius. Tutkimuksen reliaabelius tarkoittaa tutkimuksen mittaustulosten toistettavuutta. (Vilkkä 2007; Hirsjärvi ym. 2009; Kankkunen & Vehviläinen-Julkunen 2009.) Tutkimuksen tulokset voidaan todeta reliaabeleiksi koska, jokaisesta näytteestä tehtiin rinnakkaiset bakteerisuspensiot ja herkkyysmaljat kahtena eri tekokertana, eli tutkimus tehtiin käytännössä kahteen kertaan. Estorenkaiden halkaisijat mitattiin kultakin herkkyysmaljalta kahteen kertaan mittausvirheiden poistamiseksi. Kahden eri tekokerran tulokset vastaavat lähes täsmällisesti toisiaan.

Validius tarkoittaa tutkimusmenetelmän kykyä mitata juuri sitä, mitä on tarkoituskin mitata. Tutkimuksen validius on hyvä, jos tutkimuksessa ei ole tehty systemaattisia virheitä. (Vilkkä 2007; Hirsjärvi ym. 2009.) Tutkimustuloksista saatiin vastaukset tutkimusongelmiin. Opinnäytetyön teossa noudatettiin hyvää tieteellistä käytäntöä. Tutkimusta tehtäessä oltiin huolellisia ja tulokset raportoitiin rehellisesti ja avoimesti. Tutkimuksen teossa noudatettiin työohjeita täsmällisesti. Tekijän kokemattomuus herkkyysmaljojen teossa vaikutti jonkin verran bakteerien kasvun tasaisuuteen, mutta estorenkaat olivat kuitenkin selkeästi luettavissa jokaisen näytteen kohdalla. Bakteerisuspensioiden tiheys tarkistettiin Densi CHEK Plus -mittarilla tekijän kokemattomuuden vuoksi, jolloin tiheys saatiin varmistettua luotettavasti. Tiheys arvioidaan rutiinityössä silmäämääräisesti. Tutkimuksen teossa käytetyt lähteet on arvioitu luotettaviksi hyvää lähdekritiikkiä käyttäen.

Tutkimuksessa käytettävissä bakteerikannoissa ei ollut nähtävissä potilastietoja, eikä tekijä ollut missään työn vaiheessa tekemisissä potilastietojen kanssa. Tutkimusta varten ei jouduttu ottamaan potilasnäytteitä. Kantoja käsiteltiin bakteerien nimillä, kantatunnuksilla ja T-numerolla ja kannat numeroitiin juoksevalla numerosarjalla 1–26, jotta käytännön työ, mm. herkkyysmaljojen ja bakteerisuspensioputkien merkitseminen olisi mahdollisimman sujuvaa.

## LÄHTEET

Carlson, P.; Koskela, M. 2011. Bakteriologiset tutkimukset. Teoksessa Vaara, M. (toim.) Infektiosairaudet. 1. painos. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim.

Evira. Antibioottiresistenssin seuranta 2012. Viitattu 22.11.2012  
[http://www.evira.fi/portal/fi/elaimet/elainten\\_terveys\\_ja\\_elaintaudit/laakitseminen/antibioottiresistenssin\\_seuranta/](http://www.evira.fi/portal/fi/elaimet/elainten_terveys_ja_elaintaudit/laakitseminen/antibioottiresistenssin_seuranta/).

Giske, C.; Sundsfjord, A.; Kahlmeter, G.; Woodford, N.; Nordmann, P.; Paterson, D.; Cantón, R.; Walsh, T. 2009. Redefining extended-spectrum beta-lactamases: balancing science and clinical need. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. Vol. 63, No 1, 1–4. Viitattu 26.11.2012.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/pmc2721700/>

Hautala, T. 2004. Mikrobilääkeresistenssin mekanismit. Viitattu 18.4.2013.  
<http://cc.oulu.fi/~sisawww/esit/040219.htm>

Heino, J.; Vuento, M. 2010. Biokemian ja solubiologian perusteet. 2. uudistettu painos. Helsinki: WSOYpro OY.

Hirsjärvi, S.; Remes, P. & Sajavaara, P. 2009. Tutki ja kirjoita. 15., uudistettu painos. Helsinki: Tammi.

Ingram, P.; Inglis, T.; Vanzetti, T.; Henderson, B.; Harnett, G.; Murray, R. 2011. Comparison of methods for AmpC  $\beta$ -lactamase detection in Enterobacteriaceae. *Journal of Medical Microbiology*. Vol. 60, No 6, 715-721.

Järvinen, A.; Vaara, M.; Huovinen, P.; Liippo, K.; Vasankari, T. 2011. Bakterilääkkeet. Teoksessa Vaara, M. (toim.) Infektiosairaudet. 1. painos. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim.

Kankkunen, P.; Vehviläinen-Julkunen, K. 2009. Tutkimus hoitotieteessä. Helsinki: WSOYpro Oy.

Kaye, K.; Cosgrove, S.; Harris, A.; Eliopoulos, G.; Carmeli, Y. 2001. Risk Factors for Emergence of Resistance to Broad-Spectrum Cephalosporins among Enterobacter spp. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. Vol. 45, No. 9, 2628–2630. Viitattu 26.11.2012.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC90703/>

Leinikki, P. 2005. Tarttuvat taudit. Terveyskirjasto. Kustannus Oy Duodecim. Viitattu 26.2.2013.  
[http://www.terveysportti.fi/terveyskirjasto/tk.koti?p\\_artikkeli=suo00031&p\\_haku=e.%20coli#s1](http://www.terveysportti.fi/terveyskirjasto/tk.koti?p_artikkeli=suo00031&p_haku=e.%20coli#s1)

Mast Group. 2013. ESBL & AmpC Detection Disc Sets. Viitattu 5.4.2013.  
[http://www.mastgrp.com/identification%20strips%20discs%20and%20rings/Glossies/ESBL\\_6pp.pdf](http://www.mastgrp.com/identification%20strips%20discs%20and%20rings/Glossies/ESBL_6pp.pdf)

Meurman, O. 2007. Työohje. Herkkyysmäärittämisohje. 29.6.2007.

Meurman, O. 2012. Työohje. ESBL-määrittäminen kaksoiskiekkotestillä. 28.9.2012.

Olsen, I.; Helovuo, H.; Løkken, P. 2002. Antibiotikainduserter superinfeksjoner. *Tandläkartidningen*. No 1. Viitattu 28.11.2012.  
[http://www.tandlakartidningen.se/media/1191/Olsen\\_1\\_2002.pdf](http://www.tandlakartidningen.se/media/1191/Olsen_1_2002.pdf)

Pastila, S. 2005. Mikrobilääkkeet. Teoksessa Hellstén, S. (toim.) Kliininen mikrobiologia terveydenhuollossa. 2. uudistettu painos. Jyväskylä: Gummerus Kirjapaino Oy.

Philippou, A.; Arlet, G.; Jacoby, G. 2002. Plasmid-Determined AmpC-Type  $\beta$ -Lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. Vol. 46, No 1, 1-11. Viitattu 26.11.2012. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC126993/pdf/0450.pdf>

Rantakokko-Jalava, K. 2012. AmpC – ja ESBL-testin evaluaatio. Työohje 8.10.2012.

Rantakokko-Jalava, K. 13.11.2012. Henkilökohtainen tiedonanto.

Rantakokko-Jalava, K. 15.3.2013. Henkilökohtainen tiedonanto.

Rantakokko-Jalava, K. 4.4.2013. Henkilökohtainen tiedonanto.

Siitonen, A.; Vaara, M. 2010. *Escherichia*, *Salmonella*, *Shigella* ja *Yersinia*. Teoksessa Vaara, M. (toim.) *Mikrobiologia*. 1. painos. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim.

Skurnik, M. 2010. Bakterigenetiikka. Teoksessa Vaara, M. (toim.) *Mikrobiologia*. 1. painos. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim.

Solunetti. 2006. Bakteerit (prokaryootti). Viitattu 7.3.2013. <http://www.solunetti.fi/fi/solubiologia/bakteerit/2/>

Solunetti. 2006. DNA:n replikaatio. Viitattu 26.2.2013. [http://www.solunetti.fi/fi/solubiologia/dna-n\\_replikaatio/2/](http://www.solunetti.fi/fi/solubiologia/dna-n_replikaatio/2/)

Tarnanen, K.; Wuorela, M.; Uhari, M.; Kukkonen-Harjula, K. 2011. Virtsatieinfektio (VTI). *Terveyskirjasto*. Kustannus Oy Duodecim. Viitattu 26.2.2013. [http://www.terveysportti.fi/terveyskirjasto/tk.koti?p\\_artikkeli=khp00038&p\\_haku=virtsatieinfektio](http://www.terveysportti.fi/terveyskirjasto/tk.koti?p_artikkeli=khp00038&p_haku=virtsatieinfektio)

Terveiden ja hyvinvoinnin laitos 2003. FiRe Standardi. Bakteerin lääkeherkkyyden määrittäminen kiekkomenetelmällä Versio 3.0. Viitattu 22.11.2012 <http://www.ktl.fi/extras/fire/Kiekkomenetelma.pdf>

Terveiden ja hyvinvoinnin laitos 2009. ESBL. Viitattu 22.11.2012 [http://www.ktl.fi/portal/suomi/tietoa\\_terveydesta/terveys\\_ja\\_sairaudet/infektiaudit/sairaalainfektio/esbl/](http://www.ktl.fi/portal/suomi/tietoa_terveydesta/terveys_ja_sairaudet/infektiaudit/sairaalainfektio/esbl/).

Terveiden ja hyvinvoinnin laitos 2012. Laajakirjoiset  $\beta$ -laktamaasit eli ESBL:t. Viitattu 22.11.2012 <http://www.ktl.fi/portal/17223>.

Terveiden ja hyvinvoinnin laitos 2012. Euroopan Antibioottipäivä: Antibioottiresistenssi vaikeuttaa potilaiden hoitoa myös Suomessa. Viitattu 26.2.2013. [http://www.thl.fi/fi\\_FI/web/fi/tiedote?id=31724](http://www.thl.fi/fi_FI/web/fi/tiedote?id=31724)

Tissari, P.; Anttila, V-J. 2010. Muu *Enterobacteriaceae*-heimo. Teoksessa Vaara, M. (toim.) *Mikrobiologia*. 1. painos. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim.

Vaara, M.; Skurnik, M.; Sarvas, M. 2010. Bakterisolun rakenne ja toiminta. Teoksessa Vaara, M. (toim.) *Mikrobiologia*. 1. painos. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim.

Vilka, H. 2007. Tutki ja mittaa. Jyväskylä: Tammi.

Willems, E.; Cartuyvels, R.; Magerman, K.; Raymaekers, M.; Verhaegen, J. 2012. Comparison of different phenotypic assays for the detection of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase production by inducible AmpC-producing Gram-negative bacilli. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*. Viitattu 27.11.2012. <http://link.springer.com/article/10.1007/s10096-012-1772-x/fulltext.html>

# Tutkimuslupahakemus

VARSINAIS-SUOMEN SAIRAANHOITOPIIRI  
EGENTLIGA FINLANDS SJUKVÅRDSDISTRIKT

HOITOTYÖN TUTKIMUS- JA OPINNÄYTETYÖ

Nro 17/2013

LUPAHAKEMUS (katso erilliset ohjeet: <http://www.vsshp.fi/fi/tutkimus>)

Hakemus lähetetään: VSSHP, TYKS, Hoitotyön toimisto, suunnittelija, PL 52, 20521 TURKU

Uusi tutkimus

Jatko/Muutos lupaan

TUTKIMUSLU- VAN HAKIJA/ HAKIJAT	Nimi/nimet: <u>Lina Karttunen</u>
Opiskelu- tai työpaikka	Osasto: <u>Västaräkinpolku 3 C 84 20610 Turku</u> puhelin: <u>041 502 5338</u> sähköposti: <u>lina.karttunen@students.turkuamk.fi</u> <u>Turun Ammatikorkeakoulu</u>
Opinnäytetyö	<input type="checkbox"/> Väitöskirja <input type="checkbox"/> Pro gradu <input checked="" type="checkbox"/> Opinnäytetyö/AMK <input type="checkbox"/> muu, mikä? <input type="checkbox"/> Lisensiaattityö <input type="checkbox"/> Ylempi AMK
TUTKIMUKSEN/ OPINNÄYTE- TYÖN TIIVIS- TETTY KUVAUS (mm. tutkimuksen nimi, päätaivoitteet, menetelmät, aineis- to, tutkimuksen suo- rituspaikka, tutki- muksen merkitys)	<u>AMPC- JA ESBL-TESTIN EVALUAATIO. Tutkimuksen tarkoituksena on selvittää, onko AmPC-ESBL-yhdistelmäkitistä huotyä tavallisen ESBL-testin lisäksi. Aineistona on Turun kaupungin sairaalan mikrobiologian laboratorian kontrollikantoja ja muutama bakterikanta on saatu THL:stä. Tutkimus suoritetaan kaupungin sairaalan mikrobiologian laboratorian tiloissa.</u>
Tutkimussuun- nitelmä erillisenä liitteenä (max. 5 s.)	
TUTKIMUKSEN OHJAAJA(T)	<u>22.1.2013</u> <u>Jenni Luukkainen</u> allekirjoitus/nimen selvennys <u>1</u> allekirjoitus/nimen selvennys
YHTEYSTIEDOT	<u>Serija Korhonen-Jaakkola</u>
SITOUMUS JA JULKAISULUPA	Sitoudun noudattamaan hyvää tutkimuskäytäntöä, sairaalan yleisiä sääntöjä sekä vaitiolovelvollisuutta ( <a href="http://www.vsshp.fi/fi/tutkimus/10711">http://www.vsshp.fi/fi/tutkimus/10711</a> , <a href="http://www.turkucrc.fi">www.turkucrc.fi</a> ). <u>18.1.2013</u> <u>Lina Karttunen</u> hakijan allekirjoitus/nimen selvennys <u>1</u> hakijan allekirj./nimen selvennys <u>1</u> hakijan allekirjoitus/nimen selvennys <u>1</u> hakijan allekirj./nimen selvennys
YLIHOITAJAN LAUSUNTO JA YHDYSHENKI- LÖN NIMEÄMINEN VSSHP:ssä	Klinikan/yksikön kehittämishanke, johon opinnäytetyö/tutkimus liittyy: Yhdyshenkilö/virkan/toimen nimike: <u>eril-lääkäri Rantabokko-Jalava</u> (yh nimeää) Puollan <input checked="" type="checkbox"/> En puolla <input type="checkbox"/> Ylihoitaja(t) <u>1</u> <u>20.1.2013</u> <u>Benita Paloheimo</u> allekirjoitus/nimen selvennys <u>1</u> allekirj./nimen selvennys
HOITOTYÖN ASiantuntija- RYHMÄN LAUSUNTO	<input checked="" type="checkbox"/> Lupaa puolletaan <input type="checkbox"/> Ei puolleta, Perustelu (tarv. liitteenä) <input type="checkbox"/> Pyydetään lähettämään eettiselle toimikunnalle <u>26.2.2013</u> <u>Benita Paloheimo</u> allekirjoitus/nimen selvennys <input checked="" type="checkbox"/> Pyydetään lisäselvityksiä: <u>es. pöytäkirja. pj. e sihteerin päätös.</u>
EETTINEN TOIMIKUNTA	Eettisen toimikunnan lausunto saatu (liitteenä) <u>1</u>
TUTKIMUS- LUVAN MYÖNTÄMINEN	<input checked="" type="checkbox"/> Myönnetty <input type="checkbox"/> Ei myönnetty <u>13.3.2013</u> <u>Benita Paloheimo</u> allekirjoitus/nimen selvennys <u>1</u> allekirjoitus/nimen selvennys <u>Benita Paloheimo</u>
	VSSHP:n/sairaalan nimen saa julkaista tutkimusraportissa/opinnäytetyössä Haluan nähdä tutkimusraportin/opinnäytetyön ennen julkaisuluvan antoa Kyllä <input checked="" type="checkbox"/> Ei <input type="checkbox"/> Kyllä <input checked="" type="checkbox"/> Ei <input type="checkbox"/>
	Päätös annettu tiedoksi hakijalle <u>19.2.2013</u> Päätöksen antoi <u>HLL</u>

## Ensimmäisen tekokerran mittaustulokset.

1.		ESBL-kiekot						ESBL+AmpC-kiekot													
Laji	CTX	CTX +kla	ero- tus	CAZ	CAZ +kla	ero- tus	tulkinta ESBL +/-	A POD	B POD +Ei	C POD +Ai	D POD +Ei+Ai	B-A	D-C	tulkinta ESBL +/-	D-B	C-A	tulkinta AmpC +/-	D-C	tulkinta AmpC +/-	ESBL	
1	<i>E. coli</i>	6	20	14	21	24	3	ESBL+	6	18	6	19	12	13	ESBL+	1	0	AmpC-	13	-	+
2	<i>E. coli</i>	29	33	4	29	29	0	ESBL-	27	28	28	28	1	0	ESBL-	0	1	AmpC-	0	-	-
3	<i>E. coli</i>	6	6	0	6	6	0	ESBL-	6	6	6	6	0	0	ESBL-	0	0	AmpC-	0	-	-
4	<i>K. pneumoniae</i>	17	17	0	6	6	0	ESBL-	6	6	15	18	0	3	ESBL-	12	9	AmpC+	3	+	-
5	<i>E. coli</i>	15	13	-2	15	20	5	ESBL+	6	6	13	21	0	8	ESBL-	15	7	AmpC-	8	+	+
6	<i>E. cloacae</i>	22	22	0	21	21	0	ESBL-	6	6	27	28	0	1	ESBL-	22	21	AmpC+	1	+	-
7	<i>E. cloacae</i>	26	26	0	23	13	-10	ESBL-	6	6	25	23	0	-2	ESBL-	17	19	AmpC+	-2	+	-
8	<i>E. coli</i>	20	19	-1	12	12	0	ESBL-	6	6	22	23	0	1	ESBL-	17	16	Ampc+	1	+	-
9	<i>E. coli</i>	14	13	-1	6	9	3	ESBL-	6	6	18	18	0	0	ESBL-	12	12	AmpC+	0	+	-
10	<i>E. coli</i>	29	38	9	6	28	22	ESBL+	8	26	10	23	18	13	ESBL+	-3	2	AmpC-	13	-	+
11	<i>E. coli</i>	28	36	8	6	26	20	ESBL+	6	24	9	23	18	14	ESBL+	-1	3	AmpC-	14	-	+
12	<i>K. pneumoniae</i>	10	32	22	16	28	12	ESBL+	6	24	6	24	18	18	ESBL+	0	0	AmpC-	18	-	+
13	<i>K. pneumoniae</i>	19	19	0	13	16	3	ESBL-	6	6	22	22	0	0	ESBL-	16	16	AmpC+	0	+	-
14	<i>K. pneumoniae</i>	6	6	0	6	6	0	ESBL-	6	6	6	6	0	0	ESBL-	0	0	AmpC-	0	-	-
15	<i>K. pneumoniae</i>	14	17	3	6	12	6	ESBL+	6	6	6	6	0	0	ESBL-	0	0	AmpC-	0	-	-
16	<i>E. cloacae</i>	6	6	0	6	6	0	ESBL-	6	6	10	10	0	0	ESBL-	4	4	AmpC-	0	-	-
17	<i>E. cloacae</i>	6	6	0	6	8	2	ESBL-	6	6	6	10	0	4	ESBL-	4	0	AmpC-	4	-	-
18	<i>E. cloacae</i>	6	8	2	6	10	4	ESBL-	6	6	16	16	0	0	ESBL-	10	10	AmpC+	0	+	-
19	<i>K. pneumoniae</i>	16	15	-1	11	13	2	ESBL-	6	6	14	14	0	0	ESBL-	8	8	AmpC+	0	+	-
20	<i>E. cloacae</i>	6	29	23	17	28	11	ESBL+	6	21	6	22	15	16	ESBL+	1	0	AmpC-	16	-	+
21	<i>E. cloacae</i>	6	30	24	16	27	11	ESBL+	6	22	6	22	16	16	ESBL+	0	0	AmpC-	16	-	+
22	<i>E. cloacae</i>	6	27	21	11	27	16	ESBL+	6	19	6	19	13	13	ESBL+	0	0	AmpC-	13	-	+
23	<i>E. cloacae</i>	6	29	23	16	27	11	ESBL+	6	22	6	22	16	16	ESBL+	0	0	AmpC-	16	-	+
24	<i>E. cloacae</i>	6	29	23	16	28	12	ESBL+	6	22	6	22	16	16	ESBL+	0	0	AmpC-	16	-	+
25	<i>E. cloacae</i>	6	28	22	16	27	11	ESBL+	6	22	6	22	16	16	ESBL+	0	0	AmpC-	16	-	+
26	<i>E. cloacae</i>	6	30	24	17	27	10	ESBL+	6	22	6	22	16	16	ESBL+	0	0	AmpC-	16	-	+

## Toisen tekokerran mittaustulokset.

2.		ESBL-kiekot						ESBL+AmpC-kiekot													
Laji	CTX	CTX +kla	ero- tus	CAZ	CAZ +kla	ero- tus	tulkinta ESBL +/-	A	B	C	D	B-A	D-C	tulkinta ESBL +/-	D-B	C-A	tulkinta AmpC +/-	D-C	tulkinta		
								PO D	POD +Ei	POD +Ai	POD +Ei+Ai						AmpC	ESBL			
1	<i>E. coli</i>	6	21	15	22	26	4	ESBL+	6	18	6	19	12	13	ESBL+	1	0	AmpC-	13	-	+
2	<i>E. coli</i>	35	34	-1	30	30	0	ESBL-	28	28	28	28	0	0	ESBL-	0	0	AmpC-	0	-	-
3	<i>E. coli</i>	6	6	0	6	6	0	ESBL-	6	6	6	6	0	0	ESBL-	0	0	AmpC-	0	-	-
4	<i>K. pneumoniae</i>	17	17	0	6	6	0	ESBL-	6	6	15	16	0	1	ESBL-	10	9	AmpC+	1	+	-
5	<i>E. coli</i>	14	14	0	15	21	6	ESBL+	6	6	14	21	0	7	ESBL-	15	8	AmpC-	7	+	+
6	<i>E. cloacae</i>	24	22	-2	24	22	-2	ESBL-	6	6	26	26	0	0	ESBL-	20	20	AmpC+	0	+	-
7	<i>E. cloacae</i>	28	28	0	25	14	-11	ESBL-	6	6	22	25	0	3	ESBL-	19	16	AmpC+	3	+	-
8	<i>E. coli</i>	20	19	-1	11	14	3	ESBL-	6	6	23	23	0	0	ESBL-	17	17	AmpC+	0	+	-
9	<i>E. coli</i>	14	11	-3	6	6	0	ESBL-	6	6	18	18	0	0	ESBL-	12	12	AmpC+	0	+	-
10	<i>E. coli</i>	27	33	6	6	24	18	ESBL+	10	25	10	25	15	15	ESBL+	0	0	AmpC-	15	-	+
11	<i>E. coli</i>	27	33	6	6	25	19	ESBL+	6	23	8	24	17	16	ESBL+	1	2	AmpC-	16	-	+
12	<i>K. pneumoniae</i>	6	26	20	13	27	14	ESBL+	6	23	6	23	17	17	ESBL+	0	0	AmpC-	17	-	+
13	<i>K. pneumoniae</i>	18	18	0	10	14	4	ESBL-	6	6	22	22	0	0	ESBL-	16	16	AmpC+	0	+	-
14	<i>K. pneumoniae</i>	6	6	0	6	6	0	ESBL-	6	6	6	6	0	0	ESBL-	0	0	AmpC-	0	-	-
15	<i>K. pneumoniae</i>	13	15	2	6	11	5	ESBL+	6	6	6	6	0	0	ESBL-	0	0	AmpC-	0	-	-
16	<i>E. cloacae</i>	6	6	0	6	6	0	ESBL-	6	6	10	10	0	0	ESBL-	4	4	AmpC-	0	-	-
17	<i>E. cloacae</i>	6	6	0	6	6	0	ESBL-	6	6	6	10	0	4	ESBL-	4	0	AmpC-	4	-	-
18	<i>E. cloacae</i>	6	6	0	6	6	0	ESBL-	6	6	17	17	0	0	ESBL-	11	11	AmpC+	0	+	-
19	<i>K. pneumoniae</i>	16	15	-1	11	13	2	ESBL-	6	6	14	15	0	1	ESBL-	9	8	AmpC+	1	+	-
20	<i>E. cloacae</i>	6	28	22	16	26	10	ESBL+	6	22	6	22	16	16	ESBL+	0	0	AmpC-	16	-	+
21	<i>E. cloacae</i>	6	28	22	16	27	11	ESBL+	6	22	6	22	16	16	ESBL+	0	0	AmpC-	16	-	+
22	<i>E. cloacae</i>	6	29	23	12	27	15	ESBL+	6	20	6	20	14	14	ESBL+	0	0	AmpC-	14	-	+
23	<i>E. cloacae</i>	6	29	23	16	28	12	ESBL+	6	22	6	22	16	16	ESBL+	0	0	AmpC-	16	-	+
24	<i>E. cloacae</i>	6	30	24	17	27	10	ESBL+	6	22	6	22	16	16	ESBL+	0	0	AmpC-	16	-	+
25	<i>E. cloacae</i>	6	28	22	17	27	10	ESBL+	6	21	6	21	15	15	ESBL+	0	0	AmpC-	15	-	+
26	<i>E. cloacae</i>	6	30	24	17	27	10	ESBL+	6	22	6	22	16	16	ESBL+	0	0	AmpC-	16	-	+