

Julia Vyssotskaja

Parodontiittipatogeenien *Prevotella intermedia*, *Fusobacterium nucleatum* ja *Parvimonas micra* antibioottiherkkyys

Metropolia Ammattikorkeakoulu

Bioanalytikko (AMK) SB10K1

Bioanalytiikan koulutusohjelma

Opinnäytetyö

16.04.2013

<p>Tekijä Otsikko</p> <p>Sivumäärä Aika</p>	<p>Julia Vyssotskaja Parodontiittipatogeenien <i>Prevotella intermedia</i>, <i>Fusobacterium nucleatum</i> ja <i>Parvimonas micra</i> antibiottiherkkyys</p> <p>26 sivua 16.4.2013</p>
<p>Tutkinto</p>	<p>Terveys- ja hoitoala</p>
<p>Koulutusohjelma</p>	<p>Bioanalytiikan koulutusohjelma</p>
<p>Suuntautumisvaihtoehto</p>	<p>Bioanalyttikko (AMK)</p>
<p>Ohjaajat</p>	<p>Erikoislääkäri Hanna Välimaa Lehtori Tuula Kurkinen</p>
<p>Parodontiitti on maailmanlaajuisesti yksi suurimmista suun terveysongelmista. Se on hampaan kiinnityskudosta tuhoava sairaus, jonka eteneminen johtuu eräiden bakteerien runsaasta lisääntymisestä suussa ja huonosta suuhygieniasta.</p> <p>Tein opinnäytetyöni HUSLAB:n klinisen mikrobiologian vastualueen bakteriologian osaston toimeksiannosta. Tämän opinnäytetyön tarkoituksena oli määrittää parodontiittipatogeenien mikrobilääkeherkkyys yleisimmin parodontiitin hoitoon käytettäville antibiooteille. Koska herkkyysmäärittystä ei tavanomaisesti tehdä parodontiittipatogeenien diagnostisista näytteistä, oli tärkeää selvittää näiden patogeenien todellinen herkkyystilanne Suomessa.</p> <p>Kaikki tutkittavat bakteerikannat oli aikaisemmin otettu talteen parodontiittipatogeenien viljelytutkimukseen tulleista diagnostisista näytteistä. Kannat tutkimusta varten säilytettiin syväjässä. Tutkittavat bakteerilajit olivat: <i>Prevotella intermedia</i>, <i>Fusobacterium nucleatum</i> ja <i>Parvimonas micra</i>. Bakteerien mikrobilääkeherkkyys tutkittiin Epsilon-testiliuskoja käyttäen seuraaville antibiooteille: penisilliini, metronidatsoli, klindamysiini, doksisykliini, atsitromysiini ja siprofloksasiini. Tulokset tulkittiin EUCAST-standardien ja aikaisemman alan julkaisujen mukaisesti ja analysoitiin tilastollisesti.</p> <p>Tulokset osoittivat, että suomalaisilta potilailta eristetyt bakteerikannat ovat pääsääntöisesti herkkiä yleisimmin parodontiitin hoitoon käytettäville antibiooteille. Kartoituksen perustella voidaan todeta, että Suomessa parodontiitin antibiottihoito voidaan vieläkin valita empiirisesti viljelynäytteen bakteerilajimäärityksen perusteella.</p>	
<p>Avainsanat</p>	<p>parodontiitti, antibiottiherkkyysmäärittäminen, Epsilon-testi</p>

Author Title	Julia Vyssotskaja Antimicrobial susceptibility of periodontal pathogens <i>Prevotella intermedia</i> , <i>Fusobacterium nucleatum</i> and <i>Parvimonas micra</i>
Number of Pages	26 pages
Date	16 April 2013
Degree	Bachelor of Health Care
Degree Programme	Biomedical Laboratory Science
Specialisation option	Biomedical Laboratory Science
Instructor(s)	Hanna Välimaa, Specialist in Clinical Microbiology (HUSLAB) Tuula Kurkinen, Senior Lecturer
<p>Periodontitis is one of the major global oral health burdens. It is a disease which destroys the tissue that attaches the tooth to the alveolar bone. Certain bacteria and poor mouth hygiene are the main reasons for periodontitis.</p> <p>I made my final project for the HUSLAB Helsinki Clinical Microbiology Department of Bacteriology, Helsinki, Finland. The purpose was to determine the antimicrobial susceptibility for periodontal pathogens for the most common antibiotics used to treat periodontal disease. Since the sensitivity assays are not routinely done for periodontal pathogens in diagnostic specimens, it was important to find out the actual sensitivity of the pathogens in Finland.</p> <p>All bacterial strains were previously recovered from diagnostic specimens of periodontal samples and preserved in sub-zero temperatures. Species studied were <i>Prevotella intermedia</i>, <i>Fusobacterium nucleatum</i> and <i>Parvimonas micra</i>. Antibiotic susceptibility tests of bacteria were carried out using the Epsilon test strips for the following antibiotics: penicillin, metronidazole, clindamycin, doxycycline, azithromycin and ciprofloxacin.</p> <p>The results showed that isolated bacterial strains were generally sensitive to the most common antibiotics used to treat periodontal disease among Finnish patients. It may be concluded that, in Finland, antibiotic treatment in periodontal disease may still be chosen empirically based on the knowledge on bacterial strains identified.</p>	
Keywords	parodontit, antimicrobial susceptibility, E-test

Sisällys

1	Johdanto	1
2	Parodontiitti	2
2.1	Parodontiitin kehittyminen, oireet ja eteneminen	2
2.2	Parodontiitin ehkäiseminen ja hoito	3
2.3	Parodontiitin aiheuttajabakteerit	4
2.4	Parodontologinen näytteenotto ja viljely	7
3	Antibiootit	9
3.1	Antibioottiresistenssi	9
3.2	Penisilliini	9
3.3	Amoksisilliini ja amoksisilliini-klavulaanihappo	10
3.4	Doksisykliini	11
3.5	Klindamysiini	11
3.6	Atsitromysiini	12
3.7	Siprofloksasiini	12
3.8	Metronidiatsoli	12
4	Aikaisemmat tutkimukset	13
5	Työn tarkoitus ja tavoitteet	14
6	Tutkimusaineisto ja -menetelmät	15
6.1	Anaerobiset olosuhteet ja bakteeriviljely	15
6.2	Herkkyysmääritys	16
6.3	Esitutkimus	17
6.4	Suoritus	18
7	Tulokset	20
8	Pohdinta	22
	Lähteet	26

1 Johdanto

Opinnäytetyöni aiheena on parodontiittipatogeenien antibioottiherkkyys suomalaisilla parodontiittipotilailla. Aihe ideoitiin HUSLABin kliinisen mikrobiologian laboratorion bakteriologian osastolla suun mikrobiologian alalla. Tutkimus on tärkeä ja ajankohtainen, koska bakteerien antibioottiresistenssi on maailmanlaajuisesti lisääntymässä ja toisaalta resistenssikehityksessä on huomattavia maantieteellisiä eroja. Opinnäytetyö on osa laajempaa HUSLABissa tekeillä olevaa parodontiittipatogeenien herkkyystudkimusta. Työn tavoitteena oli tutkia parodontiittipatogeenien antibioottiherkkyys yleisimmin parodontiitin hoitoon käytettäville antibiooteille suomalaisilta parodontiittia sairastavilta potilailta eristetyistä bakteerikannoista.

Opinnäytetyössä tutkittiin *Prevotella intermedian*, *Fusobacterium nucleatum* ja *Parvimonas micran* mikrobilääkeherkkyyksiä Epsilon-testin avulla. Testatut antibiootit olivat penisilliini, metronidatsoli, klindamysiini, doksisykliini, atsitromysiini ja siprofloksasiini. Penisilliinille resistentille kannoille tehtiin lisäksi amoksisiliini- ja amoksisiliini-klavulaanihappoherkkyystudkimus.

Suomessa mikrobilääkeresistenssitilannetta seuraa FiRe-tutkimusryhmä (Finnish Study Group for Antimicrobial Resistance). Se on Terveiden ja hyvinvoinnin laitoksen sekä kliinisen mikrobiologian laboratorioden muodostama vapaaehtoisuuteen perustuva yhtiö. Yhtiön tehtävänä on luotettavan ja vertailukelpoisen tiedon luominen sekä kansallisten suositusten ja ohjeiden valmistaminen ja ylläpito. Vuonna 2011 kaikki suomalaiset FiRe-laboratoriot siirtyivät käyttämään eurooppalaista EUCAST - (The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) standardia. (Terveiden ja hyvinvoinnin laitos 2013.)

EUCAST vastaa koko Euroopan alueella kaikista antibioottiherkkyyssääntelyjen teknisistä suorituksista sekä laatii suosituksia MIC-arvojen herkkyystulkintarajoista. Sen tarkoituksena on yhtenäistää antibioottiherkkyyssrajoja koko Euroopassa. (EUCAST 2013.) Myös tässä työssä noudatetaan EUCAST-standardeja.

2 Parodontiitti

Hampaan ympärillä olevaa kudosta, johon kuuluvat ien, parodontaaliligamentti, juurisementti ja alveoliluu kutsutaan parodontiumiksi. Parodontium kiinnittää hampaan leukaluuhun sekä suojelee hammasta ja osallistuu puolustusreaktioihin mikrobeja vastaan. (Uitto 2008a.)

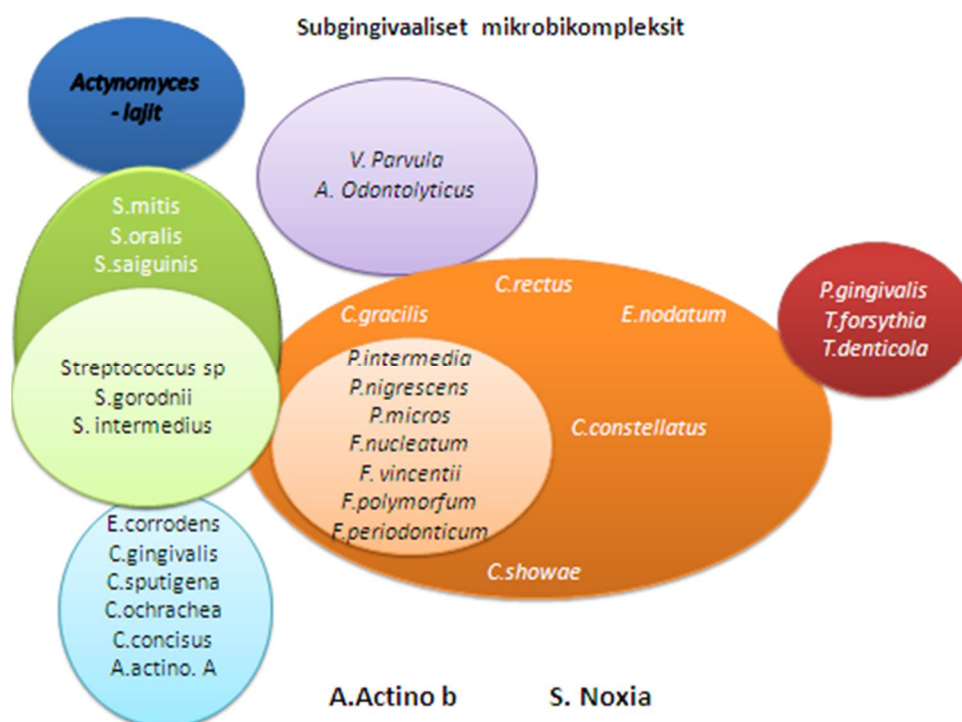
Parodontiitti on bakteerien aiheuttama infektiosairaus, joka tuhoaa hampaan kiinnityskudoksia aiheuttaen niissä palautumattomia vaurioita. Hoitamaton sairaus johtaa lopulta hampaan irtoamiseen. Parodontiitin esiasteena on aina gingiviitti eli ientulehdus, joka on vielä hoidettavissa hyvällä suuhygienialla. Parodontiitin kehittymiseen meneekin yleensä useita vuosia tai vuosikymmeniä. Nykypäivänä parodontiitti on yksi yleisimmistä bakteeritulehduksista ja tärkeimmistä suun terveysongelmista maailmanlaajuisesti. Sairautta aiheuttavat pieninä määrinä terveessäkin suussa esiintyvät bakteerit eli niin sanotun normaaliflooran bakteerit. Bakteerikasvulle edullisissa olosuhteissa nämä samat normaaliflooraan kuuluvat bakteerit voivat aiheuttaa suun alueen infektiosairauksia kuten parodontiittia. Näin voi käydä esimerkiksi silloin, kun bakteerit pääsevät rikastumaan ientaskuun hampaan pinnalle, jos suuhygienia on riittämätön. (Käypä hoito suositus 2010.)

2.1 Parodontiitin kehittyminen, oireet ja eteneminen

Suun mikrobiflooran bakteerit ja syljen proteiinit muodostavat hampaan pinnalle kalvo- maista ohutta plakkikerrostumaa, jota kutsutaan biofilmiksi. Biofilmin sisällä bakteerit tekevät yhteistyötä ja yrittävät suojautua ympäristön haitoilta, esimerkiksi hampaiden harjaukselta. Syljen mukanaan tuomat mineraalit kuten kalsiumkarbonaatti ja kalsiumfosfaatti kovettavat plakkia, jolloin muodostuu hammaskiveä. Hammaskiven karhea pinta edesauttaa bakteerien kiinnittymistä hampaan pinnalle. (Uitto 2008b.)

Osan bakteereista tiedetään esiintyvän muita suun bakteereita useammin ja erityisesti suurissa määrin parodontiitin yhteydessä (kuvio 1). Pelkällä läsnäolollaan hammasplakki ja sen sisältämät bakteerit aiheuttavat ärsykkeen, johon ikenet reagoivat hyvin voimaksati. Ärsyke aiheuttaa ikenessä tulehduksellisen reaktion ja hammasta ympäröivä kudosis tulehtuu. Tämä johtaa hampaan ja ikenen välisen liitosepiteelin löystymiseen. Bakteerit pääsevät leviämään syvemmälle hampaan ja ikenen väliseen ientaskuun,

josta niitä on vaikea puhdistaa omatoimisesti. Ientaskuihin varastoituu helposti bakteereita, jolloin ongelma yleensä pahenee. Bakteerit leviävät ientaskun ympäriskudokseen, jolloin lopulta kiinnityskudokset sekä juuren ympärillä oleva luu tuhoutuvat ja hammas irtoaa. Kudostuhon aiheuttavat isännän oma tulehdusreaktio, jossa tärkeää roolia näyttävät sekä lymfosyytit, plasmasolut ja neutrofiilit että bakteerien tuottamat toksinit ja entsyymit, kuten lipopolysakkaridit ja sytokiinit. (Uitto 2008b.) Tulehtuneista ientaskuista bakteerit pääsevät helposti verenkiertoon ja sen välityksellä myös muualle elimistöön, mikä voi johtaa vaarallisiin komplikaatioihin kuten sepsikseen tai endokardiittiin eli sydämen sisäkalvon tulehdukseen (Dahlén– Frandsen– Tove 2004: 127).



Kuvio 1. Subgingivaaliset mikrobikompleksit parodontiitissa, mukailtu julkaisusta Soc-ransky 1998. Opinnäytetyössä tutkitut bakteerit kuuluvat yllä esitetyn mukaisesti oranssin kompleksin bakteereihin, jotka toimivat ientaskussa biofilmin rakentumista välittävinä bakteereina ja jotka esiintyvät kohonneina osuuksina ientaskun mikrobifloorassa parodontiittipotilailla. Kuvassa vasemmalla varhaiset ientaskua kolonisoivat bakteerit ja oikealla myöhäiset punaisen kompleksin bakteerit, jotka liittyvät selkeimmin vaikeisiin kroonisen parodontiitin kliinisiin muotoihin.

2.2 Parodontiitin ehkäiseminen ja hoito

Parodontiitin ehkäisy tapahtuu sekä potilaan että hammashoidon ammattilaisten yhteistyönä. Hyvä suun kotihoito ja tupakoinnista pidättäytyminen ovat parodontaaliterveyden

kannalta tärkeimpiä asioita. (Käypä hoito suositus 2010.) Monipuolinen ravinto, jossa ei ole liikaa hiilihydraatteja, stressin hallinta ja riittävä liikunta ovat hyväksi myös parodontiumin terveydelle. Diabetesta sairastavilla on suurempi riski sairastua parodontiittiin. (Könönen 2012.) Epätasapaino isännän puolustuksen ja hampaan biofilmin välillä on syynä kroonisen parodontiitin kehittymisessä (Dahlén ym. 2004: 129). Parodontiitin ehkäisyn tavoitteena onkin pitää biofilmi poissa hampaan pinnalta ja ientaskuista. Tärkein keino ehkäistä ientulehdusta on säännöllinen hampaiden harjaus joko tavallisella tai sähköhammasharjalla. (Käypä hoito suositus 2010.)

Parodontologinen tutkimus kuuluu tavanomaisiin suun terveydentilan tutkimuksiin. Se on syytä tehdä säännöllisin väliajoin kaikenikäisille potilaille. Näin sairaus voidaan todeta mahdollisimman varhaisessa vaiheessa. Kun parodontiitti on diagnosoitu, se hoidetaan aikailematta. Ensijaisesti hoitona on anti-infektiivinen hoito, joka tehdään kaikille parodontiittia sairastaville potilaille. Biofilmi poistetaan, juuren pinnat tasoitetaan ja plakkia keräävien paikkojen reunat hiotaan. Biofilmi voidaan hajottaa mekaanisesti joko käsi-instrumenteilla kuten kyreteillä tai ultraäänilaitteella. (Käypä hoito suositus 2010.) Vaikeassa parodontiitissa hoito saattaa edellyttää anti-infektiivisen hoidon lisäksi kirurgista hoitoa, mikrobilääkitystä tai niitä molempia. Ennen mikrobilääkityksen aloittamista on aina suositeltava määrittää parodontiittisten hampaiden ienkudoksessa esiintyvät mikrobit, jotta osattaisiin valita kullekin potilaalle yksilöllisesti parhaiten tehoava, mutta ei liian laajakirjainen antibiootti. (Asikainen 2008.)

Parodontiitin lääkevalintaan vaikuttavat infektioitautien hoidossa yleisesti käytetyt kriteerit sovellettuna parodontiitin taudinluonteeseen. Hammaslääkäri valitsee lääkkeen harkintansa mukaan. Päätöksentekoon ja lääkeytyksen valintaan vaikuttavat sekä potilaan yksilölliset ominaisuudet, kuten muu lääkeyty ja yleissairaudet, että myös hammaslääkärin tieto, taito ja kokemus. Suomessa parodontiittipatogeenien antibioottiherkkyttä ei ole ennen järjestelmällisesti tutkittu. Yleinen käsitys on, että antibioottiresistenssiä parodontiittipatogeenilla ei juurikaan esiinny. Siitä syystä antibioottiherkkyysmääritys näille bakteereille tehdään tavallisesti vain valikoiduissa tapauksissa, kun hoitava hammaslääkäri pyytää sitä erikseen. (Nieminen 2008a.)

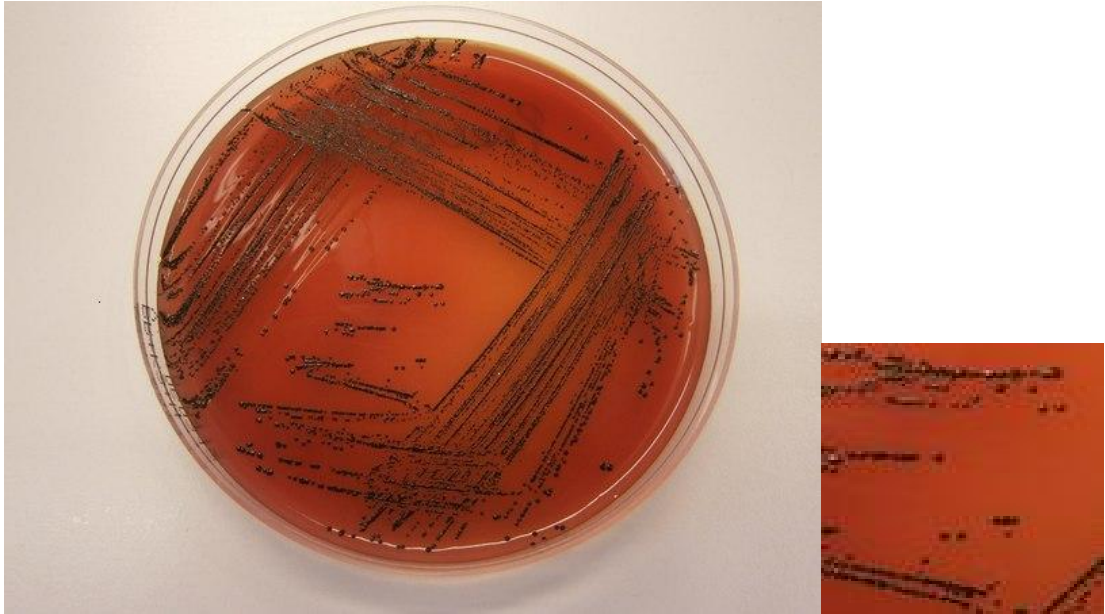
2.3 Parodontiitin aiheuttajabakteerit

Parodontiittisessa ienkudoksessa esiintyy useita eri bakteereja, mutta vain osan näistä tiedetään liittyvän parodontiittiin selvästi (kuvio 1). Erityisen vahvasti parodontiittiin liit-

tyvät *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (aikaisemmin *Actinobacillus actinomycetemcomitans*), *Porphyromonas gingivalis* ja *Treponema denticola*, joiden esiintyminen parodontiitissa jo hyvin pieninäkin määrinä on merkittävää. Muita merkittäviä parodontopatogeeneja ovat *Tannerella forsythia*, *Parvimonas micra* (aikaisemmin *Peptostreptococcus micros*), *Prevotella intermedia*, *Campylobacter rectus* sekä *Fusobacterium nucleatum*. Koska syventyneisiin ientaskuihin ei juurikaan pääse happea, siellä on anaerobien bakteerilajien kasvua suosivat olosuhteet. Tyypillistä parodontaali-infektioille onkin anaerobibakteerien runsaus. (Socransky 2008: 134–140.) Opinnäytetyössäni käsittelen kolmea merkittävää parodontiittiin liittyvää bakteerilajia, jotka kaikki ovat anaerobibakteereja: *Prevotella intermedia*, *Parvimonas micra* sekä *Fusobacterium nucleatum*.

Anaerobit bakteerit ovat prokaryoottisoluja, kuten aerobitkin. Ne eroavat toisistaan aineenvaihduntansa perustella. Anaerobien bakteerien elektronisiirtoketjun lopussa elektronin vastaanottajana voi toimia jokin muu kemiallinen aine kuin happi, esimerkiksi nitraatti tai sulfaatti. Nämä bakteerit eivät käytä lisääntyessään happea ja ne lisääntyvät ympäristössä, jossa on alhainen happipitoisuus tai jossa happea ei ole ollenkaan. Ihmisillä anaerobisia bakteereita löytyy osana normaaliflooraa iholta, erilaisilta limakalvoilta kuten suusta, nenästä, nielusta, mahasuolikanavasta, emättimestä sekä virtsaputkesta. (Sarvas – Skurnik – Vaara 2010: 35–36.)

Prevotella intermedia kuuluu prevotella-sukuun. Prevotellat ovat anaerobeja gram-negatiivisia sauvabakteereja. Ryhmän lajeja esiintyy yleisesti suuontelossa. Ne voivat aiheuttaa muun muassa erilaisia pään ja kaulan alueen infektioita. Pesäkkeen väri vaihtelee ruskean eri sävyistä mustaan (kuvio 2.). Pesäke on tasareunainen, sen koko on hyvin vaihteleva ja profiili matala tai kupera. Pesäkkeen pinta voi olla joko kiiltävä tai mattamainen. *Prevotella intermedian* tunnistamiseen voi saada lisävarmistusta positiivisella indoli- ja lipaasireaktioilla. Ultravioletivalossa *Prevotella intermedialla* on tiilenpunainen autofluoresenssi, jota myös käytetään sen tunnistuksessa. Myös sen lähisukulainen *Prevotella nigrescens* on yleinen parodontaali-infektioissa. *Prevotella nigrescens* käyttäytyy tunnistustesteissä kuten *Prevotella intermedia*. (Socransky 2008: 150.) Parodontaaliviljelytutkimuksissa nämä molemmat ovat merkittäviä löydöksiä ja ne vastataan yhtenä löydöksenä



Kuvio 2. *Prevotella intermedia* Brucella + K3-vitamiini-hemiini maljalla.

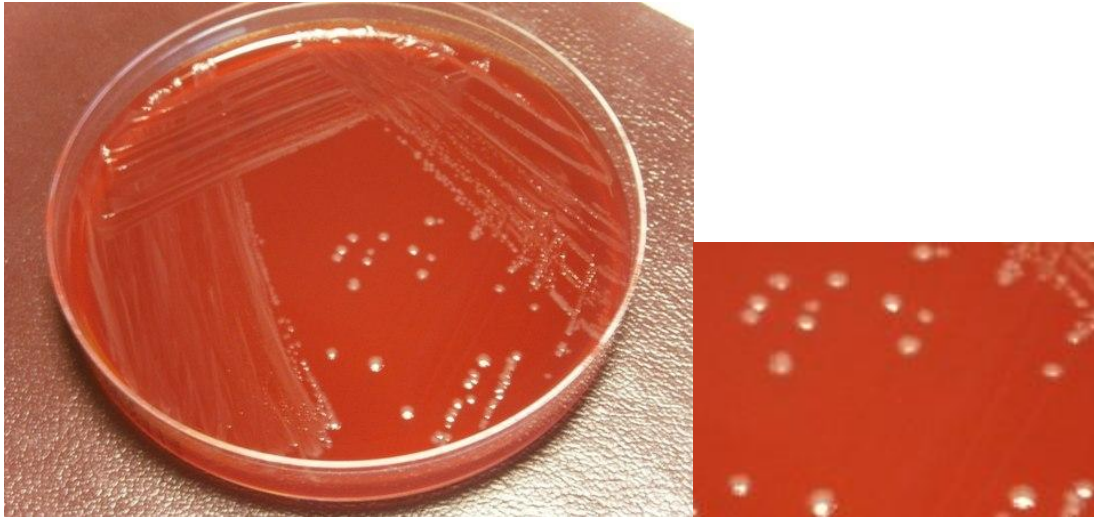
Parvimonas micra (entinen nimi *Peptostreptococcus micros*) on grampositiivinen anaerobinen kokki. Alun perin bakteeri on luokiteltu peptostreptococcus-sukuun. Nämä organismit ovat osa alkuperäiskansojen mikrobistoa ja ne esiintyvät pääsääntöisesti suuontelossa ja suolistossa. Bakteeri liittyy usein monimikrobisiin infektioihin kuten parodontiittiin. *Parvimonas micra* pesäke on valkoinen, pyöreä, hieman koholla ja usein sen ympärillä on kirkastuma (kuvio 3.). Pesäke on yleensä sileäreunainen ja sileäpintainen, mutta myös röpöreunaisia pesäkkeitä esiintyy. (Socransky 2008: 155.)



Kuvio 3. *Parvimonas micra* Brucella + K3-vitamiini-hemiini maljalla.

Kliinisissä infektioissa fusobakteereista yleisin on *Fusobacterium nucleatum*, endotoksiinia muodostava anaerobinen gramnegatiivinen ohut ja neulasmaisen sauvan muotoinen bakteeri. Tätä

bakteerilajia löydetään yleensä suusta, ylähengitysteistä, genitaalialueelta sekä suolistosta. Bakteri on erittäin virulentti ja voi aiheuttaa suun infektioiden lisäksi muun muassa Lemierren oireyhtymän, joka on nielutulehduksen harvinainen ja erittäin vakava komplikaatio. Maljalla *Fusobacterium nucleatum* pesäke näyttää useimmiten ”leivänmurumaiselta”. Pesäke on väriltään kellertävä ja kiiltävä matala, keskisuurikokoinen (koot vaihtelevat <0,5 - 2mm) sekä tarkkarajainen (kuvio 4). Indolitestissa syntyy positiivinen värireaktio. (Socransky 2008: 161.)



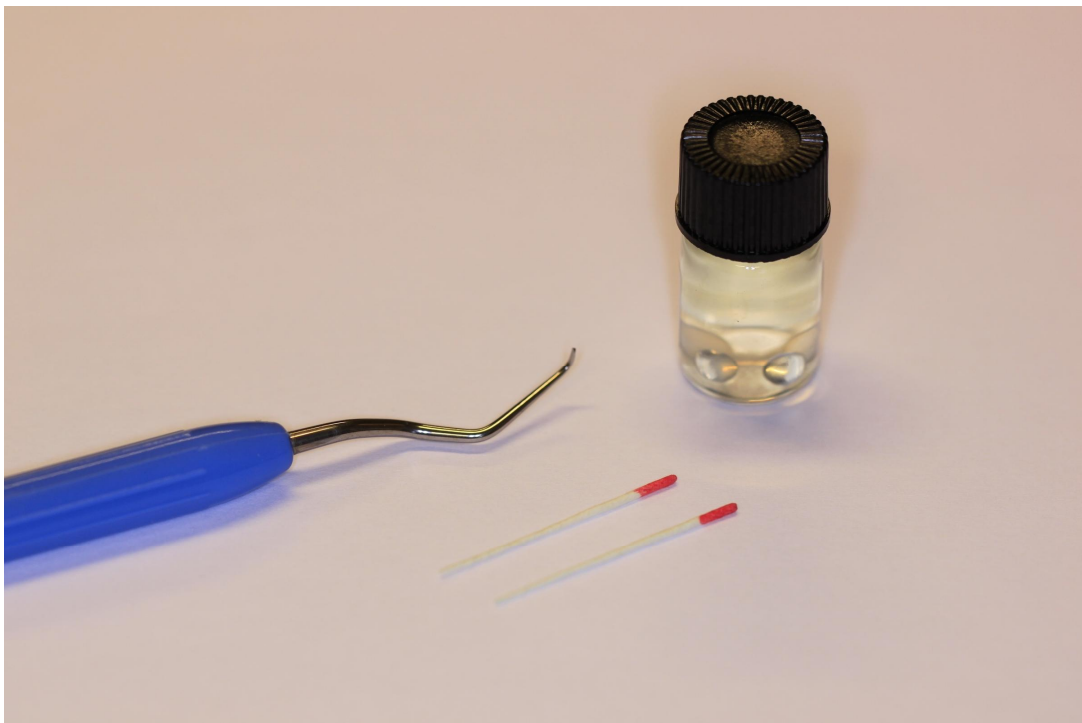
Kuvio 4. *Fusobacterium nucleatum* Brucella + K3-vitamiini-hemiini maljalla.

2.4 Parodontologinen näytteenotto ja viljely

Parodontiittipatogeenien identifioinnissa ja niiden suhteellisen määrän toteamisessa näytteen koko bakteerimäärästä käytetään menetelmänä yleensä bakteerinäytteen viljelyä. Kvantitatiiviset nukleinihaponosoitustutkimukset ovat viime vuosina yleistyneet vaihtoehtoisena diagnostisena menetelmänä. Mikrobiologisen diagnoosin avulla voidaan saada vahvistusta kliiniselle diagnoosille. Tutkimustulokset auttavat hoitopäätöksen teossa valittaessa antibioottilääkitystä mekaanisen hoidon tueksi ja ne ovat apuväline myös hoidon tehon seurannassa. Parodontiittipatogeenit tunnistetaan ensisijaisesti pesäkemorfologian perustella stereomikroskoopin avulla. (Nieminen 2008b.)

Näyte otetaan kyretillä tai paperinastalla joko yhdestä tai useammasta ientaskuista VMGA-kuljetusputkeen, joka sisältää 2 ml anaerobisesti valmistettua geelimäistä kuljetusainetta (kuvio 5). Geeliin on lisätty väri-indikaattori. Näytepullon koostumus on sellainen, että anaerobit bakteerit säilyvät siinä hyvin hengissä. Sinivihreä väri ennen näytteenottoa kertoo, että näytteenottopullo on hapettunut. Näytteenottoa varten vali-

taan kliinisesti sairaimmat, syvimät ientaskut. Ennen näytteenottoa plakki poistetaan ienrajan yläpuolelta hampaan pinnalta pumpulipallolla, jotta näyte ei kontaminoituisi ientaskun ulkopuolisilla bakteereilla. Kyretillä raaputetaan juuren pintaa mahdollisimman syvältä. Näin saatu näyte siirretään näytteenottopullossa olevan geeliin sisään, jossa kyrettiä pyöräytetään näytteen irrottamiseksi. Vaihtoehtoisesti ientaskun bakteereja voidaan imeyttää paperinastaan, joka viedään näytteenoton jälkeen geeliin. Hapen pääsyä näytteenottopullon rajoitetaan pitämällä pulloa auki mahdollisimman lyhyen ajan. (HUSLAB preanalytiikan käsikirja 2013.)



Kuvio 5. Parodontaaliviljelynäytteen ottovälineet: VMGA-kuljetusputki, kyretti ja paperinastat.

Näyte tulisi viljellä kahden vuorokauden kuluessa näytteenotosta. Näyteviljely kestää yhteensä 7 vuorokautta, jolloin myös hitaasti kasvavat anaerobibakteerit saadaan esiin näytteestä. Maljojen tarkastelussa käytetään stereomikroskooppia. Parodontiittipatogeenit tunnistetaan ensisijaisesti pesäkemorfologian perusteella. Löydösten pesäkemäärät lasketaan ja vastaus annetaan suhteutettuna näytteen kokonaisbakteerimäärään. Herkkyysmääritys merkitsevyysrajan ylittäville parodontiittipatogeneille tehdään ainoastaan pyydettäessä. (Tarkka – Torkko 2013.)

3 Antibiootit

Antibiooteiksi kutsutaan mikrobilääkkeitä, jotka vaikuttavat mikro-organismeihin niiden kasvua estävästi tai tappavasti. Osa antibiooteista vaikuttaa mikro-organismeihin bakteriostaattisesti eli ne estävät bakteerien kasvua, kun taas osa vaikuttaa bakterisidisesti eli ne pystyvät tappamaan bakterisoluja. Antibiootit voivat vaikuttaa mm. bakteerien soluseinämän synteesiin, proteiinisynteesiin, bakteerien sytoplasmiseen kalvoon, tai nukleiinihappoaineenvaihduntaan. (Järvinen – Vaara – Huovinen – Liippo – Vasankari. 2011: 114–117.)

3.1 Antibioottiresistenssi

Osa mikrobeista on luonnostaan resistenttejä useillekin lääkeaineille. Luonnollinen bakteerien resistenssi eri bakterilääkkeille vaihtelee suuresti bakterilajin mukaan. Hankituksi resistenssiksi kutsutaan luonnostaan herkkien bakteerien ominaisuutta, kun ne muuttuvat vastustuskykyisiksi bakterilääkkeille bakteerin perintötekijöissä tapahtuvien muutoksien eli mutaatioiden avulla. Muutosta voi tapahtua joko kromosomaalisten geenien tai siirtyvien geenien välityksellä ja niitä syntyy jatkuvasti bakteerien jakaantumisessa. (Järvinen ym. 2011: 122–131.)

Bakteereilla tiedetään olevan useita eri resistenssimekanismeja. Bakterilääkkeen sitoutumis- tai vaikutuskohta voi muuttua. Jotkut bakteerit voivat tuottaa bakterilääkkeitä hajottavia entsyymejä, toiset voivat pumpata lääkeaineen pois solun sisältä tai sulkea seinämänsä estäen näin bakterilääkkeen pääsyn soluun. Uusien aineenvaihdunta-reittien avulla on myös mahdollista välttää bakterilääkkeen vaikutusta. Bakteereita, jotka ovat samanaikaisesti resistenttejä usean eri ryhmän mikrobilääkkeelle, kutsutaan moniresistentiksi. Nykyaikana antibioottiresistenssi on yksi lääketieteen vakavimpia uhkia. Antibioottiresistenssiä tutkitaan antibioottiherkkyysmääritysten avulla. Määrittämisessä voidaan käyttää joko kiekkoherkkyysmenetelmää tai Epsilontestia. (Hautala 2004.)

3.2 Penisilliini

Penisilliini ($R-C_9H_{11}N_2O_4S$) kuuluu beetalaktaamien antibioottiryhmään. Penisilliinien perusrunkona on beetalaktaamirenkaan muodostama 6-beetaaminopenisillaanihappo. Sen vaikutusmekanismina, kuten muillakin beetalaktaameilla, on bakteerinsoluseinän

rakentamisessa tarvittavan peptidoglykaanin synteessin esto. Beetalaktaamien rakenne muistuttaa bakteerin soluseinämän peptidoglykaanin D-alanyyli-D-alaniinin rakennetta, joten ne pystyvät sitoutumaan bakteeriseinässä oleviin entsyymeihin muodostamalla niiden kanssa pysyviä komplekseja ja lopettamaan tai muuttamaan niiden toimintaa. Entsyymejä, johon beetalaktaamit kiinnittyvät, ovat esimerkiksi transpeptidaasit, karboksipeptidaasit ja endopeptidaasit. Niitä kutsutaan penisilliiniherkiksi entsyymeiksi tai penisilliiniä sitoviksi proteiineiksi eli PBP:ksi (penicillin binding protein). Penisilliinit ovat bakterisidisiä aineita. Koska bakteerien soluseinä eroaa rakenteeltaan ihmissolun membraanista ratkaisevasti, beetalaktaamit eivät ole isännän soluille haitallisia. (Järvinen ym. 2011: 114–115.)

PBP-entsyymin mutaatiot ovat yksi merkittävä mekanismi, jonka avulla bakteerit kehittävät resistenssiä beetalaktaameille. Muuttunut PBP-entsyymi ei voi sitoa beetalaktaamia, joten sen toiminta jatkuu normaalisesti, eikä hoito silloin tehoa. Lisäksi resistenssi voi johtua bakteerin solukalvon läpäisevyyden heikentymisestä tai bakteerin tuottamasta penisilliiniä hajottavasta beetalaktaamaasista. Penisilliiniresistenssi on usein plasmidivälitteistä. (Järvinen ym. 2011: 122–127.)

Penisilliinit luokitellaan peruspenisillineihin, laajakirjoisin penisillineihin, stafylokokki-penisillineihin sekä pseudomonaspenisillineihin. Peruspenisillinejä ovat oraalinen fenoksimetyylipenisilliini eli V-penisilliini ja parenteraalinen bentsyylipenisilliini eli G-penisilliini. (Koulu–Mervaala – Tuomisto 2012: 877.) Penisilliiniä käytetään sille herkkeen, yleensä grampositiivisten kokkibakteerien sekä osittain gramnegatiivisten bakteerien aiheuttamien sairauksien hoidossa. Myös monet anaerobit bakteerit ovat herkkiä penisilliinille. (Koulu ym. 2012: 882) Peruspenisilliiniryhmän antibiootit tehoavat moniin suun bakteereihin ja ne ovat käyttökelpoisia lääkkeitä hammasperäisten infektioiden hoidossa (Käypä hoito suositus 2010). Työssäni käytin ainoastaan V-penisilliinia.

3.3 Amoksisilliini ja amoksisilliini-klavulaanihappo

Amoksisilliini ($C_{16}H_{19}N_3O_5S$) ja amoksisilliini-klavulaanihappo kuuluvat penisilliinin tavoin niiden vaikutusmekanismin perustella soluseinämää heikentäviin bakteerilääkkeisiin eli beetalaktameihin. Amoksisilliini on bakterisidinen aminopenisilliini, joka on laajakirjoinen penisilliini. Klavulaanihappo on rakenteeltaan oksapenaami. Se voi palauttaa amoksisilliinin tehon beetalaktaamaasia tuottavia bakteereita vastaan. Siksi yhdistämällä

amoksisilliini ja klavulaanihappo on saatu lääkeaineen teho laajennettua myös beeta-laktamaasia tuottaviin bakteereihin. (Koulu ym. 2012: 885–889.)

Amoksisilliini tehoaa samoihin bakteereihin kuin peruspenisilliinit, mutta lisäksi sillä on tehoa eräisiin gramnegatiivisiin sauvoihin ja enterokokkeihin (Koulu ym. 2012: 885–889). Amoksisilliinia käytetään hammasperäisten infektiokomplikaatioiden ehkäisemiseen suun alueen toimenpiteiden yhteydessä, infektiokomplikaatioille alttiiden potilaiden hammasperäisten infektioiden hoidossa ja parodontaali-infektioiden hoidossa (Käypä Hoito 2010). Kaikille penisilliinille resistentille kannoille tässä tutkimuksessa tehtiin amoksisilliini sekä amoksisilliini-klavuhappo antibioottiherkkyysmäärittäminen.

3.4 Doksisykliini

Doksisykliini ($C_{22}H_{24}N_2O_8$) on bakteriostaattinen proteiinisynteesin estävä aine, joka kuuluu tetrasykliineihin. Näillä aineilla on paljon enemmän toksisia haittavaikutuksia kuin beetalaktaameilla. Yleiset haittavaikutukset ovat allergiat kuten ihottumat, ruoansulatuskanavan ärsytys, maksa- ja munuaisvauriot. (Huovinen 2012: 160.) Tetrasykliinit estävät proteiinentuotannon kiinnittymällä bakterisolun 30s-ribosomin alayksikköön, joten aminohappo-tRNA:n tartunta ribosomiin estyy. Doksisykliini on laajakirjoinen antibiootti. Sen yleisiä käyttöalueita ovat bronkiitti ja muut alempien hengitysteiden infektiot sekä sinuiitti. Doksisykliinillä on hyvä teho streptokokkeihin ja suun anaerobeihin ja siksi se soveltuukin hyvin myös hammasperäisten infektioiden hoitoon. (Koulu ym. 2012:899–902.)

3.5 Klindamysiini

Klindamysiini ($C_{18}H_{33}ClN_2O_5S$) on doksisykliinin tavoin bakteriostaattinen proteiinisynteesin estäjä. Vaikutusmekanismin perustella aine kuuluu linkosamidien ryhmään. Nämä lääkkeet ehkäisevät bakterisolun ribosomaalista proteiinisynteesiä kiinnittymällä niille herkkien bakteerien ribosomien 50S-alayksiköihin. Klindamysiinin resistenssi voi siirtyä joko plasmidivälitteisesti tai kromosomaalisesti. (Koulu ym. 2012: 910.)

Luonteenomaista klindamysiinille on hyvä teho anaerobisiin bakteereihin. Yksi sen tärkeimmistä käyttöalueista ovat hammasperäiset infektiot, esimerkiksi periodontaalinen absessi ja parodontiitti. (Koulu ym. 2012: 910–911.)

3.6 Atsitromysiini

Atsitromysiini ($C_{38}H_{72}N_2O_{12}$) on makrolidiryhmään kuuluva mikrobilääke ja sen vaikutus on bakteeriosaattinen. Aine on johdettu puolisynteettisesti erytromysiinistä. Klindamysiinin ja doksisykliinin tavoin sen vaikutus perustuu proteiinisynteesi estoon. Makrolidit ovat yleisesti ottaen enemmän grampositiivisiin kuin gramnegatiivisten bakteereihin tehoavia lääkkeitä, mutta ne tehoavat usein myös hemofiluksiin, neisserioihin ja moniin anaerobisiin. Lääkkeen ensijaisia käyttöaiheita ovat alahengitystieinfektiot, erityisesti pneumoniat, bronkiitit ja otitit. Atsitromysiini soveltuu myös suun alueen infektioiden hoitoon. (Koulu ym. 2012: 907–908.)

3.7 Siprofloksasiini

Siprofloksasiini ($C_{17}H_{18}N_3FO_3$) on nukleiinihappojen synteesiin vaikuttava aine joka kuuluu fluorokinolonien ryhmään. Siprofloksasiini estää prokaryoottisolun DNA-gyraasin nimisen entsyymin toimintaa, joka on välttämätön DNA-polymeraasin toiminnalle. Näin bakteerin DNA:n kahdentuminen estyy. Vaikutukseltaan siprofloksasiini on bakterisidinen. (Järvinen ym. 2011:117.) Resistenssi fluorokinoleja vastaan voi kehittyä eri mekanismeilla. Yksi niistä on mutaatio DNA-gyraasin fluorokinolin vaikutus kohdassa. Lisäksi erilaiset muutokset proteiinien rakenteessa voivat aiheuttaa resistenssiä. Plasmidivälitteistä resistenssiä ei ole nykypäivällä todettu eikä Suomessa pidetään se ongelmana. (Koulu ym. 2012: 926–928.)

Siprofloksasiini on synteettinen, laajakirjoinen mikrobilääke, se tehoaa useisiin gramnegatiivisiin ja grampositiivisiin bakteereihin. Siprofloksasiinia käytetään virtsatietulehdusten, ihon, pehmytkudosten ja luuston infektioiden, keuhko- ja suolistoinfektioiden hoitoon. Lisäksi sitä käytetään jossain määrin parodontaali-infektioiden hoidossa. (Koulu ym. 2012: 929.)

3.8 Metronidatsoli

Metronidatsoli ($C_6H_9N_3O_3$) kuuluu nitroimidatsoliryhmään. Metronidatsoli estää bakteerien nukleiinihappojen synteesiä ja sen vaikutustapa on bakterisidinen. Se sitoutuu DNA:han ja saa aikaan mutaatioita ja katkoksia kun niiden nitroryhmä on pelkistynyt eli

ainoastaan pelkistävässä olosuhteissa. Normaaleissa solunsisäisissä olosuhteissa sel-laista ei voi tapahtua, mutta se onnistuu anaerobisilla bakteereilla niiden elektronisiirto-proteiinien avulla. Sen vuoksi metronidatsolit ovat erittäin tehokkaita kaikkia anaerobisia bakteereja vastaan ja siksi sitä käytetään myös suun anaerobibakteeri-infektioiden hoi-toon. (Järvinen ym. 2011:117.) Metronidatsoliresistenssiä on havaittu vain yksittäista-pauksissa. (Koulu ym. 2012: 975–976.)

4 Aikaisemmat tutkimukset

Viime vuosina parodontiittipatogeenien herkkyystudkimuksia on raportoitu koko Euroo-pan alueella hyvin niukasti. Olen kuitenkin löytänyt muutamia mielenkiintoisia, suhteel-lisen tuoreita tutkimuksia, joita käytin oman tutkimukseni käytännön suorituksen mallei-na.

Vuonna 2005 Alankomaissa ja Espanjassa julkaistiin yhteistyössä aiheeseen liittyvä tutkimus, jonka tavoitteena oli verrata parodontiittipatogeenien antibioottilherkkyysofioi-leja parodontiittia sairastavilla espanjalaisilla ja hollantilaisilla potilailla. Tutkitut baktee-riajat olivat *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotel-la intermedia*, *Fusobacterium nucleatum* ja *Micromonas micros*. Jokaiselle lajille tehtiin kahdeksan eri antibioottilherkkymääritystä käyttämällä Epsilon-testiliuskoja. Tulokset osoittivat, että espanjalaisilla potilailla resistenttien bakteerikantojen prosenttiosuus oli huomattavasti suurempi kuin hollantilaisilla potilailla. Espanjalaisilta potilailta eristetyis-tä *Fusobacter nucleatum* kannoista 20% oli resistenttejä penisilliinille, amoksisilliinille ja metronidatsolille, *Prevotella intermedian* kannoista 16% oli resistenttejä tetrasykliinille ja 33% atsitromysiinille. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* kannoista 30% prosent-tia oli resistenttejä amoksisilliinille ja atsitromysiinille. *Porphyromonas. gingivalis* oli mo-lemmissa maissa herkkä kaikille tutkituille antibiooteille (van Winkelhoff – Herrera – Oteo – Sanz 2005: 893 – 898.)

Vuonna 2012 on Alankomaista julkistettu tuoreempi tutkimus, jossa on tutkittu samoja bakteerilajien herkkyys kuudelle eri antibiooteille. Tutkimuksessa saatuja tuloksia ver-rattiin aikaisempiin tuloksiin ja herkkyystudoksissa todettiin MIC-arvojen nousseen hie-man aikaisempaan tutkimukseen verrattuna. Se tarkoittaa siitä, että resistenssi näille antibiooteille kehittyy koko ajan, joten sitä on hyvä seurata säännöllisesti. (Veloo 2012: 450 – 454). Erityisen runsaasti resistenssiä parodontiittipatogeenilla on raporto-i-

tu olevan Etelä-Amerikassa, esimerkiksi Kolumbiassa (Valenzuela – De Quadros 2009: C25-8).

Sveitsistä on julkaistu samantyyppinen tutkimus vuonna 2008. Tutkimuksessa selvitettiin vuosina 1911-2005 eristettyjen parodontiittipatogeenien antibioottiherkkyttä. Tulokset osoittivat, että resistenttien kantojen prosenttiosuus oli hyvin pieni, joten Sveitsissä parodontiittipatogeenien resistenssiä ei pidetä suurena ongelmana. (Chenau – Meyer – Lenkeit – Kulik 2008: 1087 – 1091.)

Yllämainitut tutkimukset osoittavat, että herkkyystilanne voi vaihdella maittain suuresti-kin mahdollisesti esimerkiksi johtuen maakohtaisista eroista antibioottien käytössä yleensä. Koska erot ovat alueellisesti mittavia, antibioottiresistenssitutkimuksia on tärkeää tehdä eri maissa ja myös seurata resistenssitilanteen kehitystä alueellisesti.

5 Työn tarkoitus ja tavoitteet

Työn tavoitteena oli tutkia keskeisimpien parodontiittipatogeenien antibioottiherkkyys yleisimmin parodontiitin hoitoon käytettäville antibiooteille. Tutkimus on osa laajempaa HUSLABissa meneillään olevaa parodontiittipatogeenien herkkyystutkimusta, jossa jo on tehty *Aggregatibacter. actinomycetemcomitansin* ja *Porphyromonas. gingivaliksen* antibioottiherkkyysmääritykset. Alun perin tässä opinnäytetyössä oli tarkoituksena tutkia neljä vahvasti parodontiittiin liittyvää anaerobista bakteerilajia, jotka ovat *Parvimonas micra*, *Prevotella intermedia*, *Fusobacterium nucleatum* sekä *Campylobacter rectus*. *Campylobacter rectus* kuitenkin rajattiin pois tutkimuksesta esitutkimuksissa ilmenneiden teknisten vaikeuksien vuoksi, koska opinnäytetyöhön varattu aika ei olisi riittänyt niiden ratkaisemiseen. Suomessa herkkyysmääritystä ei tavanomaisesti tehdä parodontiittipatogeenien diagnostisista näytteistä ja siksi on erittäin tärkeää selvittää näiden patogeenien todellinen herkkyystilanne.

Opinnäytetyössäni haen vastausta seuraavaan tutkimuskysymykseen:

Ovatko nämä kolme parodontiittipatogeenia edelleen herkkiä Suomessa kokemus-
räisesti parodontiitin hoitoon käytettäville antibiooteille?

6 Tutkimusaineisto ja -menetelmät

Tutkimuksessa käytetyt bakteerilajit olivat *Parvimonas micra*, *Prevotella intermedia* sekä *Fusobacterium nucleatum*. Kutakin bakteerilajia oli HUSLABissa kerätty tutkimusta varten parodontaaliviljelyyn tulleesta kunkin bakteerin suhteen positiivisesta 50:stä peräkkäisestä diagnostisesta näytteestä. Keräysvaiheessa näytteistä oli poistettu potilastunnistetiedot eikä tuloksia siten voida yhdistää yksittäisiin potilaisiin. Bakteereja oli säilytetty tutkimusta varten pakastettuina maitoon -70 °C lämpötilassa.

Bakteerien herkkyys tutkittiin seuraaville antibiooteille: penisilliini, metronidatsoli, klindamysiini, doksimysiini, atsitromysiini ja siprofloksasiini. Penisilliinille resistenteille bakteerikannoille tehtiin myös amoksisilliini- ja amoksisilliini-klavulaanihappoherkkyysmäärytys. Kasvatusmaljan valinnassa huomioitiin tutkittavien bakteerien kasvuvaatimukset.

6.1 Anaerobiset olosuhteet ja bakteeriviljely

Kaikki kolme tutkittavaa bakteerilajia ovat parodontaali-infektioihin tunnetusti liittyviä anaerobeja bakteereja eli ne eivät käytä lisääntymiseensä happea. Anaerobisia bakteereita viljeltäessä happea ei saa olla läsnä, tästä johtuen niitä varten on varattava hapettomat kasvatusolosuhteet. Bakteereita kasvatettiin siksi erityisessä näille bakteereille sopivassa anaerobikaapissa (kuvio 6.). Lisäksi herkkyysmäärytystä edeltävissä työvaiheissa kantojen kantojen kasvatukseen käytettiin kasvatusastioita, joihin saadaan anaerobinen atmosfääri anaerobikehittimien avulla. Kehittimet ovat pussimuodossa ja pystyvät poistamaan astiasta happea. Anaerobista atmosfääriä voidaan seurata laittamalla astiaan indikaattori, jonka väri muuttuu valkoiseksi kun happi poistuu astiasta kokonaan.



Kuvio 6. Anaerobikaappi Whitley Workstation Mg 500.

Koska kyseessä ovat anaerobiset bakteerit, työskentelyssä tuli huomioida, että bakteerit altistuisivat hapelle vain mahdollisimman lyhyen ajan ja että ne kasvatetaan hapetomissa olosuhteissa. Bakteerien viljely olisi siten optimaalista tehdä anaerobiosuhteissa. Tämä ei kuitenkaan ollut mahdollista, koska anaerobityöskentelyyn soveltuvaa biosuojakaappia ei ollut käytettävissä. Sen sijaan viljely tehtiin huoneilmassa ja erityistä huomiota kiinnitettiin siihen, että bakteerit altistuisivat huoneilman hapelle mahdollisimman lyhyen ajan. Tästä syystä maljat siirrettiin välittömästi kasvamaan anaerobikaappiin. Lisäksi kasvatusalustat laitettiin vähintään yhden vuorokauden ajaksi anaerobiesikäsitteilyyn anaerobikasvatusastiaan. Se, että tutkittavat bakteerit ovat anaerobeja, huomioitiin myös bakteerien kasvatusajassa. Anaerobibakteerit kasvavat yleensä selvästi hitaammin kuin aerobibakteerit ja siksi herkkyystulokset luettiin vasta kaksi päivää viljelemisen jälkeen.

6.2 Herkkyysmäärittäminen

Bakteerin antibioottiherkkyyden määrittäminen on keskeinen osa mikrobiologista diagnostista tutkimusta. Oikean lääkeyksen valitsemiseksi on tärkeää tietää, mikä bakteerilääke tehoaa potilasnäytteessä todettuihin bakteereihin. Herkkyysmäärittämenetelmiä on useita. Epsilon-testi, jota tässä työssä käytettiin, on tarkka ja luotettava tapa mitata

pienin lääkeaineen mikrobikasvua estävä pitoisuus eli niin kutsuttu MIC-arvo (minimal inhibitory concentration). MIC-tulos on kääntäen verrannollinen bakteerin herkkyyteen tutkitulle antibiootille.

Epsilon-testi on kaupallinen ohut muoviliuska, johon on imeytetty nouseva gradientti bakteerilääkettä. MIC-arvon lukemista varten liuskassa on mitta-asteikko. Liuska asetetaan bakteerimaljalle, johon on ensin imeytetty tutkittavasta bakteerikannasta valmistettu suspensio. Inkuboinnin jälkeen liuskan ympärillä syntyy bakteerikasvun estovyöhyke, jonka perusteella luetaan MIC-arvo suoraan mitta-asteikolta (kuvio 7.). Käytännössä bakteerien herkkyys eri mikrobilääkkeille ilmoitetaan SIR-merkinnöillä (S = herkkä, I = herkkyys lääkkeelle on alentunut, R = resistentti). (Carlson – Koskela 2011: 43–45.)



Kuvio 7. Epsilon-testi Brucella + K3-vitamiini-hemiini maljalla.

6.3 Esitutkimus

Suoritin opinnäytteeni laboratorio-osuuden HUSLABin bakteriologian laboratoriossa alkuvuodesta 2013. Muutama päivää ennen varsinaista kokeellisen työn alkua harjoitelin laboratoriossa antibioottilherkkyyksien tekemistä, muun muassa bakteerisuspension valmistamista ja bakteerien dreijausta kasvatusalustalle tasaiseksi ja sopivan pak-

suseksi kasvustoksi, mikä on tärkeää herkkyysmääritysten tuloksen luotettavuuden kannalta. Lisäksi tutustuin laboratorion työvälineisiin, työohjeisiin ja laitteisiin

Esitutkimuksen avulla pyrittiin varmistamaan menetelmän toimivuus ennen varsinaisten tutkimusnäytteiden tutkimista. Siksi sitä varten herätettiin ja puhdistettiin ainoastaan pieni määrä kantoja. Ensimmäisenä otettiin kaksi *Prevotella intermedia* bakteerikantaa, jostain sitten tehtiin herkkyysmääritykset. Tämä laji kasvoi hyvin esitutkimuksessa, sekä myös tutkimusvaiheessa. Kun *Prevotella intermedia* -aineisto oli tutkittu kokonaan, aloin tutkia *Fusobacterium nucleatumia*. Vaikka esitutkimus oli taas onnistunut hyvin, sen kanssa työskentelyssä tuli hankaluuksia tutkimuksen myöhäisessä vaiheessa, koska kaikki kannat eivät jostain syystä lähteneet kasvamaan. Toiset kannat eivät kasvaneet missään vaiheessa, toiset kasvoivat puhdistusvaiheessa, mutta eivät kasvaneet herkkyysmäärityksissä. *Fusobacterium nucleatum* -tulosten valmistumisen jälkeen aloitin *Parvimonas micra* -esitutkimuksen. Lajin kasvu esitutkimuksessa oli erittäin harvaa, joten esitutkimus tehtiin uudestaan kokeilemalla vaihtoehtoisena kasvatusalustana Wilkins-Chalgren (WC) elatusainemaljaa. Kasvatusmaljan vaihto ei kuitenkaan auttanut ja siksi päädyttiin tekemään hieman paksumpaa bakteerisuspensiota tätä lajia tutkittaessa. Kolmas esitutkimus onnistui hyvin, kun suspensiosta tehtiin 1,5-2 McFarland vahvuinen.

6.4 Suoritus

Kaikissa työvaiheissa kasvatusalustana käytettiin yleisesti anaerobien parodontiittipatogeenien kasvatuksessa käytettävää erittäin ravintopitoista Brucella-maljaa, johon oli lisätty K-vitamiinia (1 µg/ml) ja hemiiniä (5 µg/ml). Herkkyysmääritystä varten bakteerikannat ”herätettiin” pakkasesta. Kahden kasvatusvuorokauden jälkeen kasvun puhtaus tarkastettiin stereomikroskoopin alla. Mikäli maljalla havaittiin tutkittavan bakteerin lisäksi muuta bakteerikasvua, tutkittava bakteerilaji puhdistettiin maljalta tekemällä puhdasviljelmä yhdestä erillisestä pesäkkeestä. Kaikki työssäni käytetyt kannat oli tarvetta puhdistaa muista bakteereista, mikä vei työstä paljon aikaa. Yleensä puhdistukset teki opinnäytetyöni ohjaaja, mutta olen autoin häntä välillä ja tein puhdistukset itsenäisesti hänen lomansa aikana. Puhdasviljelmiä kasvatettiin kaksi vuorokautta +37 °C lämpötilassa anaerobiastiassa. Inkubaation jälkeen kasvuston puhtaus varmistettiin stereomikroskoopilla (kuvio 8) kasvustoa tarkastelemalla, jonka jälkeen bakteereista tehtiin varsinaiset herkkyysmääritykset.



Kuvio 8. Stereomikroskooppi.

Kaikki herkkyysmäärittämissä käytetyt maljat säilytettiin anaerobiastiassa anaerobiatmosfäärissä jääkaappilämpötilassa vähintään vuorokauden ajan ennen herkkyysmäärittämissä tekemistä. Maljat otettiin huoneenlämpöön vähintään 30 minuuttia ennen viljelyä. Kaksi päivää vanhoista puhtasviljelmistä siirrettiin viljelysilmukalla bakteerimassaa, jota suspensoitiin koeputkessa olevaan 0,9 % keittosuolaliuokseen ja sekoitettiin sähkösekoittajalla. Bakteerikasvustot otettiin huoneilmaan juuri ennen niiden viljelyä maljoille ja työskentelyaika pidettiin mahdollisimman lyhyenä. Tavoitteena oli tehdä 1,0 McFarland vahvuinen bakteerisuspensio. Suspension vahvuus mitattiin densitometrillä. Samalla viljelysilmukalla tehtiin hajotus perämaljalle, josta myöhemmin varmistettiin kasvuston puhtaus MALDI-TOF laitteella.

Suspension valmistuttua viljelyt suoritettiin mahdollisimman pikaisesti. Suspension kastettiin steriili vanupuikko, jota kierrettiin putken reunaa vasten niin, että ylimääräinen neste valui pois. Suspensiota levitettiin maljalle vanupuikolla dreijaamalla. Dreijaus tehtiin aina laminaarikaapissa aerosolimuodostuksen takia. Epsilon-testiliuskat asetettiin maljalle vakuumisiirrostajan avulla jokaiselle maljalle kaksi kappaletta V-kirjaimen muotoon (matalimmat pitoisuudet vierekkäin). Liuskat asetettiin varoen, ettei niiden alle jää ilmakuplia. Jos ilmakuplia kuitenkin jäi, yritettiin ne saada pois kevyesti pinsetillä

painamalla. Erityistä huomiota tuli kiinnittää myös siihen, ettei testiliuska liikkunut enää sen kosketettua maljan pintaa, koska antibioottia liukenee kasvatusalustaan välittömästi. Testiliuskan liikkumisen seurauksena voidaan tulokseksi saada virheellisiä MIC-arvoja. Liuskojen maljalle asettamisen jälkeen maljat siirrettiin välittömästi kasvamaan anaerobikaappiin.

Herkkyudet luettiin kahden vuorokauden kasvatusajan jälkeen ja tulokset merkittiin tulostustaulukkoon. Suosituksien mukaan lukijoita tulee aina olla kaksi, joten luimme herkkyydet rinnakkain ohjaajani kanssa ja vertailimme saamiamme tuloksia keskenään. Tulostemme erot olivat hyvin pieniä, joten arvioimme tuloksiamme olevan luotettavat.

7 Tulokset

Kutakin bakteerilajia oli alun perin pakastettu 50 potilaan peräkkäisestä näytteestä. *Fusobacterium nucleatumia* on lopullisessa aineistossa kuitenkin vain 42 kantaa, koska kaikista pakastetuista näytteistä ei saatu tutkittavaksi tarkoitettua bakteeria kasvamaan. *Prevotella intermediaa* ja *Parvimonas micraa* tutkittiin molempia 50 kantaa.

Saaduista MIC-arvoista tehtiin herkkyystulkinta EUCAST-standardia noudattaen penisilliinille, klindamysiinille, metronidatsolille, amoksisilliinille ja amoksisilliiniklavulaanihakonille. Koska EUCAST ei anna tutkituille bakteerilajeille SIR-tulkintaohjeita siprofloksasiinille, doksisykliinille tai atsitromysiinille, tulkittiin näiden MIC-tulokset noudattaen samoja raja-arvoja kuin on käytetty alalla tehdyssä aikaisemassa julkaisussa (taulukko 1). (van Winkelhoff – Herrera – Oteo – Sanz 2005: 893 – 898.) Tämän jälkeen laskettiin kullekin antibiootille herkkien ja resistenttien bakteerien prosenttiosuus. Lisäksi kirjattiin saatujen MIC-arvojen vaihteluväli sekä MIC50% ja MIC90% arvot bakteeri- ja antibioottikohtaisesti. MIC50% ja MIC90% arvot ilmoittavat mille antibioottikon-sentraatiolle 50% tai vastaavasti 90% tutkituista näytteistä oli herkkiä.

Taulukko 1.

MIC-arvojen tulkinnassa käytetyt raja-arvot. S (bakteeri on herkkä tutkitulle antibiootille), I (herkkyys lääkkeelle on alentunut), R (bakteeri on resistentti tutkitulle antibiootille).

Antibiootti	S	R
Penisilliini	<0,25 tai 0, 25	>0,5
Siprofloksasiini	<4	4
Doksisykliini	<8	8
Atsitromysiini	<2	2
Metronidatsoli	<4 tai 4	>4
Klindamysiini	<4 tai 4	>4
Amoksisilliini	<0,5 tai 0,5	>2
Amox-klavu	<4 tai 4	>8

Prevotella intermedia –kannoista osa oli odotetusti resistenttejä penisilliinille, koska kyseinen bakteeri voi olla beetalaktamaasin tuottaja (taulukko 2). Aineistossa resistenttejä kantoja oli 13/50 (26%). Näistä 3/12 oli resistenttejä lisäksi amoksisilliinille. Kaikki penisilliinille resistentit kannat olivat herkkiä amoksisilliini-klavulaanihappoyhdistelmälle. Lisäksi kannoista 1/50 (2%) oli resistenttejä siprofloksasiinille ja 2/50 (4%) atsitromysiinille. Kaikki kannat olivat sen sijaan herkkiä doksisykliinille, klindamysiinille ja metronidatsolille.

Taulukko 2. *Prevotella intermedian* tulokset.

<i>Prevotella intermedia</i> 50 kantaa	% R	MIC range	MIC50%	MIC90%
Penisilliini	26	0,002->32	0,006	0,008
Siprofloksasiini	2	0,064-6	0,38	0,5
Doksisykliini	0	0,023-2	0,0047	1,5
Atsitromysiini	4	<0,016-3	0,064	0,125
Metronidatsoli	0	<0,016- 0,094	0,023	0,064
Klindamysiini	0	<0,016-3	<0,016	<0,016

Fusobacterium nucleatumilla (taulukko 3) todettiin penisilliiniresistenssi 8/42 (9,5%) kannoista, joista osa oli myös resistenttejä amoksisilliinille, mutta ei amoksisilliini-

klavulaanihakolle. Yksi kanta oli lisäksi resistentti siprofloksasiinille. Muille tutkituille antibiooteille resistenssiä ei esiintynyt.

Taulukko 3. *Fusobacterium nucleatum* tulokset.

<i>Fusobacterium nucleatum</i> 42 kantaa				
	% R	Mic range	MIC50%	MIC90%
Penisilliini	9,5	<0,002 - >32	0,004	0,008
Siprofloksasiini	4,7	0,25-4	1	2
Doksisykliini	0	<0,016-0,25	0,094	0,75
Atsitromysiini	0	<0,016-1	0,047	0,19
Metronidatsoli	0	<0,016-0,047	0,023	0,023
Klindamysiini	0	<0,016-0,047	<0,016	<0,016

Parvimonas micralla (taulukko 4) ei todettu penisilliiniresistenssiä. Atsitromysiiniresistenssiä todettiin 1/50 (4%) kannalla. Muuten tämä bakteeri oli herkkä kaikille tutkituille antibiooteille.

Taulukko 4. *Parvimonas micran* tulokset.

<i>Parvimonas micra</i> 50 kantaa				
	% R	MIC range	MIC50%	MIC90%
Penisilliini	0	<0,002-0,004	0,002	0,003
Siprofloksasiini	0	0,016-0,125	0,19	0,38
Doksisykliini	0	<0,0016-1,0	0,023	0,23
Atsitromysiini	4	0,016-3,0	0,5	1
Metronidatsoli	0	<0,016-0,125	0,094	0,19
Klindamysiini	0	<0,016-1,0	0,125	0,19

8 Pohdinta

Tutkimuksen tarkoituksena oli tutkia tämän hetkistä parodontiittipatogeenien resistenssilannetta Suomessa. Tulokset osoittavat, että suomalaisilta potilailta eristetyt bakteerikannat ovat pääsääntöisesti herkkiä yleisimmin parodontiitin hoitoon käytettäville anti-

biooteille. Ainoastaan *Prevotella intermedia* oli merkittävässä määrin resistentti penisilliinille. Tulos oli odotettu ja tämä seikka on otettu jo huomioon muun muassa suun alueen hoitosuosituksia laadittaessa (Käypä hoito suositus 2010). Resistenssi on samaa tasoa aiemmin hollantilaispotilasta julkaistujen tulosten kanssa (van Winkelhoff – Herrera – Oteo – Sanz2005:893 – 898).

Muilta osin voidaan todeta, että Suomessa nyt tutkittujen bakteerien aiheuttamiin parodontaaali-infektioihin voidaan valita antibiootti edelleen viljelynäytteen bakteerien nimemäärityksen perusteella ilman herkkyysmäärittystä. Tämä on hyvä asia, koska parodontaaali-infektioiden diagnostiikkaa tehdään enenevässä määrin viljelyn lisäksi myös nukleinihaponosoitusmenetelmillä, joissa herkkyysmäärittäminen pääsääntöisesti ei ole mahdollista.

Vaikka antibiootin valinta nyt tutkittujen bakteerien osalta voidaan tulosten perusteella tehdä empiirisesti ilman herkkyysmäärittystä, on edelleen erittäin tärkeää tehdä parodontitiitin antibioottihoitoa suunniteltaessa mikrobiologinen tutkimus infektiossa esiintyvien bakteerien lajienimien määrittämiseksi. Tämä on oleellista turhien ja turhan laajakirjoisten antibioottihoitojen välttämiseksi.

Verrattaessa tutkimuksessani saamia tuloksia aikaisempiin tämän aiheeseen liittyvien tutkimuksiin tuloksiin voin sanoa, että odotuksien mukaisesti herkkyystilanne voi vaihdella maittain suurestikin. *Prevotella intermedian* penisilliiniresistenssi on samaa tasoa aiemmin hollantilaispotilasta julkaistujen tulosten kanssa (van Winkelhoff – Herrera – Oteo – Sanz2005:893 – 898.). Suomessa kuten myös Sveitsissäkin tilanne on pysynyt hyvänä ja resistenttien kantojen prosentiosuus on hyvin pieni (Chenaux – Meyer-Lenkeit – Kulik 2008: 1087 – 1091.) .Espanjassa ja Kolumbiassa tilanne on toisenlainen ja näyttää hyvin uhkaavalta (van Winkelhoff – Herrera – Oteo – Sanz 2005:893 – 898; Veloo 2012: 450 – 454). Suurin ja joskus turhankin antibiootin käytön takia resistenttien kantojen osuus kasvaa koko ajan. Näiden ongelmien välttämiseksi Suomessa antibiootteja voi ostaa ainoastaan lääkärin määräämällä reseptillä, ja antibiootteja käytettäessä on aina tärkeä noudattaa lääkärin antamia käyttöohjeita.

Opinnäytetyöni mahdolliset tulkinta- ja mittausvirheet voidaan poissulkea, koska tulosten lukijoita oli aina kaksi eikä tulosten välillä havaittu merkittäviä eroavaisuuksia lukijoiden kesken. Lisäksi kaikki tutkittavat kannat ovat jälkikäteen tunnistettu MALDI-TOF laiteella puhdasviljelmästä, joten mahdolliset kontaminaatoriskit tässä työssä voidaan

myös poissulkea. Työni tulosten luotettavuutta on lisännyt se, että kaikki näytteet käsiteltiin samalla tavalla EUCAST-standardien ja Epsilon-testiohjeiden mukaisesti. Ainoastaan *Parvimonas micra* -kannoista tehtyjen bakteerisuspensioiden vahvuus erosi muista, koska muuten laji kasvoi huonosti tai ei kasvanut lainkaan. Bakteerisuspension vahvuuden vaikutusta antibioottiherkkyystuloksiin ei kuitenkaan pidetä suurina virhelähteinä. Anaerobinen atmosfääri oli varmistettu väri-indikaattorin avulla, joka on aina ollut mukana anaerobikaapissa sekä anaerobiastioissa, joten kaikki kannat ovat kasvatettu samalla tavalla anaerobisissa olosuhteissa. Näytemäärä tutkimusta varten oli tuntuva – 42-50 kantaa jokaista bakteerilajia, mikä on myös lisännyt tulosten luotettavuutta..

Bioanalyttikon eettinen näkökulma on otettu huomioon opinnäytetyössäni. Kaikki tutkitavat näytteet olivat numeroitu juoksevalla numerosarjalla eikä niissä ollut potilastietoja.

Näytteiden määrä oli suuri ja tutkimus oli erittäin työläs. Käytännön osuus kesti pitkään. Se alkoi tammikuussa ennen minun mikrobiologian harjoittelujaksoa, kesti sen aikaan ja myös sen jälkeenkin huhtikuuhun asti eli 7.1.- 15.4.2013 välisellä ajalla. Viimeiset tulokset sain päivää ennen valmiin raportin jättämistä opettajalle, joten niiden analysoinnissa on ollut kiirettä. Juuri tämän kiireellisyyden takia oli jätetty yksi bakteerilaji tutkimuksesta pois. Tätä *Campylobacter rectus* -lajia on kuitenkin syytä tutkia, mitä voisin ehdottaa jatkotutkimusaiheena Metropolia Ammattikorkeakoulun opiskelijoille

Tekemäni tutkimus oli hyvin mielenkiintoinen ja tärkeä. Innostusta tämän työn tekemiseen lisäsi paljon tieto työelämän tarpeesta tutkimustuloksille. Tutkimuksen tehtäessä pääsin mukaan minulle uuteen aiheeseen oraalimikrobiologiaan ja anaerobibakteerien tutkimiseen. Koulun mikrobiologian peruskurssilta nämä alueet ovat jääneet kokonaan pois, joten opin paljon uutta ja sain kokemusta tältä alueelta.

Kiitokset

Haluan kiittää HUSLABin mikrobiologian vastualuejohtaja Martti Vaaraa mahdollisuudesta suorittaa opinnäytetyö bakteriologian osastolla. Kiitos oraalimikrobiologian työpisteen työntekijöille näytteiden keräämisestä tutkimusta varten, sekä kaikille bakteriologian osaston työntekijöille ystävällisistä ja asiantuntevista neuvoista. Erityisesti kiitän ohjaajani Hanna Välimaa erinomaisesta ohjauksesta ja avusta työn suorituksessa.

Lähteet

Asikainen, Sirkka 2008. Parodontiitin bakteerilääkehoito. *Therapia Odontologica*. Verkkodokumentti. <<http://www.terveysportti.fi/dtk/tod/koti>>. Luettu 23.03.2013.

Carlson, Petteri – Koskela, Markku 2011. Bakteriologian tutkimukset. Teoksessa Hedman, Klaus – Heikkinen, Terho – Huovinen, Pentti – Järvinen, Asko – Meri, Seppo – Vaara, Martti (toim.): *Infektiosairaudet. Mikrobiologia, immunologia ja infektiosairaudet*. Kirja 3. Helsinki: Duodecim 38–58.

Chenau, Stephan – Meyer, Jurg – Lenkeit, Krystyna – Kulik, Eva M. 2008. Antibiotic susceptibility of putative periodontal pathogens in advanced periodontitis patients. *Journal of antimicrobial Chemotherapy*. 61, 1087–1091.

Dahlén, Gunnar – Frandsen, Ellen V.G – Larsen, Tove 2004. Suomen Hammaslääkärilehti. 11(3):126–131. Saatavilla myös sähköisesti osoitteessa: <<http://www.terveysportti.fi/dtk/tod/koti>>.

EUCAST 2013. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Verkkodokumentti. <<http://www.eucast.org/>>. Luettu 19.02.13.

Hautala, Timo. Oulun Yliopisto. Sisätautien klinikka 2004. Verkkodokumentti. <<http://cc oulu.fi/~sisawww/esit/040219.htm>>. Luettu 8.01.2013.

Huovinen, Pentti 2005. Suomen Hammaslääkärilehti. 12(7):430–432. Saatavilla myös sähköisesti osoitteessa <<http://www.terveysportti.fi/dtk/tod/koti>>.

Järvinen, Asko – Vaara, Martti – Huovinen, Pentti – Liippo, Kari – Vasankari, Tuula 2011. Bakteerilääkkeet. Teoksessa Hedman, Klaus – Heikkinen, Terho – Huovinen, Pentti – Järvinen, Asko – Meri, Seppo – Vaara, Martti (toim.): *Infektiosairaudet. Mikrobiologia, immunologia ja infektiosairaudet*. Kirja 3. Helsinki: Duodecim. 112–173.

Huslab preanalytiikan käsikirja; Bakteeriviljelynäyte: Parodontologinen näyte, viljely 2012. Verkkodokumentti. <<http://huslab.fi/ohjekirja/8788.html>>. Luettu 20.02.2013.

Koulu, Markku – Mervaala, Eero – Tuomisto, Jouko 2012. Antimikrobiset lääkeaineet. Farmakologia ja toksikologia. Kuopio: Kustannusosakeyhtiö MEDICINA. 877–939.

Käypä hoito suositus 2010. Suomalaisen Lääkäriseuran Duodecimin ja Suomen Hammaslääkäriseura Apollonia ry:n asettama työryhmä. Suomen Hammaslääkärilehti. 19–27.

Könönen, Eija 2012. Hampaan kiinnityskudossairaus. Lääkärikirja Duodecim. Verkkodokumentti. <http://www.terveyskirjasto.fi/terveyskirjasto/tk.koti?p_artikkeli=dlk00716>. Luettu 8.1.2013.

Valenzuela, MT – De Quadros, CA 2009. Antibiotic resistance in Latin America. *Vaccine* 27 (Suppl. 3): C25–8.

Nieminen, Anja 2008a. Parodontiitin paikallinen lääkehoito perushoidon yhteydessä. *Therapia Odontologica*. Verkkodokumentti. <<http://www.terveysportti.fi/dtk/tod/koti>>. Luettu 7.2.2013.

Nieminen, Anja 2008b. Parodontiumin tutkiminen. *Therapia Odontologica*. Verkkodokumentti. <<http://www.terveysportti.fi/dtk/tod/koti>>. Luettu 20.02.2013.

Sarvas, Matti – Skurnik, Mikael – Vaara, Martti 2010. Bakteerien metabolia. Teoksessa *Teoksessa Hedman, Klaus – Heikkinen, Terho – Huovinen, Pentti – Järvinen, Asko – Meri, Seppo – Vaara, Martti (toim.): Mikrobiologia. Mikrobiologia, immunologia ja infektiosairaudet. Kirja 1. Helsinki: Duodecim. 33–40.*

Socransky, Sigmund – Haffajee, Anne 2008. Periodontal infections. Teoksessa Lindhe, Jan – Lang, Niklaus – Karring, Thorkild (toim.): *Clinical periodontology and implant dentistry. 5. painos. Iowa, USA: Blackwell Munksgaard. 134–161.*

Socransky, SS, – Haffajee, AD– Cugini, MA – Smith, C – Kent RL. 1998. *J Clin Periodontol. Feb;25(2): 134–44.*

Tarkka, E – Torkko, H. 2013. Parodontologinen näyte, viljely. Kliininen mikrobiologia, bakteriologian osasto. *Oraalimikrobiologia. Työohje.*

Terveyden ja hyvinvoinnin laitos. 2013. FiRe. Verkkodokumentti. <http://www.thl.fi/fi_FI/web/fi/tutkimus/hankkeet/fire>. Luettu 19.2.2013.

Uitto, Veli-Jukka 2008a. Parodontaalisairauksien tausta ja diagnostiikka. Lääkärin käsikirja. *Therapia Odontologica*. Verkkodokumentti. <<http://www.terveysportti.fi/dtk/tod/koti>>. Luettu 22.03.2013.

Uitto, Veli-Jukka 2008b. Parodontaalisairauksien patogeneesi. Lääkärin käsikirja. *Therapia Odontologica*. Verkkodokumentti. <<http://www.terveysportti.fi/dtk/tod/koti>>. Luettu 22.03.2013.

van Winkelhoff, A.J. – Herrera, D. – Oteo, A. – Sanz, M. 2005. Antimicrobial profiles of periodontal pathogens isolated from periodontitis patients in the Netherlands and Spain. *Journal of Clinical Periodontology* 32 (8). 893–898.

Veloo, A.C.M. – Seme, K. – Raangs, E. – Rurengs, P. – Singadij, Z. – Wekama Mulder, G. – Van W Winkelhoff, A. J. 2012. Antibiotic susceptibility profiles of oral pathogens. *International Journal of Antimicrobial Agents* 40. 450-454.