

Mariam Guled

Salmonellan mikrobilääkeresistenssin seuranta:
Salmonella Enteritidis, *Salmonella* Typhimurium

Metropolia Ammattikorkeakoulu
Laboratorioanalyttikko (AMK)
Laboratorioalan koulutusohjelma
Opinnäytetyö
21.12.2012

Alkulause

Aluksi haluan kiittää Terveyden ja hyvinvoinnin laitosta mahdollisuudesta suorittaa opinnäytetyöni laitoksen bakteriologian laboratoriossa.

Haluan kiittää laboratoriopäällikkö Saara Salmenlinnaa opastuksesta opinnäytetyössäni, suuret kiitokset valtavasta tuesta, kannustuksesta sekä ohjauksesta, varsinkin opinnäytetyöni kirjoitusvaiheessa.

Osoitan kiitokseni myös opinnäytetyöni ohjaajalle lehtori Jarmo Palmille, olet ollut aina saatavilla ja antanut palautetta nopeasti.

Lisäksi haluan osoittaa sydämelliset kiitokset perheelleni, jolta olen saanut suuresti kannustusta ja tukea. Erityisesti lähellä sydäntäni on äitini, ilman hänen tukeaan opinnäytetyön tekeminen ei olisi ollut mahdollista, kuten ei moni muukaan asia elämässä.

Helsingissä 21.12.2012

Mariam Guled

<p>Tekijä Otsikko</p> <p>Sivumäärä Aika</p>	<p>Mariam Guled Salmonellan mikrobilääkeresistenssin seuranta: <i>Salmonella</i> Enteritidis, <i>Salmonella</i> Typhimurium</p> <p>36 sivua 21.12.2012</p>
<p>Tutkinto</p>	<p>Laboratorioanalyttikko (AMK)</p>
<p>Koulutusohjelma</p>	<p>Laboratorioalan koulutusohjelma</p>
<p>Ohjaajat</p>	<p>Laboratoriopäällikkö, FT Saara Salmenlinna Lehtori, FM Jarmo Palm</p>
<p>Mikrobilääkeherkkyyden määrittämisen tarkoituksena on saada selville, onko bakteeri resistentti antibiootille. Terveiden ja hyvinvoinnin laitoksen Bakteriologian yksikössä mikrobilääkeherkkyyden määrittäminen suolistobakteereilla on osa epidemiologista seurantaa. Herkkyysmäärityksen avulla tunnistetaan resistenssin muutoksia ja siten edistetään epidemiaselvityksiä.</p> <p>Vuodesta 2011 lähtien mikrobilääkeherkkyyismäärityksissä siirryttiin käyttämään EUCAST (The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) -ohjeistusta, jonka tarkoituksena on yhtenäistää antibioottiherkkyysrajoja Euroopassa. Herkkyysmääritykset tehdään kiekkomenetelmällä.</p> <p>Työn tarkoituksena oli analysoida ja vertailla potilaista eristettyjen salmonella-kantojen mikrobilääkeherkkyyttä ja estorenkaiden jakaumaa sekä arvioida, johtuivatko havaitut erot kantojen välisistä eroista vai menetelmästä johtuvista tekijöistä. Tutkittavat kannat olivat tammi - kesäkuulta 2011 ja 2012.</p> <p>Tutkimusaikana todettiin 130 <i>Salmonella</i> Typhimurium ja 480 <i>Salmonella</i> Enteritidis -tapaus. Suurin osa kannoista tuli ulkomailta. Kotimaiset kannat olivat herkempiä antibiooteille. Tutkimuksessa havaittiin, että resistenttien <i>S. Typhimurium</i> -kantojen määrä on kasvanut seuraaville antibiooteille: ampisilliini, kloramfenikoli ja kefotaksiimi. Huolestuttavin havainto oli nalidiksiinihapolle resistenttien <i>S. Enteritidis</i> -kantojen määrän kasvu.</p> <p>Kontrollikantojen kuvaajissa on ollut poikkeamia sekä 2011 että 2012. Ainoastaan kolmella antibiootilla (kahdestatoista) kontrollikannan mittaukset sijoittuivat vaihteluväliarvojen sisäpuolelle. Loput kontrollin mittaustuloksista osuivat myös vaihteluvälin ulkopuolelle. Osalla antibiooteista kontrollikannan estorenkaiden jakaumat olivat hieman muuttuneet vuodesta 2011 vuoteen 2012. Samanlaista jakauman siirtymistä esiintyi myös potilaskannoilla. Menetelmästä johtuvaa syytä siirtymiin ei löytynyt.</p>	
<p>Avainsanat</p>	<p>Salmonella, antibioottiherkkyysmääritys, kiekkomenetelmä</p>

Author Title	Mariam Guled Salmonella antimicrobial resistance surveillance: <i>Salmonella</i> Enteritidis ja <i>Salmonella</i> Typhimurium
Number of Pages Date	36 pages 21 Dec 2012
Degree	Bachelor of Laboratory Services
Degree Programme	Laboratory Sciences
Instructors	Saara Salmenlinna, M.Sc., Ph.D Jarmo Palm, Senior lecturer
<p>Antimicrobial susceptibility testing aims to determine bacterial resistance to antibiotic treatment. At the Bacteriology Unit, at the Institute for Health and Welfare, determination of antimicrobial susceptibility of intestinal bacteria is part of epidemiological surveillance. The aim is to identify and register changes in resistance to antimicrobial agents.</p> <p>Since the beginning of 2011, antimicrobial sensitivity determination was switched over to using EUCAST (The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) guidelines. The guidelines are designed to standardize antibiotic sensitivity limits in Europe. Sensitivity analyses are performed with the disk method.</p> <p>The purpose of the current study is to analyze and compare antimicrobial sensitivity of the control strain and of patient <i>Salmonella</i> strains. Also we also evaluated whether the observed differences were due to differences between the strains or due to method related factors. The strains studied were isolated between January-June 2011 and 2012.</p> <p>During the study period 130 <i>Salmonella</i> Typhimurium and 480 <i>Salmonella</i> Enteritidis cases were identified and registered. Most of the strains were isolated from patients returning from abroad. Domestic strains were found to be more sensitive to antibiotics. Our results show that <i>S.</i> Typhimurium resistance rates have increased to the following antibiotics: ampicillin, chloramphenicol and cefotaxime. <i>S.</i> Enteritidis strains resistant to nalixidic acid have increased, which was a worrying trend.</p> <p>Control strain graphs showed deviation both in 2011 and in 2012. Only three (out of twelve) graphs were within the normal range. The rest of the results were deviated in the same direction. The there was slight change in the distribution of blocking rings of control strains for some antibiotics from 2011 to 2012. A similar change is also seen in patient strains. Methodological reasons for the change were not found.</p>	
Keywords	Salmonella, antimicrobial susceptibility, disk diffusion test

Sisällys

1	Johdanto	1
2	Salmonella	2
3	Mikrobilääkkeet	5
	Vaikutustavat	5
4	Mikrobilääkeresistenssi	7
4.1	Resistenssin synty	7
4.2	Resistenssin yleistyminen ja leviäminen	8
5	Mikrobilääkeresistenssin seuranta	10
6	Mikrobilääkeherkkyysmäärittäminen	11
7	Työn tavoite	12
8	Työn menetelmät, materiaalit ja toteutus	12
8.1	Kiekkomenetelmä	12
8.2	Tietojärjestelmä	13
8.3	Työn toteutus	15
8.4	Estorenkkaan mittaus	18
8.5	Laadunvarmistus	19
9	Tulokset ja tulosten tulkinta	21
9.1	<i>S. Enteritidis</i> ja <i>S. Typhimurium</i> : tartuntatapaukset ja resistenssi	22
9.2	<i>E. coli</i> -kontrollikannan estorenkaiden halkaisijoiden (ERH) jakauma	24
9.3	Muutokset <i>S. Enteritidis</i> in ERH -jakaumassa	26
9.4	Muutokset <i>S. Typhimurium</i> in ERH -jakaumassa	28
10	Päätelmät	32
	Lähteet	34

1 Johdanto

Suolistobakteerien aiheuttamien ripulitautien hoidossa perusterveillä potilailla ei yleensä käytetä mikrobilääkkeitä. Joskus lääkehoito on kuitenkin tarpeellista. Mikrobilääkeherkkyyttä määrittämällä voidaan havaita muutoksia mikrobin kyvyssä vastustaa mikrobilääkkeitä. Mikrobilääkeherkkyyden määrittäminen on myös osa suolistobakteerien epidemiologista seurantaa. Määrittämisen tarkoituksena on saada selville, onko bakteeri resistentti antibiootille. Terveiden ja hyvinvoinnin laitoksessa on testattu salmonellojen lääkeherkkyyttä jo 70-luvulta saakka. [1.]

Salmonellat olivat vuoteen 1999 asti yleisin ja 2000-luvulla toiseksi yleisin ihmisen suolistotulehduksen aiheuttaja Suomessa. Suomessa todetuista salmonelloositapauksista suurin osa liittyy ulkomaamatkailuun. [1; 2, s. 12.]

Salmonellojen mikrobilääkeherkkyys on huonontunut viime vuosien aikana. Erityisesti resistenssi fluorikinoloniryhmän lääkkeille on kasvanut. Marianne Gunellin väitöstutkimuksen mukaan Kaakkois-Aasiasta on löytynyt entistä enemmän fluorokinoloniantibiooteille vastustuskykyisiä salmonellakantoja. 1990-luvulla lähes kaikki salmonellat olivat herkkiä fluorokinoloneille, kun taas 2000-luvulla yli puolet on vastustuskykyisiä. Salmonellojen resistenssiominaisuus siirtyy erittäin helposti salmonellasta toiseen. [3.]

Terveiden ja hyvinvoinnin laitoksen bakteriologian yksikössä tehdään bakteerien herkkyysmäärittäksiä antibioottiresistenssin kehittymisen seurantaa ja epidemiologisia selvityksiä varten. Vuodesta 2011 lähtien on käytetty EUCAST (The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) -ohjeistusta. EUCASTin tarkoituksena on yhtenäistää antibioottiherkkyysrajoja Euroopassa. Vuonna 1992 perustettu Suomalainen mikrobilääkeresistenssin seurantaverkosto (FiRe, Finnish Study Group for Antimicrobial Resistance), Tartuntatautirekisteri (TTR) ja Sairaala-infektiohjelma (Siro) yhdessä THL:n asiantuntijalaboratorioiden kanssa seuraavat mikrobilääkeresistenssiä Suomessa. [4; 5.]

2 Salmonella

Enterobacteriaceae-heimoon kuuluva salmonella on tärkeä patogeeni. Se on gramnegatiivinen, fakultatiivisesti anaerobinen sauvabakteeri, joka ei kuulu ihmisen suoliston normaaliflooraan. [6, s. 112 - 114.]

Salmonellat jaetaan kahteen lajiin: *Salmonella enterica* ja *Salmonella bongori*. Biokemiallisten reaktioiden perusteella *Salmonella enterica* voidaan jakaa kuuteen alalajiin. *S. enterica* ssp. *enterica* sisältää tunnetuimmat serotyypit. *Salmonella* Typhi-serotyyppi aiheuttaa lavantaudin, Paratyphi-serotyyppi aiheuttaa pikkulavantaudin ja Typhimurium-serotyyppi aiheuttaa hiirilavantaudin. [7; 8.]

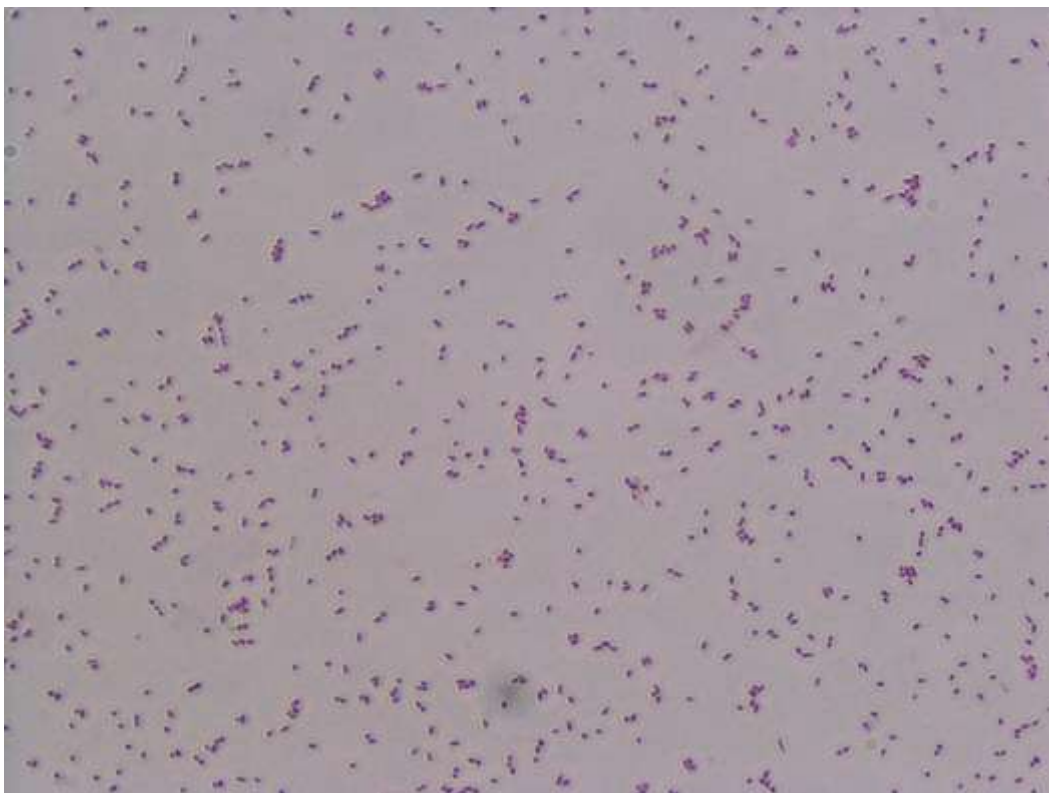
Tavallisesti salmonellat nimetään serotyypin mukaan esim. *S. Enteritidis*. Tarkempi nimi olisi *S. enterica* subsp *enterica* serovar *Enteritidis*. Salmonellasta tunnetaan yli 2 500 serotyyppiä, ja niistä kaikki voivat aiheuttaa taudin ihmiselle. Salmonellat ovat luonnostaan herkkiä antibiooteille. Salmonellojen mikrobilääkeherkkydessä on tapahtunut muutos huonompaan lähivuosien aikana. Varsinkin maissa, joissa rehuihin lisätään antibiootteja tai joissa mikrobilääkkeitä on saatavana ilman reseptiä, tavataan suhteellisen runsaasti R-plasmidivälitteistä resistenssiä. Suomessa mikrobilääkkeiden harkitun käytön ansiosta salmonellakantamme ovat usein herkkiä mikrobilääkkeille. Tavaroiden ja elintarvikkeiden vapaalla liikkumisella ja matkailulla on saattanut olla osuutta epidemioihin, joiden aiheuttajana on ollut moniresistentti salmonellakanta. [7, s. 256; 9, s. 184 - 190.]

Salmonellat jaetaan serotyyppeihin niiden ulkopinnalla olevien O- ja H- antigeenien perusteella. Bakterisolun pinnassa olevan lipopolysakkaridin (LPS) sokeriketjusta muodostunutta osaa kutsutaan O-antigeeniksi. Kanta on normaalia eli smooth (S) -muotoa, jos sokeriketjut ovat täydellisiä, jos taas niitä puuttuu joko osittain tai kokonaan, on kanta rough (R) -muotoa. Salmonellat pystyvät liikkumaan värekarvojensa eli flagellojensa avulla aktiivisesti. H-antigeeni sijaitsee bakteerin värekarvojen pinnalla. O- ja H-antigeenien olemassaolo todetaan antigeeni-vasta-aine-

agglutinaatio-testillä [9, s. 184 - 190]. Harvoilla Salmonelloilla, kuten *S. Typhi*, on kapseli. Sen kapseli on polysakkaridia jota kutsutaan Vi – (virulenssi)antigeeniksi.

Salmonella-kannat voidaan alatyypittää tartuntalähteiden selvittämiseksi. Faagityyppi määräytyy sen mukaan, miten kanta reagoi spesifiselle bakteriofaagille. Salmonellan genotyypin määrittäminen tehdään esim. pulssikenttägeelielektroforeesilla (PFGE). Genotyypityksessä vertaillaan saman lajin bakteerikantojen genomeja toisiinsa. Geneettisesti samanlaiset kannat eivät eroa toisistaan. Menetelmää käytetään epidemiologisessa tutkimuksessa, jossa vertaillaan samaan serotyyppiin tai faagityyppiin kuuluvia kantoja keskenään. Pulssikenttäelektroforeesissa kustakin kannasta saadaan geneettinen sormenjälki, jota voidaan vertailla toisiin kantoihin. [8; 9, s.184 - 190; 10; 11; 12.]

Salmonelloosi on *Salmonella*-sukuun kuuluvan suolistobakteerin aiheuttama tauti (kuva 1) [1]. Ihmiselle salmonellat voivat aiheuttaa vakavia yleis- ja suolistoinfektioita. Salmonellan itämisaika on 12–72 tuntia, ja se aiheuttaa yleensä ripulia, kuumetta ja vatsakramppeja. Infektio-oireet kestävät 4-7 päivää, ja yleensä ihminen parantuu taudista ilman hoitoja. Joskus salmonella voi aiheuttaa vakavia, sairaalahoitoa vaativia oireita. Yleistyneet salmonellainfektiot sekä lavantauti että pikkulavantauti hoidetaan mikrobilääkkeellä. Näillä potilailla salmonellainfektio on levinnyt verenkiertoon ja sitä kautta muualle kehoon ja voi johtaa kuolemaan ilman nopeaa ja oikeanlaista hoitoa. Salmonella on erityisen vaarallinen vanhuksille, pikkulapsille ja niille, joilla on heikentynyt immuunisysteemi. [13; 14, s. 256; 6, s. 112 - 114.]



Kuva 1. Salmonella (kuvan ottaneet Mariam Guled ja Lotta Siira).

Suomessa todetaan 2000 - 3000 tartuntatapausta vuodessa. Vuonna 2011 ilmoitettiin noin 2100 salmonellatartuntatapausta. Kotimaisia tapauksia näistä oli yli 300 (18 %), ulkomailla saatuja tartuntoja todettiin noin 1600 ja 150 (7 %) tapauksessa tartunnan alkuperä ei ollut tiedossa. Yleisimmät *Salmonella*-serotyypit vuonna 2011 Suomessa olivat Typhimurium, Enteritidis, Oranienburg ja ryhmä B. Ulkomaisista tapauksesta yleisin serotyyppi on *S. Enteritidis* ja yleisin tartuntamaa oli Thaimaa. [2, s. 12.]

3 Mikrobilääkkeet

Mikrobilääke eli usein yleiskielessä sanottuna antibiootti on mikrobeja tappava tai niiden kasvua ja lisääntymistä hidastava tai estävä lääke, joko toisen mikrobin tuottama tai teollisesti valmistettu yhdiste.

Bakteerilääkkeen keksiminen on mullistanut terveydenhuollon ja lisännyt ihmisen eliniän odotetta kymmenellä vuodella. Ensimmäinen kliinisesti merkittävä bakteerilääke oli sulfavalmistite Prontosilin, jonka tehon Gerhard Domagk havaitsi vuonna 1932. Prontosililla oli hyvä teho sen ajan tappaviin tauteihin, kuten lapsivuodekuumeeseen ja aivokalvontulehdukseen. Penisilliinin kehittäminen on kuitenkin jättänyt sulfonamidit varjoonsa. Vuonna 1929 Alexander Fleming havaitsi sattumalta *Penicillium notatum*-homesienen estävän stafylokokkien kasvua bakteerimaljalla. Kuitenkin penisilliinillä hoidettiin potilasta ensimmäisen kerran vasta vuonna 1942. [6, s. 112 - 114.]

Toinen maailmansota vauhditti bakteerilääkkeiden kehitystyötä. Bakteerilääkkeiden kehitystyö hidastui 1980-luvun jälkeen. Tämä johtui osittain siitä, että markkinoilla oli tehokkaita bakteerilääkkeitä. Kehitystyön hidastumisen tärkein syy on kuitenkin se, että on vaikea löytää uusia yhdisteitä. Viimeisten parinkymmenen vuoden ajan on tullut vain muutamia uusia bakteerilääkkeitä, mutta jo olemassa olevista bakteerilääkkeistä on kehitelty uusia johdannaisia. Tähän joukkoon kuuluvat mm. nalidiksiinista kehitetyt fluorokinolit sekä kefalosporiinit, joista on saatu neljänteen polveen asti lääkkeitä. [6, s. 112 - 114.]

Vaikutustavat

Mikrobilääkkeiden perusedellytys on, että lääke on selektiivisesti toksinen. Mikrobilääkkeiden selektiivisyys perustuu prokaryoottien ja eukaryoottien välisiin eroihin. Esim. beetalaktaamirakenteisten mikrobilääkkeiden vaikutus kohdistuu bakteerien soluseinämän peptidoglykaanin biosynteesin estoon [6, s. 112 - 114; 15]. Vastaavaa rakennetta ei ole eukaryoottisoluilla, minkä vuoksi beetalaktaamit ovat lähes ihanteellisia lääkeaineita.

Bakterisidiset lääkkeet kykenevät tappamaan bakteereita. Bakteriostaattinen mikrobilääke estää bakteereita kasvamasta ja lisääntymästä, mutta ei tapa sitä. Bakteerien kasvu voi näin ollen jatkua, jos lääkkeen pitoisuus alenee. Laajakirjoiset mikrobilääkkeet vaikuttavat suureen joukkoon grampositiivisia ja -negatiivisia bakteereita, lääkkeen laaja kirjo ei vaikuta tehokkuuteen. Useat lääkkeet ovat kapeakirjoisia ja oikeassa käytössä erittäin tehokkaita. [15.]

Useammat mikrobilääkkeet voidaan luokitella vaikutusmekanisminsa perusteella neljään ryhmään: soluseinämän peptidoglykaanisynteesiä estävät aineet, proteiinisynteesin translaatiiovaihetta estävät aineet, nukleiinihappojen synteesiä estävät aineet ja bakteerin sytoplasmakalvoa vaurioittavat aineet. [6 s. 112 - 114; 15.]

Beetalaktaamiantibiootit estävät soluseinämän peptidoglykaanisynteesiä. Beetalaktaamiantibiootit sitoutuvat soluseinää rakentaviin entsyymeihin substraatin tavoin ja häiritsevät bakteerien soluseinämän muodostumista. Tetrasykliinit estävät proteiinisynteesin translaatiiovaihetta. Ne estävät bakteerien valkuaisainetuotannon muuttamalla reversiibelisti ribosomin muotoa siten, että aminohappo-tRNA ei pysty tarttumaan kiinni ribosomiin. Fluorokinolit ovat bakterisidisiä ja estävät nukleiinihappojen synteesiä estämällä DNA:n kahdentumisen sitoutumalla DNA-gyraasin A-alayksikköön. Eukaryoottisolulla ei ole DNA-gyraasia, joten ne eivät ole herkkiä fluorokinoleille. Bakteerin sytoplasmista kalvoa vaurioittavia aineita käytetään vähän, koska useimmat ovat toksisia myös eukaryoottisoluille, kuten peptidiantibiootteihin kuuluva polymyksiini. Ne pystyvät sitoutumaan bakteerien ulkokalvon lipopolysakkaridiin. Vaurioitettuaan ulkokalvoa ne tunkeutuvat solulimakalvoon rikkoen sen. [15; 16.]

4 Mikrobilääkeresistenssi

Mikrobilääkkeiden kehitys on mahdollistanut mm. tekonivelkirurgian, elinsiirrot, tehohoidon ja sytostaattihoidot. Mikrobit löytävät kuitenkin keinoja estää lääkkeiden vaikutukset ja ovatkin kehittäneet vastustuskyvyn monille tunnetuille lääkkeille. Antibioottiresistenssin merkitys kasvaa, ja siihen pyritään puuttumaan sekä sairaalahygieniasa, lääkkeiden käytön ohjeistuksessa, että sairaaloiden tavoiteasettelussa. Suomen sairaaloiden antibioottiresistenssitilanne on maailmanlaajuisessa vertailussa hyvä. Valtaosa antibioottilutuksesta tapahtuu avohoidossa. Pääpaino torjunnassa pyritään suuntaamaan resistenssitilanteen luotettavaan seurantaan, antibioottien kriittiseen käyttöön ja resistenssin leviämisen hidastamiseen sairaalahygienian keinoin. Resistenssiä aiheuttaa antibioottien runsas käyttö. Resistenttejä kantoja syntyy sekä sairaalassa että sairaaloiden ulkopuolella.

Sairaalassa hoidettavien potilaiden puolustuskyky on heikko, ja he ovat alttiita sairaalainfektioille. Sairalainfektioita aiheuttavat virulenttien mikrobien lisäksi ns. opportunistimikrobit. Nämä säilyvät hengissä sairaalaympäristössä, adheroituvat esineisiin ja vastustavat antibiootteja ja desinfiointiaineita. Näitä ovat mm. koagulaasinegatiiviset stafylokokit, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter*-lajit, *Enterobacter*-lajit, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Burkholderia cepacia* ja *Corynebacterium jeikeium*. Nämä lajit ovat osa potilaan normaalimikrobistoa, siirtyvät potilaaseen ympäristön kautta ja kolonisoivat potilasta aiheuttaen infektioita. [17.]

4.1 Resistenssin synty

Bakteerit voivat olla luonnostaan resistenttejä lääkeaineille. Resistenssiominaisuus voi syntyä eri tavoin: 1) bakteerit voivat tuottaa antibioottia hajottavia entsyymejä, 2) mikrobilääkkeen vaikutuskohta voi muuttua, 3) solukalvon permeabiliteetti voi muuttua, 4) mikrobi voi tehostuneesti poistaa antibioottia sisältään tai 5) mikrobi voi kiertää lääkkeen vaikutuskohteena olevan metaboliavaiheen [17].

Mikrobien kyky ottaa ja luovuttaa geneettistä materiaalia toisiltaan on yksi tapa hankkia resistenssi. Hitaampi tapa on spontaanien mutaatioiden kautta kehittynyt resistenssi. Indusoituvaksi resistenssiksi kutsutaan piilevää resistenssiominaisuutta, joka ei tule ilmi ilman antibioottia. Resistenssin kehittymisen edellytyksenä on antibiootille altistuminen. Antibioottien läsnä ollessa herkäät alaryhmät kuolevat ja resistentit ryhmät valikoituvat vallitseviksi. Tällainen ominaisuus tulee esille myös herkkyyismäärityksissä.

Mikrobien DNA:n replikaatiossa tapahtuu mutaatioita noin 10^{-9} - 10^{-10} frekvenssillä geeniä kohti. Replikaatiovirheet aiheuttavat usein mikrobin heikkenemisen, mutta jotkut virheet saattavat edesauttaa vahvemman mikrobin kehittymisen. Esimerkiksi mutaatio antibiootin sitoutumiskohdassa voi johtaa lääkeaineen tehon alenemiseen. Mikrobi voi siirtää geneettistä materiaalia myös konjugaatiolla ja horisontaalisesti mikrobista toiseen, plasmidien tai bakteriofaagien avulla. [17.]

4.2 Resistenssin yleistyminen ja leviäminen

1960-luvulla Lontoossa resistentit mikrobit olivat vielä harvinaisia. Ne yleistyivät merkittävästi antibioottien käytön yleistymisen myötä. 1980-luvulla huomattiin Hongkongissa, että bakteerien resistenssi ja moniresistentit kannat yleistyivät sairaaloissa. Resistenttejä kantoja esiintyy sairaaloissa, sairaalankaltaisissa ympäristöissä ja myös sairaaloiden ulkopuolella. Edellytys resistenssin kehittymiselle on altistuminen antibiootille (antibioottipaine).

Sairaalaympäristöissä mikrobi voi levitä monella eri tavalla. Uusi potilas voi tuoda mukanaan uuden resistentin mikrobin, mikrobi voi myös kulkeutua työntekijän tai kontaminoituneen välineen kautta. Tarvittavat torjuntatoimenpiteet suunnitellaan riskitekijöiden perusteella.

Tärkeimmät leviämistavat ovat resistentin kannan leviäminen potilaasta toiseen tai resistentin mikrobin valikoituminen mikrobilääkehoidon aikana. On epätodennäköisempää, että resistentti mikrobikanta syntyy jatkuvasti uudelleen.

Todennäköisempää on, että jo resistenssin omaava kanta leviää ympäristöön. Yleinen leviämistie on henkilökunnan käsien välityksellä. Teho-osastoilla, joilla on vaikeasti hoidettavia potilaita ja paljon fyysisiä kontakteja, resistenttejä kantoja todetaan useammin kuin muualla. Resistenttejä kantoja todetaan usein myös mm. vastasyntyneiden osastoilla, palovammaosastoilla ja osastoilla, joilla potilaalle joudutaan antamaan useita peräkkäisiä antibioottihoitoja. [17.]

Antibioottiresistenssi on lisääntynyt myös avohoidossa, sairaaloiden ulkopuolella. Viime vuosina huolta ovat herättäneet esim. laajakirjoisia beetalaktamaaseja tuottavat (ESBL) gramnegatiiviset sauvabakteerit. Näitä ovat esim. osa *Eschericia coli* ja *Klebsiella pneumoniae* -kannoista. Erityisesti *E. coli* -kannassa esiintyvä ESBL on plasmidivälitteinen resistenssiominaisuus. ESBL antaa resistenttien beetalaktaamiaantibioteille, mukaan lukien kolmannen polven kefalosporiinit, ja heikentää merkittävästi antibiootin tehoa.

ESBL-kannat leviävät matkailun ja ruuan välityksellä. Antibioottien kontrolloimattomalla käytöllä ja jätevesien puutteellisella käsittelyllä on merkitystä ESBL-kantojen lisääntymisessä. ESBL-kantojen lisääntyminen luonnossa johtuu valintapaineesta, jota ylläpitävät luontoon päässeet antibiootit. ESBL-kantoja on viime vuosina löydetty enemmän myös sairaalahoidossa olevilta potilailta. Tämä ei kuitenkaan ole merkki siitä, että ESBL-tartunnat sairaaloissa olisivat lisääntyneet vaan siitä, että yhä suurempi osa sairaaloihin tulleista potilaista on ESBL-kantajia. Valtaosa ESBL-kantojen aiheuttamista infektioista on endogeenisiä virtsatieinfektioita. [17 - 18.]

5 Mikrobilääkeresistenssin seuranta

FiRe (Finnish Study Group for Antimicrobial Resestance) on suomalainen mikrobilääkeresistenssiä tutkiva ryhmä, jonka muodostavat kliinisen mikrobiologian laboratoriot yhdessä THL:n kanssa. FiRe perustettiin vuonna 1992 ja sen ensisijainen tehtävänä on tuottaa kliinisesti tärkeiden mikrobien lääkeresistenssilastot [19; 20]. Tehtävää varten ylläpidetään menetelmästandardia, joka validoitiin kaikissa FiRe-laboratorioissa. Vuonna 2009 FiRe siirtyi FiRe-standardista (joka nojautui täysin amerikkalaiseen CLSI-standardiin) EUCAST-standardiin.

Euroopan unionin alaisena toimiva Euroopan tautien ehkäisy- ja -valvontakeskus (ECDC) tekee yhteistyötä EU-toimielinten ja jäsenvaltioiden kanssa. ECDC kerää tietoja merkittävimmistä tartuntataudeista jäsenvaltioiltaan, ja laatii niistä koko Euroopan kattavan tilaston tartuntatautien esiintymisestä, samoin kuin myös HIV:n/aidsin ja tuberkuloosin tilanteesta. ECDC:n tavoitteena on parantaa Euroopasta saatavien tietojen luotettavuutta ja vertailtavuutta yhdenmukaistamalla tietojen keruuta. ECDC kerää tietoa myös mikrobilääkeresistenssistä. [21.]

Sairaalainfektio-ohjelman (Siro) tarkoitus on auttaa sairaalainfektioiden seuraamisessa ja torjumisessa sairaaloissa. Siro kerää tietoa ja seuraa infektioiden esiintymistä Suomen sairaaloissa. [5.]

6 Mikrobilääkeherkkyysmäärittäminen

Mikrobilääkeherkkyysmäärittäminen tarkoittaa sitä, onko tutkittava bakteeri lääkkeen sietokyvyltään normaali vai onko sillä merkittävästi normaalia korkeampi sietokyky. Merkittävästi normaalia korkeamman sietokyvyn omaavaa bakteeria kutsutaan resistenssiksi.

Eri laboratorioissa on erilaisia menetelmiä, joilla voidaan osoittaa bakteerikannan lääkeherkkyys. Yhteistä menetelmille on, että niillä mitataan bakteerin kykyä lisääntyä lääkkeen läsnä ollessa. Kvantitatiivisissa testeissä bakteeri altistetaan lääkkeelle portaittain. Tällaisia ovat agar-diffuusioon perustuvat kiekkomenetelmät ja kaupallinen E-testi, joissa bakteeria altistetaan jatkuvasti kasvavalla pitoisuudella. Malja- ja liuoslainennosmenetelmillä sekä E-testillä saadaan tulokseksi pienin estävä bakteerilääkepitoisuus eli MIC-arvo. Näiden yleiskäyttöisten menetelmien lisäksi voidaan tutkia resistenssimekanismeja, resistenssistä vastuussa olevaa proteiinia tai geeniä.

Bakteerien vastustuskyky on lisääntynyt kaikkialla maailmassa kuluneen parinkymmenen vuoden ajan. Kliinisen mikrobiologian laboratorion tehtävänä on määrittää bakteerien antibioottiresistenssi. Antibioottiherkkyysmäärittäminen avulla seurataan bakteerilajien resistenssin kehittymistä. [22.]

7 Työn tavoite

Tavoitteena oli vertailla *Salmonella* -potilaskantojen mikrobilääkeresistenssiä ja estorenkaiden jakaumaa tammi - kesäkuulta 2011 ja 2012 THL:n Bakteriologian yksikössä jo määritettyjen salmonellakantojen osalta. Työssä tutkittiin oliko kantojen kiekkoherkkyysmäärittämisessä saatujen estorenkaiden halkaisijoiden millimetreissä eroja kahden vuoden välillä. Jos merkittäviä eroja havaittiin, pyrittiin selvittämään mistä ero voisi johtua. Tavoitteena oli myös analysoida mahdollisia muutoksia *E. coli* -kontrollikannan estorengasjakauksessa samalla ajanjaksolla. Lisäksi tavoitteena oli hyödyntää Bakteriologian yksikön uutta laboratoriotietojärjestelmää herkkyystulosten analysoinnissa.

8 Työn menetelmät, materiaalit ja toteutus

8.1 Kiekkomenetelmä

Kiekkomenetelmä on yksi vanhimpia tapoja määrittää bakteerin kykyä lisääntyä lääkkeen läsnä ollessa. Tasaisesti viljellyn maljan pinnalle asetetaan tasaisin välein bakteerilääkekiekkoja; kiekosta diffundoituva bakteerilääke estää bakteerin kasvun kiekon ympäriltä sitä suuremmalta alueelta, mitä herkempi bakteeri on lääkkeelle. Agardiffuusioon perustuva kiekkomenetelmä on helppo suorittaa teknisesti. Tulosten luku ei kuitenkaan ole aina helppoa.

Työssä käytetyn EUCAST-menetelmän perusperiaate on määritelty "International Collaborative Study" -raportissa, 1972. Raportissa on pohdittu perusteellisesti kiekkomenetelmän keskeisiä tekijöitä. Menetelmässä bakteerin herkkyys kvantitoidaan estorenkaiden halkaisijan avulla. Saatua millimetrlukemaa verrataan raja-arvoihin, jotka perustuvat MIC:n (Minimal Inhibitory Concentration) luonnollisen logaritmin ja estorenkaiden halkaisijan (ERH) väliseen lineaariseen riippuvuussuhteeseen. MIC-arvo on pienin bakteerilääkkeen pitoisuus, joka tietyissä olosuhteissa pystyy estämään bakteerin kasvun.

Kansainvälisesti käytetty SIR-järjestelmä jakaa raja-arvot kolmeen herkkyysluokkaan. SIR-järjestelmä erottaa resistentin (R, resistant) bakteerin herkästä (S, susceptible) bakteerista, ja näiden luokkien väliin on määritelty välialue (I, indeterminate tai intermediate). Tämä välialue on määritelty noin 5 mm leveäksi alueeksi, joka toimii puskurivyöhykkeenä estäen menetelmän epätarkkuudesta johtuvat virhetulkinnat. [22.]

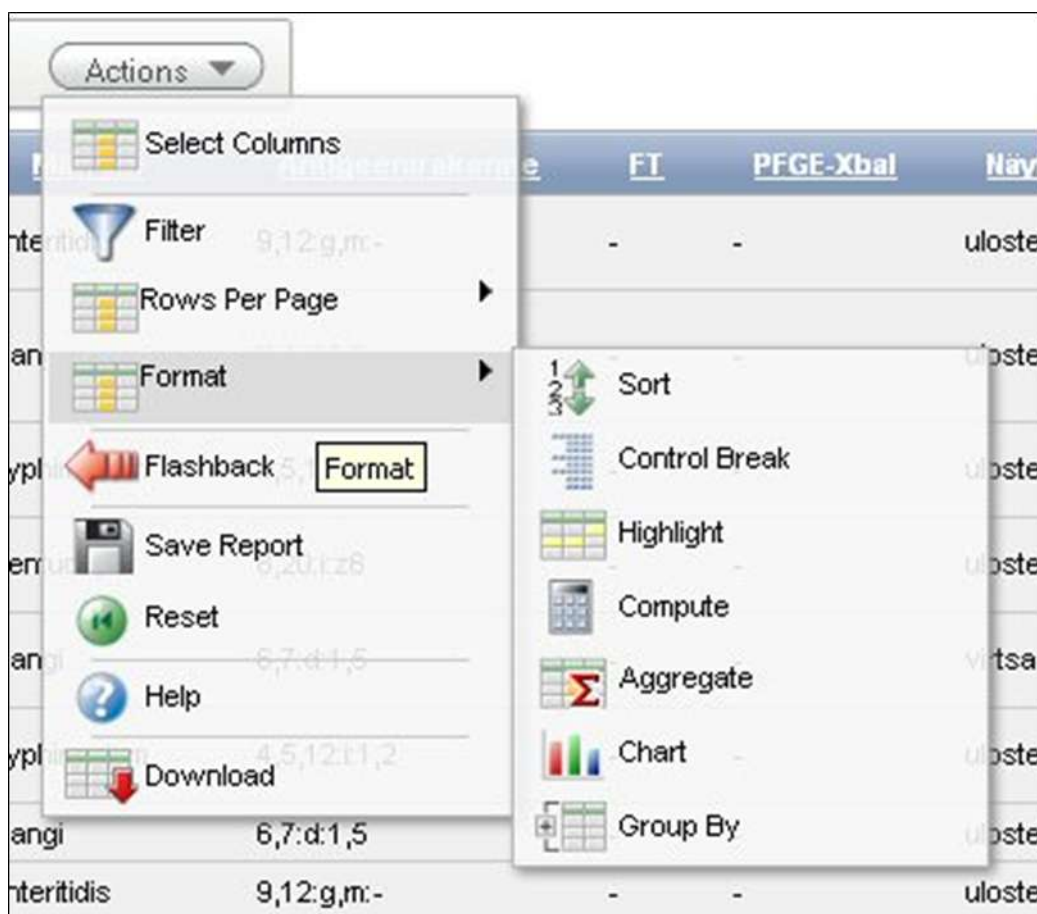
8.2 Tietojärjestelmä

Yksikössä on käytössä THL:ssä kehitetty Oracle 10-pohjainen laboratoriotietojärjestelmä. Järjestelmään kirjataan THL:n laboratorioon lähetetyt näytteeseen tai kantaan liittyvät potilaan henkilötiedot sekä näytteelle tai kannalle tehdyt tutkimusmenetelmät ja niiden tulokset. Järjestelmää käytetään tutkimuspyyntöjen, -tulosten ja -vastausten tallentamiseen, epidemiaseurantaan, raportointiin ja tutkimukseen [23]. Vastaamisen jälkeen kantaan liittyvät henkilötiedot sekä sovitut analyysitulokset siirtyvät sähköisesti laboratoriotietokannasta tartuntatautirekisteriin.

Kiekkoherkkyysmäärittämisessä tietojärjestelmään tallennetaan mitattu estorenkään halkaisija millimetreinä. EUCAST-standardin raja-arvojen avulla lasketaan tulkinta (S/I/R). Ohjelma antaa raja-arvojen perusteella bakteerin herkyyden (S, I tai R) kullekin antibiootille. [23.]

Laboratoriojärjestelmässä on raporttipohjia, joista oletusarvoja muokkaamalla ja tietoja suodattamalla voidaan luoda raportteja eri tarkoituksiin. Analyysin kohteena olivat seuraavat salmonellan serotyypit: *S. Typhimurium* ja *S. Enteritidis*.

Herkkyystuloksien analyysissä hyödynnettiin Actions-työkalun (kuva 2) muokkaustoimintoja. Filtterin avulla voidaan haku rajata mm. haluttuun mikrobiin, näytteenottopäivään ja tartuntamaahan ja sen avulla voidaan poistaa duplikaatit.



Kuva 2. Actions-linkin toiminnot [24].

Tässä työssä käytettiin vain potilaskantoja. Nämä kannat saatiin tietokannasta suodattamalla pois ne kannat (eläimistä, elintarvikkeista), joilla ei ollut henkilötunnuksen kohdalla merkintää.

Käytössä ollut tietokanta oli laaja, mutta valitsemalla haluttu näytteenottoajanjakso saatiin rajattua analysoitava tieto. Tähän työhön valittiin mukaan kahden peräkkäisen vuoden (2011 ja 2012) tammi - kesäkuun kannat. Näin pyrittiin samaan vertailukelpoista materiaalia, johon esim. vuodenaikaisvaihtelu ei vaikuttanut.

Tavoitteena oli vertailla kotimaisten ja ulkomaisten *S. Typhimurium*- ja *S. Enteritidis*-kantojen mikrobilääkeresistenssiä. Tiedon hakuun käytettiin "Tartuntamaa"-tietokentän suodatusta.

Analyysiin valittiin yksi kanta potilasta kohden. Saman henkilön useammat kannat suodatettiin pois seuraavasti. Näytteet ryhmiteltiin kolmeen sarakkeeseen; mikrobin, henkilötunnuksen ja sukunimen perusteella. Henkilötunnusten lukumäärä laskettiin funktio-toiminnolla. Näin saatiin selville, kuinka monta herkkyysmääritystä oli tehty potilasta kohden. Duplikaatit poistettiin manuaalisesti rivifiltterin avulla.

Lopuksi rajatusta datasta tehtiin kuvaaja raporttiosioon. Raportin tietojen perusteella voi tehdä erilaisia kuvaajia, kuitenkin niin että voimassa on kerrallaan yksi kuvaaja per raportti. Saadut tiedot jouduttiin siirtämään Exceliin, jossa tehtiin halutut kuvaajat. [24.]

8.3 Työn toteutus

Työ suoritettiin Terveiden ja hyvinvoinnin laitoksen Bakteriologian yksikössä. Näytteenä oli potilaskannasta tehty *Salmonella* -bakteerin tuore puhdasviljelmämalja. Viljelysilmukalla siirrettiin bakteerimassaa tuoreelta viljelmältä. Massa suspensioitiin koeputkessa olevaan 0,9 % keittosuolaliuokseen, joka vorteksoitiin. Tavoitteena oli saada tasainen suspensio. Suspension sameus mitattiin turbidometrillä ja haluttu lukema oli 0,13, joka vastaa MacFarland 0,5 standardia. Suspension valmistuttua viljely tulee suorittaa 15 minuutin kuluessa. Suspensioon kastettiin steriili vanupuikko ja ylimääräinen neste poistettiin vanupuikosta painamalla puikko putkenseinämää vasten. Aluksi vanupuikkoa vedettiin edestakaisin maljan keskikohdan läpi, minkä jälkeen vanupuikossa oleva ympäri siirrostettiin maljalle maljanpyörittäjää käyttäen (kuva 3). Vanupuikkoa vedettiin rauhallisesti ja tasaisesti, samalla pyörittäen maljan läpi. Näin toimien saadaan tasainen kasvusto, jossa estorenkaiden reunat ovat mahdollisimman tasaiset. Edellinen työvaihe tehtiin suojakaapissa.



Kuva 3. Maljanpyörittäjä.



Kuva 4. Kiekkoannostelija.



Kuva 5. Kiekkoannostelija ylhäältä päin.

Kiekoitus tapahtui kiekkoannostelijaa käyttäen (kuvat 4 ja 5). Koska kiekkoannostelijassa olevien antibioottien tuli olla huoneenlämpöisiä ja maljojen pintakuivia, otettiin ne lämpiämään vähintään tunti ennen käyttöä. Kiekkoannostelija asetettiin maljan päällä ja annostelijaa painettiin aika kovaa alas. Varmistettiin että kiekot ovat hyvin agarin päällä. Annostelijassa on kaikki tarvittavat 12 bakteerilääkekiekkoa. Kiekkoannostelija asettaa kiekot riittävän kauaksi toisistaan, jotta estorenkään halkaisija on kaikissa tapauksissa mitattavissa. Kiekot asetettiin annostelijaan taulukossa 1 esitettyssä järjestyksessä.

Taulukko 1. Mikrobilääkkeet [25].

Mikrobilääkkeet	Lyhenne	Pitoisuus kiekossa	Merkintä putkessa
Ampisilliini	Amp	10 µg	Amp 10
Kloramfenikoli	Chl	30 µg	C 30
Streptomysiini	Str	10 µg	S 10
Sulfonamidi	Sul	3µg	S 3
Tetrasykliini	Tet	30 µg	Te 30
Trimetopriimi	Tmp	5 µg	W 5
Siprofloksasiini	Cip	5 µg	Cip 5
Gentamysiini	Gen	5 µg	Cn 10
Nalidiksiinihappo	Nal	30 µg	Na 30
Kefotaksiimi	Ftx	5 µg	Ctx 5
Mesillinaami	Mec	10 µg	Mel 10
Imipeneemi	Imp	10 µg	Imp 10

Maljat inkuboitiin +37 °C ja inkubaatioaika oli 16-20 h. Maljat asetettiin lämpökaappiin kannet alaspäin, korkeintaan kolme maljaa päällekkäin. Seuraavana päivänä otettiin maljat lämpökaapista ja tarkastettiin, että kasvusto oli tasainen ja estorengaat selvästi näkyvissä. Estorengaan halkaisijan mittauksessa käytettiin apuna AutoMausermittauslaitetta (kuva 6). Mittauslaite pyöristi automaattisesti luvut kokonaisluvuiksi. Jos bakteerit olivat kasvaneet kiinni kiekkoon, annettiin arvoksi kiekon halkaisija 6.

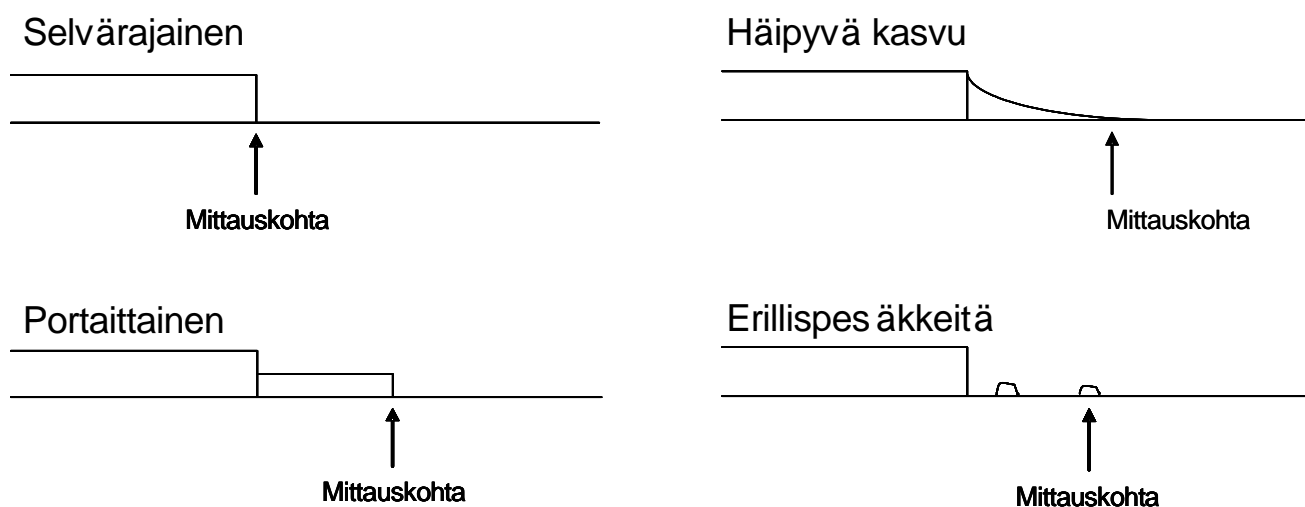


Kuva 6. Estorenkaan mittaustekniikka [25].

8.4 Estorenkaan mittaus

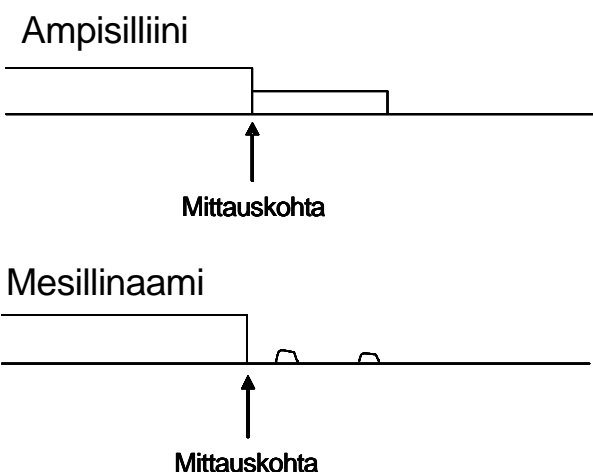
Estorenkaan halkaisija luettiin maljan pohjasta noin 30 cm:n päästä. Malja asetettiin tummaa alustaa vasten siten, että valo tuli ylhäältä. Estorenkaan halkaisija mitattiin siitä kohdasta, jossa bakteerikasvusto loppui (kuva 7). Poikkeuksena oli ampisilliini, joka mitattiin ulomman kasvuyöhykkeen reunasta. Sisempää kasvuyöhykettä (huntua) ja mesillinaamin erillispesäkkeitä ei huomioitu (kuva 8). Jos epäiltiin kontaminaatiota, pesäkkeiden puhtaus varmistettiin viljelemällä kanta uudelleen ja toistamalla testi. Trimetopriimi mitataan portaittaisen kasvun sisäreunasta. Mahdollista heikkoa kasvua kiekoon asti ei oteta huomioon, jos estorenkaan reuna on muuten selkeä. Salmonellalla tällaista heikkoa kasvua ei yleensä esiinny.

Mittauspisteet tuli valita siten, että ne olivat mahdollisimman kaukana naapurikiekosta. Näin eliminoidaan mahdollista lääkkeiden yhteisvaikutuksen vaikutusta tuloksiin. Mittauspistettä ei myöskään valittu maljan reunalta konsentraation vääristymän vuoksi. Jos estorenkaan halkaisijaa ei pystytty mittaamaan syystä tai toisesta, mitattiin sen säde ja saatu tulos kerrottiin kahdella.



Kuva 7. Estorenkkaan halkaisijan mittauskohdat [25].

Poikkeukset:



Kuva 8. Estorenkkaan halkaisijan mittauskohdat ampisillinille ja mesilliinaamille [25].

8.5 Laadunvarmistus

Laadunvarmistus vastaa siitä, että menetelmä tuottaa tulokset ennalta määriteltyjen vaatimusten mukaisesti, herkkyytulosten oikeellisuudesta ja vertailtavuudesta. Bakteriologian laboratoriossa uuden mikrobilääkekiekkopatruunan yhteydessä tulee testata mikrobilääkkeen vaikutus kontrollikannoilla. Bakterikanta-lääkekiekko-parin toimivuus kontrolloitiin kansainvälisellä *E. coli* -kontrollikannalla (ATCC 25922).

Kontrollikannan herkkyysmääritykset tehtiin samalla aikavälillä ja samalla tavalla kuin potilaskantojen, jotta saadut tulokset olisivat vertailukelpoisia. Kontrollikantojen estorenkaiden halkaisijat tuli sijoittaa annettuihin vaihteluväliraja-arvoihin, jotta EUCAST-standardin SIR-rajat olisivat voimassa. [20; 22.]

9 Tulokset ja tulosten tulkinta

Tässä työssä analysoitiin kaikki *Salmonella* Enteritidis ja *Salmonella* Typhimurium -kantojen mikrobilääkeherkkyyskuvaajat. Potilaskantojen ERH -jakaumat olivat valtaosin samanlaisia kahdella vertailujaksolla. Työssä otettiin esille ne kuvaajat, joissa oli havaittavaa muutosta vertailuajanjaksolla, jota haluttiin tarkemmin tarkastella. *S.* Enteritidiksien osalta otettiin sulfonamidi, gentamysiini ja nalidiksiinihappo antibioottikuvaajat. *S.* Typhimuriumin osalta otettiin ampisilliini, streptomysiini, sulfonamidi ja tetrasykliini antibioottikuvaajat. Kuvaajissa vertaillaan sekä muutosta vuosien välillä että potilaskantojen ja kontrollikannan estorenkaiden jakaumia. Kuvaajissa (kuvat 14 - 20) merkityt pystyviivat havainnollistavat missä SIR-raja-arvot kulkevat. Raja-arvot kertovat, onko tutkittava bakteerikanta kyseiselle antibiootille herkkä (S), resistenssi (R) tai näiden välissä oleva alue (I) (taulukko 2).

Taulukko 2. Antibioottien raja-arvot (R/I/S)[25].

ANTIBIOOTTI	Estorenkaiden halkaisijan mm (EUCAST-standardi v1.1.)		
	Resistentti(R)	Intermediate (I)	Herkkä (S)
Ampisilliini, Amp	<14		≥14
Streptomysiini, Str (FiRe 6.0)	<12	12-14	≥15
Sulfonamidi, Sul (FiRe 6.0)	<13	13-16	≥17
Tetrasykliini, Tet (FiRe 6.0)	<15	15-18	≥19
Gentamysiini, Gen	<14	14-16	≥17
Nalidiksiinihappo, Nal	<16		≥16

9.1 S. Enteritidis ja S. Typhimurium: tartuntatapaukset ja resistenssi

Salmonella Enteritidis -tartunnat olivat vertailuajanjaksolla vähentyneet 21,6 % (269 vs. 211), mutta kotimaisten kantojen määrä oli pysynyt ennallaan. *S. Enteritidis*-kantojen (2011 vs. 2012) kuvaajissa on tapahtunut muutos seuraaville antibiooteille: sulfonamidin, siprofloksasiini, gentamysiinin ja mesillinaami. Nalidiksiinihappo oli ainoa antibiootti, jolle kotimainen *S. Enteritidis* oli resistentti. *S. Enteritidis* resistenssikantojen määrä on kasvanut amp, chl, sul, tet, tmp, gen, ftx ja imp -antibioottien osalta. Mesillinaamille yksikään kanta ei ollut resistentti. Ampisilliiniherkyydeltään alentuneiden kantojen määrä on kasvanut toiseksi eniten (taulukko 2). Ajanjaksolla 1.1.-30.6.2011 yleisin tartuntamaa oli Turkki (13 %) ja yleisin faagityyppi oli 14B (19 %), kun taas samalla ajanjaksolla vuonna 2012 yleisin tartuntamaa oli Thaimaa (19,4 %) ja eniten oli faagityyppiä NST (15,2 %).

Taulukko 3. Resistenttien *S. Enteritidis* -kantojen lukumäärä.

<i>S. Enteritidis</i>	Lukumäärä	
	1.1.-30.6.2011	1.1.-30.6.2012
Antibiootti/ Tartuntapaikka		
Amp	20 (7,4 %)	29 (13,7 %)
Chl	0	2 (0,9 %)
Str	5 (1,9 %)	4 (1,8 %)
Sul	4 (1,5 %)	9 (4,3 %)
Tet	21 (7,8 %)	26 (12,3 %)
Tmp	2 (0,7 %)	6 (2,8 %)
Cip	0	0
Gen	0	1 (0,5 %)
Nal	52 (19,3 %)	96 (45,5 %)
Ftx	3 (1,1 %)	9 (4,3 %)
Mec	0	0
Imp	0	1 (0,5 %)
Ulkomaa	250	193
Kotimaa	19	18
ei ilmoitettu	0	1
Yhteensä	269	211

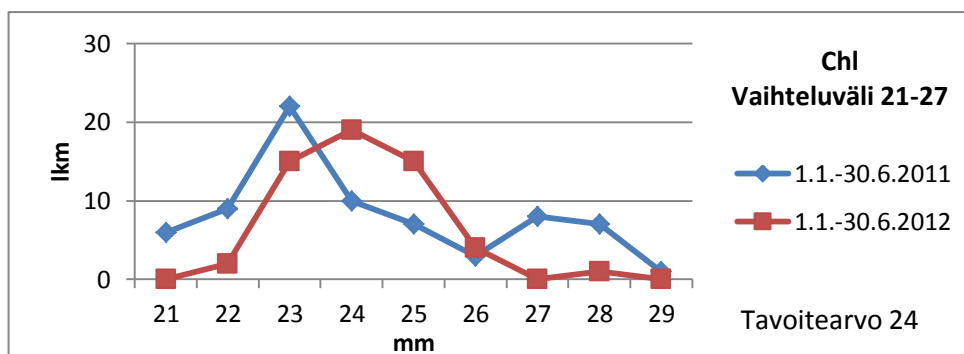
Salmonella Typhimurium -tartuntatapausten määrä oli kasvanut 30,1 %. Kotimaisten tartuntojen määrä oli kasvanut 40 %. Kefotaksiimille, imipeneemille, siprofloksasiinille ja gentamysiinille ei yksikään kotimainen kanta ollut resistentti. Resistenttien *S. Typhimurium* -kantojen määrä on kasvanut seuraavilla antibiooteilla: amp, chl, gen, ftx ja mec. Imipeneemille kaikki kannat olivat herkkiä. Trimetopiriimin ja imipeneemin kohdalla resistenssitilanne on pysynyt samanlaisena (taulukko3).

Taulukko 4. Resistenttien *S. Typhimurium* -kantojen lukumäärä.

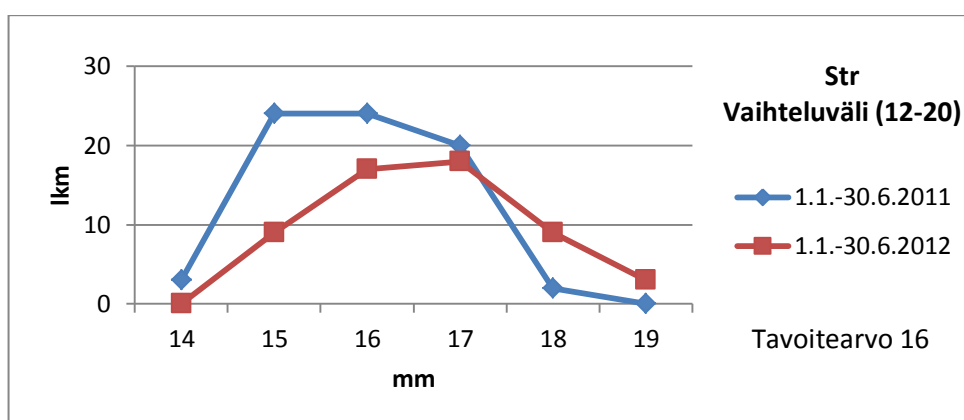
<i>S. Typhimurium</i>	Lukumäärä	
Antibiootti/ Tartuntapaikka	1.1.-30.6.2011	1.1.-30.6.2012
Amp	19 (37,3 %)	25 (34,2 %)
Chl	12 (23,5 %)	14 (19,1 %)
Str	21 (41,2%)	17 (23,3 %)
Sul	25 (49, 0%)	24 (32,9 %)
Tet	26 (51,0 %)	23 (31,5 %)
Tmp	7 (13,7 %)	7 (9,6 %)
Cip	0	1 (1,4 %)
Gen	2 (3,9 %)	3 (4,1 %)
Nal	14 (27,4 %)	13 (17,8 %)
Ftx	0	2 (2,7 %)
Mec	0	1 (1,4 %)
Imp	0	0
Ulkomaa	33	43
Kotimaa	18	30
ei ilmoitettu	1	0
Yhteensä	51	73

9.2 *E. coli* -kontrollikannan estorenkaiden halkaisijoiden (ERH) jakauma

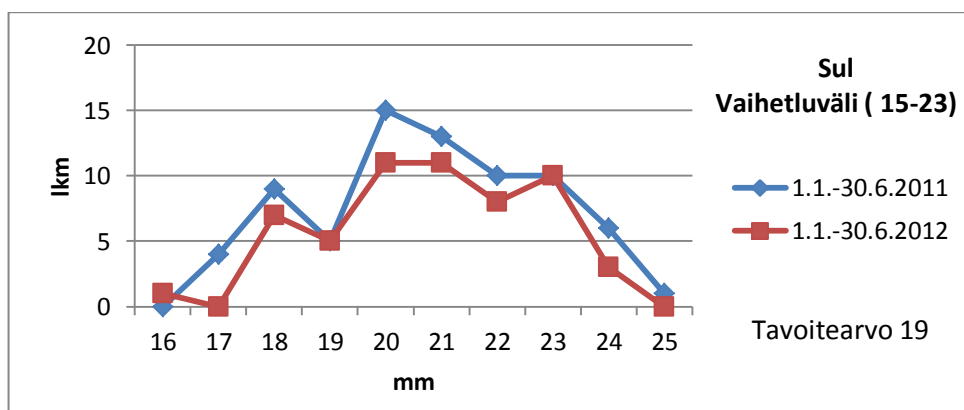
Kontrollikannan kuvaajissa näkyvät vaihteluväli-arvot ja tavoitearvot (kuvat 9 - 13). Suurimmalla osalla antibiooteista (Chl, Sul, Tet, Tmp, Nal, Ftx, Mec, Imp) mittauksia osui myös vaihteluvälin ulkopuolelle. Sulfonamidi-kontrollikannan ERH -jakauma näyttivät samanlaisilta vertailujaksoilla (kuva 11). Amp, str, cip ja gen -antibioottien kontrollikannan ERH-jakauma oli muuttunut vertailujaksoilla siten, että jakauma oli siirtynyt, mutta pysynyt vaihteluvälillä. Chl, sul, tet, tmp, nal, mec ja imp -antibioottien kontrollikannan mittaustulokset osuivat vaihteluvälin ulkopuolelle samaan suuntaan. Suurimmalle osalle ERH-jakauman muutos oli tapahtunut ns. parempaan suuntaan (eli osui paremmin vaihteluvälille, esim. Chl). Erot voivat johtua monesta eri tekijästä kuten lukijasta, siirroksen vahvuudesta tai ajasta siirrostuksen ja kiekon laittamisen välillä.



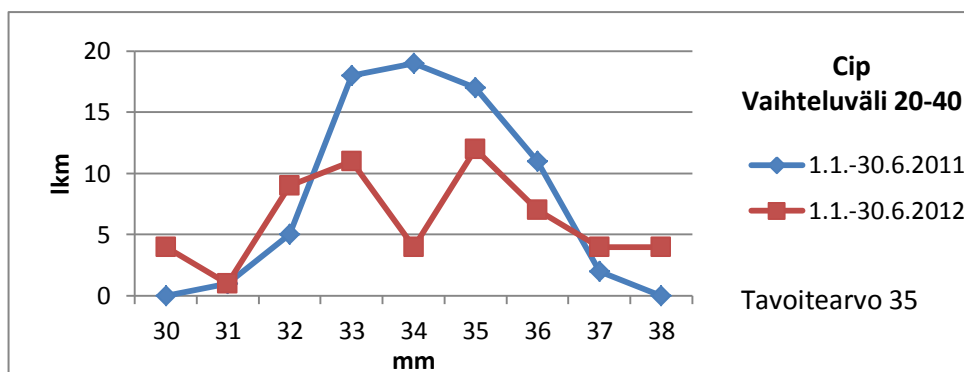
Kuva 2. *Escherichia coli*-kontrollikannan kloramfenikoliherkkyyskuvaaja.



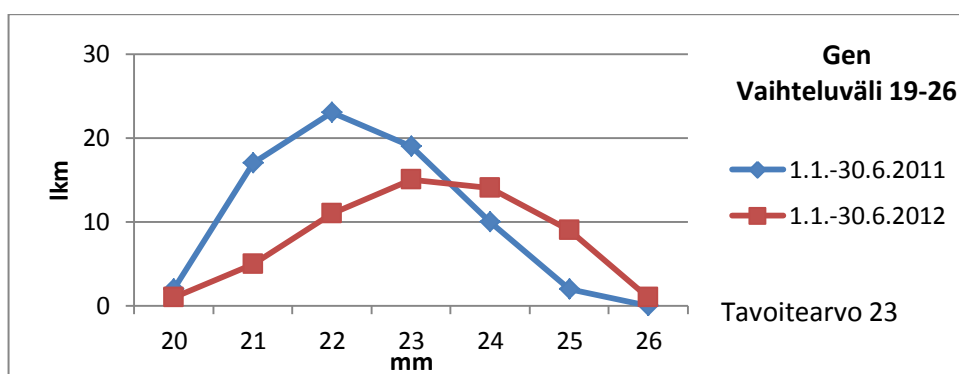
Kuva 3. *Escherichia coli*-kontrollikannan streptomysiiniherkkyyskuvaaja.



Kuva 4. *Escherichia coli*-kontrollikannan sulfonamidiherkkyyskuvaaja.



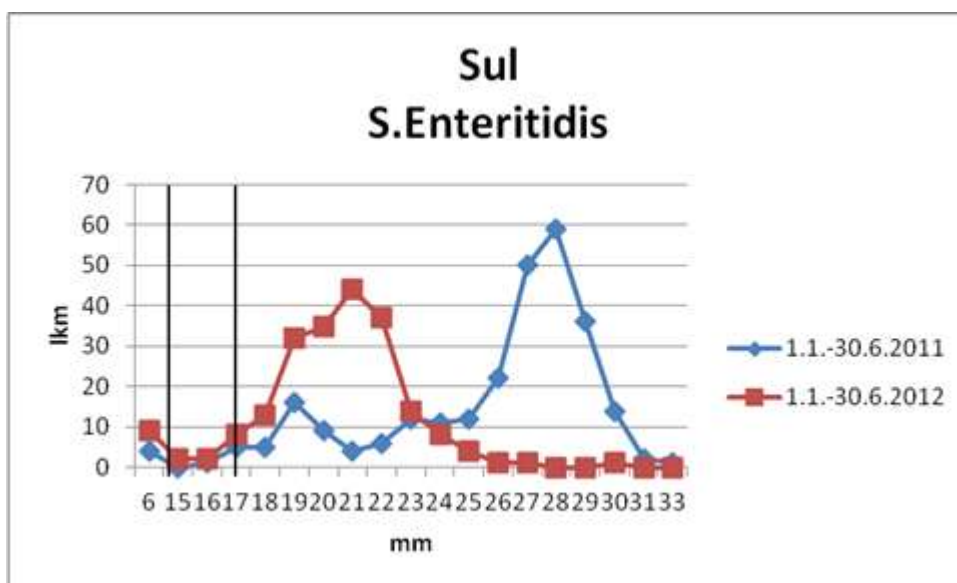
Kuva 5 *Escherichia coli* -kontrollikannan siprofloksasiiniherkkyyskuvaaja.



Kuva 6. *Escherichia coli* -kontrollikannan gentamysiiniherkkyyskuvaaja.

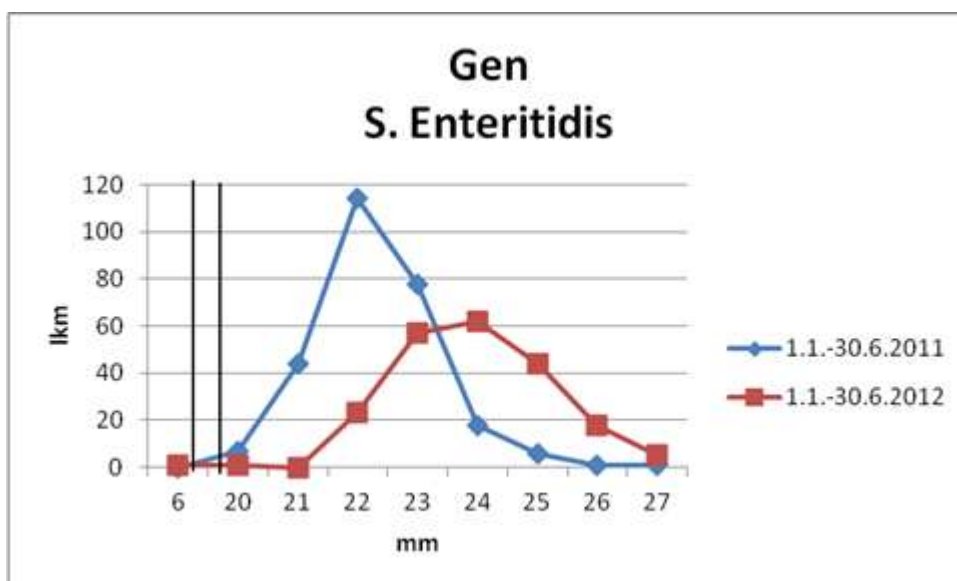
9.3 Muutokset *S. Enteritidis* ERH -jakaumassa

Sulfonamidille resistenttien kantojen määrä on kasvanut (4:stä 9:ään, 56 %) vuodesta 2011. Herkkien kantojen osalta estorenskaan halkaisijan millimetрилukema on laskenut vuosien välillä. Vuonna 2011 huippu oli 28 mm:n kohdalla ja vuonna 2012 huippu oli 21 mm:n kohdalla (kuva 14). Vuonna 2012 19-22 mm:n kohdalla oli 31 (21 %) kantaa Thaimaasta. Vuonna 2011 27-30 mm:n kohdalla 49 (32 %) kantaa oli faagityypiltään 19 B.



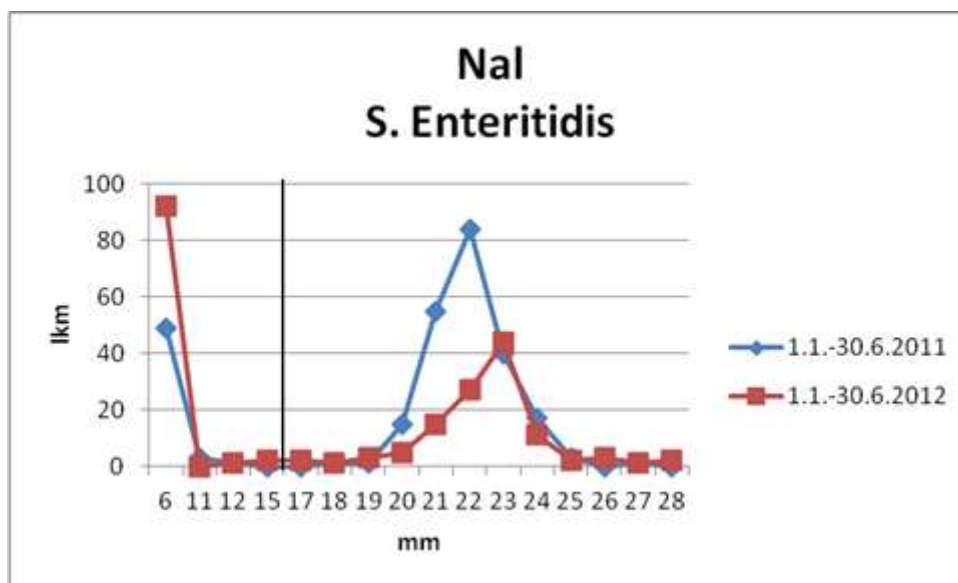
Kuva 7. *Salmonella* Enteritidis -kantojen sulfonamidi mikrobilääkeherkkyys.

Gentamysiinillä on havaittavissa estorenkään halkaisijan millimetrlukeman nousua sekä potilaskannoilla (kuva 15) että kontrollikannalla. Gentamysiinillä on selkeä piikki vuonna 2011, 22 mm kohdalla ja vuonna 2012 on piikki 24 mm kohdalla. Kontrollikuvaajasta (kuva 13) voi nähdä saman muutoksen, vaikka lukutavassa ei ole tapahtunut muutosta. Yhtä ulkomaista *S. Enteritidis* kantaa lukuun ottamatta (v. 2012), resistenssiä gentamysiinille ei esiintynyt.



Kuva 8. *Salmonella* Enteritidis -kantojen gentamysiiniherkkyyskuvaaja.

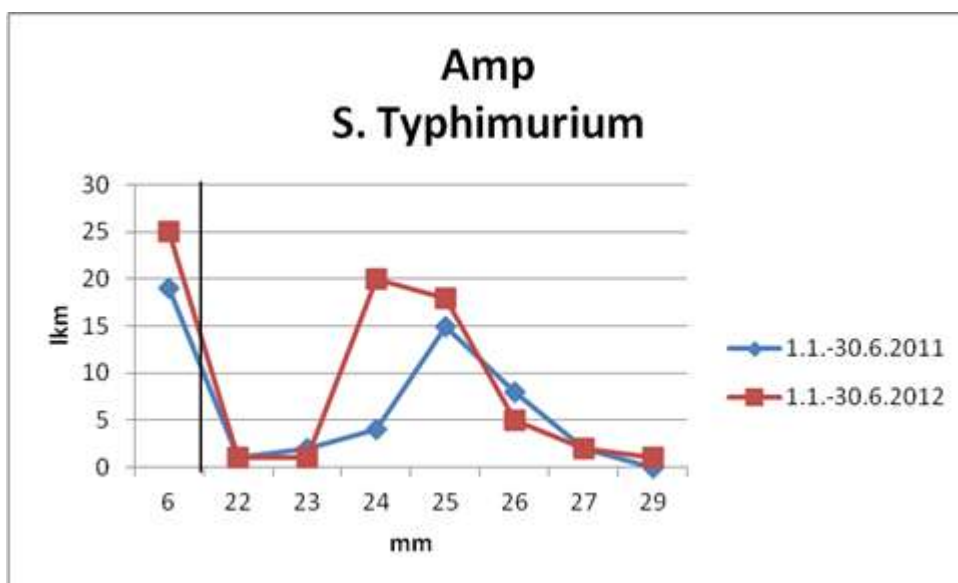
Nalidiksiinihapon kuvaajassa (kuva 16) voi nähdä, että resistenssien kantojen määrä on melkein kaksinkertaistunut edellisestä vuodesta (52 vs. 96, 45,8 %). Suurin osa näistä on ulkomaisia kantoja. Resistenttejä kantoja tuli eniten Thaimaasta, niiden osuus oli kasvanut 31 %:sta 42 %:iin. Resistenteillä kannoilla, kotimaisten osuus on nousut 2 %:sta 6 %:iin.



Kuva 9. *Salmonella* Enteritidis -kantojen nalidiksiinihappoherkkyyskuvaaja.

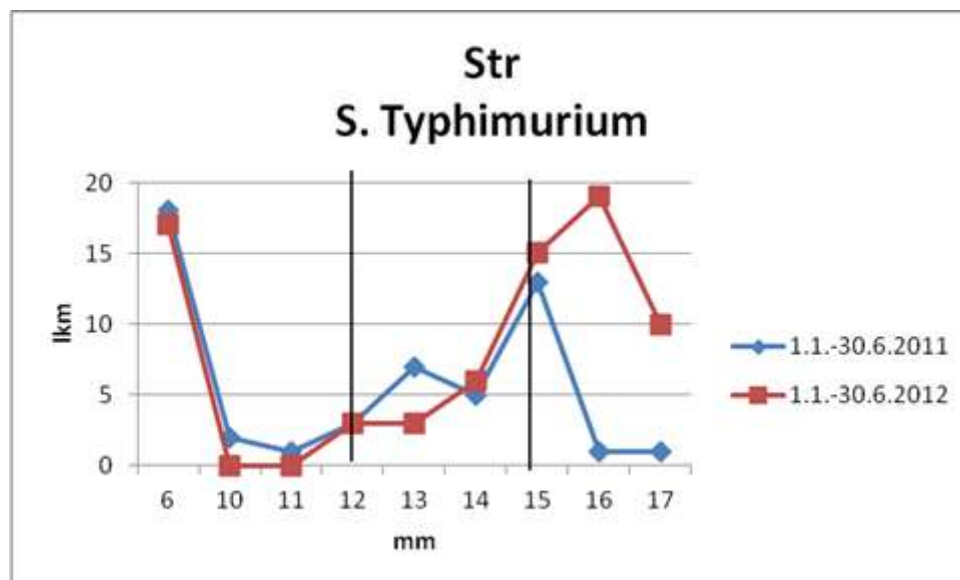
9.4 Muutokset *S. Typhimurium* ERH -jakaumassa

Ampisilliinille herkällä *S. Typhimurium* -kannoilla jakauma on siirtynyt vasemmalle (kuva 17). Kun vuonna 2011 piikin kärki oli 25 mm:n kohdalla, oli se vuonna 2012, 24 mm:n kohdalla. Resistenttien kantojen määrä on kasvanut 24 %. Kotimaisten resistenttien kantojen määrä on kuitenkin vähentynyt 34 %.



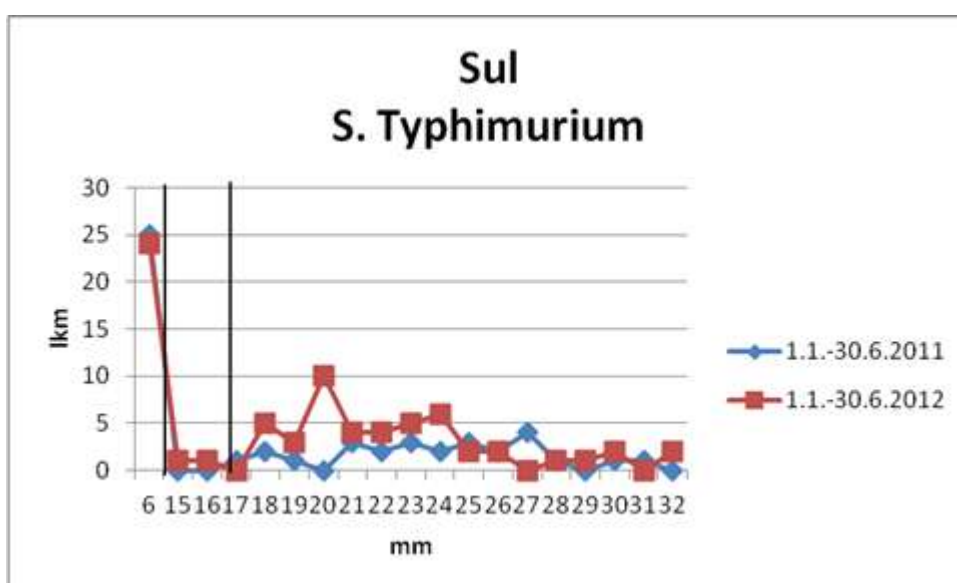
Kuva 10. *Salmonella* Typhimurium -kantojen ampisilliniherkkyyskuvaaja.

Streptomysiiniherkkyyskuvaajassa (kuva 18) huomattava osuus *S. Typhimurium* -kannoista oli sijoittunut intermediate- (I) eli välialueelle. Resistenttien kantojen osuus oli vuonna 2011 35 %, ja 2012 se oli laskenut 23 %:iin. Herkkien kantojen osuus oli nousut 29 %:sta 60 %:iin. Resistenteistä kannoista vuonna 2011 72 % oli Thaimaasta ja 14 % oli kotimaisia.



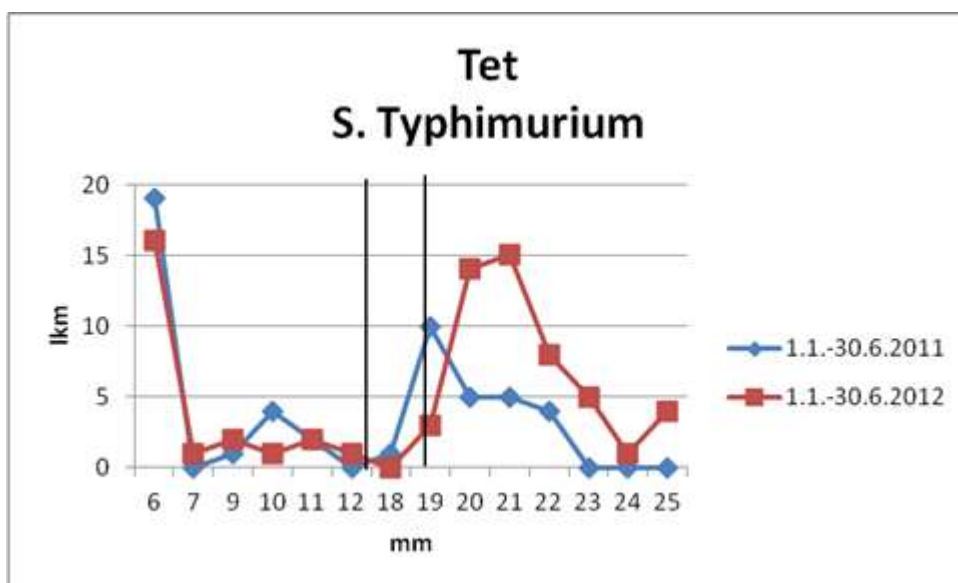
Kuva 11. *Salmonella* Typhimurium -kantojen streptomysiiniherkkyyskuvaaja.

Salmonella Typhimuriumin sulfonamidiresistenttien kantojen lukumäärä ei ole muuttunut radikaalisti vertailuajanjaksolla. Sulfonamidiherkkyttä oli hankala lukea. Hankalan siitä teki, että maljalla antibiootin ympärille kasvaa ohuelti huntua, josta luetaan kirkkain alue. Lukemisen hankaluus saattaa selittää, miksi herkkyyskuvaajassa ei näy selkeitä piikkiä. Kontrollikannan lukemisessa ei ollut samoja vaikeuksia, koska *E. coli*ssa tällaista heikkoa kasvua ei yleensä esiintynyt. Tällöin kontrollikuvaajassa voi nähdä selkeitä piikkejä (kuva 11). Potilaskannoilla selkein piikki näkyy resistenteillä kannoilla, joita oli helppo lukea. Vuonna 2012 20 mm:n kohdalla näkyvän piikin kannoista 60 % oli kotimaisia ja 40 % oli faagityypiltään 41.



Kuva 12. *Salmonella* Typhimurium-kantojen sulfonamidiherkkyyskuvaaja.

Tetrasykliiniherkkyyskuvaajassa on huomattavissa pieni siirtymä herkempään suuntaan (kuva 20), kun kontrollikannassa muutos oli toiseen suuntaan. Vuonna 2011 estorenkään halkaisijan piikki näkyy 19 mm:n kohdalla, joka tulkitaan vielä herkäksi (S), ja vuonna 2012, 22 mm:n kohdalla. Resistenttien kantojen osuus on laskenut 51 %:sta 41 %:iin, kun taas herkkien kantojen osuus on noussut 57 %:sta 63 %:iin. Vuonna 2011, 10 mm:n kohdalla oleva piikin kaikki kannat ovat kotimaisia ja 75 % on faagityypiltään 12.



Kuva 20. *Salmonella* Typhimurium -kantojen tetrasykliiniherkkyyskuvaaja.

10 Päätelmät

Työn tavoite oli vertailla *Salmonella* -potilaskantojen mikrobilääkeresistenssiä ja estorenkaiden jakaumaa tammi - kesäkuulta 2011 ja 2012. Mikrobilääkeresistenssiä tutkittiin kiekkomenetelmän avulla. Työssä tutkittiin oliko kantojen kiekkoherkkyyksessä saatujen estorenkaiden halkaisijoiden millimetreissä eroja kahden vuoden välillä.

Tutkimuksessa havaittiin, että kotimaisten kantojen yleinen resistenssitilanne oli pysynyt tutkittavilla ajanjaksoilla muuttumattomana. Huolestuttavin havainto oli nalidiksiinihapolle resistenttien *S. Enteritidis* -kantojen määrän kasvu.

Joissakin antibioottikuvaajissa esiintyi sekä *S. Enteritidis* että *S. Typhimurium* -kannoilla pienempiä piikkejä. Koska kontrollikannoissa samaa ilmiötä ei näkynyt, tutkittiin kantojen faagityyppiä ja tartuntamaata. Suurimmalle osalle piikeistä ei ollut kyseessä spesifinen kantatyyppi, esim. tietyltä alueelta peräisin oleva kanta. Toinen mahdollinen syy piikeille voisi olla, että kannat on mitattu tietyntä päivänä tai saman, eri tavalla tulkitsevan, henkilön toimesta, jolloin kyseessä voisi olla mittausepätaarkkuus.

Kontrollikantojen kuvaajissa on ollut poikkeamia sekä 2011 että 2012. Ainoastaan kolmella antibiootilla (Amp, Cip ja Gen) kontrollikannan mittaukset sijoituivat vaihteluväliraja-arvojen sisäpuolelle. Loput kontrolleista saivat mittaustuloksia myös vaihteluvälin ulkopuolelle samaan suuntaan (suurempi mittaus kuin sallittu vaihteluväli). Tämä voi olla merkki mahdollisesta virheestä rutiinimenetelmässä. Kloramfenikolin mittaus oli sekä maksimi- että minimi-vaihteluvälin ulkopuolella. Koska kontrollikannan tuloksista osa sijoittui vaihteluvälialueen ulkopuolelle, olisi hyvä tarkastaa menetelmä kontrollikannalla riittävän usein, virheen löytämiseksi hetkellisesti esim. päivittäin. Kontrollikannan tulokset voivat olla merkki alkavasta ongelmasta, jota on syytä seurata.

Mahdollisia syitä poikkeamiin ovat: a) lukemisesta johtuva virhe, koska estorenkaan reunaa on vaikea määrittää, b) antibioottikiekkojen kosteus, c) siirroksen paksuus (vaikka sameus mitattiin, voi siirros olla joillakin paksumpi tai heikompi kuin muilla) , d)

aika siirrostuksen ja kiekonlaittamisen välillä, e) inkubaatioaika, f) kasvualustasta johtuva virhe, g) sekä kasvatusolosuhteet. Näihin kaikkiin virhelähteisiin on pyritty kiinnittämään huomiota. Hyvä ja ajantasainen ohjeistus sekä ohjeiden noudattaminen ovat tärkeitä tekijöitä antibioottiliherkkyyssmittauksen laadun varmistuksessa. Menetelmän suorittamisessa ja ohjeissa ei ole tapahtunut muutoksia kahden tutkitun ajanjakson välillä. Toisaalta kevästä 2012 antibioottiliherkkyyksiä on tehnyt entistä useampi tekijä.

Potilaskantojen herkkyyssuutokset johtuivat todennäköisesti kannoista, eivätkä menetelmästä. Potilaskantojen ERH-jakaumat näyttivät suurimmaksi osaksi samanlaisilta vertailujaksoilla. Tutkimuksessa ei tullut ilmi syitä, miksi muutokset jakaumissa johtuisivat menetelmästä.[22]

Lähteet

- 1 Zoonoosikeskus. *Salmonelloosi*. Verkkodokumentti.
www.zoonoosikeskus.fi/portal/fi/zoonoosit/bakteerien_aiheuttamat_taudit/salmonella/. Luettu 20.7.2012.
- 2 Jaakola, Sari, Lyytikäinen, Outi, Rimhanen-Finne, Ruska, Salmenlinna, Saara, Vuopio, Jaana, Roivainen, Merja, Lönflund, Jan-Erik, Kuusi, Markku & Ruutu, Petri. 2012. Tartuntataudit Suomessa 2011. Raportti 36/12. Tampere: Juvenes Print-Tampereen yliopistopaino, s 12. Rimhanen-Finne, Ruska. Siitonen, Anja. Liene-mann, Taru & Kyyhkynen, Aino.
- 3 Gunell, Marianne. 2010. Mechanisms of resistance in nontyphoidal *Salmonella enterica* strains exhibiting a nonclassical quinolone resistance phenotype. *Antimicrob Agents Chemother*. Väitöskirja. Turku; Turun yliopiston julkaisuja.
- 4 Bergman, Miika. Mikrobilääkeresistenssi Suomessa. Verkkodokumentti.
www.ktl.fi/attachments/osastot/infe/ttraportti/2bergman_abpaiva181110.pdf. Luettu 19.9.2012.
- 5 Lyytikäinen, Outi. Sairaalainfektioiden seuranta, Siro. Verkkodokumentti.
http://www.ktl.fi/portal/suomi/osastot/infe/tutkimus/sairaalainfektioiden_seuranta__siro/. Luettu 12.10.2012.
- 6 Hedman, Klaus, Heikkinen, Terho, Huovinen, Pentti, Järvinen, Asko, Meri, Seppo & Vaara, Matti. 2011. *Infektiosairaudet 3*. Helsinki: Duodecim, s. 112-114. Järvinen, Asko. Vaara, Martti., Huovinen, Pentti. Liippo., Kari & Vasankari, Tuula.
- 7 *Salmonellat*. 2011. Verkkodokumentti.
www.ktl.fi/portal/suomi/osastot/bato/yksikot/suolistobakteerilaboratorio/salmonellat/. Luettu 20.9.2012.
- 8 Labema. Salmonella. 2009. Verkkodokumentti.
www.labema.fi/~1kgjx0000001/?Y999=MSC&Y103=9/#salmonella. Luettu 14.9.2012.
- 9 Hedman, Klaus, Heikkinen, Terho, Huovinen, Pentti, Järvinen, Asko, Meri, Seppo & Vaara, Matti. 2010. *Mikrobiologia*. Jyväskylä: WS Bookwell Oy, s.184-190. Siitonen, Anja & Vaara, Martti.
- 10 Bakteriologian yksikön menetelmäohje: Salmonellojen O- ja H-serotyypitys versio 1.2.
- 11 Bakteriologian yksikön menetelmäohje: Salmonellojen paratyphi B ja S, java, faagityypitys versio 1.2.

- 12 Bakteriologian yksikön menetelmäohje: PFGE-Yleisohje.
- 13 CDC. Salmonella. 2012. Verkkodokumentti.
www.cdc.gov/salmonella/general/. Luettu 23.7.2012.
- 14 Hakanen, Antti, Lehtipolku, Mirva, Gunell, Marianne. 2009. Salmonellojen ja kampylobakteerien mikrobilääkeherkkyys. *Moodi* (5/2009), s. 256.
- 15 Tiilikainen, Anja S, Vaara, Martti & Vaheri, Antti. 1996. Lääketieteellinen mikrobiologia. Vammala:Vammalan kirjapaino Oy, s. 270-283. Tiilikainen, Anja S., Mäkelä, Pirjo & Leinikki, Pauli.
- 16 Pekkarinen, Anni. Antibioottien aiheuttamat haittavaikutukset koirilla suomessa. 2006. Verkkodokumentti.
<https://helda.helsinki.fi/bitstream/handle/1975/978/Antibioottien%20aiheuttamat%20haittavaikutukset%20koirilla%20PDF.pdf?sequence=1>. Luettu 20.9.2012.
- 17 Hautala, Timo. Mikrobilääkeresistenssin mekanismit. 2004. Verkkodokumentti. <http://cc.oulu.fi/~sisawww/esit/040219.htm>. Luettu 20.9.2012.
- 18 Meurman, Olli. 2012. ESBL on väestötason ongelma. Suomen sairaalahygienialehti (30/2012), s. 180 & 182.
- 19 Suomalainen mikrobilääkeresistenssin tutkimusryhmä FiRe. Kliinisesti tärkeiden bakteerilöydösten lääkeresistenssi Suomessa. Verkkodokumentti. <http://www.finres.fi/index.php?id=3>. Luettu 12.10.2012. 1
- 20 Gunell, M. Hakanen, A. Aittoniemi, J. Kauppila, J. Rantakokko-Jalava, K. Rissanen, A. Saha. K. Vaara, M. Vuento, R. Huovinen, P. Nissinen, A. Finres 1997-2010. Mikrobilääkeresistenssi Suomessa. Verkkodokumentti.
http://www.finres.fi/fileadmin/files/Sekalaista/THL_RAPO67_2012_FI_NRES_lores.pdf
- 21 Euroopan tautien ehkäisy- ja -valvontakeskus. 2009. ECDC:n toiminnan tavoite: Eurooppa ilman tauteja Verkkodokumentti.
http://www.ecdc.europa.eu/fi/publications/Publications/0902_COR_Keeping_Europe_Healthy.pdf. Luettu 16.11.2012.
- 22 FiRe. Bakteerien lääkeherkkyden määrittäminen kiekkomenetelmällä Versio 6. 2009. Verkkodokumentti.
www.finres.fi/fileadmin/files/standardi/kiekkomenetelma.pdf. Luettu 17.7.2012.
- 23 Bakteriologian yksikön Milla-laboratoriotietojärjestelmän käyttöohje. 2012. Verkkodokumentti.

http://terho.thl.fi/wiki01/download/attachments/36013512/Yleinen_tietojen+ja+tulosten+kirjaaminen.doc?version=1&modificationDate=1338809600779. Luettu 19.9.2012.

- 24 Bakteriologian yksikkö. MILLA-tietojärjestelmän hakupohjien käyttö. 2012
- 25 Bakteriologian yksikön menetelmäohje: Bakterilääkeherkkyys versio 2.1. 1