

Opinnäytetyö (AMK)
Bioanalytiikan koulutusohjelma
Bioanalytiikka
2013

Paula Lehtonen & Anniina Toivonen

ESBL-KANTOJEN PIPERASILLIINI- TATSOBAKTAAMIHERKKYYS- MÄÄRITYS ERI MENETELMILLÄ



TURUN AMMATTIKORKEAKOULU
TURKU UNIVERSITY OF APPLIED SCIENCES

Paula Lehtonen & Anniina Toivonen

ESBL-KANTOJEN PIPERASILLIINI-TATSOBAKTAAMIHERKKYYS-MÄÄRITYS ERI MENETELMILLÄ

Beetalaktamaasia tuottavien bakteerikantojen määrä on lisääntynyt Suomessa tasaisesti. Eristetyistä *Klebsiella*- ja *Escherichia coli* -kannoista noin kahdella prosentilla on ESBL-ominaisuus. ESBL (Extended Spectrum Beta-Lactamase) on bakteerien tuottama entsyymi, joka hajottaa beetalaktaamiantibiootteja ja tekee kannoista vaikeita hoitaa. Se kykenee hajottamaan penisilliinejä sekä kolmannen polven kefalosporiineja. Piperasilliini-tatsobaktaamin on osoitettu olevan toimiva mikrobilääke ESBL-entsyymiä tuottavien bakteerien hoidossa. Ongelmana kuitenkin on piperasilliini-tatsobaktaamin herkkyysmäärityksen epävarmuus ja vaihtelevat tulokset.

Opinnäytetyön tarkoituksena oli tutkia piperasilliini-tatsobaktaamin mikrobilääkeherkkyttä neljällä eri herkkyysmenetelmällä. Menetelmät olivat Vitek 2 –analyysointilaitteisto, kaksi eri kaupallista gradientti MIC-liuskatestiä ja kiekkoherkkyys. Aihe saatiin kliinisen mikrobiologian osastolta, jossa myös toteutettiin empiirinen tutkimus. Kannat saatiin Terveystieteiden ja hyvinvoinnin laitoksen Turun yksiköstä sekä kliinisen mikrobiologian osastolta. Tutkimuksessa käytettiin 83 *E. coli*- ja *Klebsiella pneumoniae* –kanta. Niistä 60 oli ESBL-kantoja, loput olivat herkkiä tai tuottivat TEM- tai karbapenemaasientsyymiä.

Bakteerikannat, jotka tuottivat ESBL-entsyymiä, antoivat vaihtelevimmat herkkyystulokset eri menetelmillä. Ero näkyi erityisesti MIC-gradienttiliuskatestien välillä sekä Vitek 2 –analyysointituloksissa. BioMerieux'n gradienttiliуска antoi systemaattisesti herkempiä tuloksia kuin Liofilchemin gradienttiliуска ja Vitek 2 –analyysointilaitteisto. Kiekkokokeiden tulokset olivat suurimmalla osalla kannoista yhtenevä BioMerieux'n gradienttiliuskatestien kanssa. Muilla kuin ESBL-kannoilla saatiin luotettavat ja yhtenevät herkkyystulokset.

MIC-herkkyysmenetelmistä saman testin toistokertoilla Vitek 2 analyysointilaitteisto antoi eniten samoja tuloksia. Kiekkoherkkyysmenetelmä oli kaikista testeistä toistettavin eikä ESBL-entsyymi vaikuttanut tuloksiin. Tulosten oikeellisuutta ja luotettavuutta herkkyysmenetelmää on hankala arvioida, koska käytössä ei ollut referenssimenetelmää.

ASIASANAT:

ESBL, piperasilliini-tatsobaktaami, herkkyysmääritys, enterobakteerit

BACHELOR'S THESIS | ABSTRACT

TURKU UNIVERSITY OF APPLIED SCIENCES

Degree programme in Biomedical Laboratory Science | Microbiology

November 2013 | 45 + 2

Seija Kirkko-Jaakkola & Kaisu Rantakokko-Jalava

Paula Lehtonen & Anniina Toivonen

DIFFERENT METHODS OF TESTING ESBL STRAINS' SENSITIVITY TO PIPERACILLIN-TAZOBACTAM

The prevalence of beta-lactamase producing bacteria strains has steadily been increasing in Finland. Circa two per cent of isolated *Klebsiella* and *Escherichia coli* strains have ESBL attribute. ESBL (Extended Spectrum Beta-Lactamase) is an enzyme produced by bacteria that is able to hydrolyse beta-lactam antibiotics and makes these strains difficult to treat. It can hydrolyse penicillins and third generation cephalosporins. Piperacillin-tazobactam has been proved an effective antimicrobial treatment against ESBL-producing bacteria. The problem is that piperacillin-tazobactam sensitivity tests give unreliable and varied results.

The purpose of this thesis is to compare four different sensitivity tests to determine the antimicrobial susceptibility of piperacillin-tazobactam. The methods are Vitek 2 system, two different commercial gradient MIC strip tests and disc sensitivity. The subject was given to us from the Department of Clinical Microbiology where we also conducted the empirical study. We obtained the strains from the Turku office of National Institute of Health and Welfare and the Department of Clinical Microbiology. We used 83 strains of *E. coli* and *Klebsiella pneumoniae* in this study, 60 of which were ESBL strains, the rest were sensitive or produced TEM or carbapenemase enzymes.

The ESBL-producing bacteria strains gave the most varied sensitivity results with different methods. The clearest difference was between the MIC gradient strips and the Vitek 2 analyzer results. The bioMérieux gradient strip gave systematically more sensitive results than the Liofilchem gradient strip and Vitek 2 system. Disc sensitivity results were similar with the bioMérieux gradient strips with most of the strains. Other than ESBL strains gave reliable and correlated sensitivity results.

Vitek 2 system gave the most consistent results on repeated tests when comparing the MIC sensitivity tests. The disc sensitivity test was the most repeatable and the ESBL enzyme did not affect the results. It is difficult to estimate the validity of our results and the most reliable sensitivity testing method because we did not have a reference method available.

KEYWORDS:

ESBL, piperacillin-tazobactam, sensitivity of the assay, enterobacteriaceae

SISÄLTÖ

SANASTO	6
1 JOHDANTO	7
2 ENTEROBAKTEERIT	8
2.1 <i>Escherichia coli</i>	8
2.2 <i>Klebsiella pneumoniae</i>	9
3 BEETALAKTAAMIT	11
3.1 Penisilliinit	11
3.2 Penisilliinit ja beetalaktamaasinessäydistelmät	12
3.3 Kefalosporiinit	12
3.4 Karbapeneemit	13
4 ENTEROBAKTEERIEN RESISTENSSI BEETALAKTAAMEILLE	14
4.1 Plasmidiperäiset beetalaktamaasit	14
4.2 Kromosomaalisesti indusoituvat beetalaktamaasit	15
5 ESBL	16
5.1 Levinneisyys	16
5.2 Tarttuminen ja kantajuus	17
5.3 Hoito, torjunta ja ennaltaehkäisy	18
6 LABORATORIODIAGNOSTIIKKA	21
6.1 Herkkyysmäärittäminen	21
6.2 ESBL-varmistustesti	24
6.3 ESBL-kantojen herkkyystulkinnat	24
7 AIKAISEMMAT TUTKIMUKSET	26
8 TAVOITE JA TARKOITUS	28
9 TYÖN TOTEUTUS	29
9.1 Työn empiirinen toteutus	29
9.2 Metodologiset lähtökohdat	31
9.3 Tutkimuseettiset näkökohdat	32

10 TULOKSET JA NIIDEN TARKASTELU	33
10.1 Herkkyysmäärittämissuomenetelmien sisäinen vaihtelu	37
10.2 Herkkyysmäärittämissuosten välinen vaihtelu	38
11 POHDINTA	39
11.1 Johtopäätökset	39
11.2 Tutkimuksen eettisyyden ja luotettavuuden arviointi	41
LÄHTEET	43

LIITTEET

Liite 1. Tutkimuslupa

Liite 2. EUCAST standardi, piperasilliini-tatsobaktaamin herkkyysrajat

KUVAT

Kuva 1. Vitek 2 –analysoittori	22
Kuva 2. MIC-gradienttiliuskat	23
Kuva 3. Kiekkoherkkyys	23

TAULUKOT

Taulukko 1. Herkät kannat	33
Taulukko 2. TEM-positiiviset kannat	34
Taulukko 3. Karbapenemaasientsyymejä tuottavat kannat	35
Taulukko 4. ESBL-kannat	36

SANASTO

Beetalaktaami	Mikrobilääkeryhmä, johon kuuluu mm. penisilliinit, kefalosporiinit ja karbapeneemit
Beetalaktamaasi	Gramnegatiivisten bakteerien tuottama entsyymi, joka pystyy hajottamaan beetalaktaamiantibiootin beetalaktaamirenkaan
CTX-M	Yleisin ESBL-entsyymi
ESBL	Extended Spectrum Beta-Lactamase, beetalaktamaasientsyymi, joka pystyy hajottamaan kolmannen polven kefalosporiineja
Karbapenemaasientsyymi	Gramnegatiivisten bakteerien tuottama entsyymi, joka pystyy hajottamaan karbapeneemiantibiootteja
NDM, OXA-48	Karbapenemaasientsyymejä
Piperasilliini-tatsobaktaami	Laajakirjoinen mikrobilääke, käytetään sairaalassa syntyneissä infektioissa
TEM	Vanha kapeakirjoinen beetalaktamaasi

1 JOHDANTO

Enterobakteerit, jotka tuottavat ESBL-entsyymiä, ovat lisääntyneet kaikkialla maailmassa. Myös Suomessa ESBL-entsyymiä tuottavat *Escherichia coli*- ja *Klebsiella pneumoniae* -kannat lisääntyvät tasaisesti. Herkkien *E. coli*- ja *K. pneumoniae* -kantojen aiheuttamat infektiot ovat samanlaisia kuin ESBL-entsyymiä tuottavien vastaavien kantojen infektiot, mutta ESBL-kantojen infektiot ovat vaikeahoitaisempia moniresistenssiominaisuuden vuoksi ja niihin on myös todettu liittyvän lisääntyvää kuolleisuutta. Näitä bakteereita on löydetty hoitolaitosten ja sairaaloiden lisäksi terveydenhuollon ulkopuolelta. (Huttunen ym. 2013; Jalava ym. 2013.) Piperasilliini-tatsobaktaamin on osoitettu olevan toimiva mikrobilääke ESBL:n hoidossa, mutta ongelmana on piperasilliini-tatsobaktaamin herkkyysmäärityksen epävarmuus ja vaihtelevat tulokset (Babini ym. 2003).

ESBL-entsyymiä tuottavilla bakteerikannoilla piperasilliini-tatsobaktaamin herkkyys vaihtelee in vitro ja tämä on herättänyt paljon keskustelua, miksi näin on (FiRe 2009). Tällä hetkellä keskustellaan piperasilliini-tatsobaktaamin käytöstä kliinisessä ESBL-infektioiden hoidossa ja sen herkkyysmäärityksen luotettavuudesta. Tässä opinnäytetyössä tarkoituksena on tutkia *E. coli*- ja *K. pneumoniae* -kantojen piperasilliini-tatsobaktaamiherkkyysmääritystä eri menetelmillä, muun muassa ovatko menetelmät toistettavia ja ovatko eri menetelmien tulokset keskenään vertailtavissa. Tutkimuksesta saatavaa tietoa voidaan käyttää jatkotutkimuksissa vakioitaessa piperasilliini-tatsobaktaamin herkkyysmäärityksiä ESBL-kannoilla.

2 ENTEROBAKTEERIT

Enterobacteriaceae-heimo on laaja ja sen tärkeimpiä bakteerisukuja ovat *Escherichia*, *Salmonella*, *Yersinia* ja *Shigella*. Kaikki ovat gramnegatiivisia sauva-bakteereita ja ne muistuttavat paljon toisiaan rakenteellisesti sekä kasvuominaisuuksiltaan ja niitä usein kutsutaan yhteisnimellä enterobakteerit. Niiden luonnollinen kasvuympäristö on usein ihmisten ja eläinten suolisto, mutta niitä tavaan myös jätevesissä sekä maaperässä. Ne ovat usein luonnostaan resistenttejä monille antibiooteille johtuen niiden tehokkaasta ulkokalvosta. Myös hankittu resistenssi on tavallista enterobakteereilla. (Siitonen & Vaara 2010.)

Enterobacteriaceae-heimoon kuuluu myös suoliston normaaliflooraan kuuluvia *Klebsiella*-, *Serratia*- ja *Enterobacter*-lajeja. Nämä bakteerit aiheuttavat harvoin infektioita terveille ihmisille ja ovat enimmäkseen opportunistibakteereita. Ne kuitenkin aiheuttavat merkittäviä sairaalainfektioita. (Tissari & Anttila 2010.)

2.1 *Escherichia coli*

Escherichia coli -termi sisältää suuren määrän aineenvaihdunnaltaan melko samanlaisia, mutta virulenssiltaan erilaisia bakteerikantoja. Ne ovat kuitenkin DNA-homologiatutkimuksien mukaan läheistä sukua toisilleen. *E. coli* on ihmisen suoliston aerobisen flooran valtabakteeri ja niitä on suoliston normaalifloorassa lukuisia erilaisia kantoja. (Siitonen & Vaara 2010.)

Rakenteeltaan *E. coli* on tavanomainen gramnegatiivinen enterobakteeri. Useilla kolikannoilla, erityisesti baktereemisia ja invasiivisia infektioita aiheuttaville on polysakkaridikapseli (K-antigeeni). Monilla koleilla on myös flagelloja eli värekarvoja (H-antigeeni), jotka auttavat bakteeria liikkumaan. *E-coli* -kannat on mahdollista serotyypittää O-, K- ja H-antigeenien mukaan. Kaiken kaikkiaan erilaisia serotyyppisiä on yli 700. K-antigeeni puuttuu useimmiten suolistoinfektioita aiheuttavilta kolikannoilta. Lisäksi koleilla on erilaisia adhesiineja (pinta-antigeeni) ja fimbrioita, joiden avulla ne kiinnittyvät kudoksiin ja pintoihin. Osa

ripulia aiheuttavista kolikannoista erittää toksineja sekä monet kannat tuottavat myös solumembraania vaurioittavaa hemolyyysiä. (Siitonen & Vaara 2010.)

Suolistossa *E. coli* on ihmiselle hyödyllinen, koska se estää muita, patogeenisempia bakteereja kolonisoimasta suolta sekä tuottaa K-vitamiineja. Sen uskotaan tyydyttävän ihmisen koko K-vitamiinitarpeen. *E. coli* kuitenkin kykenee aiheuttamaan infektioita, jos se pääsee parenteraalitalaan limakalvojen vastuskyvyn alennettua tai vamman kautta. Jotkut kannat ovat huomattavasti patogeenisempia kuin toiset. Patogeenisiä *E. coli* -kantoja on erittäin vähän suoliston normaalin *E. coli* -flooran joukossa. (Siitonen & Vaara 2010.)

Tavallisin *E. coli* aiheuttama infektio on virtsatieinfektio. Se aiheuttaa kaikista virtsatieinfektioista lähes 90 %. Bakteerit pääsevät virtsateihin virtsaputkea pitkin ja tartunta on useimmiten peräisin omasta suoliston ja välilihan alueen flooraasta. Naisilla virtsatieinfektiot ovat huomattavasti yleisempiä kuin miehillä. (Siitonen & Vaara 2010.) 45 % kaikissa sepsiksissä aiheuttaja on gramnegatiivinen sauva, etenkin *E. coli*. Usein sairaalassa saatu septinen infektio on gramnegatiivisen bakteerin aiheuttama. (Vauhkonen & Holmström 2005.) Eräillä *E. coli* -bakteereilla on tiettyjä virulenssiominaisuuksia, jonka vuoksi ne aiheuttavat suolistoinfektioita (Siitonen & Vaara 2010).

E. coli on herkkä antibiooteille, jotka tehoavat gramnegatiivisiin bakteereihin. Sairaaloissa on yleistä hankittu plasmidiperäinen moniresistenssi, koska siellä käytetään paljon mikrobilääkkeitä. Herkkyyden määrittäminen on lähes jokaisessa infektiotapauksessa tarpeellinen. (Siitonen & Vaara 2010.)

2.2 *Klebsiella pneumoniae*

Klebsiella-lajit kuuluvat ihmisen suoliston sekä nenä-nielun normaaliflooraan ja aiheuttavat siten harvoin infektioita perusterveille ihmisille, mutta ovat kuitenkin merkittäviä sairaalainfektioiden aiheuttajia. Niiden esiintyvyys usein lisääntyy mikrobilääkehoidon ja sairaalajakson aikana. (Tissari & Anttila 2010; Gunell ym. 2012.)

Yleensä infektioita aiheuttava *Klebsiella*-kanta on lähtöisin potilaasta itsestään, esimerkiksi suoliston mikrobistosta, mutta *Klebsiellat* säilyvät hengissä myös muissa ympäristöissä, kuten hoitohenkilökunnan käsissä, hengityskoneissa ja pesualtaissa. Tartuntareittejä voi siis olla useita, myös ruoka, vesi ja maaperä voivat olla *Klebsiella*-tartunnan lähteitä. Mikrobilääkeresistenssi ja taudinaiheuttamiskyky kuitenkin vaihtelee eri kantojen välillä. (Gunell ym. 2012.)

Klebsiellat ovat gramnegatiivisia sauvabakteereita ja niillä on hyvä kyky muodostaa polysakkaridikapselia, jolla on tärkeä merkitys *Klebsiella*-lajien virulenssille. Polysakkaridikapselin perusteella *Klebsiellat* voidaan luokitella K-antigeenityyppeihin, joita on yli 70. *K. pneumoniaella* on kuvattu uudentyyppinen fimbria, joka on esiintynyt valtaosalla kannoista, jotka tuottavat CAZ-5/SHV-4-typin ESBL-entsyymiä sekä nonfimbraalinen adhesiini, jota plasmidi koodittaa. (Tissari & Anttila 2010.)

K. pneumoniae on yleisin kliinisistä näytteistä löytyvä *Klebsiella*-laji ja aiheuttaa tyypillisesti lohkokauhakuumeen. Infektio voi olla hankittu avo- tai sairaalahoidosta ja se voi olla alkaa rajusti, jolloin kuolleisuus on suuri tai myös hyvin lieväoireinen. *K. pneumoniae* on suhteellisen tavallinen löydös myös virtsatieinfektioissa, kirurgisissa haavainfektioissa sekä vatsan alueen kirurgisissa näytteissä. (Tissari & Anttila 2010; Gunell ym. 2012.)

Klebsiellat ovat luonnostaan resistenttejä muun muassa ampisilliinille tuottamansa beetalaktamaasin johdosta, mutta kuitenkin yleensä herkkiä amoksisilliinille ja klavulaanihapon yhdistelmälle, toisen ja kolmannen polven kefalosporiineille, karbapeneemeille sekä fluorokinoloneille. Laajakirjoista plasmidin koodittamaa beetalaktamaasia tuottavat ESBL-kannat ovat koko ajan lisääntymässä. (Tissari & Anttila 2010.)

3 BEETALAKTAAMIT

Beetalaktaamien lääkeryhmään kuuluvat penisilliinit, kefalosporiinit sekä muita beetalaktaamirakenteisia lääkkeitä, kuten karbapeneemit ja astreonaamit. Beetalaktaamit sitoutuvat useisiin bakteerin peptidoglykaanisynteesin loppuvaiheen entsyymeihin, niin sanottuihin penisilliiniä sitoviin proteiineihin eli PBP:iin (penicillin binding protein). Kaikki beetalaktaamit ovat bakterisidisia (bakteereita tuhoavia) ja vaikuttavat kasvaviin soluihin. (Järvinen ym. 2011a.)

3.1 Penisilliinit

Penisilliini löydettiin vuonna 1929, jonka jälkeen se saatiin kliiniseen käyttöön 1940-luvulla. Siitä lähtien se on ollut peruslääke monien erilaisten infektioiden hoidossa ja penisilliinit ovat edelleen paljon käytetty mikrobilääkeryhmä. Penisilliinien teholle ominaista on niiden nelirengas, niin sanottu beetalaktaamirengas. Tästä myös tulee yleisnimitys beetalaktaamiantibiootti. (Männistö & Tuominen 2007.) Penisilliinit luokitellaan peruspenisillineihin, aminopenisillineihin, stafylokokkipenisillineihin, piperasilliiniin ja mesillinaamiin (Järvinen ym. 2011a).

Piperasilliini kuuluu penisilliini-lääkeryhmään ja on amoksisilliinin johdannainen. Se soveltuu ainoastaan parenteraaliseen käyttöön, mutta on muuten hyvin amoksisilliinin kaltainen valmiste. Se hajoaa beetalaktamaasien vaikutuksesta, joten sitä käytetään yhdessä beetalaktamaasin estäjän, tatsobaktaamin kanssa, joka estää useiden plasmidivälitteisten beetalaktamaasien toiminnan. *E. coli*- ja *Klebsiella*-kannat, jotka tuottavat laajakirjoista ESBL-entsyymiä saattavat usein herkkyysmäärittelyssä olla herkkiä piperasilliini-tatsobaktaamille, mutta niiden beetalaktamaasit usein kuitenkin hajottavat piperasilliini-tatsobaktaamin antibiootihoidossa. (Järvinen ym. 2011a.)

3.2 Penisilliinit ja beetalaktamaasinessäjäyhdistelmät

Penisilliinirungosta on kehitetty aineita, jotka sitoutuvat bakteerien tuottamiin beetalaktamaasientsyymeihin ja inaktivoivat ne. Ensimmäisenä käyttöön on tullut klavulaanihappo, jolla on pieni antibakteerinen vaikutus, mutta yhdistettynä muihin lääkkeisiin, esimerkiksi amoksisilliiniin, se laajentaa lääkkeen vaikutuskirjoa huomattavasti. (Männistö & Tuominen 2007.) Beetalaktamaasit reagoivat klavulaanihapon kanssa herkästi ja sitoutuvat siihen pysyvästi, jolloin beetalaktamaasientsyymi inaktivoituu. Näin klavulaanihappo suojelee mikrobilääkettä gramnegatiivisten bakteerien beetalaktamaaseilta. (Handal & Olsen 2002.)

Tatsobaktaami ja sulbaktaami ovat uudempia aineita. Molemmilla on heikompi antibakteerinen vaikutus kuin klavulaanihapolla. Näistä kahdesta ainoastaan tatsobaktaami yhdistettynä piperasilliiniin on markkinoilla Suomessa. Tatsobaktaami estää erilaisia beetalaktamaaseja paljon laajemmin kuin klavulaanihappo, mutta se ei kuitenkaan lisää piperasilliinin aktiivisuutta. (Männistö & Tuominen 2007.)

Farmakokineettisesti tatsobaktaami on paljon klavulaanihapon kaltainen. Piperasilliiniin yhdistäminen nostaa kaksinkertaisesti tatsobaktaamin pitoisuutta plasmassa. Yhdistelmävalmisteen haitat ovat kuitenkin enimmäkseen piperasilliinin aiheuttamia, sekä niitä on vähemmän kuin klavulaanihappolääkeyhdistelmillä. (Männistö & Tuominen 2007.)

3.3 Kefalosporiinit

Kefalosporiinit ovat Cephalosporium-homeen erittämän antibiootin puolisynteettisiä johdannaisia ja penisilliinien tavoin rakenteeltaan beetalaktaameja. Laajakirjoisimmilla kefalosporiinantibioottivalmisteilla voidaan hoitaa kohtalaisen hyvin grampositiiviset että gramnegatiiviset bakteeri-infektiot. (Järvinen ym. 2011a.)

Kefalosporiinit on jaettu neljään sukupolveen: I, II, III ja IV polven kefalosporiineihin. Toisen ja kolmannen polven kefalosporiinit ovat laajakirjoisempia ja tehoavat yhä useampiin gramnegatiivisiin sauvabakteereihin. Oraaliseen käyttöön tarkoitetut kefalosporiinit imeytyvät yleensä hyvin maha-suolikanavan kautta, toisen ja kolmannen polven kefalosporiinit soveltuvat yleensä vain parenteraaliseen käyttöön. (Järvinen ym. 2011a.)

3.4 Karbapeneemit

Tienamysiini on mikrobilääke, joka muistuttaa rakenteeltaan penisillinejä ja sen puolisynteettisiä johdoksia alettiinkin kutsua karbapeneemeiksi. Kaikista beeta-laktaameista karbapeneemeilla on kaikista laajin antibakteerinen kirjo. (Järvinen ym. 2011a.)

Karbapeneemejä käytetään enimmäkseen komplisoituneiden infektioiden hoitoon ja vaikeissa infektioissa. Niitä tulee käyttää harkiten niiden laajakirjoisuuden vuoksi ja myös, että vältettäisiin resistenssin leviämistä. Aivan viime aikoina gramnegatiivisilla bakteereilla on alkanut esiintyä karbapenemaaseja, entsyymejä, jotka hajottavat karbapeneemejä (CPE-bakteerit). Yksi yleisimmistä kliinisistä karbapenemaaseista on OXA-48. (Järvinen ym. 2011a.) CPE-bakteerit ovat vastustuskykyisiä karbapeneemiantibioteille ja ovat myös resistenttejä lähes kaikille muille käytössä oleville antibiooteille. Bakteerit ovat lisääntyneet useiden maiden sairaaloissa, mutta myös sairaaloiden ulkopuolella, muun muassa Intiassa. Suomessa on vuonna 2013 ollut ensimmäinen *Klebsiella* KPC-laitosepidemia pääkaupunkiseudulla. Riskitekijä saada CPE-bakteeri on sairaalahoito ulkomailla sekä tavallisimpien antibioottien (kefalosporiini, karbapeneemi) käyttö lisää riskiä saada CPE-bakteerin aiheuttama infektio tai kolonisaatio. (Terveystieteiden tutkimuskeskus 2013a.)

4 ENTEROBAKTEERIEN RESISTENSSI

BEETALAKTAAMEILLE

Bakteerien resistenssi beetalaktaameille voi johtua monista tekijöistä, muun muassa bakteerien muuntuneista PBP-entsyymeistä, joihin beetalaktaamit eivät pysty sitoutumaan tai bakteerin muodostamasta beetalaktamaasientsyymeistä, jotka hajottavat beetalaktaamirenkään ja näin inaktivoivat beetalaktaamin tehon. Myös bakteerin tehokas ulkokalvo voi estää lääkkeen vaikutuksen bakteerisoluuun. Bakteerien beetalaktamaasientsyymejä on kymmeniä ja niiden tehoissa on huomattavia eroja. (Järvinen ym. 2011a.)

Kliinisesti tärkein resistenssi bakteereille on kyky inaktivoida mikrobilääke. Se tapahtuu joko modifioimalla mikrobilääke tai sitoutumalla siihen. Suurin osa enterobakteereista tuottaa luonnostaan vähän kromosomaalisia beetalaktamaaseja, mutta niiden tehtävänä on ilmeisesti olla mukana soluseinän synteesissä. Sillä ei kuitenkaan ole suurta kliinistä merkitystä. Todellisia kliinisiä vaikeuksia ovat aiheuttaneet siirtyvien kromosomiulkoisten geenien eli plasmidien välittämät beetalaktamaasit ja kromosomaalisen beetalaktamaasin tuotannon voimakas induktio. (Järvinen ym. 2011b.)

4.1 Plasmidiperäiset beetalaktamaasit

Gramnegatiivisten enterobakteerien kromosominulkoisten R-tekijöiden tuottamat laajaspektriset beetalaktamaasit ovat kliinisesti tärkein beetalaktaamiresistenssin mekanismi. Tärkeimmät plasmidivälitteiset geenit ovat TEM, SHV ja CTX-M. (Jalava ym. 2013a.) TEM-ryhmän beetalaktamaaseista vanhin on TEM-1, joka hajottaa muun muassa ampicilliinia, mutta ei niin sanottuja laajakirjoisia beetalaktaamiantibiootteja. Siitä on syntynyt pistemutaatioiden kautta paljon monimuotoisia TEM-beetalaktamaaseja. Nykyisin niitä tunnetaan kaikkiaan yli 250 erilaista, joista suurin osa luokitellaan ESBL-entsyymeiksi. SHV-ryhmän beetalaktamaaseja tunnetaan yli 168, joista suurin osa on laajakirjoisia. CTX-M ryhmän beetalaktamaaseja tunnetaan yli 100 erilaista. (THL 2013b.) Yleisin

geeneistä on TEM-1. Terveistä suomalaisista noin 20 prosentilla on suolistossa TEM-1-beetalaktamaasia tuottava ampicilliiniresistentti *E. coli* -bakteeri. (Huovinen & Vaara 2011.)

ESBL-geenit voivat sijaita sekä bakteerien kromosomeissa että plasmideissa, mutta ne leviävät vain plasmidien kautta. Se mahdollistaa entsyymien siirtymisen bakteerikannasta tai -lajista toiseen. (Jalava ym. 2013.) Kokonaisen plasmidin on myös mahdollista siirtyä bakteerista toiseen transduktion välityksellä (Huovinen & Vaara 2011).

4.2 Kromosomaalisesti indusoituvat beetalaktamaasit

Kolmannen polven kefalosporiinit tehoavat useimpiin gramnegatiivisiin bakteereihin. Useat sairaaloiden moniresistentit gramnegatiiviset ongelmabakteerit, esimerkiksi *Enterobacteriaceae*- ja *Serratia*-lajit, ovat herkkyysmäärittämissä usein herkkiä kefotaksiimille, mutta resistenttejä kefuroksiimille. Niinpä kefotaksiimia alettiin käyttää paljon näiden bakteeri-infektioiden hoidossa. Kuitenkin pian ilmeni, että nämä ongelmabakteerit alkoivat suhteellisen nopeasti kehittää resistenssiä antibiootille jopa hoidon aikana. Tämä johtuu bakteerien luonnollisesta, kromosomaalisesta kyvystä muodostaa pieniä määriä beetalaktamaasia, joka hajottaa kaikkia kefalosporiineja ja penisilliinejä. Beetalaktamaasin tuotanto indusoituu, kun bakteeri on kosketuksissa beetalaktaamien kanssa, ja entsyymiä alkaa muodostua suuria määriä. Tällaisia tehokkaita induktoreita ovat muun muassa kefotaksiimi, keftriaksoni, keftatsidiimi ja klavulaanihappo. Tämän lisäksi bakteerikannat muuntuvat niin sanotuiksi derepressiomutanteiksi, jotka muodostavat beetalaktamaasia valtaisia määriä, vaikka induktoreita ei enää olisi-kaan. Tällaiset mutantit ovat erittäin resistenttejä. (Järvinen ym. 2011a.)

5 ESBL

ESBL on enterobakteerien tuottama laajakirjainen beetalaktamaasientsyymi, joka pystyy hajottamaan myös laajakirjoisia kolmannen polven kefalosporiineja. Enterobakteerit, jotka tuottavat ESBL-entsyymiä, ovat epidemiologialtaan monimutkaisia. Merkittävimpiä niitä tuottavia bakteerikantoja ovat *E. coli* ja *K. pneumoniae*, mutta myös monilla muilla gramnegatiivisilla sauvoilla on nykyisten tutkimusten mukaan todettu esiintyvän ESBL-plasmideja. (Jalava ym. 2013a.)

5.1 Levinneisyys

Ensimmäiset ESBL-kannat löydettiin Keski-Euroopasta 1982, jolloin niiden leviäminen alkoi kaikkiin maanosiin. Ne syntyivät pistemutaation kautta TEM-1, TEM-2 ja SHV-1 -beetalaktamaaseista, luultavimmin lisääntyneen kolmannen polven kefalosporiinin käytön seurauksena. Bakteri, jossa ensimmäiset TEM- ja SHV-entsyymit havaittiin, oli *K. pneumoniae* ja ne keskittyivät enimmäkseen sairaaloihin. (Kolho 2005.)

Maailmanlaajuisesti ESBL-bakteerit alkoivat levitä 2000-luvulla. Tämän johtui CTX-M-entsyymiä tuottavan *E.coli* -kannan nopeasta leviämisestä. Se levisi hoitolaitoksissa, mutta vähitellen sitä alkoi esiintyä myös avohoidossa saatujen infektioiden yhteydessä. Nykyään CTX-M-entsyymiä tuottavaa *E.coli* -kantaa löytyy myös pitkäaikaishoitolaitospotilaiden infektiosta. (Jalava 2013a.) Vuodesta 2008 kolmannen polven kefalosporiineille herkkyydeltään resistentit tai alentuneet *E. coli*- ja *K. pneumoniae* -kannat on ilmoitettu tartuntatautirekisteriin. Näistä suurin osa on ESBL-entsyymiä tuottavia kantoja. (Lyytikäinen ym. 2013.)

Vuonna 2011 virtsasta eristetyistä *E.coli* -kannoista yli 2 % tuotti ESBL-entsyymiä ja verestä eristetyistä *E. coli* -kannoista 4,6 % tuotti ESBL-entsyymiä (Gunell ym. 2012). Vuonna 2012 suurin osa ESBL-löydöksistä oli *E.coli* -kantoja ja vain pieni osa *K. pneumoniae*-kantoja. *E. coli* -löydöksiä tehtiin kaikenikäisiltä, mutta suurin osa, 75 % oli naisilta, puolet yli 65-vuotiailta. Eniten

löydöksiä viljeltiin virtsasta. (Lyytikäinen ym. 2013.) Tilanne kertoo enemmänkin virtsatieinfektioiden yleisimmästä kohderyhmästä, eikä todista sitä, että juuri naiset olisivat ESBL-infektioiden riskiryhmässä (Huttunen ym. 2013). ESBL-verilöydösten määrä on myös kasvanut (5,2 % *E. coli* ESBL -osuus vuonna 2012) edellisvuosiin verrattuna (Lyytikäinen ym. 2013).

5.2 Tarttuminen ja kantajuus

ESBL-kannat leviävät kosketustartunnan välityksellä (THL 2013c). Suomessa ei ole yhtenäistä ohjetta ESBL-potilaan hoitoon, mutta yleinen käytäntö sairaanhoitopiireissä on ESBL-potilaan kosketuseristys. Uusimpien tutkimusten mukaan korkean hygienian sairaaloissa ESBL-bakteerin leviäminen on melko vähäistä, vaikka potilas ei olisi kosketuserityksessä. ESBL-bakteeri leviää suuremmalla todennäköisyydellä kotioloissa kuin laitoksessa. Sairaalassa ESBL-bakteerin leviämistä voi lisätä tilanteet, joissa bakteeria erittyy runsaasti potilaan ympäristöön, esimerkiksi kantajapotilaan ripuli, virtsan- ja ulosteenkarkailu tai virtsatiekatetri. Virtsatiekatetrin käyttöä tulisi välttää ESBL-kantajalla niin kauan kuin hoito sen sallii, koska se on yksi ESBL-infektion riskitekijä. (Huttunen ym. 2013.)

ESBL-tartuntoja saadaan paljon ruoan välityksellä sekä ulkomaan matkoilta. Ulkomailla käytetään paljon mikrobilääkkeitä eläintuotannossa. Alankomaissa myydyistä broilerin lihasta yli 90 % sisälsi ESBL-entsyymiä tuottavia *E. coli* -kantoja. Kannat voivat asettautua osaksi ihmisen suoliston bakteeristoa ja myöhemmin aiheuttaa infektioita. ESBL-kantoja esiintyy paljon huonon hygienian maissa, esimerkiksi Aasian maissa matkaavilla on suurempi riski kolonisoitua tai saada ESBL-infektio, vaikka ei olisi ollut kohdemaan sairaanhoidon piirissä. Yleisesti ulkomaanmatkat ovat suuri riski ESBL-kantajuudelle. Riskiä lisää hoito sairaalassa matkan aikana. (Jalava ym. 2013b.)

Nykyään diagnosoidaan jatkuvasti lisääntyvässä määrin ESBL-kantojen aiheuttamia infektioita. Se ei kuitenkaan johdu siitä, että ESBL-kantojen aiheuttamat tartunnat olisivat lisääntyneet sairaaloissa, vaan siitä, että yhä useammat sai-

raaloihin tulevat potilaat ovat ESBL-kantajia. Yleisimmät ESBL-infektiot, virtsatieinfektiot, ovatkin lähtöisin potilaan omasta normaalifloorasta. (Meurman 2012.)

Osa ESBL-potilaista jää pitkäaikaisiksi tai pysyviksi oireettomiksi kantajiksi bakteerin asettuessa suoliston normaaliflooraan (THL 2013c). Suomessa ei ole tutkittu väestöstä, kuinka yleistä kantajuus on, mutta viitteitä kantajuudesta saadaan analysoimalla virtsaviljelylöydöksiä, joiden mukaan kantajuus on Suomessa noususuunnassa. Euroopassa ESBL-kantajuus on 2-10 % tasoa, kun taas muun muassa Thaimaassa ja Egyptissä noin puolet väestöstä on kantajia. (Meurman 2012; Huttunen ym. 2013.)

ESBL-kantajuuden seulonta on ongelmallista, varsinkin seulonnan kohdentaminen. Riskiryhmät, kuten ulkomailla sairaalahoidossa olleet ja ulkomailla matkailleet tulee seuloa. Kantajuus on levinnyt väestössä laajasti ja kantajia esiintyy kaikissa ikäryhmissä, myös terveissä, nuorissa henkilöissä, joilla ei ole mitään sairaalahygieenistä riskitekijää. Tällöin koko väestö tulisi seuloa, jotta ESBL-kantajat löydettäisiin. (Meurman 2012.) Seulonta on ongelmallista myös mikrobiologisen seulontamenetelmän heikon herkkyyden vuoksi. ESBL-entsyymiä tuottavien bakteereiden seulontaviljelyiden herkkyydessä on epävarmuuksia. Tämän lisäksi ei tiedetä, kuinka kauan ESBL-entsyymiä tuottavan bakteerin kolonisaatio suolistossa kestää. (Jalava ym. 2013.)

5.3 Hoito, torjunta ja ennaltaehkäisy

Suomessa todettuihin ESBL-bakteereihin on vielä toistaiseksi löytynyt tehoavia mikrobilääkkeitä. Osassa tapauksista joudutaan lääke antamaan suonensisäisesti, koska suun kautta otettavat lääkkeet eivät tehoa ESBL-bakteeriin. (THL 2013c; Huttunen & Syrjänen 2011.) Bakteerikannat, jotka kantavat ESBL-geeniä, ovat kefalosporiinien ja penisilliinien lisäksi usein resistenttejä fluoro-kinoloneille, tetrasykliineille, aminoglykosideille ja trimetopriimeille (Jalava ym. 2013).

E. coli ja *K. pneumoniae*-bakteerit, joista 2-5 %:lla on ESBL-ominaisuus, aiheuttavat yleisimmin virtsatieinfektioita. Tavallisimmat virtsatieinfektioihin käytettävät lääkkeet ovat trimetopriimi, nitrofurantoiini sekä pivmesilliinami. Jos infektion aiheuttaja tuottaa ESBL-entsyymiä, infektio vaatii usein sairaalahoitoa ja edellä mainitut lääkkeet voivat olla tehottomia. Nitrofurantoiini ja pivmesilliinami suuremmalla annoksella voivat hoitaa ESBL-bakteerin aiheuttaman virtsatieinfektion, mutta vaikeaoireisiin infektioihin tulee käyttää suonensisäistä antibioottia. Suonensisäiseen lääkitykseen käytetään karbapeneemeja, kuten meropeneemi, imipeneemi ja ertapeneemi. Myös piperasilliini-tatsobaktaamia voidaan käyttää, jos laboratorio on vastannut kannan olevan sille herkkä. (Vuopio 2013; Huttunen & Syrjänen 2011; Wuorela 2013.)

Suomessa suurimmalla osalla *E. coli* -kannoista ESBL-entsyymi on CTX-M-tyyppinen. Kannat ovat samaan aikaan yleensä resistenttejä sulfatrimetopriinille, fluorokinoloneille ja tobramysiineille eikä hoitona suositella käytettäväksi kefalosporiineja, penisilliinejä tai beetalaktamaasi-inhibiittoreiden kombinaatioita. Hankalimpien tautimuotojen hoitoon käytetään karbapeneemiryhmän antibiootteja. (Siitonen & Vaara 2010.)

Yhtenäistä ESBL-bakteerin torjuntaohjetta ei ole ja käsitykset sekä käytännöt vaihtelevat suuresti sen vaatimista suojaustoimenpiteistä eri sairaanhoitopiireissä. Perinteisesti ajatellaan, että ESBL-entsyymiä tuottava bakteeri on merkittävä löydös sairaalahygienisessä ja suojaustoimien tulisi olla sen mukaiset. Useimmat sairaanhoitopiirit ohjeistavat järjestämään ESBL-potilaille kosketuseristyksen. Kuitenkin epidemiologinen tilanne on muuttunut ja ESBL-kantojen kolonisoitumista väestöön tapahtuu yhä useammin ja kuka tahansa voi olla kantaja. Siksi nykyään ei ole aina mahdollista järjestää eristysuonetta kaikille ESBL-kantajille resurssipulan vuoksi. (Meurman 2012; Jalava ym. 2013.)

Kosketuseristystä suositellaan kun potilaalla on *E. coli*-kannan ESBL-infektio tai -kolonisaatio ja hän on hoidossa tehohoitopotilaiden tai immuunipuutospotilaiden kanssa samalla osastolla sekä kun potilas on dementikko, ripuloiva, oksenteleva tai muuten riskipotilas. Jos potilaalla on *K. pneumoniae*-kannan aiheuttama ESBL-infektio tai kolonisaatio, hänen tulisi myös olla eristysuoneessa,

jossa on oma WC ja suihkutilat. Eristyksessä olevan potilaan hoitotoimenpiteissä tulee ottaa huomioon myös muut tavanomaiset suojatoimenpiteet, kuten hyvä käsihygienia ja suojainten käyttö tilanteissa, joissa on eritekontaktiriski. Joissakin sairaanhoitopiireissä noudatetaan tiukennettua kosketuseristystä myös polikliinisesti ja terveyskeskusvastaanoitoilla. Tämä ei ole kuitenkaan aina perusteltua, sillä infektioerjunnan tulisi perustua ESBL-kantajan hoidossa toimenpiteiden ja potilaan tilanteen määrittämään tartuntariskiin. (Meurman 2012; Javalava ym. 2013.)

ESBL-tartuntojen ehkäisyssä periaatteena on hyvän käsihygienian noudattaminen. Myös ESBL-kolonisoinnin varhainen tunnistaminen potilailta, joilla on suurempi riski kolonisoitua matkailun ja ennen kaikkea ulkomailla sairaalahoitossa olon myötä, on tärkeää. Mikrobilääkkeiden asianmukainen käyttö korostuu ESBL-tartuntojen ehkäisyssä. Mikrobilääkitys tulisi määrätä kohdennetusti taudin hoitoon antibioottiherkkyyssmääritysten mukaisesti. Infektiot tulisi ehkäistä poistamalla tarpeettomat infektioportit, jotka usein ovat ESBL-infektion riskitekijöitä. Hyvä tiedottaminen tulee huomioida muun muassa potilassiirroissa, jossa ESBL-kanta voi siirtyä laitoksesta ja maasta toiseen. (Huttunen ym. 2013; Tiitinen & Terho 2012.)

6 LABORATORIODIAGNOSTIIKKA

Bakteerin todellinen lääkeherkkyys riippuu monesta eri asiasta elimistössä, esimerkiksi ympäristöstä, bakteerien määrästä ja niiden kasvunopeudesta. Infektion hoitoon vaadittava seerumin lääkepitoisuus täytyy lähes aina määrittää kliinisin kokein laboratoriossa. MIC-arvoa käytetään bakteerilääkkeen tehon sekä bakteerin herkkyden mittana. MIC-arvo on pienin lääkepitoisuus, joka estää bakteerin kasvun. (Huovinen & Vaara 2011; Nissinen 2009.)

6.1 Herkkyysmäärittäminen

Viljelymaljalla kasvaville kliinisesti merkitseville bakteereille tehdään mikrobilääkeherkkyys, jotta saadaan tietää mitkä antibiootit tehoavat bakteerin hoitoon. Grampositiivisilla ja -negatiivisilla bakteereilla on oma valikoimansa testattavia antibiootteja kuten myös anaerobibakteereille. Lääkeherkkyyspaneeli saattaa vaihdella laboratorioittain. (Vuento & Lappalainen 2013.) Laboratorioissa on käytössä monia eri herkkyystestimenetelmiä, joille on yhteistä, että kaikki mitattavat bakteerin lisääntymiskykyä lääkeaineen läsnä ollessa. Bakteeri altistetaan lääkkeelle joko portaittaisesti (laimennusmenetelmä) tai jatkuvasti kasvavana pitoisuutena (gradienttiliuskatesti ja agardiffuusiomenetelmä). Laimennusmenetelmällä ja gradienttiliuskatestillä saadaan MIC-arvo. Agardiffuusiomenetelmässä tulos mitataan pinta-alaltaan erikokoisista estorengaista. (Nissinen 2009.) Herkkyudet on jaettu kansainvälisesti käytetyn SIR-järjestelmän mukaan kolmeen ryhmään, S=herkkä, I=epävarma ja R=resistentti. S tarkoittaa, että bakteeri on herkkä testattavalle antibiootille, ja lääke soveltuu infektioiden hoitoon. I:n mukaan bakteerin herkkyys on vähentynyt tai bakteeria ei voida pitää täysin herkkänä. R tarkoittaa bakteerin olevan resistentti lääkkeelle. Joistain lääkkeistä käytetään vain lyhenteitä S ja R. (Huovinen & Vaara 2011.) Referenssimenetelmänä käytetään ISO –standardin mukaista mikroliemilaimennosta (EUCAST 2013).

Laimennosmenetelmä on tarkka tapa mitata mikrobilääkkeen MIC-arvo kyseessä olevalla bakteerilla. Siihen tarvitaan sarja elatusaineputkia tai bakteerimaljoja, joissa on suurentuvia määriä mitattavaa antibioottia, useimmiten kahdentuvina pitoisuuksina. Tutkittavaa bakteeria lisätään aina sama määrä putkiin tai maljoille. MIC-arvo saadaan 24-48 tunnin inkubaation jälkeen ensimmäisestä putkesta tai maljasta, jossa ei nähdä bakteerin kasvua. (Huovinen & Vaara 2011.) Yhdysvalloissa MIC-automaatit yleistyivät 1980-luvulla. 2000-luvulla MIC-automaatit ovat kehittyneet siten, että automaatti tunnistaa bakteerin nopeasti sekä herkkyystulos saadaan pikaisesti, jopa saman työpäivän aikana. (Nissinen 2009).

Vitek 2 –analysointilaitteisto (kuva 1) on MIC-automaatti antibioottilääkkeitä määrittämiseen sekä bakteerien ja hiivojen tunnistamiseen (Pincus 2007). Puhdasviljelmästä tehdään sameudeltaan vakio bakteerisuspensio (gramnegatiiviset sauvat 0,5 - 0,63 McFarland) herkkyysmäärittystä varten. Kullekin bakteeriryhmälle on oma AST-herkkyyskortti. Herkkyyskorttien kaivot sisältävät elatusaineen joukkoon kuivattuja antibiootteja eri konsentraatioina. Analysointilaitteisto laimentaa suspension tiettyyn pitoisuuteen ja mittaa bakteerin kasvua ilman antibioottia ja eri lääkeainepitoisuuksissa. Laitteisto vertaa kasvua kontrolliin ja laskee pienimmän kasvua estävän antibioottipitoisuuden, MIC-arvon, kullekin antibiootille. Tulos on valmis saman työpäivän aikana. (Elo-Lehtonen ym. 2008.)



Kuva 1. Vitek 2 –analysointilaitteisto.

MIC-gradienttiliuska (kuva 2) on helppo ja vaivaton tapa MIC-arvon mittaamiseen. Testissä käytetään kaupallista liuskaa, jossa on jatkuva gradientti mikrobilääkettä. Liuska asetetaan agarmaljalle, johon on ensin viljelty tasaisesti tutkittavaa bakteerisuspensiota. Bakteerin MIC-arvo tutkittavalle mikrobilääkkeelle on maljan kohta, jossa bakteerin kasvu ja gradienttiliuska kohtaavat. Gradienttiliuska on käytössä muun muassa resistenttien bakteerien herkkyysmäärityksen tarkistuksissa. Rajoittava tekijä testissä on sen kallis hinta. (Carlson & Koskela 2011.)

Käytetyin herkkyysmäärittäminen on agardiffuusiomenetelmä (kiekkomenetelmä) (kuva 3) sen helpon suoritustavan takia (Nissinen 2009). Elatusainemaljan pinnalle viljellään tasaisesti tutkittavaa bakteeria, jonka jälkeen maljalle asetetaan mikrobilääkekieskoja. Kiekosta diffundoituu mikrobilääkettä, joka estää bakteerin kasvun kiekon ympäriltä. Mitä herkempi bakteeri on, sitä suuremmalta alueelta kiekon ympäriltä kasvu on estynyt. Tulos ilmoitetaan herkkyysluokkien mukaisesti. Kiekkomenetelmä soveltuu hyvin nopeakasvuisten bakteerien herkkyysmäärittämiin. Se voi kuitenkin antaa helposti virheellisiä tuloksia, joten tehdessä tarkkoja herkkyystutkimuksia siihen ei täysin luoteta. (Huovinen & Vaara 2011.)



Kuva 2. MIC-gradienttiliuskat.



Kuva 3. Kiekkoherkkyys.

6.2 ESBL-varmistustesti

ESBL-ominaisuus on varmistettavissa suhteellisen helposti fenotyypillisellä kaksoiskiekkotestillä, *E. coli*- ja *Klebsiella*-kannoista. ESBL-bakteerit ovat hyvin estettävissä beetalaktamaasi-inhibiittoreilla, johon myös ESBL-varmistustesti perustuu. Tällä testillä *E. coli*, *Klebsiella*-, *Proteus*- ja *Salmonella*-lajeissa voidaan luotettavasti todeta ESBL-entsyymien esiintyminen. Varmistustesti tehdään, jos edellä mainittujen kantojen herkkyysmaljoilla ilmenee kannan olevan resistentti (R) tai sen herkkyys on vähentynyt (I) keftriaksonille ja/tai keftatsidiimille. (Rantakokko-Jalava 2011; Rantakokko-Jalava 2010.)

ESBL-määrityksen kaksoiskiekkotestissä käytetään kahta kefalosporiinia, keftaksiimia (CTX) ja keftatsidiimia (CAZ) sekä näitä antibiootteja yhdistettynä klavulaanihappoon (CV). Kiekot (CTX, CAZ, CTX/CV ja CAZ/CV) asetetaan Müller Hinton maljalle, johon on viljelty 0,5 McFarland standardia vastaava bakteerisuspensio. Inkubaation jälkeen mitataan estorenkoot. Kiekot ovat diagnostisia ESBL-paneelissa, joten niillä ei ole tulkintarajoja. Jos klavulaanihappokombinoidun kiekon tai molempien klavulaanihappokombinoitujen kiekkojen estorenkoot ovat halkaisijaltaan 5 mm tai yli verrattuna vastaavan antibiootin kiekon estorenkootaan ilman klavulaanihappoa, kanta on ESBL-positiivinen. (Meurman 2013; Rantakokko-Jalava 2010.)

Yhdistelmäkiekkovarmistustestimenetelmä sopii *E. coli*, *Proteus Mirabilis*, *K. pneumoniae* ja *K. oxytoca* -kannoille. Muiden kantojen ESBL-määritykseen kiekkovarmistustesti ei ole luotettava. Varmistustestissä on virhelähteitä, esimerkiksi bakteerin AmpC-geenin tuotto antaa virheellisiä tuloksia. Tällöin luotettavien ESBL-entsyymien tuoton varmistaminen on PCR-menetelmä. (Jalava ym. 2011.)

6.3 ESBL-kantojen herkkyystulkinnat

Suomessa mikrobilääkeherkkyysrajat perustuivat aiemmin vuonna 1996 valmistuneeseen FiRe-standardiin, joka mukaili amerikkalaista CLSI (Clinical Labora-

tory Standard Institute) -standardia. FiRe, Finnish Study Group for Antimicrobial Resistance, Suomalainen mikrobilääkeresistenssin tutkimusryhmä perustettiin 1991 ja sen tavoite oli muun muassa yhdenmukaistaa diagnostisten bakteerilöydösten lääkeherkkyysmäärittämenetelmät. Vuonna 2011 kaikki FiRe-laboratoriot siirtyivät käyttämään eurooppalaista EUCAST-standardia. (THL 2013d.) Tämän myötä metodiikka pysyi suurimmaksi osaksi ennallaan, mutta tulkintarajat muuttuivat (Jalava ym. 2011).

EUCAST-standardi ei anna ohjeita liittyen ESBL-entsyymiä tuottavien gramnegatiivisten bakteerien seulontaan eikä myöskään ESBL-tuoton varmistamiseksi. Jos *Enterobacteriaceae*-heimon bakteeri antaa herkkyysmäärittäksessä alentuneen herkkyuden kefalosporiineille tai monobaktaameille, voidaan epäillä, että bakteeri tuottaa ESBL-entsyymiä. ESBL-bakteerin varmistus tehdään joko yhdistelmäkiekkotestillä tai MIC-menetelmällä. Koska EUCAST-standardi ei määrittele varmistusmenetelmää, varmistus tehdään edellä kuvatulla, aiemman CLSI -standardin mukaisella yhdistelmäkiekkotestillä. (Jalava ym. 2011; Leclercq ym. 2011.)

Suomalaisen työryhmän CLSI:n mukaan tehty varmistustestin ESBL-positiivinen tulos muuttaa siis EUCAST-standardin määrittelemää tulkintaa siten, että herkän (S) kannan herkkyys tulkitaan olevan alentunut (I). Tämä koskee kefalosporiineja, penisilliinejä, monobaktaameja sekä penisilliini/beetalaktamaasi-inhibiittoriyhdistelmiä. (Jalava ym. 2011.)

7 AIKAISEMMAT TUTKIMUKSET

Babini ym. (2003) tutkimuksen mukaan piperasilliini-tatsobaktaamia käytetään paljon ESBL-entsyymiä tuottavien *Klebsiella*-infektioiden hoidossa, vaikkakin herkkyyksissä on paljon vaihtelevuutta. Osa ESBL-bakteereista on resistenttejä, osa herkkiä. Tutkijat halusivat tietää, miksi näin on ja tulisiko piperasilliini-tatsobaktaamia käyttää testauksessa aina samassa suhteessa 8:1 vai eri suhteella tasobaktaamin ollessa aina 4 mg/l. Tutkimuksessa testattiin piperasilliinia eri beetalaktamaasi-inhibiittoreiden kanssa. Kun piperasilliinia käytetään 4 mg/l tatsobaktaamin kanssa, saadaan bimodaalisia MIC-herkkyksiä ESBL-entsyymiä tuottavissa *Klebsiella*-kannoissa. MIC-arvot olivat kuitenkin unimodaalisia kun piperasilliinia testattiin 4 mg/l klavulaanihapon kanssa. Bimodaaliset MIC-arvot kuitenkin nousivat, kun klavulaani pienennettiin 0,25 mg/l. Kun piperasilliini-tatsobaktaami testattiin suhteessa 8:1, MIC-arvot muuttuivat unimodaaliksiksi. Tutkijoiden mukaan nämä eri yhdistelmät osoittavat, että piperasilliini yhdistettynä 4 mg/l tatsobaktaamin kanssa muodostamat bimodaaliset MIC-arvot johtuvat olosuhteista, eikä ESBL-entsyymiä tuottavan *Klebsiellan* resistenttiydestä tatsobaktaamille. Tutkimuksessa saatiin suuri vaihtelu piperasilliini-tatsobaktaamin 4 mg/l herkkyyksissä. Osa kannoista oli hyvinkin resistenttejä ja osa herkkiä. Tutkijat suosittelivatkin piperasilliini-tatsobaktaamin käyttöä herkkyysmäärittäytulosten mukaan ESBL-infektioiden hoidossa.

Raveh ym. (2007) tutkivat enterobakteerin herkkyyttä ertapeneemille, meropeneemille ja piperasilliini-tatsobaktaamille klavulaanihapon kanssa ja ilman. Tutkimuksessa oli 121 *E.Coli* ja *Klebsiella* -kanta, joilla kaikilla oli ESBL-entsyymi. Herkkyudet saatiin gradienttiliuskalla. Klavulaanihappoa lisättiin 2 µg/ml maljalle. Kaikkien antibioottien MIC-tulokset paranivat klavulaanihapon kanssa. Ertapeneemin MIC-tulos ilman klavulaanihappoa oli 0,25 µg/ml ja klavulaanihapon kanssa 0,094 µg/ml, meropeneemin MIC-tulos ilman klavulaanihappoa oli 0,064 µg/ml ja klavulaanihapon kanssa 0,032 µg/ml ja piperasilliini-tatsobaktaamin MIC-tulos ilman klavulaanihappoa 256 µg/ml ja klavulaanihapon kanssa 16 µg/ml. Tutkimuksen mukaan tehokkain antibiootti ESBL:n hoitoon on

meropeneemi, koska MIC-tulos ilman klavulaanihappoa ja sen kanssa oli herkin kaikista antibiooteista ja piperasilliini-tatsobaktaami oli tehoton klavulaanihapon kanssa ja ilman.

Gavin ym. (2006) tutkivat ennakoivatko piperasilliini-tatsobaktaamin laboratoriossa saadut herkkyysmääritysrajat hoitotuloksia. ESBL-entsyymiä tuottavien bakteerien hoitotulokset ovat olleet huonoja ja infektioiden on liittynyt lisääntynyttä kuolleisuutta. CLSI suosittelee beetalaktaami/beetalaktamaasi-inhibiittoreita infektioiden hoitoon. Tutkimuksen mukaan kuitenkin monet klinikot ovat haluttomia käyttämään piperasilliini-tatsobaktaamia hoitona. Tutkimuksessa oli 23 *E. coli* ja *Klebsiella*-kannan aiheuttamaa ESBL-infektiota, joita hoidettiin piperasilliini-tatsobaktaamilla. Niistä kuusi oli virtsatieinfektioita ja 17 muita kuin virtsatieinfektioita. 11 potilaan infektion aiheuttava ESBL-entsyymiä tuottava bakteeri oli herkkä piperasilliini-tatsobaktaamille. Näistä 10 potilaalla piperasilliini-tatsobaktaamihoito onnistui. Kuudella potilaalla infektion aiheuttama ESBL-kannan piperasilliini-tatsobaktaami MIC-herkkyystulos oli $>16/4 \mu\text{g/ml}$. Näistä potilaista kahden hoito oli onnistunut. Kaikilla kuudella virtsatieinfektiopotilaalla piperasilliini-tatsobaktaamihoito oli onnistunut.

8 TAVOITE JA TARKOITUS

Työn tarkoituksena on tutkia piperasilliini-tatsobaktaamin mikrobilääkeherkkyyttä laboratorioissa rutiinikäytössä olevilla neljällä herkkyysmenetelmällä. Herkkyysmenetelmät ovat kiekkoherkkyys, Vitek 2 -analysointilaite ja kaksi eri kaupallista gradientti MIC-liuskatestiä.

Tavoitteena on saada luotettava lääkeherkkyystulos piperasilliini-tatsobaktaamiantibiootille ja parantaa herkkyysmäärityksen laatua.

Tutkimusongelmat

1. Millä herkkyysmenetelmällä saadaan luotettavin herkkyystulos piperasilliini-tatsobaktaamiantibiootille?
2. Poikkeako jokin herkkyysmenetelmä systemaattisesti muista menetelmistä?

9 TYÖN TOTEUTUS

Aihe saatiin Tykslabin kliinisen mikrobiologian osastolta 938 keväällä 2013. Opinnäytetyön teoreettisen viitekehyksen kirjoittaminen aloitettiin kesällä ja tutkimuslupa (liite 1) anottiin ja saatiin Turku CRC:stä syksyllä 2013. Opinnäytetyön empiirinen osuus suoritettiin Tykslab kliinisen mikrobiologian osastolla syksyn aikana. Tutkimuskannat saatiin THL:n Turun yksiköstä ja Tykslabin kliinisen mikrobiologian osastolta. Tutkittavia *E. coli* ja *K. pneumoniae* kantoja oli 83. Tutkimustulokset taulukoitiin ja analysoitiin lokakuussa 2013. Opinnäytetyö raportoitiin marraskuussa 2013.

9.1 Työn empiirinen toteutus

Empiirinen tutkimus toteutettiin Tykslabin kliinisen mikrobiologian osastolla 938, josta myös saatiin tarvittavat välineet työn toteutusta varten. Kliinisen mikrobiologian osastolta saatiin 40 *E. coli*- ja *K. pneumoniae*-kantaa. Osa kannoista tuotti ESBL-entsyymiä, osa oli herkkiä ja osa tuotti karbapenemaasientsyymiä. Joukossa oli myös 7 TEM –beetalaktamaasia tuottavaa kantaa. THL:n 43 *E. coli* ja *K. pneumoniae* kantaa tuottivat kaikki ESBL-entsyymiä.

Osasto 938:n kannat sulatettiin pakastimesta ja viljeltiin Chromagar orientation (ORI) -maljoille. Kantoja kasvatettiin vuorokausi lämpökaapissa (+38°C) ja viljeltiin seuraavana päivänä uudestaan ORI-maljoille. Tällä varmistettiin kantojen kasvavan puhtaana. Koko herkkyysprosessin ajan kannat pidettiin elossa viljelemällä ne uudelleen joka päivä ORI-maljoille. THL:n kannat saatiin valmiiksi maljoille viljeltynä ja ne viljeltiin samoin kuin osastolta saadut kannat.

Puhtaista tuoreista kannoista tehtiin 0.5 McFarlandin suspensio. Suspension vahvuus varmistettiin Densicheck 2 -mittarilla sekä puhtaus TSA-S verimaljalla. Samasta suspensiosta tehtiin herkkyudet neljällä eri menetelmällä: Vitek 2 –analysointori (AST-N230 herkkyyskortti gramnegatiivisille sauvoille), Oxoid kiekkoherkkyys (tzp 36 µg) sekä kaksi E-testiä, Liofilchem (tzp 0,016-256 µg/ml) ja BioMerieux (tzp 0.016-256/4 µg/ml). Vitek 2 –analysointorin AST-kortin kai-

voissa piperasilliini-tatsobaktaamipitoisuudet ovat 2/4, 8/4, 24/4, 32/4, 32/8 ja 48/8. Oxoidin kiekkoherkkyyspaneeli sisältää piperasilliini-tatsobaktaamin lisäksi ampisilliinin, amoksisilliini-klavulaanihapon, amikasiinin, kefaleksiinin ja kefuroksiimin.

15 minuutin sisällä bakteerisuspension teosta viljeltiin suspensio Mueller Hinton II -herkkyysmaljoille, kaksi maljaa yhtä kantaa kohden. Viljelyn jälkeen bakteerisuspensiot vietiin Vitek 2 -analysaattoriin. Toiselle herkkyysmaljalle asetettiin kiekkopaneeli ja toiselle kaksi eri valmistajan MIC- gradienttiliuskaa. Kiekkojen ja liuskojen annettiin asettua agarille ja laitettiin 15 minuutin sisällä lämpökaappiin (+35°C) kasvamaan 18 - 20 tunniksi. Vitek 2 -analysaattori analysoi tulokset saman työpäivän aikana.

Herkkyysmaljat luettiin seuraavana päivänä 20 tunnin kuluessa viljelystä. Kiekkojen estorenkaut mitattiin viivaimella ja liuskat asteikon mukaisesti. Tulokset kirjattiin ylös ja tulkittiin EUCAST standardin (liite 2) mukaan. Herkkyysmääritykset samoista kannoista tehtiin kahtena perättäisenä päivänä toistettavuuden varmistamiseksi. Joka päivä sarjojen yhteydessä viljeltiin kontrollit ja tehtiin niistä herkkydet. Kontrolleina käytettiin kantoja ATCC 25922 (*E. coli*) ja ATCC 35218 (*E. coli*). Ensimmäinen on EUCASTin suosittelema kontrollikanta *E. coli* ja herkkä kaikille antibiooteille. Sallittu vaihteluväli on määritelty sekä kiekkoetta MIC-menetelmille. Jälkimmäinen tuottaa TEM-1 beetalaktamaasia ja EUCAST suosittelee sitä beetalaktamaasi-inhibiittorikombinaatioiden inhibiittoriosan kontrollointiin. Sen sallittu vaihteluväli on määritetty vain kiekkoille. Kontrollit luettiin EUCAST standardin kontrollitaulukon mukaan. Kontrollit olivat standardin mukaisia, joten tuloksia voitiin pitää luotettavina.

Kantojen herkkyysmääritykset tehtiin neljässä erässä. Yhdessä päivässä käsiteltiin noin 20 kantaa. Tutkimuksen kesto oli kolme viikkoa. Muutamia kantoja jouduttiin uusimaan teknisen puutteellisuuden vuoksi, esimerkiksi kiekko oli siirtynyt inkuboinnin aikana.

9.2 Metodologiset lähtökohdat

Opinnäytetyö on kvantitatiivinen eli määrällinen tutkimus. Sen keskeisiä piirteitä ovat muun muassa johtopäätökset aiemmista tutkimuksista, käsitteiden määrittely, aineiston keruun suunnitelmat, aineiston saattaminen tilastolliseen muotoon sekä päätelmien teko. (Hirsjärvi ym. 2009.) Aineistot ovat kooltaan suuria ja optimaalisen aineistokoon määrittämiseksi on hyvä tehdä etukäteen laskelmia. Koko aineisto kerätään ensin ja vasta sen jälkeen tehdään analyysi. (Aira & Seppä 2010.)

Tässä opinnäytetyössä aineistoa ja lähteitä arvioitiin kriittisesti. Aineisto analysoitiin ja sen pohjalta ylimääräiset lähteet karsittiin. Empiirinen tutkimus perustui käytettyyn lähdeaineistoon. Aiheesta löytyi aikaisempia tutkimuksia, mutta ne eivät suoranaisesti liity tämän opinnäytetyön aiheeseen. Työn keskeiset käsitteet määritettiin teoreettisen viitekehyksen kokoamisen aikana.

Kvantitatiivisessa tutkimuksessa validius (pätevyys) tarkoittaa mittarin tai tutkimusmenetelmän kykyä mitata juuri sitä, mitä on tarkoitus mitata. Jos tutkimus on pätevä, se ei saisi sisältää systemaattista virhettä eli teoreettiset ja operationaaliset määritelmät ovat yhtä pitäviä. Validiutta voidaan arvioida eri näkökulmista, esimerkiksi tutkimusasetelmavalidiudesta, ennustevalidiudesta ja rakennevalidiudesta. (Hirsjärvi ym. 2009; Vilkkä 2005.)

Tutkimuksen reliaabelius (luotettavuus) tarkoittaa mittaustulosten toistettavuutta eli tulosten tarkkuutta. Tämä tarkoittaa, että mittaustulos on aina toistettaessa sama riippumatta tutkijasta. Monet asiat tutkimuksen aikana voivat heikentää tutkimuksen luotettavuutta, esimerkiksi satunnaisvirheet. Tutkimuksen tavoitteiden kannalta virheiden vaikuttavuus ei välttämättä ole kovin suuri. Tärkeää kuitenkin on, että tutkija ottaa kantaa mahdollisiin satunnaisvirheisiin tutkimuksessa. (Hirsjärvi ym. 2009; Vilkkä 2005.)

9.3 Tutkimuseettiset näkökohdat

Tutkimus on arvoperustaista ja inhimillistä toimintaa ja sillä pyritään löytämään totuus tieteellisesti hyväksytyillä menetelmillä eri tieteenaloilla. Eettisten pohdintojen merkitys on erityisen tärkeä tieteissä, joissa tutkitaan inhimillistä toimintaa ja käytetään tietolähteinä ihmisiä. Tällaisia tieteitä ovat muun muassa kaikki terveystieteet. (Leino-Kilpi & Välimäki 2004.)

Tutkimuseetiikalla tarkoitetaan hyviä tieteellisiä käytäntöjä ja tutkimuseettisen käsitteen mukaan tutkijan pitäisi noudattaa tutkimuksessaan rehellisyyttä, älyllistä kiinnostusta, tunnollisuutta ja kollegiaalista arvostusta (Pietarinen 1999). Hyvän tieteellisen käytännön loukkauksia on kaksi pääluokkaa, piittaamattomuus hyvästä tieteellisestä käytännöstä sekä vilppi tieteellisessä käytännössä. Piittaamattomuus tulee ilmi laiminlyönteinä ja holtittomuutena tutkimuksen suorittamisvaiheessa sekä muiden tutkijoiden osuuden vähättelyssä ja puutteellisissa viittauksissa aikaisempiin tutkimuksiin. Piittaamattomuutta on myös tulosten huolimaton tai puutteellinen kirjaaminen sekä vanhojen tulosten julkaiseminen uusina. Vilppi tulee ilmi luvattomana lainaamisena ja havaintojen vääristelyinä.

Tässä opinnäytetyössä edetään hyviä tieteellisiä käytäntöjä noudattaen ja välttäen plagiointia sekä kunnioittamalla aiempia tutkimustuloksia ja tieteellistä teoriaa. Tutkimustulokset raportoidaan rehellisesti ja niitä vääristelemättä.

Tässä opinnäytetyössä anonymiteetin vaaliminen ja potilasnäytteiden kunnioittaminen on erityisen tärkeää (Leino-Kilpi & Välimäki 2004). Tutkimuksessa käytetyt näytteet saatiin Tykslab kliinisen mikrobiologian ja Turun THL:n pakasteesta. Näytteet olivat potilasnäytteitä kymmenen vuoden ajalta. Niissä ei ollut potilaiden henkilötietoja ja ne olivat merkitty numerosarjoilla. Työn helpottamiseksi näytteet numeroitiin uudelleen juoksevilla numeroilla 1-83.

10 TULOKSET JA NIIDEN TARKASTELU

Tutkimuksessa oli 66 *E. coli* ja 17 *K. pneumoniae* -bakteerikantaa, yhteensä 83, joita tutkittiin neljällä eri herkkyysmenetelmällä. Kahdessa piperasilliini-tatsobaktaami gradienttiliuskassa MIC-asteikko vaihtelee välillä 0.016-256. Molemmissa liuskoissa on myös niin sanotut puolilaimennokset MIC-portaiden välissä. Vitek 2 -analysointilaitteen piperasilliini-tatsobaktaamin MIC-asteikon alin mahdollinen arvo on ≤ 4 ja korkein ≥ 128 . Väliin jäävät MIC-arvot ovat 8, 16, 32 ja 64, jotka analysointilaitteisto antaa yhden laimennoksen tarkkuudella.

Esimerkiksi, jos gradienttiliuska antaa arvon 2 ja Vitek 2 -analysointilaitteisto ≤ 4 , on Vitek 2 -analysointilaitteen arvo lähin mahdollinen gradienttitestiliuskan kanssa. Kiekoista mitataan estorenkaiden millimetriarvot. MIC-arvot sekä kiekkojen millimetriarvot tulkitaan EUCAST standardin määrittämien tulkintarajojen mukaan.

Herkkyystulokset laitettiin excel-taulukkoon ja kannat jaettiin neljään ryhmään: herkäät kannat (1), kannat, joilla oli TEM-beetalaktamaasi (2), karbapenemaasientsyymi-kannat (3) ja ESBL-kannat (4). Herkkyystuloksia tarkasteltiin seuraavasti: gradienttiliuskojen MIC-arvojen vaihtelua liuskojen välillä, Vitek 2 -tulosten ja gradienttiliuskojen antamien MIC-arvojen vastaavuutta sekä kiekkoherkkyystuloksen tulkinnan ja eri MIC-menetelmien tulkintojen vastaavuutta. Lisäksi tarkasteltiin kunkin testin tulosten vaihtelevuutta toistojen välillä.

Herkkiä kantoja (taulukko 1), ilman hankittua resistenssiä, oli 7 (8%) 83 kannasta, 6 *E. coli* ja 1 *K. pneumoniae*. *E. coli* on aina herkkä kaikille testatuille antibiooteille ja *K. pneumoniae* on aina R ampisilliinille, mutta muuten herkkä. Tutkimuksessa käytettävien gradienttiliuskojen MIC-arvot olivat kahden laimennoksen sisällä, kuin myös saman testin toistokerrat, sekä Vitek 2 -analysointilaitteisto antoi lähimmän mahdollisen MIC-tuloksen. Vitek 2 -analysointilaitteen toistoissa ei ollut vaihtelua. Kiekkojen estorenkaiden millimetrialueet olivat lähes samoja, vaihteluväli oli 26-30 mm. Toistojen välinen vaihteluväli oli 3 mm. Toistojen välisen erotuksen keskiarvo oli 1,1 mm. Kaikkien herkkyysmenetelmien tulkinta oli S.

Taulukko 1. Herkät kannat.

Kanta	Hankittu β-laktamaasi	Vitek		Gradienttiliuska		Gradienttiliuska		Kiekot	
		1. määrittys TZP	2. määrittys TZP	1. määrittys Liofilchem	2. määrittys Liofilchem	1. määrittys BioMerieux	2. määrittys BioMerieux	1. määrittys TZP	2. määrittys TZP
1 E.coli	neg	<=4 S	<=4 S	3 S	1,5 S	1,5 S	1,5 S	27 S	26 S
2 E.coli	neg	<=4 S	<=4 S	1,5 S	0,5 S	0,75 S	0,5 S	29 S	27 S
3 E.coli	neg	<=4 S	<=4 S	1,5 S	0,5 S	0,5 S	0,5 S	29 S	30 S
4 E.coli	neg	<=4 S	<=4 S	0,75 S	0,5 S	1 S	0,75 S	26 S	26 S
5 E.coli	neg	<=4 S	<=4 S	1 S	0,5 S	0,75 S	0,75 S	27 S	27 S
6 E. coli	neg	<=4 S	<=4 S	1,5 S	1 S	1,5 S	1,5 S	27 S	28 S
7 K.pneu	neg	<=4 S	<=4 S	1,5 S	1,5 S	1,5 S	2 S	26 S	23 S

Kantoja, joilla on beetalaktamaasi, (TEM) (taulukko 2), mutta joilla ei ole ESBL-entsyymiä, oli 7 (8%), joista 6 oli E. colia ja 1 K. pneumoniae. Kanta 10 oli R ja muut antoivat tulkinna S. Kanta 10 (merkitty taulukkoon harmaana) oli tutkimuksen ainoa ESBL-entsyymiä tuottamaton kanta, jonka tulkinta vaihteli eri herkkyysmenetelmissä. TEM-geenin lisäksi sillä ei todettu muuta hankittua beetalaktamaasia eikä AmpC-fenotyyppejä, joten resistenssin syy jäi epäselväksi. Gradienttiliuskojen MIC-tulokset sekä toistokerrat olivat yhden laimennoksen sisällä. Vitek 2 -analysointori antoi saman tulkinna eikä toistokerroissa ollut vaihtelevuutta. Kiekkoherkkyksissä TEM-positiivisilla kannoilla vaihteluväli 16-27 mm ja toistojen välinen vaihteluväli oli 3 mm. Toistojen välisen erotuksen keskiarvo oli 1,3 mm.

Taulukko 2. TEM-positiiviset kannat.

Kanta	Hankittu β-laktamaasi	Vitek		Gradienttiliuska		Gradienttiliuska		Kiekot	
		1. määrittys TZP	2. määrittys TZP	1. määrittys Liofilchem	2. määrittys Liofilchem	1. määrittys BioMerieux	2. määrittys BioMerieux	1. määrittys TZP	2. määrittys TZP
8 E.coli	TEM	<=4 S	<=4 S	1 S	1 S	1,5 S	1 S	23 S	25 S
9 E. coli	TEM	<=4 S	<=4 S	4 S	3 S	2 S	2 S	21 S	22 S
10 E. coli	TEM	>=128 R	>=128 R	> 256 R	> 256 R	128 R	192 R	16 R	19 I
11 E. coli	TEM	8 S	8 S	8 S	8 S	6 S	6 S	22 S	22 S
12 E. coli	TEM	<=4 S	<=4 S	1,5 S	1,5 S	1,5 S	2 S	28 S	27 S
13 E. coli	TEM	<=4 S	<=4 S	1 S	1 S	1 S	1 S	24 S	26 S
14 K.pneu	TEM	<=4 S	<=4 S	3 S	2 S	2 S	2 S	22 S	22 S

Karbapenemaasiensyymejä tuottavia kantoja (taulukko 3) oli 9 (11%) 83 kannasta. 4 oli E. coli- ja 5 K. pneumoniae -kantoja. Kannat olivat kaikilla herkkyysmenetelmillä resistenttejä. Gradienttiliuskojen MIC-tulokset olivat yhden laimennoksen sisällä sekä Vitek 2 -analysointorin MIC-arvo oli lähin mahdollinen. Vitek 2 -analysointorin sekä liuskatestien toistokerrat olivat identtisiä. Kiek-

kojen estorenkaiden vaihteluväli oli 6-11 mm ja toistojen välinen vaihteluväli oli 2 mm. Kiekkotoistojen välisen erotuksen keskiarvo 0,6 mm.

Taulukko 3. Karbapenemaasiensyymejä tuottavat kannat.

Kanta	Hankittu	Vitek		Gradienttiliuska		Gradienttiliuska		Kiekot		
		β-laktamaasi	1. määrittys	2. määrittys	1. määrittys	2. määrittys	1. määrittys	2. määrittys	1. määrittys	2. määrittys
			TZP	TZP	Liofilchem	Liofilchem	BioMerieux	BioMerieux	TZP	TZP
15	<i>E.coli</i>	oxa-48	>=128 R	>=128 R	>256 R	>256 R	>256 R	256 R	9 R	10 R
16	<i>E.coli</i>	oxa-48	>=128 R	>=128 R	>256 R	>256 R	>256 R	>256 R	6 R	6 R
17	<i>K.pneu</i>	oxa-48	>=128 R	>=128 R	>256 R	>256 R	>256 R	>256 R	6 R	6 R
18	<i>E.coli</i>	oxa-48	>=128 R	>=128 R	>256 R	>256 R	>256 R	>256 R	10 R	8 R
19	<i>E.coli</i>	NDM	>=128 R	>=128 R	>256 R	>256 R	>256 R	>256 R	6 R	6 R
20	<i>K.pneu</i>	oxa-48	>=128 R	>=128 R	>256 R	>256 R	>256 R	>256 R	6 R	6 R
21	<i>K.pneu</i>	oxa-48	>=128 R	>=128 R	>256 R	>256 R	>256 R	>256 R	6 R	6 R
22	<i>K.pneu</i>	oxa-48	>=128 R	>=128 R	>256 R	>256 R	>256 R	>256 R	11 R	9 R
23	<i>K.pneu</i>	oxa-48	>=128 R	>=128 R	>256 R	>256 R	>256 R	>256 R	6 R	6 R

Tutkimuksen 83 kannasta 60 (72 %) oli ESBL-kantoja (taulukko 4). 21/60 (35 %) ESBL-kannalla (kaikki *E. coli* -kantoja) piperasilliini-tatsobaktaamin herkkyystulkinta oli aina S. 7/60 (12%) kannalla (2 *E. coli* ja 5 *K. pneumoniae* -kanta) tulkinta oli aina R. 32/60 (53 %) ESBL-kannalla (27 *E. coli* ja 5 *K. pneumoniae* -kanta) piperasilliini-tatsobaktaamin tulkinta vaihteli eri herkkyysmenetelmillä tai toistolla. 3/60 (5%) kannalla (kaikki *E. coli* -kantoja) tulkinta vaihteli S:n ja I:n ja 8/60 (13%) kannalla (7 *E. coli* ja 1 *K. pneumoniae* -kanta) I:n ja R:n välillä. 21/60 (35%) kannalla (17 *E. coli* ja 4 *K. pneumoniae* -kanta) tulkinta vaihteli S:stä R:ään eri menetelmillä tai toistoilla.

Taulukko 4. ESBL-kannat.

Kanta	Hankittu β-laktamaasi	Vitek		Gradienttiliiska		Gradienttiliiska		Kiekot		
		1. määrittys TZP	2. määrittys TZP	1. määrittys Liofilchem	2. määrittys Liofilchem	1. määrittys BioMerieux	2. määrittys BioMerieux	1. määrittys TZP	2. määrittys TZP	
24	E.coli	CTX-M	<=4 S	<=4 S	0,75 S	0,75 S	1 S	1 S	25 S	27 S
25	E.coli	CTX-M	<=4 S	<=4 S	1 S	0,75 S	0,75 S	1 S	26 S	26 S
26	E.coli	CTX-M	<=4 S	<=4 S	3 S	2 S	2 S	1,5 S	22 S	27 S
27	E.coli	CTX-M	<=4 S	<=4 S	3 S	2 S	2 S	2 S	23 S	23 S
28	E.coli	CTX-M	<=4 S	<=4 S	2 S	2 S	1,5 S	2 S	24 S	25 S
29	E.coli	CTX-M	<=4 S	<=4 S	1 S	1 S	1 S	1 S	26 S	27 S
30	E.coli	CTX-M	<=4 S	<=4 S	0,75 S	1 S	1 S	1 S	25 S	29 S
31	E.coli	CTX-M	<=4 S	<=4 S	1 S	1,5 S	1,5 S	1,5 S	20 S	27 S
32	E.coli	CTX-M	<=4 S	<=4 S	0,125 S	0,19 S	0,064 S	0,047 S	31 S	31 S
33	E.coli	CTX-M	<=4 S	<=4 S	4 S	3 S	2 S	2 S	24 S	25 S
34	E.coli	CTX-M	<=4 S	<=4 S	3 S	3 S	2 S	1,5 S	23 S	23 S
35	E.coli	CTX-M	8 S	<=4 S	6 S	3 S	4 S	2 S	27 S	29 S
36	E.coli	CTX-M	<=4 S	<=4 S	1 S	1 S	0,5 S	0,5 S	27 S	30 S
37	E.coli	CTX-M	<=4 S	<=4 S	2 S	1,5 S	2 S	0,75 S	27 S	30 S
38	E.coli	CTX-M	<=4 S	<=4 S	1,5 S	2 S	1 S	1 S	21 S	25 S
39	E.coli	CTX-M	<=4 S	<=4 S	4 S	4 S	2 S	2 S	24 S	24 S
40	E.coli	CTX-M	<=4 S	<=4 S	3 S	2 S	2 S	2 S	24 S	23 S
41	E.coli	CTX-M	<=4 S	<=4 S	3 S	2 S	1,5 S	1,5 S	24 S	25 S
42	E.coli	CTX-M	<=4 S	<=4 S	2 S	2 S	1 S	1,5 S	25 S	26 S
43	E.coli	CTX-M	<=4 S	<=4 S	2 S	2 S	1,5 S	1,5 S	25 S	27 S
44	E.coli	CTX-M	<=4 S	<=4 S	4 S	3 S	6 S	1,5 S	24 S	25 S
45	E.coli	CTX-M	8 S	8 S	16 I	16 I	6 S	8 S	19 I	19 I
46	E.coli	CTX-M	<=4 S	<= 4 S	12 I	12 I	2 S	2 S	22 S	22 S
47	E.coli	CTX-M	16 I	16 I	6 S	4 S	3 S	3 S	23 S	24 S
48	E.coli	CTX-M	16 I	16 I	48 R	48 R	16 I	16 I	15 R	16 R
49	E.coli	CTX-M	64 R	64 R	>256 R	>256 R	16 I	12 I	16 R	17 I
50	E.coli	SHV-2a	64 R	64 R	>256 R	>256 R	64 R	16 I	19 I	17 I
51	E.coli	CTX-M	64 R	64 R	96 R	24 R	128 R	128 R	16 R	17 I
52	E.coli	CTX-M	16 I	64 R	32 R	32 R	16 I	16 I	17 I	18 I
53	E.coli	SHV-2a	>=128 R	>=128 R	256 R	256 R	192 R	192 R	17 I	19 I
54	E.coli	CTX-M	>=128 R	64 R	256 R	32 R	48 R	16 I	14 R	19 I
55	K.pneu	SHV-2	>=128 R	>=128 R	>256 R	>256 R	192 R	256 R	17 I	19 I
56	E.coli	CTX-M	64 R	>=128 R	>256 R	>256 R	64 R	16 I	15 R	16 R
57	E.coli	CTX-M	8 S	8 S	32 R	48 R	6 S	16 I	18 I	18 I
58	E.coli	CTX-M	8 S	8 S	32 R	24 R	16 I	12 I	17 I	18 I
59	E.coli	CTX-M	64 R	64 R	16 I	48 R	16 I	8 S	19 I	19 I
60	E.coli	CTX-M	8 S	16 I	64 R	24 R	12 I	8 S	18 I	18 I
61	E.coli	CTX-M	16 I	16 I	32 R	16 I	8 S	8 S	18 I	18 I
62	E.coli	CTX-M	8 S	8 S	64 R	96 R	24 R	12 I	16 R	18 I
63	E.coli	CTX-M	>=128 R	>=128 R	16 I	16 I	1 S	1 S	22 S	22 S
64	E.coli	CTX-M	8 S	16 I	32 R	16 I	8 S	6 S	21 S	20 S
65	E.coli	CTX-M	16 I	16 I	48 R	24 R	12 I	8 S	17 I	18 I
66	E.coli	CTX-M	16 I	8 S	256 R	64 R	12 I	16 I	17 I	18 I
67	E.coli	CTX-M	16 I	64 R	8 S	24 R	2 S	2 S	22 S	22 S
68	E.coli	CTX-M	8 S	8 S	192 R	16 I	6 S	4 S	20 S	21 S
69	E.coli	CTX-M	8 S	8 S	32 R	16 I	4 S	24 R	19 I	20 S
70	E.coli	CTX-M	16 I	8 S	32 R	32 R	12 I	12 I	18 I	18 I
71	E.coli	CTX-M	16 I	64 R	48 R	192 R	12 I	6 S	19 I	23 S
72	E. coli	CTX-M	8 S	16 I	32 R	12 I	6 S	4 S	19 I	19 I
73	K.pneu	SHV-12	8 S	<=4 S	32 R	3 S	1,5 S	2 S	23 S	25 S
74	K.pneu	SHV-11	16 I	16 I	>256 R	>256 R	8 S	6 S	19 I	20 S
75	K.pneu	SHV-12	>=128 R	>=128 R	>256 R	>256 R	32 R	8 S	18 I	19 I
76	K.pneu	SHV-12	64 R	64 R	>256 R	>256 R	6 S	8 S	18 I	19 I
77	E. coli	CTX-M	>=128 R	>=128 R	>256 R	>256 R	>256 R	>256 R	13 R	12 R
78	E. coli	CTX-M	>=128 R	>=128 R	>256 R	>256 R	>256 R	>256 R	14 R	13 R
79	K.pneu	CTX-M	>=128 R	>=128 R	>256 R	>256 R	24 R	24 R	16 R	16 R
80	K.pneu	CTX-M	>=128 R	>=128 R	>256 R	>256 R	24 R	32 R	16 R	16 R
81	K.pneu	CTX-M	>=128 R	>=128 R	>256 R	>256 R	>256 R	>256 R	6 R	6 R
82	K.pneu	CTX-M	>=128 R	>=128 R	>256 R	>256 R	>256 R	>256 R	14 R	14 R
83	K.pneu	CTX-M	>=128 R	>=128 R	>256 R	>256 R	32 R	24 R	16 R	16 R

Tulkinta vaihtelee S-I
Tulkinta vaihtelee I-R
Tulkinta vaihtelee S-R

10.1 Herkkyysmäärittämenetelmien sisäinen vaihtelu

ESBL-entsyymiä tuottavilla kannoilla Vitek 2 -analysointilaitteen 1. ja 2. määrittämenetelmien tulokset vaihtelivat 12 (20 %) kannan kohdalla. 9:llä (15 %) toistojen välinen vaihtelu oli yksi laimennos ja 3 (5%) kannalla kaksi laimennosta. 8:lla (13%) vaihtui tulkinta. Viidellä MIC vaihteli 8 (S) ja 16 (I) välillä, kolmella 16 (I) ja 64:llä (R) välillä.

Liofilchemin gradienttiliuskojen 1. ja 2. määrittämenetelmien tulokset vaihtelivat 31 (52%) ESBL-entsyymiä tuottavan kannan kohdalla. 21:llä (35%) toistojen välinen vaihtelu oli yksi laimennos ja 7 (12%) kannalla kaksi laimennosta. Yli kahden laimennoksen vaihtelu oli 3 (5%) kannalla. 8 kannalla tulkinta vaihteli, joista kuudella vaihtelu oli I-R ja kahdella S-R.

BioMerieux'n gradienttiliuskojen 1. ja 2. määrittämenetelmien tulokset vaihtelivat 33 (55%) ESBL-entsyymiä tuottavan kannan kohdalla. 24 (40%) kannalla toistojen välinen vaihtelu oli yksi laimennos ja 8:lla (13%) kaksi laimennosta. Yli kahden laimennoksen vaihtelu oli yhdellä (2%) kannalla. 11 kannalla tulkinta vaihtui. 5 kannalla vaihtelu oli S-I, 4:llä I-R ja 2:lla S-R.

ESBL-entsyymiä tuottavilla kannoilla kiekkoherkkyyksien eri lukukerroilla tulkinta vaihtui 7 (12%) kannalla, joista 3 kantaa vaihteli välillä S-I ja 4 R-I. Näiden estorenkaiden erotuksen keskiarvo oli 2,1 mm. Kaikkien kiekkoherkkyystoistojen välisen erotuksen keskiarvo oli 1,3 mm, joka ei poikkea huomattavasti muiden ryhmien kiekkojen estorenkaiden keskiarvosta.

ESBL-kannoista vain neljällä kannalla MIC-tulkinnan vaihtelu selittyi yli kahden laimennoksen erolla (kanta 54, 68, 69 ja 73). Muilla kannoilla MIC-tulkinnan vaihtelu tapahtui kahden laimennoksen sisällä.

10.2 Herkkyysmääritysten välinen vaihtelu

ESBL-entsyymiä tuottavien bakteerien herkkyysmäärityksissä BioMerieux'n gradienttiliuska antaa 32 (53%) kannan kohdalla saman tulkinnan kuin Liofilchemin gradienttiliuska ja 19 (32%) kannan kohdalla BioMerieux'n gradienttiliuska antaa herkemmän tulkinnan kuin Liofilchemin gradienttiliuska. 9 kannalla kohdalla tulkinnan vaihtelu oli epämääräistä. Verrattaessa BioMerieux'n gradienttiliuskan antamia tulkintoja Vitek 2 –analysointilaitteen tulkintoihin, 35 (58%) kantaa antaa saman tuloksen ja 8 (13%) kannan kohdalla BioMerieux'n gradienttiliuska oli herkempi. 3 (5%) kannan kohdalla Vitek 2 -analysointilaitteeseen antoi herkemmän tulkinnan kuin BioMerieux'n gradienttiliuska. 14 (23%) kannan kohdalla tulkinnan vaihtelu oli epämääräistä. 39 (65%) kannan kohdalla BioMerieux'n gradienttiliuska ja kiekot antoivat saman tulkinnan. 5 (8%) kannalla BioMerieux'n gradienttiliuska antoi herkemmän tulkinnan kuin kiekot ja 2 (3%) kannan kohdalla kiekot olivat herkempiä. 14 (23%) kannan kohdalla tulkinta oli epämääräinen.

Selkeästi poikkeava tuloksen antoi vain yksi kanta (68), jossa Liofilchemin gradienttiliuska antoi tulkinnaksi 1. määrittelyssä R:n ja toisessa I:n ja muilla menetelmillä tulkinta oli S. 4 kannan (46, 47, 53 ja 55) kohdalla yksi menetelmä antoi lievästi poikkeavan tuloksen verrattuna muihin menetelmiin.

MIC-tulkintoja verrattaessa kiekkoherkkyysien tulkintaan, Vitek 2 –analysointilaitteeseen antoi saman tulkinnan 34 (57%) kannan kohdalla ja Liofilchemin gradienttiliuska 32 (53%) kannan kohdalla. Kiekkojen tulkinnat olivat herkempiä 8 (13%) kannalla verrattuna Vitek 2 –analysointilaitteeseen ja 14 (23%) kannalla, kun verrattiin Liofilchemin gradienttiliuskaan. 4 (7%) kannan kohdalla Vitek 2 –analysointilaitteeseen oli herkempi kuin kiekot.

11 POHDINTA

Opinnäytetyössä haluttiin määrittää luotettavin herkkyysmenetelmä ESBL-kannoille. Herkkyysmäärittämissä käytettävä antibiootti oli piperasilliini-tatsobaktaami. Eri menetelmien tulosten oikeellisuutta ei voida arvioida, sillä herkkyksiä ei tehty referenssimenetelmällä tutkijoista riippumattomista aikataulusyistä. Myös referenssimenetelmällä pitäisi tehdä useita toistoja luotettavan tuloksen saamiseksi, jolloin eri menetelmiä voidaan verrata referenssimenetelmään. Tässä opinnäytetyössä eri menetelmiä verrattiin toisiinsa ja tutkittiin, poikkeako jokin menetelmä systemaattisesti muista. Herkkyysmenetelmät toistettiin kahdesti peräkkäisinä päivinä, jolloin nähtiin antaako sama menetelmä yhteneviä tuloksia. Aikaisemmissa tutkimuksissa pohditaan enemmän piperasilliini-tatsobaktaamin kliinisiä vaikutuksia eikä tulokset siten ole vertailukelpoisia tämän tutkimuksen kanssa.

11.1 Johtopäätökset

Merkittävä havainto tutkimustulosten perusteella on, että suuri osa ESBL-kannoista antoi vaihtelevia tuloksia eri herkkyysmenetelmillä. Vaihtelevimmat tulokset saatiin 60 ESBL -entsyymiä tuottavalla kannalla, joista 32 kannan tulkinta vaihteli vähintään yhdellä herkkyysmenetelmällä. Vaihtelu tapahtui eri menetelmien ja saman menetelmän toistojen välillä. ESBL-kannat, joilla tulkinta ei vaihdellut, olivat suurimmalta osin herkkiä kantoja, mutta myös seitsemän resistenttiä kantaa antoi yhtenevän tulkinnan. Kaikki herkät kannat olivat *E.coli* -kantoja ja seitsemästä resistentistä kannasta viisi oli *K. pneumoniae* -kantoja. Tästä on vaikea tehdä johtopäätöksiä, koska *K. pneumoniae* -kantojen otos oli huomattavasti *E. coli* -kantoja pienempi.

Herkillä, TEM-positiivisilla ja karbapenemaasia tuottavilla kannoilla herkkyystulkinta ei vaihdellut. Ne antoivat saman tulkinnan jokaisella herkkyysmenetelmällä. Poikkeuksena oli kanta 10, joka antoi kaikilla herkkyysmenetelmillä tulkinnan

R, paitsi kiekkoherkkyyksissä. Toisessa luvussa tulkinta oli I, mutta kiekkojen estorenkaiden tulokset olivat lähellä tulkintaraja-arvoja.

ESBL-kannoilla eri MIC-menetelmien toistettavuudessa oli eroja. Vitek 2 – analysaattori antoi eniten samoja tuloksia ja BioMerieux'n gradienttiliuska vähiten eri määrityskerroilla. Kiekkoherkkyysmääritys oli kaikista menetelmistä toistettavin, eikä ESBL-entsyymien läsnäololla ollut vaikutusta tuloksiin. MIC-herkkyysmäärityksissä tatsobaktaamin pitoisuus on aina 4 mg/ml ja piperasilliinin pitoisuus kasvaa MIC-arvojen mukaisesti. Kiekkossa on piperasilliinia 30 µg ja tatsobaktaamia 6 µg. Kiekkoherkkyysmenetelmässä piperasilliini ja tatsobaktaami diffundoituvat agarille samanaikaisesti samaa tahtia, joten niiden suhde on koko ajan vakio. MIC-menetelmissä suhde ei pysy vakiona. Tämän vuoksi kiekkoherkkyysmenetelmä saattaa olla toistettavampi kuin MIC-menetelmät. Myös Babinin 2003 tutkimuksessa pohditaan tulisiko piperasilliini-tatsobaktaamin suhde olla aina vakio.

Menetelmän toistettavuus tutkittiin tekemällä herkkyysmääritykset kahtena peräkkäisenä päivänä samoille kannoille. Toistettavuus toteutui ESBL -entsyymiä tuottamattomilla kannoilla hyvin, eli MIC-arvot olivat yhden laimennoksen sisällä ja jokaisella toistokerralla tulkinta oli sama, poikkeuksena kanta 10. ESBL -entsyymiä tuottavilla kannoilla vaihtelua oli kaikissa herkkyystoistoissa. Tulosten perusteella ESBL-entsyymi heikentää herkkyystulosten toistettavuutta.

Tutkimustulosten perusteella voidaan todeta, että BioMerieux'n gradienttiliuska antoi jonkin verran herkempiä tuloksia kuin Vitek 2 –analysaattori ja kiekkomenetelmä. Kun verrataan gradienttiliuskoja, BioMerieux'n gradienttiliuska antoi systemaattisesti herkempiä tulkintoja kuin Liofilchemin gradienttiliuska. Verratessa MIC-tulkintoja kiekkojen tulkintoihin kiekot antoivat samoja tai hieman herkempiä tuloksia kuin Liofilchemin gradienttiliuska ja Vitek 2 –analysaattori.

ESBL-entsyymiä tuottavien bakteerien vaihtelevat herkkyystulokset ovat usein EUCAST-standardin tulkintaraja-arvoilla. Tulosten perusteella MIC-arvojen laimennosväli jäi alle kahden, mutta tulkinta kuitenkin muuttui välillä S-I, I-R tai S-R. Edellä mainitun perusteella voidaan todeta, että vaihtelua tapahtui enemmän

tulkintaraja-arvoilla, jolloin voidaan pohtia, tulisiko I:n vaihteluvälin olla suurempi.

11.2 Tutkimuksen eettisyyden ja luotettavuuden arviointi

Eettisyys otettiin huomioon tutkimuksen jokaisessa vaiheessa. Tutkijat toimivat rehellisesti ja noudattivat hyvän tieteellisen käytännön periaatteita. Tutkimuksessa ei tapahtunut vilppiä tai piittaamattomuutta tutkimusta ja muita tutkijoita kohtaan. Tutkijat kunnioittivat aikaisempia tutkimustuloksia ja teoriaa arvioidessa omia tutkimustuloksia. Potilasnäytteiden anonymiteetti säilyi koko tutkimuksen ajan. Tässä opinnäytetyössä käytettiin monipuolista ja luotettavaa lähdeaineistoa. Teoreettisessa viitekehyksessä pyrittiin käyttämään mahdollisimman uusia lähteitä ja arvioimaan jokainen lähde kriittisesti. Aineistoa kerättiin sekä suomenkielisistä että englanninkielisistä lähteistä. Teoreettiseen viitekehykseen merkittiin selkeästi, kenen lähde on käytetty. Lähteitä ei plagioitu. Teoreettinen viitekehys on laaja ja käsiteltäviä asiasanoja oli paljon, joten tässä opinnäytetyössä päätettiin teoreettinen viitekehys jakaa monen pääotsikon alle. Tämä selkeyttää työn lukemista ja ymmärrettävyyttä.

Tutkimuksen validiutta voidaan arvioida eri näkökulmista. Tutkimus ei saisi sisältää systemaattisia virheitä ja teorian ja tutkimuksen tulisi tukea toisiaan. (Hirsjärvi ym. 2009; Vilkkä 2005.) Systemaattisia virheitä yritettiin välttää mitaamalla bakteerisuspension vahvuus Densichek-mittarilla. Kliinisessä työssä suspensio arvioidaan silmämääräisesti. Tutkijoiden kokemattomuuden vuoksi myös bakteerisuspension tiheys maljalla saattoi vaihdella, mutta kiekot ja MIC-gradienttiliuskat olivat helposti luettavissa. Herkkyysmaljojen lukuvaiheessa huomatu tekniset virheet korjattiin uusimalla kannan herkkyysmääritys. Validiteettia tarkastellessa pohditaan, mitataanko juuri sitä, mitä oli tarkoitus mitata, eli saatiinko vastaukset tutkimusongelmiin. (Riski 2013.) Tutkimustuloksilla ei saatu vastausta molempiin tutkimusongelmiin. Toista tutkimusongelmaa ei voitu ratkaista, koska käytössä ei ollut referenssimenetelmää. Opinnäytetyössä on käsitelty teoriaa laajasti ja tutkimusongelmia on käsitelty teorian pohjalta.

Reliaabeliuudella tarkoitetaan, onko mittaustulos aina toistettava ja luotettava (Hirsjärvi ym. 2009). Tutkimuksessa näytteet mitattiin kahteen kertaan, eli työ tehtiin käytännössä kahdesti, jolloin saatiin varmistettua mittaustuloksen olevan aina toistettava. Teknisten virheiden vuoksi myös pieni osa näytteistä uusittiin, jolloin välttyttiin ei-satunnaisilta virheiltä. Näyte-erät olivat pieniä, jolla yritettiin välttää virheiden mahdollisuutta. Jokaisena päivänä tehtiin myös kaksi eri kontrollia, joilla varmistettiin menetelmien toimivuus tekopäivinä. Työssä noudatettiin hyvää tieteellistä käytäntöä. Tutkimusta tehdessä oltiin huolellisia ja työohjeita noudatettiin tarkasti. Tulokset raportoitiin niitä vääristelemättä. Tutkimuksen aikana konsultoitiin mikrobiologian erikoislääkäriä, joka myös tarkasti lopullisen raportin.

Tätä tutkimusta tulisi jatkaa vertaamalla saatuja tuloksia referenssimenetelmään, jolloin saataisiin arvioitua luotettavin herkkyysmenetelmä. Sitä voisi jatkaa myös käyttämällä tutkimuksessa ESBL-entsyymiä tuottavista bakteereista isompaa otosta.

LÄHTEET

- Aira, M. & Seppä K. 2013. Laadullinen ja määrällinen tutkimus lääketieteessä. Suomen Lääkäri lehti. Vol 56, No 9/2010, 805-810. Viitattu 17.10.2013
<http://www.laakarilehti.fi/files/sv/SLL92010-805.pdf>.
- Babini, G; Yuan, M; Hall, L. & Livermore, D. 2003. Variable susceptibility to piperacillin/tazobactam amongst Klebsiella spp. with extended-spectrum β -lactamases. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. Vol 51, No 3/2003, 605–612. Viitattu 19.9.2013
<http://jac.oxfordjournals.org/content/51/3/605.full.pdf+html>.
- Carlson, P. & Koskela, M. 2011. Bakteriologiset tutkimukset. Teoksessa Hedman, K.; Heikkinen, T.; Huovinen, P.; Järvinen, A.; Meri, S. & Vaara, M. Infektiosairaudet. Mikrobiologia, immunologia ja infektiosairaudet, kirja 3. 1. painos. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim.
- Elo-Lehtonen E.; Rantakokko-Jalava K.; Lamminpää J. & Harju I. Bakteerien ja hiivojen identifiointi ja herkkyysmääritykset Vitek 2 -järjestelmällä. Työohje. 1.10.2008.
- EUCAST 2013. Relevant external documents. Viitattu 16.10.2013
http://www.eucast.org/documents/external_documents/.
- FiRe Standardi v. 6. 2009. Bakteriryhmäkohtaiset kommentit. Viitattu 30.10.2013
http://www.thl.fi/attachments/Fire/liite_5_bakteerikohtaiset_kommentit.pdf
- Gavin, P.; Suseno, M.; Thomson, R. Jr.; Gaydos, J.; Pierson, C.; Halstead, D.; Aslanzadeh, J.; Brecher, S.; Rotstein, C.; Brossette, S. & Peterson, L. 2006. Clinical Correlation of the CLSI Susceptibility Breakpoint for Piperacillin- Tazobactam against Extended-Spectrum- β -Lactamase-Producing Escherichia coli and Klebsiella Species. Antimicrobial Agents Chemotherapy. Vol 50, No 6/2006, 2244-2247.
- Gunell, M; Hakanen, A; Aittoniemi, J; Kauppila, J; Rantakokko-Jalava, K; Rissanen, A-M; Saha, K; Vaara, M; Vuento, R; Huovinen, P. & Nissinen, A. 2012. Mikrobilääkeresistenssi Suomessa. Finres 1997–2010. Raportti 67/2012. Tampere/Juvenes Print. Suomen Yliopistopaino. Viitattu 21.8.13 https://www.julkari.fi/bitstream/handle/10024/90830/URN_ISBN_978-952-245-767-7.pdf?sequence=1.
- Handal, T. & Olsen, I. 2002. Bakteerien resistenssi ja beetalaktamaasit. Suomen hammaslääkärilehti. No 6/2002, 276-336. Viitattu 14.10.2013
<http://www.digipaper.fi/hammaslaakarilehti/90490/index.php?pgnumb=9>.
- Hirsjärvi, S.; Remes, P. & Sajavaara, P. 2009. Tutki ja kirjoita. 15., uudistettu painos. Helsinki: Kustannusosakeyhtiö Tammi.
- Huovinen, P. & Vaara, M. 2011. Bakterilääkehoidon perusteet. Teoksessa Hedman, K.; Heikkinen, T.; Huovinen, P.; Järvinen, A.; Meri, S. & Vaara, M. Infektiosairaudet. Mikrobiologia, immunologia ja infektiosairaudet, kirja 3. 1. painos. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim.
- Huttunen, R. & Syrjänen, J. 2011. Milloin MRSA tai ESBL tulee huomioida sairaaloiden empiirisessä suonensisäisessä antibioottivalinnassa? TAYS Infektio. Ajankohtaisia infektioasioita. No 5/2011, 1-2. Viitattu 13.10.2011
<http://www.pshp.fi/download.aspx?ID=17855&GUID=%7B480D01DB-467C-4C05-ADBC-F51F714E6DE5%7D>.
- Huttunen, R.; Syrjänen, J. & Vuento, R. 2013. Resistentit bakteerit – haaste sairaalan jokaisessa potilaskontaktissa. Suomen Lääkäri lehti. Vol 68, No 13-14/2013, 993-999a. Viitattu 2.9.2013
http://www.laakarilehti.fi/files/nostot/nosto14_1.pdf.

- Jalava, J.; Rintala, E. & Lyytikäinen O. 2013a. ESBL-entsyymejä tuottavien enterobakteerien torjunta on syytä suunnitella uudella tavalla. Suomen Lääkärilehti. Vol 68, No 18/2013, 1329-1334a. Viitattu 2.9.2013
http://www.thl.fi/attachments/Infektiotaudit/ESBLn_torjunta_SLL2013.pdf.
- Jalava, J.; Rintala, E. & Lyytikäinen O. 2013b. Laajakirjoisia beetalaktamaaseja (ESBL) tuottavien enterobakteerien epidemiologia ja torjunta. Suomen sairaalahygienialehti. Vol 31, No 4/2013, 197-206. Viitattu 2.9.2013 http://www.sshy.fi/SSHYLehti_2013/Sahti_4_2013.pdf.
- Jalava, J.; Rissanen, A-M.; Vaara, M.; Kirveskari, J.; Järvinen, A.; Rantakokko-Jalava, K.; Hakkanen, A.; Österblad, M. & Bergman, M. 2011. Suositus ESBL:ää ja plasmidivälitteistä AmpC- β -laktamaasia tuottavien bakteerien diagnostiikasta. Versio 1.0. Viitattu 12.9.13
<http://www.thl.fi/thl-client/pdfs/d661615f-d0ea-4c20-9baa-e829929f753a>.
- Järvinen, A.; Huovinen, P. & Vaara, M. 2011a. Beetalaktaamit. Teoksessa Hedman, K.; Heikkinen, T.; Huovinen, P.; Järvinen, A.; Meri, S. & Vaara, M. Infektiosairaudet. Mikrobiologia, immunologia ja infektiosairaudet, kirja 3. 1. painos. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim.
- Järvinen, A.; Huovinen, P. & Vaara, M. 2011b. Bakteerilääkehoidon perusteet. Teoksessa Hedman, K.; Keikkinen, T.; Huovinen, P.; Järvinen, A.; Meri, S. & Vaara, M. Infektiosairaudet. Mikrobiologia, immunologia ja infektiosairaudet, kirja 3. 1. painos. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim.
- Kolho, E. 2005. Escherichia coli ja muut enterobakteerit. Teoksessa Hellsten, S. Infektioiden torjunta sairaalassa. 5. uudistettu painos. Suomen Kuntaliitto. Porvoo: WS Bookwell Oy.
- Leclercq, R.; Canto, R.; Brown, D. F. J.; Giske, G.; Heisig, P.; MacGowan, A, P.; Mouton, J. W.; Nordmann, P.; Rodloff, A. C.; Rossolini, G. M.; Soussy, C-J.; Steinbakk, M.; Winstanley, T. G. & Kahlmete, G. 2011. EUCAST expert rules in antimicrobial susceptibility testing. Clinical Microbiology and Infection. Vol 19, No 2/2013, 141-160. Viitattu 12.9.13
http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Expert_Rules/EUCAST-Expert-rules-v2-Clin_Microbiol_Infect_2013_19_141%E2%80%93160.pdf.
- Leino-Kilpi, H. & Välimäki, N. 2004. Etiikka hoitotyössä. 1.-2. painos. Juva: WSOY.
- Lyytikäinen, O.; Jalava, J. & Kirveskari, J. 2013. ESBL. Raportissa Jaakola, S.; Lyytikäinen, O.; Rimhanen-Finne, R.; Salmenlinna, S.; Vuopio, J.; Roivainen, M.; Nohynek, H.; Löflund, J-E.; Kuusi, M. & Ruutu, P. Tartuntataudit Suomessa 2012. Raportti 10/2013. THL. Tampere: Juvenes Print – Suomen yliopistopaino Oy. Viitattu 3.9.13
http://www.julkari.fi/bitstream/handle/10024/104475/URN_ISBN_978-952-245-890-2.pdf?sequence=1.
- Meurman, O. 2012. ESBL on väestötason ongelma. Suomen Sairalahygienialehti. Vol 30, No 4/2012, 180-186. Viitattu 2.9.13 http://www.sshy.fi/SSHYLehti2011_2012/sahti4_2012.pdf.
- Meurman, O. 2013. ESBL-määritys kaksoiskiekkotestillä. Työohje 15.2.2013.
- Männistö, P & Tuominen, R. 2007. Soluseinämää heikentävät bakteerilääkkeet. Teoksessa Koulu, M. & Tuomisto, J. Farmakologia ja toksikologia. 7. painos. Jyväskylä: Gummerrus Kirjapaino Oy.
- Nissinen, A. 2009. FiRe Standardi v. 6. Viitattu 1.9.2013
<http://www.thl.fi/attachments/Fire/kiekkomenetelma.pdf>.
- Pietarinen, J. 1999. Tutkijan ammattietiikka. Tutkijan ammattietiikan perusta. Viitattu 16.5.2013.
http://www.minedu.fi/export/sites/default/OPM/Julkaisut/1999/liitteet/tutkijan_ammattietiikka_99.pdf?lang=fi.

- Pincus, D. H. 2007. Microbial identification using the bioMérieux Vitek 2 system. Encyclopedia of Rapid Microbiological Methods. Viitattu 1.9.2013
https://store.pda.org/TableOfContents/ERMM_V2_Ch01.pdf.
- Raveh, D.; Yinnon, A.M.; Broide, E. & Rubensky, B. 2007. Susceptibilities of ESBL-Producing Enterobacteriaceae to Ertapenem, Meropenem and Piperacillin-Tazobactam with and without Clavulanic Acid. Abstract. Chemotherapy. Vol 53, 185–189. Viitattu 28.5.2013
<http://www.karger.com/Article/FullText/100516>.
- Rantakokko-Jalava, K. 2010. Mitä uutta herkkyyksissä? Luentomateriaali 31.12.2010.
- Rantakokko-Jalava, K. 2011. Moniresistentit mikrobit - mitä mikrobiologialla on tarjolla? Suomen Sairaalahygienialehti. Vol 29, No 3/2011, 117-122. Viitattu 11.9.13
http://www.sshy.fi/SSHYLEhti2011_2012/sahti3_2011.pdf.
- Riski, H-M. 2013. Opinnäytetyön loppuohjeistus. Luentomateriaali. 24.10.2013.
- Siitonen, A. & Vaara, M. 2010. Escherichia, Salmonella, Shigella ja Yersinia. Teoksessa Hedman, K.; Heikkinen, T.; Huovinen, P.; Järvinen, A.; Meri, S. & Vaara, M. Mikrobiologia. Mikrobiologia, immunologia ja infektiosairaudet, kirja 1. 1. painos. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim.
- THL 2013a. Laajasti antibiooteille vastustuskykyisen Klebsiellan (CPE-Klebsiella) aiheuttama osastoepidemia Puolarmetsän sairaalassa. Viitattu 14.10.2013
<https://blogi.thl.fi/web/infektiouutiset/etusivu/-/blogs/laajasti-antibiooteille-vastustuskykyisen-klebsiellan-cpe-klebsiella-aiheuttama-osastoepidemia-puolarmetsan-sairaalassa>.
- THL 2013b. Laajakirjoiset β -laktamaasit, ESBL. Viitattu 24.8.2013
http://www.thl.fi/fi_FI/web/infektiaudit-fi/resistenssigeenimaaritykset/esbl.
- THL 2013c. ESBL. Viitattu 2.9.2013 http://www.thl.fi/fi_FI/web/infektiaudit-fi/esbl.
- THL 2013d. Tutkimusryhmän esittely. Viitattu 11.9.2013
http://www.thl.fi/fi_FI/web/fi/tutkimus/hankkeet/fire/tutkimusryhman_esittely.
- Tiitinen, T & Terho, K. 2012. Lääkeresistenssin ehkäisy. Sairaanhoidajan käsikirja. Viitattu 4.9.13
http://www.terveysportti.fi.ezproxy.turkuamk.fi/dtk/shk/koti?p_haku=aseptiikka%20henkil%C3%B6hygieniassa.
- Tissari, P. & Anttila, V-J. 2010. Muu Enterobacteriae-heimo. Teoksessa Hedman, K.; Heikkinen, T.; Huovinen, P.; Järvinen, A.; Meri, S. & Vaara, M. Mikrobiologia. Mikrobiologia, immunologia ja infektiosairaudet, kirja 1. 1. painos. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim.
- TYKSLAB Ohjekirja. 2012. Resistentit gramnegatiiviset sauvat, viljely. Varsinais-Suomen sairaanhoitopiiri. Viitattu 10.9.13 <http://webohjekirja.mylabservices.fi/TYKS/11815.html>.
- Vauhkonen, I. & Holmström, P. 2005. Sepsis. Sisätaudit. 1. painos. Helsinki: Werner Söderström Osakeyhtiö.
- Vilka, H. 2005. Tutki ja kehitä. Helsinki: Kustannusosakeyhtiö Tammi.
- Vuento, R. & Lappalainen, M. 2013. Mikrobiologinen diagnostiikka. Therapia Fennica. Viitattu 11.9.2013 http://therapiafennica.fi/wiki/index.php?title=Mikrobiologinen_diagnostiikka.
- Vuopio, J. 2013. Resistentit sairaalabakteerit. Lääkäriin käsikirja. Viitattu 13.10.2013
http://www.terveysportti.fi.ezproxy.turkuamk.fi/dtk/ltk/koti?p_haku=virtsatieinfektio%20esbl.
- Wuorela, M. 2013. Virtsatieinfektiot. Lääkäriin käsikirja. Viitattu 13.10.2013
http://www.terveysportti.fi.ezproxy.turkuamk.fi/dtk/ltk/koti?p_haku=virtsatieinfektio.

Tyks-Sapa-liikelaitos/Tykslab

12.9.2013
Päätös T134/4/12.9.13**TUTKIMUSLUPA**
(Toimintasääntö § 15)

Tutkimuksen numero: T134/2013, 4/12.9.13

Tutkimuksen nimi: ***ESBL-Kantojen piperasilliini-tatsobaktaamiherkkyys-määrittäminen eri menetelmillä***

Tutkimuksen ajoitus 2013

Vastuullinen tutkija Seija Kirkko-Jakkola (TurkuAMK)
Opinnäytetyön suorittaja Anniina Toivonen ja Paula Lehtonen (TurkuAMK)

Tutkittavien lukumäärä -

Myönnän luvan yllä mainittuun tutkimukseen VSSHP:ssä. Edellytän, että tutkimuksesta ei aiheudu haittaa yksiköiden normaalille toiminnalle eikä muita kustannuksia sairaalalle.



Benita Paloheina
ylihoitaja

JAKELU Vastuullinen tutkija
Opinnäytetyön tekijä
TurkuCRC
Hoitotyön toimisto

Enterobacteriaceae

EUCAST Clinical Breakpoint Table v. 3.1, valid from 2013-02-11

Disk diffusion (EUCAST standardised disk diffusion method)
Medium: Mueller-Hinton agar
Inoculum: McFarland 0.5
Incubation: Air, 35±1°C, 18±2h
Reading: Read zone edges as the point showing no growth viewed from the back of the plate against a dark background illuminated with reflected light.
Quality control: *Escherichia coli* ATCC 25922

Antibiotic	MIC breakpoint (mg/L)		Disk content (µg)	Zone diameter breakpoint (mm)		Notes
	S ≤	R >		S ≥	R <	
Penicillins ¹						Numbers for comments on MIC breakpoints Letters for comments on disk diffusion
Benzylpenicillin	-	-	-	-	-	
Ampicillin	8 ¹	8	10	14 ^{A,B}	14 ^B	11A. Wild type Enterobacteriaceae are categorised as susceptible to aminopenicillins. Some countries prefer to categorise wild type isolates of <i>E. coli</i> and <i>P. mirabilis</i> as intermediate. When this is the case, use the MIC breakpoint S ≤ 0.5 mg/L and the corresponding zone diameter breakpoint S ≥ 50 mm.
Ampicillin-subactam	8 ²	8 ²	10-10	14 ^{A,B}	14 ^B	11A. Wild type Enterobacteriaceae are categorised as susceptible to aminopenicillins. Some countries prefer to categorise wild type isolates of <i>E. coli</i> and <i>P. mirabilis</i> as intermediate. When this is the case, use the MIC breakpoint S ≤ 0.5 mg/L and the corresponding zone diameter breakpoint S ≥ 50 mm.
Amoxicillin	8 ¹	8	-	Note ^C	Note ^C	2. For susceptibility testing purposes, the concentration of clavulanate is fixed at 2 mg/L.
Amoxicillin-clavulanate	8 ^{1,3}	8 ³	20-10	17 ^{A,B}	17 ^A	3. For susceptibility testing purposes, the concentration of clavulanate is fixed at 2 mg/L.
Piperacillin	8	16	30	20	17	4. For susceptibility testing purposes, the concentration of tazobactam is fixed at 4 mg/L.
Piperacillin-tazobactam	8 ⁴	16 ⁴	30-6	20	17	
Ticarcillin	8	16	75	23	23	
Ticarcillin-clavulanate	8 ³	16 ³	75-10	23	23	
Phenoxymethylpenicillin	-	-	-	-	-	
Oxacillin	-	-	-	-	-	
Cloxacillin	-	-	-	-	-	
Dicloxacillin	-	-	-	-	-	
Flucloxacillin	-	-	-	-	-	
Mecillinam (uncomplicated UTI only)	8 ⁵	8 ⁵	10	15 ^{E,F}	15 ^{E,F}	51E. Mecillinam (pivmecillinam) breakpoints relate to <i>E. coli</i> , <i>Klebsiella</i> spp. and <i>P. mirabilis</i> only. F. Ignore isolated colonies within the inhibition zone for <i>E. coli</i> .