



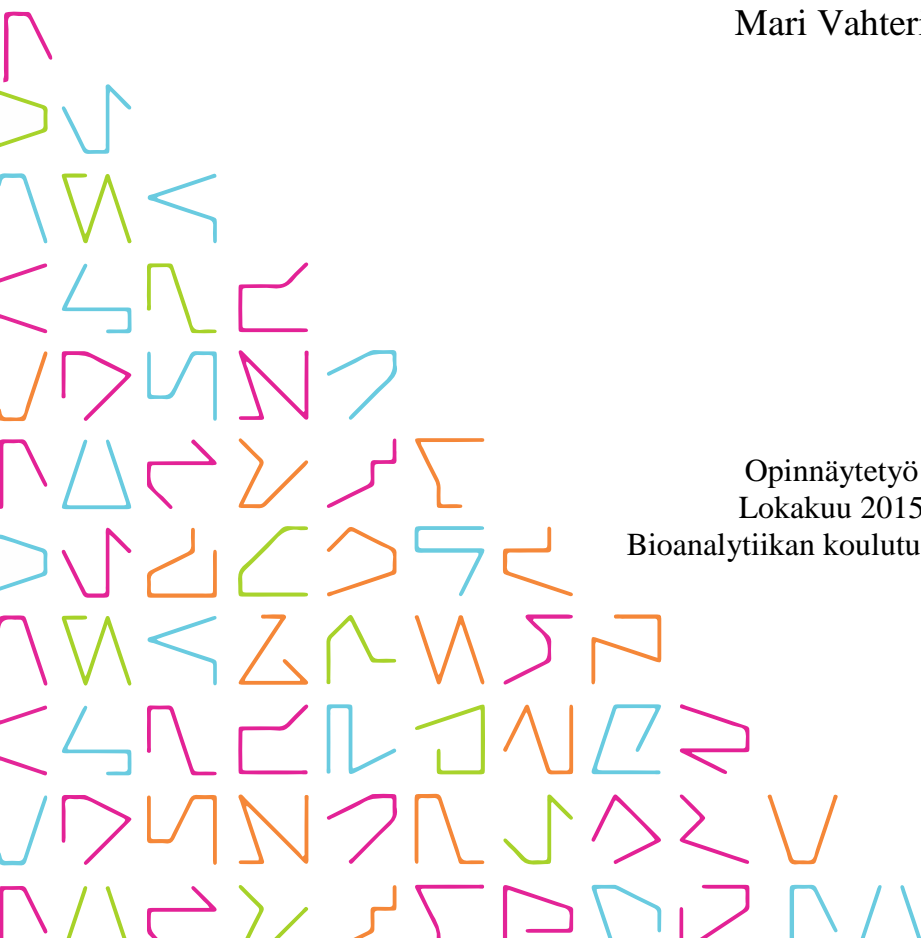
TAMPEREEN
AMMATTIKORKEAKOULU

ENTEROBAKTEERIEN LAAJAKIRJOISTEN BEETALAKTAMAASIEN TUNNISTAMINEN

Ulla Sulkula

Mari Vahteri

Opinnäytetyö
Lokakuu 2015
Bioanalytiikan koulutusohjelma



TIIVISTELMÄ

Tampereen ammattikorkeakoulu
Bioanalytikkokoulutus, Jyväskylä 12SABIOj

ULLA SULKULA & MARI VAHTERI:
Enterobakteerien laajakirjoisten beetalaktamaasien tunnistaminen

Opinnäytetyö 35 sivua, josta liitteitä 6 sivua
Lokakuu 2015

ESBL ja AmpC ovat gram negatiivisten bakteerien tuottamia entsyymejä, jotka ovat resistenttejä tiettyjä antibiootteja kohtaan. ESBL- entsyymeitä tuottavien bakteerien yleistymisen sairaaloissa vaikeuttaa antibioottilaitoa sekä johtaa hoitoon liittyvien infektioiden lisääntymiseen. Beeta- laktaamiryhmän antibiooteilla on ollut merkittävä rooli gram negatiivisten sauvabakteerien aiheuttamien infektioiden hoidossa. Resistentin lisääntyminen beetalaktaameja ja erityisesti karbapeneemejä kohtaan on huolestuttava ilmiö, sillä karbapenemaasit hajoittavat kaikkien beetalaktaameiden lisäksi myös karbapeneemejä. Suomessa karbapenemaasia tuottavat kannat ovat vielä toistaiseksi harvinaisia. Etenkin enterobakteerien kohdalla karbapenemaasia tuottavien bakteerien leviäminen Suomeen on tapahtunut ulkomailta sairaalahoitoa saaneiden potilaiden ja ulkomailta tulleiden sairaalasiirtojen välityksellä. Jotta voidaan toimia moniresistenttien bakteerien torjuntaohjeiden mukaisesti, on laboratoriolla oltava käytössään riittävät diagnostiset valmiudet karbapenemaasien, ESBL:n sekä AmpC:n tunnistamiseen.

Tämän opinnäytetyön tarkoituksena on tunnistaa laajakirjoisten beetalaktamaasien aiheuttaja. Lisäksi vertailimme kahden eri valmistajan kiekkomenetelmää karbapenemaasien tunnistamiseen. ESBL & AmpC osoittamiseen käytimme Mast Group ESBL&AmpC Detection Disc Set kiekkopaneelia. Karbapenemaasin osoittamiseen käytimme Mast Group Mastdiscs combi ja CAT-ID, sekä ROSCO Combined disk test kiekkopaneeleita. Kohteenamme oli 48 enterobakteerikantaa, joilla on jokin tunnettu mekanismi tai Vitek-AES epäily tällaisen olemassaolosta. Tämän tutkimuksen perusteella voidaan todeta Mast Group ESBL&AmpC Detection Disc Sets kiekkopaneeli toimivaksi ja se otettiin käyttöön Fimlab Oy Keski-Suomen toimipisteen mikrobiologian laboratoriossa syksyllä 2015.

Asiasanat: laajakirjoiset beetalaktamaasit, kiekkopaneeli

ABSTRACT

Tampereen ammattikorkeakoulu

Tampere University of Applied Sciences

Degree Programme of Biomedical Laboratory Science, Jyväskylä 12SABIOj

ULLA SULKULA & MARI VAHTERI

Detecting the Extended-Spectrum β -lactamase of Enterobacteriaceae

Bachelor's thesis 35 pages, appendices 6 pages

October 2015

The extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) and AmpC are enzymes produced by gram-negative bacteria that are resistant to certain antibiotics. The increased emergence of the bacteria producing ESBL enzymes in hospitals makes antibiotic treatments difficult and leads to the increase of care-related infections. The antibiotics of the beta-lactamase group have had a significant role in the treatment of infections caused by gram-negative bacilli. The increased resistance to beta-lactamases and especially to carbapenemases is a worrying phenomenon because, in addition to disintegrating all the beta-lactamases, the carbapenemases also disintegrate carbapenems.

In Finland the carbapenemase-producing strains are still rare. Especially with regard to enterobacteriaceae, the few carbapenemase producing strains that have been found in Finland have been in patients who have received hospital treatment abroad. In order to act according to the prevention guidelines of the multi-resistant bacteria, laboratories must have an adequate diagnostic readiness for the detection of carbapenemases, ESBL and AmpC.

The purpose of this thesis was to detect the cause of extended-spectrum beta-lactamases. In addition, the thesis focused on evaluating two disc detection procedures of two different manufacturers for the detection of carbapenemases. For the ESBL and AmpC detection the test set used in this thesis was the Mast Group ESBL & AmpC Detection disc panel. For carbapenemase detection the Mastdiscs combi and the CAT-ID test from the Mast Group were used as well as the Combined Disk Test Kit from ROSCO. The tests were run for 48 different bacterial strains that already had an extended-spectrum beta-lactamase mechanism or suspicion of its presence. Based on this study, it can be stated that the ESBL & AmpC Detection Disc Sets from the Mast Group were proven valid. For this reason, they were introduced at the Fimlab microbiology laboratory in Jyväskylä in the autumn of 2015.

Key words: Extended- Spectrum Beta- Lactamase, Disk sets

SISÄLLYS

1	JOHDANTO.....	5
2	TYÖN TARKOITUS, TAVOITE JA TUTKIMUSONGELMAT	6
3	ENTEROBAKTEERIT	7
4	BEETALAKTAMAASIT	8
	4.1 ESBL ja AmpC	8
	4.2 Karbapenemaasit.....	10
5	BEETALAKTAAMIT	12
6	TYÖN TOTEUTUS	15
	6.1 ESBL:n ja AmpC: osoittaminen	15
	6.2 Karbapenemaasin osoittaminen	17
7	TULOSTEN KIRJAUS	19
8	TUTKIMUSTULOKSET.....	22
	8.1 ESBL ja AmpC	22
	8.2 Karbapenemaasi.....	23
9	POHDINTA.....	25
	9.1 Johtopäätökset ja jatkotutkimusaiheet	25
	9.2 Tutkimuksen luotettavuuden ja eettisyyden arviointi.....	26
	LÄHTEET.....	27
	LIITTEET	30
	Liite 1 AmpC+ ESBL Detection Set D68C (Mast Group) Boroonihappo (Rosco).....	30
	Liite 2. AmpC Detection Set D69C (Mast Group).....	31
	Liite 3. Cefepime 30 & Cefepime 30/ Clavulanic acid 10 D63C (Mast Group).....	32
	Liite 4. Carbapenemase Detection kit (MBL+ KPC) D70C & Carbapenemase screening disk D71C (Mast Group)	33
	Liite 5. ESBL/AmpC Calculator (Mast Group)	34

1 JOHDANTO

Opinnäytetyö tehtiin Fimlab Laboratoriot Oy Keski-Suomen toimipisteeseen. Työnimenä ”Enterobakteerien laajakirjoisten beetalaktamaasien tunnistaminen” ja aiheen saimme sairaalan mikrobiologilta. Työssä validoitiin kiekkomenetelmä, jolla voidaan tunnistaa laajakirjoisten beetalaktamaasiresistenssin aiheuttaja (ESBL, AmpC, karbapenemaasi) ja verrata kahden eri valmistajan menetelmien toimivuutta karbapenemaasin osoittamiseen. Laajakirjoisilla beetalaktamaaseilla on sekä kliinistä että sairaalahygienistä merkitystä. Laajakirjoisia beetalaktamaaseja tuottavat bakterikannat, erityisesti ESBL:n yleistyminen sairaaloissa johtaa hoitoon liittyvien infektioiden lisääntymiseen sekä vaikeuttaa antibioottihoitoa. (THL 2014.) Kiekkomenetelmistä kumpikaan ei ole ollut käytössä Fimlabilla. Tarkoituksena oli ottaa kiekkopaneelit käyttöön, jos ne osoittautuivat toimiviksi.

Opinnäytetyössä käytettävät testit validoitiin eli testattiin menetelmän sopivuutta ja toimivuutta resistenssimekanismin tunnistamiseen. Käytössämme oli laajakirjoisten beetalaktamaasien ESBL: n ja AmpC:n sekä karbapenemaasin tunnistukseen tarkoitettuja kiekkopaneeleita. Vertailimme kahden eri valmistajan kiekkopaneeleita karbapenemaasin tunnistamiseen.

Enterobakteerit ovat luonnostaan herkkiä laajakirjoisille kefalosporiineille ja karbapeneemeille. Osalla lajeista on kromosomaalisia laajakirjoisia beetalaktamaaseja esim. mutaation kautta. (Nissinen 2014.) Kaikki bakteerit tuottavat proteiineja, joilla on vaihteleva kyky inaktivoida beetalaktaameja. Enterobakteerit voivat saada laajakirjoisia beetalaktamaaseja plasmidien välityksellä. Resistenssiplasmidit kantavat usein eri resistenssitekijöitä. Laajakirjoisilla beetalaktamaaseilla on sekä kliinistä, että sairaalahygienistä merkitystä ja ne voidaan osoittaa sekä fenotyypillisesti, että varmistaa genotyypityksellä. (Nissinen 2014.) Fenotyyppi tarkoittaa bakteerien ilmiä ja fenotyypisiä menetelmiä ovat mm. viljely, jolla voidaan tunnistaa bakteerilaji ja määrittää sen lääke-resistenssi. Genotyyppi tarkoittaa mikrobin perimää. Genotyypitys on mikrobin perimän selvittelyä esim. PCR-menetelmällä. Fenotyypitys ja Genotyypitys luovat perustan bakteerien kohdistuvalle tarkalle tyyppitykselle ja täten mahdollisten epidemioiden jäljitykselle. (Siitonen ym. 2002.)

2 TYÖN TARKOITUS, TAVOITE JA TUTKIMUSONGELMAT

Aineistolähtöisen opinnäytetyön tarkoituksena on todellisen arkielämän moninainen kuvaaminen eri muodoissa. Ilmiötä tutkitaan mahdollisimman kattavasti ja todellisissa, luonnollisissa tilanteissa. Opinnäytetyön tavoitteella tarkoitetaan sen hyötyä toimeksiantajalle, sekä opiskelijalle itselleen ammatillisen osaamisen kehittymistä. Opinnäytetyön tarkoitusta luonnehditaan neljällä peruspiirteellä, kartoittava, kuvaileva, selittävä tai ennustava. (Hirsijärvi ym. 2000.)

Opinnäytetyön tarkoituksena oli validoida laajakirjoisten beetalaktamaasien tunnistamiseen tarkoitettuja kiekkopaneeleita sekä vertailla kahden eri valmistajan menetelmiä toisiinsa. Käytössämme oli 48 bakteerikantaa, joilla oli jokin tunnetuista mekanismeista ESBL, AmpC tai karbapenemaasi tai epäily näiden mekanismien olemassa olosta.

Tavoitteena opinnäytetyöllä oli osoittaa menetelmien toimivuus ja sen pohjalta saada menetelmä käyttöön Fimlab Keski- Suomen toimipisteen mikrobiologian laboratorioon.

3 ENTEROBAKTEERIT

Kaikki *Enterobacteriaceae*- heimon bakteerit ovat gram negatiivisia sauvabakteereita. Niistä tärkeimpiä bakteerisukuja ovat *Esherichia coli*, *Salmonella*, *Shigella* sekä *Yersinia*, joiden luonnollinen kasvuympäristö on eläimen tai ihmisen suolisto. Enterobakteerit ovat tehokkaan ulkokuorensa ansiosta resistenttejä useille antibiooteille. *E. coli* muodostaa valtaosan ihmisen suoliston normaalifloorasta ja aiheuttaa täten myös eniten infektioita, joista yleisimpiä ovat virtsatieinfektiot. Osa enterobakteereista esim *E. coli* sekä *Klebsiella pneumoniae* voivat hankkia itselleen ESBL- ominaisuuden. Tämän ominaisuuden hankkineet bakteerit tuottavat antibiootteja pilkkovia entsyymejä tehden niistä resistenttejä useimmille hoidossa käytettäville antibiooteille. (Tissari ym. 2010.) Luontainen resistenssi on tyypillinen ominaisuus tietyille bakteerisuvuille tai tyypeille ja ovat täten aina resistenttejä tiettyjä mikrobilääkeryhmiä kohtaan. Esim. gram negatiiviset bakteerit ovat resistenttejä vankomysiinille. (Pastila 2005.) Hankitulla resistenssillä puolestaan tarkoitetaan aiemmin herkän bakteerikannan muuttumista resistentiksi joillekin antibiooteille. Hankittu resistenssiominaisuus sijaitsee plasmidissa tai kromosomissa ja se tulee bakteerille, kun sen geneettiset ominaisuudet muuttuvat. Resistenssimekanismi siirtyy uusiin bakteereihin, bakteerin jakautuessa. (Järvinen ym 2011.)

Gram värjäys

Gram värjäystä käytetään bakteerien tunnistamiseen ja se toimii muiden bakteerintunnistustestien tukena bakteerien nimeämisessä.

Gram värjäyksessä kaikki bakteerit värjäytyvät sinivioletiksi kristallisvioletti värillä. Värjäyksen huuhtelut tehdään alkoholilla, joka huuhtoo gram negatiivisista bakteereista kristalliviolettiväriä pois jättäen bakteerit värittömiksi. (Liimatainen 2000.) Gram negatiivisten bakteerien ulkoseinämässä oleva peptidoglykaanikerros on niin ohut, että alkoholi pääsee sitä vaurioittamaan aiheuttaen reikiä, joista väri pääsee huuhtoutumaan ulos. Tämän jälkeen tässä vaiheessa oleviin värittömiin bakteereihin käytetään safraniinivastaväriä, joka värjää ne punaisiksi. Gram positiivisten bakteereiden peptidoglykaanikerros on puolestaan niin paksu, ettei alkoholihuuhtelu sitä vaurioita, jolloin väri ei vapaudu ja bakteerin väri säilyy siniviolettina. (Liimatainen 2000, 127; Hussey & Smith 2005.)

4 BEETALAKTAMAASIT

Beetalaktamaasi on gram negatiivisten sauvabakteerien tuottama entsyymi. Tämä entsyymi pilkkoo beetalaktaamirenkaan, joka on beetalaktaamiantibioottien esim. kefalosporiinit tai penisilliinin rakenneosia. Tästä syystä tietyt beetalaktaamiryhmän antibiootit eivät tehoa beetalaktamaasi entsyymiä tuottaviin bakteereihin. Beetalaktamaasit luokitellaan ryhmiin niiden entsyymien aktiivisessa kohdassa olevan beetalaktaamirengasta pilkkovan aminohapon mukaan. (Taulukko 1.) (THL STANDARDI versio 6. Bakteri-ryhmäkohtaiset kommentit.)

TAULUKKO 1. Beetalaktamaasien luokittelu.(THL STANDARDI versio 6. Bakteri-ryhmäkohtaiset kommentit.)

luokka	entsyymin aktiivinen kohta	esimerkkejä
A	Seriini	KPC,useimmat ESBL:t
B	Sinkki	Metallobeetalaktamaasit
C	Seriini	AmpC
D	Seriini	OXA

4.1 ESBL ja AmpC

AmpC ja ESBL ovat bakteerien tuottamia entsyymejä, jotka antavat bakteereille resistenssin tiettyjä antibiootteja kohtaan. ESBL(Extended- Spectrum Beta- Lactamases) tarkoittaa laajakirjoista beetalaktamaasientsyymiä, joka tekee bakteerin vastustuskykyiseksi penisilliineille, kefalosporiineille ja monobaktaameille. ESBL- geenejä esiintyy yleisimmin Klebsiella-lajeilla ja E.colilla. (Tissari ym. 2010.)

AmpC- geeni esiintyy usealla enterobakteerilla kromosomaalisena. *E. coli* luonnollista ampicilliiniresistenssiä aikanaan tutkittaessa kartoitettiin bakteerin genomia sen resistenssigeenin löytymiseksi. Geenejä löydettiin ensin 1, joka nimettiin A:ksi. Myöhemmin tutkimuksissa kuitenkin huomattiin, ettei A geeni ollut beetalaktamaasia koodaava geeni. Seuraavaksi löydetty B:ksi nimetty geeni ei myöskään ollut beetalaktamaasia koodaava, vaan vasta kolmas, joka nimettiin loogisesti AmpC:ksi. (THL STANDARDI versio 6. Bakteerilääkeryhmäkohtaiset kommentit.) Bakteerikannan resistentiksi kefalosporiineille, penisilliineille ja monobaktaameille tekee sen geenien sääntelyn purkautuminen. AmpC voi olla myös plasmidivälitteinen ja liikkua näin eri bakteerilajien välillä. Plasmidivälitteisen AmpC- geenin omaavat kannat, joilla ei ole AmpC:tä kromosomaalisena voivat aiheuttaa sairaalaepidemioita, jolloin niiden merkitys on sama kuin ESBL:n. (Philippon, Arlet & Jacoby 2002.) AmpC plasmidiperäiset beetalaktamaasit ovat yleisin syy ampicilliiniresistentille. (Hakanen 2009.) Plasmidivälitteinen AmpC- tyyppi tuottaa entsyymiä jatkuvasti suuria määriä. Vaikka AmpC hajottaa 3. polven kefalosporiineja ESBL- entsyymiä heikommin, voi suuri entsyymimäärä yhdistettynä näiden lääkkeiden hitaasta imeytymisestä bakteerin periplasmiseen tilaan, voi aiheuttaa samanlaisen resistentin kuin ESBL. AmpC- tyyppien entsyymit eivät ole kuitenkaan inhiboivissa samoilla inhibiittoreilla, kuin ESBL ja lisäksi ne hajottavat myös kefoksitiinia. (THL Standardi versio 6.)

ESBL- ominaisuuden välittyminen tapahtuu bakteerin plasmidissa ja siihen liittyy monesti resistenssi muitakin mikrobilääkeryhmiä kohtaan. Koska ESBL leviää bakteerikannasta ja bakteerilajista toiseen plasmidivälitteisen ominaisuutensa vuoksi, pidetään ESBL- kantoja hoidollisena ja sairaalahygienisinä ongelmina. ESBL- kantojen diagnostiikka perustuu herkkyysmäärittelyyn ja bakteeriviljelyyn. *E. coli* ja *K. pneumoniae* kannat ovat luonnostaan herkkiä 3. polven kefalosporiineille ja ne testataan edelleen ESBL- ominaisuuden suhteen. ESBL- ominaisuutta koodaavia geenejä on todettu suuri määrä, jolloin kaikki ESBL:t eivät toimi klassisesti. Enterobakteerit ilmentävät myös muita laajakirjoisia beetalaktamaaseja, kuten AmpC:tä, joka on useilla enterobakteereilla luontainen resistenssimekanismi. AmpC- ominaisuus voi siirtyä plasmidivälitteisesti sille epätyypillisiin suolistobakteereihin, kuten *E. coli*in. Samalla bakteerilla voi siis olla sekä ESBL- että AmpC- ominaisuus. Tämä voi puolestaan aiheuttaa diagnostista hankaluutta. (Aittoniemi 2010.) ESBL- bakteerin kantajuus on yleistynyt ja niiden aiheutta-

mat infektiot ovat yleistyneet Suomessa 2000- luvun puolivälin jälkeen. (Kanerva 2012.)

4.2 Karbapenemaasit

Karbapenemaasit hajottavat yleisesti ottaen kaikkia beetalaktaameja ja ne ovat laajakirjoisimpia beetalaktamaaseja. Karbapenemaasigeenin omaavat bakteerit kuten *Escherichia coli* ja *Klebsiella pneumoniae*, ovat resistenttejä karbapeneemien lisäksi myös kefalosporiineille, penisilliineille ja monobaktaameille. Tämän lisäksi ne ovat usein myös resistenttejä beetalaktaami- inhibiittori-yhdistelmille kuten esim. amoksisilliini/klavulaanihappo. Geenit jotka koodaavat karbapenemaasia ovat liittyneinä yleensä erilaisiin plasmideihin, joissa mukana on useita eri mikrobilääkeresistenssitekijöitä koodaavia geenejä. Tämän johdosta gram negatiiviset bakteerit jotka omaavat karbapenemaasigeenin ovat resistenttejä myös useille muille mikrobilääkeryhmille kuten tetrasykliineille, fluorokinoloneille sekä aminoglykosideille. Karbapenemaasit leviävät plasmidien välityksellä ja pystyvät siirtymään lajista ja bakteerikannasta toiseen. Karbapeneemiresistenssiä voivat aiheuttaa myös bakteerin ulkokalvon proteiinimuutokset sekä erilaisten solupumppujen aktivaatiot yhdessä beetalaktaameja hajottavien entsyymien kanssa ilman varsinaista karbapenemaasia. (Jalava 2010.)

Karbapenemaasi tyyppejä ovat KPC ”*Klebsiella pneumoniae* karbapenemase, OXA ”oxacillin- hydrolyzing”, usein OXA- 48, VIM ” Verona intregron- encoded metallo- β -lactamase”, NDM ” New Delhi metallo- β - lactamase. (Jalava 2010.) Bakteerikannoilla jotka omaavat karbapenemaasigeenin on usein myös muita resistenssigeenejä, jolloin ne ovat aina moniresistenttejä (MDR), usein resistenttejä lähes kaikille antibiooteille (XDR) ja joskus resistenttejä kaikkia käytettävissä olevia antibiootteja vastaa eli pan-resistenttejä (PDR). Tämän tyyppisten bakteerien yleistyminen lisää kuolleisuutta ja kustannuksia sekä pitkittää hoitoja. Bakteereja on tästä syystä pidettävä sairaalahygienisesti merkittävänä. Hoidollisesti sekä sairaalahygienisesti merkittävimpinä uhkina pidetään KPC- geenejä omaavia *klebsiella pneumoniae*- kantoja sekä OXA- geenejä omaavia *Acinetobacter baumannii*- kantoja. Epidemioita ovat aiheuttaneet myös KPC- geenin omaavat *Enterobacter cloacae* ja *Pseudomonas aeruginosa*- kannat. Suomesta karbapenemaasin omaavia gram negatiivisia sauvabakteereja on löydetty vain yksittäisiä kantoja, vaikka ne ovat jo hyvin laajalle levinneitä. Karbapenemaaseja tuottavien bak-

teerien tunnistamisessa käytettävälle diagnostiikalle tämä suositus asettaa minimitason. Karbapenemaaseja tuottavien bakteereiden toteaminen perustuu näiden kantojen alentuneeseen karbapeneemiherkkyyteen. (Tissari ym. 2010.)

Alentunut herkkyys on merkinä siitä, että jotta karbapenemaasi voidaan osoittaa, on kantaa tutkittava tarkemmin. Ainoa luotettava tapa tutkia karbapenemaasin tuottoa on tunnettujen karbapenemaasigeenien osoittaminen molekylaarisilla menetelmillä. Karbapenemaasia tuottavien kantojen löytymiseen paras antibiootti tutkimusten mukaan on meropeneemi. Tiettyjen karbapenemaaseja tuottavien kantojen diagnostiikka saattaa olla hyvin hankalaa esim. OXA- 48- ryhmä. Tämä johtuu siitä, että pelkkä OXA- 48- entsyymi ei aiheuta 3. polven kefalosporiiniresistenssiä ja lisäksi myös karbapeneemiherkkydet voivat olla matalia. On ehdotettu, että OXA- 48- entsyymin läsnäolosta voisi olla merkinä korkea Temosilliini- MIC. (Jalava 2010.)

Klebsiella pneumoniae- kantojen aiheuttamia epidemioita on todettu mm Kreikassa, Israelissa, Turkissa, Kiinassa, Väli-Amerikassa ja joissain osissa Yhdysvaltoja. Näiden kantojen aiheuttamia vaikeita infektioita on löydetty erityisesti teho-osastojen potilailta ja kannat ovat olleet myös useimmille muille bakteereille vastustuskykyisiä. Laboratoriossa karbapenemaasia tuottavan kannan tunnistaminen voi olla haasteellista ja se varmistetaan molekyylibiologisin menetelmin. Näiden kantojen yleistyminen vaikeuttaa ja uhkaa erityisesti vaikeasti sairaiden potilaiden hoitoa. Suomessa ensimmäiset (KPC-) kannat jotka tuottavat karbapenemaasia havaittiin kesällä 2009. (Tissari ym. 2010.)

5 BEETALAKTAAMIT

Kaikki bakteerit tuottavat proteiineja, joilla on vaihteleva kyky inaktivoida beetalaktaameja. (Taulukko 2.) Näiden proteiinien yleisyys bakteerikunnassa johtuu siitä, että ne ovat alun perin entsyymejä, jotka osallistuvat bakteerin soluseinän peptidoglykaanin valmistukseen, jota bakteerit tarvitsevat. Jos tällaisella entsyymillä on kyky inaktivoida beetalaktaameja niin tehokkaasti, että sillä on kliinistä merkitystä, kutsutaan sitä silloin beetalaktamaasiksi. Beetalaktamaasiksi tullaan mutaatioiden kautta. Mutaatioiden sijainti ja määrä vaikuttavat siihen, mitä beetalaktaameja se inaktivoi tehokkaimmin. (Nissinen 2011, 12.) ESBL- ominaisuuden omaavat bakteerit ovat resistenttejä penisilliineille, vaihtelevasti 3. polven kefalosporiineille ja monobaktaameille ja herkkiä beetalaktamaasi- inhibiittoreille (Klavulaanihappo) ja keftamysiinille. Plasmidiperäiset beetalaktamaasit ovat yleisin syy ampisilliiniresistenssiin ja estyvät ainakin osittain klavulaanihapolla tai muilla beetalaktamaasin estäjillä. Kromosomaaliset beetalaktamaasit ovat puolestaan resistenttejä lähes kaikille beetalaktaamimikrobilääkkeille, lukuun ottamatta karbapeneemejä, eivätkä esty klavulaanihapolla tai muilla beetalaktamaasin estäjillä. (Hakanen 2009.)

Beetalaktaamit ovat laajalti käytössä niiden bakteereja tappavien ominaisuuksiensa ja tehokkuutensa vuoksi. Beetalaktamaasi- inhibiittorit ovat molekyylijä, jotka estävät beetalaktamaasin toiminnan niihin sitoutumalla. Beetalaktamaasi- inhibiittoreilla on pyritty säilyttämään beetalaktaamien teho lääkevalmisteissa. (Nourrison ym. 2015.)

1 polven kefalosporiinit

Ensimmäisen polven kefalosporiineihin kuuluvat vanhimmat ruiskutettavat kefalotiini, kefaloridiini, kefalosporiinit, sekä useita suun kautta annettavia aineita. Johdosten välillä on vain vähän eroja. Ensimmäisen polven kefalosporiinit ovat erityisen tehokkaita gram positiivisiin bakteereihin, mutta eivät kestä riittävästi gram negatiivisten bakteerien tuottamia beetalaktamaaseja. (Männistö ym. 2001.)

2 polven kefalosporiinit

Ruiskutettavat 2. polven kefalosporiinit kestävät beetalaktamaaseja 1. polven kefalosporiineja huomattavasti paremmin. Tälle ryhmälle resistenttejä bakteereita ovat esim. Pseudomonas, jonka solukalvoa 2.polven kefalosporiini eivät pysty läpäisemään. (Männistö ym. 2001.)

3 polven kefalosporiinit

3. polven kefalosporiinit ovat jonkin verran aktiivisempia gram negatiivisia bakteereja vastaan, kuin 2. polven kefalosporiinit, ne ovat rasvaliukoisia ja penetroituvat hyvin bakteeriin. (Männistö ym. 2001.)

TAULUKKO 2. Beetalaktaamien alaryhmät ESBL- positiivinen E.coli virtsaviljelyssä, (Nissinen 2011.)

Beetalaktaamien alaryhmät:

Penisilliinit

- penisilliini
- ampisilliini
- piperasilliini(ei käytössä Suomessa)
- mesillinaami

Penisilliinin ja beetalaktamaasi-inhibiittorin yhdistelmät

- amoksisilliini-klavulaanihappo
- piperasilliini-tatsobaktaami

I-polven kefalosporiinit

- esim. kefaleksiini

II-polven kefalosporiinit

- kefuroksiimi

- kefuroksiimiaksetiili
- kefaklori

III-polven kefalosporiinit (ns. laajakirjoiset kefalosporiinit)

- kefotaksiimi
- keftriaksoni
- keftatsidiimi

Karbapeneemit

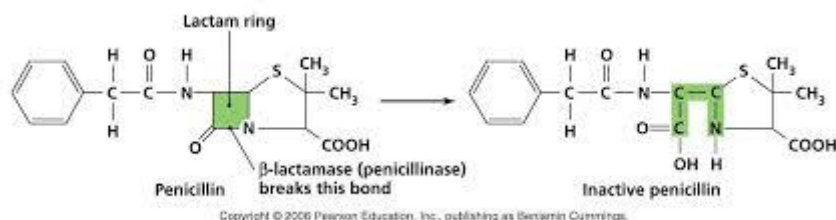
- esim. meropeneemi, imipeneemi

Monobaktaamit

- atstreonaami

Beetalaktaamirengas eli ns. nelirengas on olennainen sekä kefalosporiinien että penisilliinien tehollisuudelle. Beetalaktamaasientsyymit pilkkovat beetalaktaamirengasta, jolloin beetalaktaamiryhmän bakteerilääke inaktivoituu (Kuvio 1.). Klavulaanihappo on kehitetty penisilliinirungosta. Klavulaanihappo sitoutuu bakteerin tuottamiin beetalaktamaaseihin ja inaktivoi ne. Klavulaanihapolla on heikko antibakteerinen vaikutus, mutta yhdistettynä esim. amoksisilliiniin, joka on hapon kestävä ja tehokas gram negatiivisia sauvabakteereita vastaan, laajentaa se vaikutuspiiriään huomattavasti. Imipeneemi ja meropeneemi ovat vaikutuspiiriltään laajimpia kaikista tunnetuista bakteerilääkkeistä ja ovat täten osoittautuneet tehokkaiksi antibiooteiksi. (Männistö ym. 2001.)

KUVIO 1. beetalaktamaasi inaktivoi beetalaktamaasiryhmän bakteerilääkkeitä.



6 TYÖN TOTEUTUS

Kohteenamme oli 48 enterobakteerikantaa, joilla on jokin tunnettu mekanismi (ESBL, AmpC, karbapenemaasi) tai Vitek- AES- perusteinen epäily mekanismin olemassa olostani eli resistentiltään vaihtelevia potilaskantoja, joiden fenotyyppi viittaa laajakirjoiseen beetalaktamaasin tuottoon. Laboratoriohenkilökunta viljeli kannat syväjäästä ChromAgar- Orientation maljoille. Kullekin kannalle tehtiin herkkyysmääritys kahden eri valmistajan samaa tarkoitusta varten hankituilla kiekkopaneeleilla. Estorenkään halkaisija on suoraan verrannollinen bakteerin herkkyyteen. Teimme vertailun vuoksi vielä Modified Hodge Test:n eli apilatestin, joka määrittää bakteerien beetalaktamaasi tuotannon. ESBL- entsyymien sekä AmpC- entsyymien tuotantoa pääsimme tutkimaan ainoastaan Mast Groupin kiekkopaneeleilla. Kaikista 48:ta kannasta valmistimme suspension keittosuolaan. Ennen maljalle levitystä, suspension tiheys varmistettiin McFarland- standardin avulla. Liian tiheä tai harva kasvusto maljalla saattaa aiheuttaa epäselvän estovyöhykkeen reunan, jolloin estovyöhykkeen laajuutta voidaan yli- tai aliarvioida. Kiekkoherkkyysmenetelmässä tutkittavaa bakteerikantaa levitetään Agar- maljan pinnalle tasaisesti. Antibioottikiekkojen tulee olla huoneenlämpöisiä ennen maljalle asetusta, sillä kosteus vaikeuttaa antibiootin imeytymistä kiekosta. Lisäksi on syytä tarkistaa, että antibiootti on kiinnittynyt elatusaineeseen kunnolla, muutoin tuloksista voi tulla epäselviä tai vaikeasti tulkittavia. (Evira 2014.)

Siirrostuksen jälkeen maljalle asetetaan antibioottikiekot, joista antibiootti imeytyy elatusaineeseen. Näkyvä kasvun raja muodostuu sille etäisyydelle, kun antibiootipitoisuus on laskenut alle pienimmän bakteerin kasvua estävän rajan. Bakteerit luokitellaan näiden estovyöhykkeiden perusteella resistentteihin (R), herkkiin (S) ja niiden välivyöhykkeisiin (I). (Evira 2014.)

6.1 ESBL:n ja AmpC: osoittaminen

ESBL- kantoja haetaan aktiivisesti *klebsiella*-, *E. coli*-, *Proteus mirabilis*- ja *salmonella*- kantojen joukosta.

ESBL ja AmpC:n tunnistukseen käytimme Mast Groupin kiekkopaneeleita D68C (Taulukko 3.), D69C (Taulukko 4.) ja D63C (Taulukko 5.) Mast Groupin kiekot ovat imu-

paperiin imeytettyjä antibioottikiekkoja. Kiekoissa on imeytettyjä lääkkeitä, kuten Kefpodoksiimia, ESBL ja AmpC- inhibiittoreita sekä entsyymien tuotannon lisääjää eli indusoivaa ainetta. Inhibiittorit ovat aineita, jotka estävät tietyn entsyymien toiminnan sitoutumalla niihin. Bakterin kromosomissa oleva AmpC- geenin ilmentyminen on normaalisti vähäistä eli se on indusoituva, eikä näin ollen aiheuta juurikaan beetalaktamiiriresistenssiä. Tiedetyt antibiootit indusoivat AmpC- geenin ilmentymistä, jolloin sitä tuotetaan tavallista enemmän, tämä saattaa puolestaan vaikuttaa bakterin beetalaktamiiriresistenssiin. (THL 2012.)

TAULUKKO 3. D68C.

KIEKKO VAIKUTTAVAT AINEET

A	Kefpodoksiimi
B	Kefpodoksiimi+ ESBL inhibiittori
C	Kefpodoksiimi+ AmpC inhibiittori
D	Kefpodoksiimi+ ESBL & AmpC inhibiittorit

Lisäksi maljalle asetettiin boronihappokiekko D ja A kiekkojen väliin, hieman lähemmäksi A- kiekkoa. Boronihappokiekkona käytettiin ROSCO:n MRP10- kiekkoa. Tällä testillä tunnistettiin kannan AmpC ja/tai ESBL-tuotanto.

TAULUKKO 4. D69C

KIEKKO VAIKUTTAVAT AINEET

A	Kefpodoksiimi+ AmpC inducer
B	Kefpodoksiimi+ AmpC inducer+ ESBL inhibiittori
C	Kefpodoksiimi+ AmpC inducer+ ESBL inhibiittori+ AmpC inhibiittori

D69C testillä osoitettiin ainoastaan AmpC:n tuotanto, mutta testi ei kerro onko kyseessä plasmidivälitteinen vai kromosomaalinen AmpC. (Valmistajan työohje 2014.)

TAULUKKO 5. D63C

KIEKKO	VAIKUTTAVA AINE
1	Kefepiimi
2	Kefepiimi+ klavulaani- happo

D63C testillä tutkitaan onko kromosomaalisen AmpC:n omaavalla enterobakteerilla myös ESBL- tuotantoa. (Valmistaja työohje 2014.)

6.2 Karbapenemaasin osoittaminen

Karbapenemaasin tunnistamiseen opinnäytetyössä käytettiin kahden eri valmistajan samaan tarkoitukseen käytettäviä kiekkopaneeleita. Mast Group D70C ja D71C (Taulukko 6.) sekä Roscon Carbapenemases. KPC+ MBL Confirm ID kit (Taulukko 7.)

TAULUKKO 6. D70C Mast Group

KIEKKO	VAIKUTTAVA AINE
A	Meropeneemi
B	Meropeneemi+ MBL inhibiittori
C	Meropeneemi+ KPC inhibiittori
D	Meropeneemi+ AmpC inhibiittori

D70C testillä tunnistettiin onko kyseessä MBL- positiivinen vai KPC- positiivinen kanta vai onko kyseessä karbapenemaasia tuottava AmpC- kanta. (Valmistajan työohje 2014.)

D71C:

Käytetään D70C rinnalla: varmistetaan Enterobakteerin KPC, MBL ja/tai OXA-48 tuotanto. Maljalle asetettiin yksi CAT-ID faropeneemi kiekko. (Valmistajan työohje 2014.)

TAULUKKO 7. ROSCO Carbapenemases. KPC+ MBL Confirm ID kit.

KIEKKO VAIKUTTAVA AINE	
A	Meropeneemi
B	Meropeneemi+ DPA
C	Meropeneemi+ borooni-happo
D	Meropeneemi+ kloksasiliini

Valmistaja huomauttaa ,että testillä on syytä tutkia ainoastaan ertapeneemille resistenttejä kantoja, sillä ertapeneemille herkät kannat saattavat aiheuttaa väärän positiivisen tuloksen boroonihapon osalta. (Valmistajan työohje 2010.)

Kaikkia maljoja inkuboitiin yön yli +37 asteessa ja tulokset luettiin seuraavana päivänä.

Modified Hodge Test (apila- testi)

Teimme jokaisesta tutkittavasta kannasta apila- testin, jonka tarkoituksena on myös määrittää tuottaako bakteerikanta beetalaktamaasia, erityisesti karbapenemaasia. Maljana käytimme MH- maljaa, jolle siirrostettiin tasaiseksi ympiksi indikaattorikanta (E.coli). Maljan keskelle asetettiin meropeneemi- kiekko ja maljan reunalta koh-tisuoraan kiekkoon asti siirrostettu runsaana viivasiirroksena tutkittavat bakteerikannat. Tutkittavien kantojen tuottama beetalaktamaasi hajottaa kiekosta maljaan diffentoituneen beetalaktaamin, joka ilmenee herkän indikaatiokannan kasvuna viivan läheisyydessä. Jokaiseen sarjaan liitettiin positiivinen ja negatiivinen kontrollikanta. Indikaattorikanta, malja, kontrollikannat sekä antibioottiekko valittiin sen mukaan, mitä beetalaktamaasin tuotantoa haluttiin tutkia. Karbapenemaasin tuotannon tutkimiseen indikaattorikanta oli E. coli, malja MH, kontrollikanta K. pneumoniae ja antibioottiekkona käytettiin meropeneemiä. (KESLAB Työohje 2010.)

7 TULOSTEN KIRJAUS

Estorenkään halkaisijat mitattiin ja tulokset merkittiin lomakkeelle, jonka jälkeen tulokset laskettiin tietyllä kaavalla (Taulukko 8.)(Liite 1.), (Taulukko 9.)(Liite 2.) ja (Taulukko 10.)(Liite 3.)

TAULUKKO 8. D68C

B- A	D-C	D-B	C-A	
$\geq 5 \text{ mm}$	$\geq 5 \text{ mm}$	$\leq 5 \text{ mm}$	$\leq 5 \text{ mm}$	ESBL
$\leq 5 \text{ mm}$	$\leq 5 \text{ mm}$	$\geq 5 \text{ mm}$	$\geq 5 \text{ mm}$	AMPC
$\leq 5 \text{ mm}$	$\geq 5 \text{ mm}$			ESBL+AMPC
$\leq 2 \text{ mm}$	$\leq 2 \text{ mm}$	$\leq 2 \text{ mm}$	$\leq 2 \text{ mm}$	ESBL+AMPC
				NEGATIIVINEN

Positiivisessa ESBL tuloksessa boroonihappokiekon ja A- kiekon välissä ei nähdä bakteerikasvun estymää.

Positiivinen AmpC:

Boroonihappokiekon estorengas on suurempi kuin A- kiekon, sekä A:n ja boroonihappokiekon väliin muodostuu synergeettinen estovyöhyke eli bakteeri kasvu on estynyt vain A- kiekon siltä puolelta, jossa boroonihappokiekko sijaitsee.

TAULUKKO 9. D69C

C-A	C-B	TULOS
$\geq 5 \text{ mm}$	$\geq 5 \text{ mm}$	AmpC positiivinen
$\leq 3 \text{ mm}$	$\leq 3 \text{ mm}$	AmpC negatiivinen

Kaikkien estorenkaiden erotuksen ollessa 3 mm tai vähemmän on kyseessä negatiivinen AmpC tulos.

TAULUKKO 10. D63C:

Z2- Z1	TULOS
≥ 5 mm	ESBL positiivinen
≤ 2 mm	ESBL negatiivinen

Karbapenemaasin osoittaminen

Kiekkopaneelit: Mast Group D70C Carbapenemase detection set (Taulukko 11.), D71C mastdiscs CAT-ID (Liite 4.)

TAULUKKO 11. D70C

B-A	C-A	TULOS
≥ 5 mm		MBL positiivinen
	≥ 4 mm	KPC positiivinen

D71C: Tulosten tulkinnassa ei mitattu estorenkkaan mitta, vaan tulkinta perustui silmämääräiseen havainnointiin. Negatiivinen karbapenemaasi tulos näkyy kirkkaana estorenkkaan kiekon ympärillä. KPC/ MBL Positiivinen tulos näkyy estorenkkaan puuttumisena eli kasvu on kiinni kiekossa. OXA- 48 positiivisessa tuloksessa maljalla on estorengas, mutta se ei ole kirkas ja nähtävillä on useita erillispesäkkeitä.

Rosco: Combined disk test. KPC + MBL Confirm ID kit

Meropeneemi+ Boroonihappo kiekon ympärillä oleva estorengas on ≥ 5 mm, tällöin Meropeneemi, Meropeneemi+DPA sekä Meropeneemi+ oksasilliini ilmentää KPC entsyymien tuotantoa eli kanta on KPC positiivinen kanta.

Meropeneemi+ DPA kiekon estorenkkaan erotuksen ollessa ≥ 5mm kuin meropeneemikiekon estorengas on kyseessä MBL positiivinen kanta (Taulukko 12.)

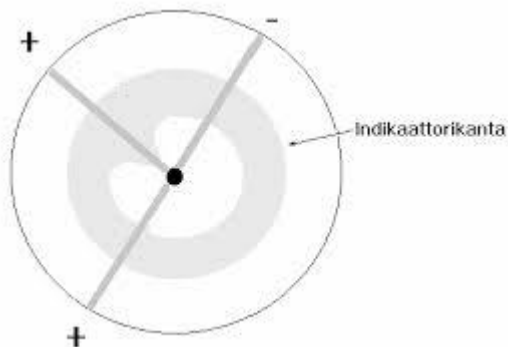
TAULUKKO 12. Rosco Compined Disk Test.

	C-A	D-A	B-A
KPC	$\geq 5\text{mm}$	$<5\text{mm}$	$<5\text{mm}$
MBL		$\geq 5\text{mm}$	

Modified Hodge Test eli apila-testi

Bakteerikanta tuottaa beetalaktamaasia, eli tulos on positiivinen, jos indikaattorikannan estorenkään reuna taipuu kiekkoa kohti tutkittavan kannan siirroksen läheisyydessä. Pienikin taipuminen luetaan positiivisena tuloksena. Tulos on negatiivinen, kun indikaattorikannan estorenkään reuna leikkaa taipumatta tutkittavan kannan viivasiirrosta. (Kuvio 2.) (TYÖOHJE Apila- testi KESLAB 2010)

KUVIO 2. Apila- testi (TYÖOHJE Apila- testi KESLAB 2010.)



8 TUTKIMUSTULOKSET

Tulokset saatuamme vertailimme niitä referenssilaboratorion tuloksiin ja arvioimme tulosten yksiselitteisyyttä. 48 tutkittua bakteerikantaa olivat *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae*, *Salmonella* ja *Proteus mirabilis* (Taulukko 13). Taulukosta puuttuu kolme kantaa, joiden tulokinnassa oli epäselvyyksiä johtuen puuttuvista kiekkoista.

TAULUKKO 13. Tutkimuksessa käytetyt bakteerikannat.

	Escherichia coli	Enterobacter cloacae	Salmonella	Proteus mirabilis	Klebsiella pneumoniae
yht.	25	3	1	2	14
ESBL	9	-	1	-	4
ampC	11	3	-	2	3
Karbap.	1	-	-	-	7
Negat	-	-	-	-	3

8.1 ESBL ja AmpC

Mast Groupin kiekkopaneeleilla saadut tulokset olivat linjassa referenssilaboratorion tuloksien kanssa. Kannat 2-4 olivat ESBL/ AmpC yhdistelmä kiekkopaneelilla D68C negatiivisia ja Mast Groupin oma laskentaohjelma ehdotti jatkotoimenpiteiksi karbapenemaasin tutkimista D71C testillä. Kannat 2-4 olivat KPC- positiivisia. D68C, D69C sekä D63C kiekkopaneelit olivat linjassa keskenään ja tulokset olivat yksiselitteisiä. Mast Groupin tarjoama laskentaohjelma oli tarkoitettu ESBL/ AmpC yhdistelmä kiekkopaneelin D68C tulosten tulkintaan, joka oli mahdollista ladata Mast Groupin sivuilta. (Liite 5.) Tulokset syötettiin taulukkoon, ohjelma teki laskutoimitukset ja antoi tuloksen heti. Laskentaohjelman tulokset olivat myös yhdenmukaiset ja linjassa referenssilaboratorion tuloksien kanssa. Lisäksi, jos laskentaohjelma ei ollut varma tuloksesta, kommenttikenttään tuli huomautus mahdollisista lisätoimenpiteistä. Esim. kannat 2-4 olivat ESBL:n ja AmpC:n suhteen negatiivisia, mutta karbapenemaasin suhteen positiivisia.

ESBL- positiiviset kannat olivat 1, 10, 27- 29, 33- 40 ja 42. Näistä kaikki kannat tunnistuivat hyvin.

AmpC- positiiviset kannat olivat 5- 6, 8- 9, 14, 17- 18, 20- 23, 26, 30- 31, 41, 43, 44- 45. Kannat tunnistuivat hyvin käytetyillä menetelmillä.

8.2 Karbapenemaasi

Karbapenemaasin tunnistamiseen tarkoitettua kiekkopaneelia käytimme kantoihin, joilla oli joko tunnettu karbapenemaasi mekanismi tai AES- vitek antoi sellaisesta epäilyn. Kantoja oli yhteensä kaksitoista, joista todellisia karbapenemaaseja tuottavia kantoja oli kahdeksan. Kannat 2-4, 11- 13 sekä 15- 16 olivat karbapenemaasia tuottavia kantoja.

Rosco

KPC kanta tunnistui suhteellisen hyvin. Useilla maljoilla oli erillispesäkeitä, jotka hankaloittivat tulkintaa. Pesäkkeiden huomioiminen mittauksessa antoi KPC negatiivisen tuloksen, mutta jos estorengas taas mitattiin pesäkkeitä huomioimatta tunnistui KPC hyvin. MBL tunnistui hyvin, mutta OXA- 48 suhteen testi osoittautui epäluotettavaksi. Kannat 27- 29 olivat karbapenemaasin suhteen negatiivisia, mutta tämän kiekkopaneelin antamien tulosten mukaan kanta oli OXA- 48 positiivinen. Mast Groupin paneelin sekä apila testin mukaan kannat 27- 29 olivat karbapenemaasi negatiivisia, mutta ESBL positiivisia.

Mast Groupin kiekkopaneeleilla

D70C

Tässäkin tulkinnassa tuotti hankaluutta maljalla olevat erillispesäkkeet. Valmistajan ohjeessa tulokset mitattiin estorengaan ollessa kirkas. Monella maljalla oli havaittavissa useita erillispesäkkeitä. Tiedettiin, että kannat 2-4 olivat KPC positiivisia, mutta maljoilla esiintyi erillispesäkkeitä, joten tulos ei ollut luotettava. Tällä testillä tunnistettiin KPC ja MBL tyypit. Valmistajan työohjeessa mainitaan testin oleva 98 % herkkyys ja 93 % spesifisyys KPC- tyyppin tunnistamiseen ja 100 % herkkyys ja spesifisyys MBL- tyyppin tunnistamiseen. (Valmistajan työohje 2013.) Kannat 2-4 ja 13 olivat KPC- positiivisia ja tunnistuivat hyvin.

D71C eli CAT- ID

D71C testi on tarkoitettu OXA-48, KPC sekä MBL tyyppien tunnistamiseen. Valmistajan ohjeessa mainittiin, että karbapenemaasin tunnistamiseen annetut raja- arvot eivät ole aina luotettavia. Lisäksi on havaittu, että juuri karbapenemaasin tunnistamiseen tarkoitettujen kiekkopaneelien epäonnistuvat karbapenemaasi- entsyymeiden havaitsemisessa. Vaikka menetelmät KPC:n ja MBL:n tunnistamiseen ovat kehittyneet, on OXA- 48 tyyppi edelleen vaikea tunnistaa. CAT- ID testin helppous oli se, ettei varsinaista mittausta tarvinnut tehdä, vaan tuloksia havainnointiin visuaalisesti. Testiä käytetään Mast Groupin D70C testin rinnalla varmistamaan, oliko kyseessä karbapenemaasia tuottava kanta. (Valmistajan työohje 2014.)

Modified Hodge Test eli apila- testi

Kaikki 8 karbapenemaasi kantaa tunnistuivat apila- testillä hyvin. Apila- testiä käytimme karbapenemaasin tunnistukseen vertailutestinä.

9 POHDINTA

9.1 Johtopäätökset ja jatkotutkimusaiheet

ESBL ja AmpC tunnistuivat, niiden tutkimiseen tarkoitettujen kiekkopaneelien avulla luotettavasti ja olivat linjassa referenssilaboratorion tuloksiin. Mast Group ESBL & AmpC Detection Disc Sets osoitettiin toimivaksi ja se otettiin käyttöön Fimlab laboratorio Keski- Suomen toimipisteen mikrobiologian laboratoriossa syksyllä 2015. Vertailua kahden valmistajan menetelmän toimivuuden välillä emme päässeet testaamaan ESBL ja AmpC:n osoituksessa. Roscolta tähän tarkoitukseen tilatut kiekot eivät saapuneet perille siinä aikataulussa, että olisimme ne ehtineet tässä tutkimuksessa huomioimaan.

Karbapenemaasin osalta tulokset eivät olleet yhdenmukaisia ja testi osoittautui OXA-48 suhteen epäluotettavaksi. KPC- kantojenkin kohdalla tulokset olivat tulkinnanvaraisia. Estovyöhykkeitä mitattaessa kiinnitettiin huomiota runsaaseen erillispesäkkeiden määrään, jolloin tulos oli negatiivinen. Erillispesäkkeet huomiotta jättäminen olisi toisaalta antanut KPC- positiivisen tuloksen. Karbapenemaasia tuottavista kannoista ainoana selkeänä tunnistui MBL, joten testiä ei voitu kokonaisuutena pitää luotettavana.

Kumpaakaan karbapenemaasi tuoton osoittamiseen tarkoitettua kiekkomenetelmää ei otettu käyttöön tutkimuksen perusteella. Vaikka karbapenemaaseja tuottavat gram negatiiviset sauvabakteerit etenkin tietyt Enterobariaceae- heimon lajit ovat yleistyneet maailmalla hyvin nopeasti ja aiheuttaneet laajoja epidemioita, ei niitä Suomesta ole löydetty kuin joitain yksittäisiä kantoja. (THL 2010.) Roscon kiekot olivat antibioottipuriste valmisteita ja säilyisivät täten Mast Groupin imupaperiin imeytettyjä antibioottikiekkoja kauemmin. Toisaalta puristevalmisteet olivat herkempiä hajoamaan ja osa kiekkoista murtui astettaessa maljalle. Mast Groupin karbapenemaasin tunnistukseen tarkoitettujen kiekkojen käyttö ja tulosten tulkinta koettiin Roscon kiekkoja yksinkertaisemmaksi. Nämä seikat olisi otettu huomioon valmistajan menetelmää käyttöön valittaessa.

Olisi ollut mielenkiintoista päästä vertailemaan valmistajien menetelmien toimivuutta myös ESBL:n ja AmpC:n osalta. Jatkotutkimusaiheina tälle opinnäytetyölle olisi myös Roscon ESBL ja AmpC:n osoittamiseen tarkoitettujen kiekkopaneelin toimivuuden osoittaminen ja vertaileminen Mast Groupin kiekkopaneelisiin.

9.2 Tutkimuksen luotettavuuden ja eettisyyden arviointi

Noudatimme opinnäytetyön tekemisessä yleistä huolellisuutta, tarkkuutta ja rehellisyyttä. Näytemateriaalimme koostui suurimmilta osin beetalaktaamistatukseltaan tunnetuista bakteerikannoista (THL, laaduntarkkailu). Osa materiaalistamme oli potilaskantoja, joiden fenotyyppi viittasi laajakirjoiseen beetalaktamaasiin. Potilaskannat oli merkitty numeroin, jolloin potilasta ei pystytty missään vaiheessa identifioimaan.

Validiteetilla eli tutkimuksen pätevyydellä ja luotettavuudella tarkoitetaan tutkimusmenetelmän kykyä selvittää sitä, mitä sillä on tarkoitus selvittää. Mittaustuloksia verrataan todelliseen tietoon mitattavasta ilmiöstä. (Järvinen ym. 2004.) Työssämme ESBL:n ja AmpC:n osoittamiseen tarkoitetut testit olivat linjassa referenssilaboratorion tuloksiin ja olivat yksiselitteisiä, eli testi osoittautui päteväksi sen suhteen, mitä sen oli tarkoituskin selvittää. Karbapenemaasi-entsyymien osoittamiseen tarkoitetut kiekkopaneelit antoivat ristiriitaisia tuloksia ja olivat täten epäluotettavia.

Reliabiliteetilla tarkoitetaan aineiston analyysin ja käsittelyn luotettavuutta. Tämä liittyy ensisijaisesti siihen tutkimuksen vaiheeseen, jossa siirrytään empiirisestä aineistosta analyysin kautta tulkintaan. Reliabiliteetti liittyy yleisyyteen, toistettavuuteen ja falsifioitavuuteen. (Järvinen ym. 2004.) Opinnäytetyön toiminnallisessa osuudessa saimme tarkan menettelytapaohjeistuksen laboratorion mikrobiologilta, mikrobiologian laboratorion henkilökunnalta ja käytössämme oli myös laitevalmistajan omia työohjeita. Noudatimme työmme toiminnallisessa osuudessa, analysoinnissa ja tulkinnassa huolellista ja järjestelmällistä toimintatapaa. Laboratorion mikrobiologi oli tiiviisti mukana yhteistyössä kaikissa työn vaiheissa.

LÄHTEET

Aittoniemi J. 2010 ESBL- positiiviset E.colit avohoidon virtsatietulehdusten aiheuttajina (toim.) Moodi 1/2010

Bigry A., Bidet P., Genel N., Doit C., Arlet G. & Bingen E. 2012. Journal of Clinical Microbiology January 18, 2012 s. 1295- 1302 Phenotypic Screening of Carbapenemases and Associated β -Lactamases in Carbapenem-Resistant *Enterobacteriaceae*

Evira 2014. Bakteerien antibioottiherkkyyden tutkiminen kiekkoherkkyysmenetelmällä. Menetelmäohje 3483/ 9. Luettu 22.10.2015

Hakanen A. 2009: Ovatko moniresistentitbakteerit kurissa. THL. Labquality päivät 5.2.2009

Hakanen A., Lehtopolku M. & Gunell M. 2009 Salmonellojen ja kamylobakteerien mikrobilääkeherkkyys Moodi 5/2009 s.256–257

Hirsijärvi S., Remes P. & Sajavaara P. 2000. Tutki ja Kirjoita. PAINOS 20, Tammi.

Hussey, M. A. & Smith A. C. 2005. Gram stain protocols. American society for microbiology. www.microbelibrary.org/component/resource/gramstein/2886-gram-stein-protocols. 2013. Luettu 18.10.2015

Jalava J. 2010. Suositus karbapenemaaseja tuottavien gramnegatiivisten sauvabakteerien laboratoriodiagnostiikasta ja kantajuusseulonnoista,

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

Kanerva M. 2012. Suolistoperäiset moniresistentit bakteerit klinikon huolenaiheena, Duodecim. 17:1755- 61. Luettu 23.9.2015.

Liimatainen O. Gramvärjäys Moodi (4-5), 126- 128.

Lyytikäinen O. 2013 Huononeva ESBL- tilanne puhutti SIRO- päivillä (toim.) Moodi 1/2013 s. 186–188

Mast Group 2012. Carbapenemase detection set for the detection of MBL and KPC enzyme production. Valmistajan työohje.

- Mast Group 2014. CAT- ID carbapenemase screening simplified. Valmistajan työohje.
- Mast Group 2012. ESBL & AmpC Detection Disc Sets. Valmistajan työohje
- Männistö P. & Tuominen R. 2001. Soluseinää heikentävät bakteerilääkkeet, Farmakologia ja toksikologia 6. painos, Kolu & Tuomisto (toim.)
- Nissinen A. 2011 ESBL-positiivinen E.coli virtsatieviljelyssä Moodi 4/2011 s.112–115
- Nourrisson C., Tan R. N., Hennequin C., Gibold L., Bonnet R. & Robin F. 2015. Journal of Clinical Microbiology Jan. 2015. 34: 975- 983. The MAST D68C test: an interesting tool for detecting extended- spectrum Beta- lactamase (ESBL-) producing Enterobacteriaceae
- Overdevest I. T. M. A., Willensen I., Elberts S., Verhulst C. & Kluythmans J. A. J. W. 2011. Journal of Clinical Microbiology Feb. 2011. s. 519- 522 Laboratory Detection of Extended-Spectrum-Beta-Lactamase-Producing. *Enterobacteriaceae*: Evaluation of Two Screening Agar Plates and Two Confirmation Techniques
- Pastila, S. 2005. Mikrobilääkkeet. Teoksessa Hellstén, S. (toim.) Kliininen mikrobiologia terveydenhuollossa. 2. uudistettu painos. Jyväskylä: Gummerus Kirjapaino Oy
- Philippon, A., Arlet, G., Jacoby, G. 2002. Plasmid-Determined AmpC-Type β -Lactamases. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. Vol. 46, No 1, 1-11. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC126993/pdf/0450.pdf> Luettu 27.10.2015
- Pournaras S., Zarkotou O., Poulou A., Krtisto I., Vrioni G., Themeli- Digalaki K. & Tsakris A. 2013. Journal of Clinical Microbiology July 10, 2013 s. 2986- 2990 A Combined Disk Test for Direct Differentiation of Carbapenemase- Producing *Enterobacteriaceae* in surveillance Rectal Swabs
- ROSCO 2010. Carbapenemases. KPC+ MBL Confirm ID kit. Valmistajan työohje
- Siitonen A. & Vaara M. 2010. Escherichia, Salmonella, Shigella ja Yersinia Teoksessa Huovinen P., Meri S., Peltola H., Vaara M., Vaheri M., Valtonen V: (toim.): Mikrobiologia ja infektiosairaudet s.176–182
- Siitonen A., Vuopio- Varkila J., Salminen M, & von Bonsdorf C. H., 2002. Duodecim 2002;118:2046- 53 Mikrobiologiset tutkimusmenetelmät infektioepidemiologian aseina
- Tissari P. & Anttila V-J. 2010. Muu Enterobacteriaceae-heimo Teoksessa Hedman K., Heikkinen T., Huovinen P., Järvinen A., Meri S. & Vaara M.(toim.): Mikrobiologia, immunologia ja infektiosairaudet s.19

TYÖOHJE: Apila- testi KESLAB 2010.

THL 2014. <https://www.thl.fi/fi/web/infektioaudit/audit-ja-mikrobit/bakteeritaudit/esbl>

Liite 2. AmpC Detection Set D69C (Mast Group)

KSKS-tal- tionu mero	Organism	Estorenaan halkaisija (mm)			Halkaisijoiden erotus (mm)		Tulkinta (x)						
		A	B	C	C-A	C-B	ampC	Negat					
		CPD10+ ampC-Ind	CPD10+ ampC-Ind+ ESBL-Inh	CPD10+ ampC-Ind+ ESBL-Inh+ ampC-Inh									
1756	kpn	16	24	23	7	-1		x					
1785	kpn	6	6	15	9	9	x						
1793	kpn	6	6	16	10	10	x						
1797	kpn	6	6	15	9	9	x						
2843	eco	6	6	22	16	16	x						
2844	eco	6	6	19	13	13	x						
2849	kpn	25	25	25	0	0		x					
2897	ecl	6	6	13	7	7	x						
2957	eco	6	6	18	12	12	x						
7315	sal	20	21	22	2	1		x					
7316	kpn	24	25	25	1	0		x	ERILLISPESÄKKEITÄ				
7319	eco	6	6	6	0	0		x					
7322	kpn	6	6	10	4	4		x					
7327	ecl	6	6	12	6	6	x						
7330	kpn	24	25	26	2	1		x					
7341	kpn	6	6	6	0	0		x					
10250	eco	6	6	26	20	20	x						
10252	eco	6	6	25	19	19	x						
10254	eco	20	20	24	4	4		x					
10257	eas	6	6	14	8	8	x						
10258	pmi	6	6	24	18	18	x						
10268	eco	6	6	27	21	21	x						
10269	pmi	6	6	25	19	19	x						
10272	eco	6	6	14	8	8	x						
10273	eco	6	6	17	11	11	x						
10275	eco	6	6	21	15	15	x						
10281	eco	6	18	19	13	1		x					
10284	eco	16	20	21	5	1		x					
10285	eco	18	21	21	3	0		x					
10286	eco	6	6	21	15	15	x						
10291	eco	6	6	18	12	12	x						
11702	kpn	25	25	25	0	0		x					
11757	eco	15	21	22	7	1		x					
11780	eco	19	23	23	4	0		x					
11816	eco	15	21	20	5	-1		x					
11824	eco	17	20	21	4	1		x					
11981	eco	18	23	24	6	1		x					
12059	kpn	6	15	14	8	-1		x					
12133	kpn	10	21	21	11	0		x					
12433	kpn	20	22	23	3	1		x					
12540	eco	6	6	21	15	15	x						
12694	eco	-	23	23	#####	0			A-KIEKKO PUUTTUU				
13251	eco	-	10	-	#####	#####			A- JA C- KIEKOT PUUTTUVAT				
13432	kpn	-	27	-	#####	#####			ERILLISPESÄKKEITÄ				
13545	eco	-	13	-	#####	#####							
13759	ecl	-	-	-	#####	#####							
1305		6	6	20	14	14	x						
381		6	6	6	0	0		x					

Liite 3. Cefepime 30 & Cefepime 30/ Clavulanic acid 10 D63C (Mast Group)

KSKS-taltionu mero	Organism	Estorenkään halkaisija (mm)		Halkaisijoiden erotus (mm)	Tulkinta (x)			
		A	B	B-A	ESBL	Negat		
		CPM30	CPM30/CLAV10					
1756	kpn	24	28	4				
1785	kpn	6	13	7			ERILLISPESÄKKEITÄ	
1793	kpn	6	15	9			ERILLISPESÄKKEITÄ	
1797	kpn	15	16	1		x		
2843	eco	29	29	0		x		
2844	eco	26	26	0		x		
2849	kpn	26	26	0		x		
2897	ecl	26	26	0		x		
2957	eco	24	24	0		x		
7315	sal	6	26	20	x			
7316	kpn	27	25	-2		x		
7319	eco	6	6	0		x		
7322	kpn	6	6	0		x		
7327	ecl	24	23	-1		x		
7330	kpn	24	23	-1		x		
7341	kpn	6	6	0		x		
10250	eco	32	33	1		x		
10252	eco	33	33	0		x		
10254	eco	33	32	-1		x		
10257	eas	34	34	0		x		
10258	pmi	26	25	-1		x		
10268	eco	30	29	-1		x		
10269	pmi	26	23	-3		x		
10272	eco	19	17	-2		x		
10273	eco	21	20	-1		x		
10275	eco	28	26	-2		x		
10281	eco	6	23	17	x			
10284	eco	18	23	5	x			
10285	eco	11	25	14	x			
10286	eco	29	29	0		x		
10291	eco	22	23	1		x		
11702	kpn	26	26	0		x		
11757	eco	10	23	13	x			
11780	eco	22	28	6	x			
11816	eco	6	22	16	x			
11824	eco	11	25	14	x			
11981	eco	20	29	9	x			
12059	kpn	6	15	9	x			
12133	kpn	14	25	11	x			
12433	kpn	18	26	8	x			
12540	eco	32	32	0		x		
12694	eco	16	25	9	x			
13251	eco	28	28	0		x		
13432	kpn	25	26	1		x		
13545	eco	28	28	0		x		
13759	ecl	24	24	0		x		

Liite 4. Carbapenemase Detection kit (MBL+ KPC) D70C & Carbapenemase screening disk D71C (Mast Group)

KSKS-tal- tion umero	Organism	Estorenkkaan halkaisija (mm)					+/- CAT-ID*	Halkaisijoiden		Tulkinta (x)			
		A	B	C	D	erotus (mm)		MBL	KPC	OXA-48	Negat		
		MEM10	MEM10+ MBL-I	MEM10+ KPC-I	MEM10+ ampC-I	B-A						C-A	
1756	kpn						0	0				-	
1785	kpn	6	6	6		+	0	0				-	
1793	kpn	6	6	18	15	+	0	12		+			
1797	kpn	6	6	19	16	+	0	13		+			
2843	eco						0	0				-	
2844	eco						0	0				-	
2849	kpn						0	0				-	
2897	ecl	19	17	24	24	+	-2	5		+			
2957	eco						0	0				-	
7315	sal						0	0				-	
7316	kpn	20	18	20	20	+	-2	0				-	
7319	eco	12	24	6	13	+	12	-6	+				
7322	kpn	6	6	15	6	+	0	9		+			
7327	ecl						0	0				-	
7330	kpn	19	18	20	20	+	-1	1				-	
7341	kpn	6	21	6	6	+	15	0	+				
10250	eco						0	0				-	
10252	eco						0	0				-	
10254	eco						0	0				-	
10257	eas	24	23	28	27	+	-1	4		+			
10258	pmi						0	0				-	
10268	eco						0	0				-	
10269	pmi						0	0				-	
10272	eco						0	0				-	
10273	eco						0	0				-	
10275	eco						0	0				-	
10281	eco	30	29	31	31	-	-1	1				-	
10284	eco	31	28	32	32	-	-3	1				-	
10285	eco	30	28	30	30	-	-2	0				-	
10286	eco						0	0				-	
10291	eco						0	0				-	
11702	kpn						0	0				-	
11757	eco						0	0				-	
11780	eco						0	0				-	
11816	eco						0	0				-	
11824	eco						0	0				-	
11981	eco						0	0				-	
12059	kpn						0	0				-	
12133	kpn						0	0				-	
12433	kpn						0	0				-	
12540	eco						0	0				-	
12694	eco						0	0				-	
13251	eco						0	0				-	
13432	kpn						0	0				-	
13545	eco						0	0				-	
13759	ecl	26	24	29	28	?	-2	3				-	

Liite 5. ESBL/AmpC Calculator (Mast Group)

LAB NUMBER	COMMENTS	A	B	C	D	Interpretation	Notes
		CPD (mm)	CPD + ESBL INHIBITOR (mm)	CPD + AMPC INHIBITOR (mm)	CPD + ESBL + AMPC INHIBITORS (mm)		
(Minimum Value must be at least 6)							
kpn	1756	11	23	12	21	ESBL	
kpn	1785	6	6	6	6	NEGATIVE	NEGATIVE FOR ESBL & AMPC. Further work required, consider presence of carbapenemase using D70C
kpn	1793	6	6	6	6	NEGATIVE	NEGATIVE FOR ESBL & AMPC. Further work required, consider presence of carbapenemase using D70C
kpn	1797	6	6	6	6	NEGATIVE	NEGATIVE FOR ESBL & AMPC. Further work required, consider presence of carbapenemase using D70C
eco	2843	6	6	22	21	AMPC	
eco	2844	6	6	18	18	AMPC	
kpn	2849	25	26	25	25	NEGATIVE	
ecl	2897	6	6	16	14	AMPC	
eco	2957	6	6	18	19	AMPC	
sal	7315	6	20	6	20	ESBL	
kpn	7316	24	24	23	23	NEGATIVE	
eco	7319	6	6	6	6	NEGATIVE	NEGATIVE FOR ESBL & AMPC. Further work required, consider presence of carbapenemase using D70C
kpn	7322	6	6	6	6	NEGATIVE	NEGATIVE FOR ESBL & AMPC. Further work required, consider presence of carbapenemase using D70C
ecl	7327	6	6	15	14	AMPC	
kpn	7330	23	25	23	23	NEGATIVE	
kpn	7341	6	6	6	6	NEGATIVE	NEGATIVE FOR ESBL & AMPC. Further work required, consider presence of carbapenemase using D70C
eco	10250	6	6	24	24	AMPC	
eco	10252	6	6	22	23	AMPC	
eco	10254	21	19	23	23	?	FURTHER WORK REQUIRED - Confirm ESBL using D63C and confirm AMPC using D69C
eas	10257	6	6	22	22	AMPC	
pmi	10258	6	6	23	23	AMPC	
eco	10268	6	6	20	23	AMPC	
pmi	10269	6	6	22	21	AMPC	
eco	10272	6	6	6	6	NEGATIVE	NEGATIVE FOR ESBL & AMPC. Further work required, consider presence of carbapenemase using D70C
eco	10273	6	6	6	6	NEGATIVE	NEGATIVE FOR ESBL & AMPC. Further work required, consider presence of carbapenemase using D70C
eco	10275	6	6	21	22	AMPC	
eco	10281	6	15	6	17	ESBL	
eco	10284	6	18	6	18	ESBL	
eco	10285	6	21	6	21	ESBL	
eco	10286	6	6	22	21	AMPC	
eco	10291	6	6	18	17	AMPC	
kpn	11702	26	26	25	25	NEGATIVE	
eco	11757	6	19	6	19	ESBL	
eco	11780	6	23	10	22	ESBL	
eco	11816	6	20	6	20	ESBL	
eco	11824	6	21	6	20	ESBL	
eco	11981	6	22	10	21	ESBL	
kpn	12059	6	12	6	12	ESBL	
kpn	12133	6	20	6	20	ESBL	
kpn	12433	6	22	6	23	ESBL	
eco	12540	6	6	21	21	AMPC	
eco	12694	6	23	6	21	ESBL	
eco	13251	6	6	24	22	AMPC	
kpn	13432	26	27	25	25	NEGATIVE	
eco	13545	6	6	21	19	AMPC	
ecl	13759	6	6	17	18	AMPC	