



Karbapenemaasin tuottajien osoittaminen PCR-menetel- mällä

Amplidiag[®] CarbaR+MCR ja Seegene Allplex[™] Entero-
DR -testien tuloksien vertailu

Saana Forsblom

Milla Kankaanpää

OPINNÄYTETYÖ
Syyskuu 2020

Bioanalyytikon tutkinto-ohjelma

TIIVISTELMÄ

Tampereen ammattikorkeakoulu
Bioanalyytikon tutkinto-ohjelma

FORSBLOM, SAANA & KANKAANPÄÄ, MILLA:
Karbapenemaasin tuottajien osoittaminen PCR-menetelmällä
Amplidiag® CarbaR+MCR ja Seegene Allplex™ Entero-DR -testien tuloksien vertailu

Opinnäytetyö 42 sivua
Syyskuu 2020

Beetalaktaamiryhmän antibiootteja, kuten karbapeneemejä, käytetään gram-negatiivisten bakteerien aiheuttamien infektioiden hoitoon. Beetalaktaamiantibiootteja pilkkovaa entsyymiä kutsutaan karbapenemaasiksi ja entsyymiä tuottavaa bakteeria taas karbapenemaasintuottajaksi. Karbapeneemiresistenssiä on raportoitu kasvavalla tahdilla 1990-luvulta lähtien. Suomessa esiintyvät karbapeneemiresistenssitapaukset liittyvät yleensä ulkomaalaiseen sairaalahoitoon tai ulkomailta saapuvien potilaiden sairaalasiirtoon. Karbapenemaasia tuottavissa enterobakteereissa kolistiiniresistenssin ilmeneminen on kasvussa Euroopassa. Polymyksiiniluokan antibiootteihin kuuluvaa kolistiinia käytetään gramnegatiivisten bakteereiden aiheuttamien infektioiden hoitoon sekä ”viimeisen keinon” antibioottina multiresistenttien infektioiden hoidossa. Kolistiiniresistenssi liikkuu bakteerista toiseen plasmidivälitteisesti *mcr*-geenien avulla.

Opinnäytetyön tarkoituksena oli verrata Amplidiag® CarbaR+MCR -testin tuloksia Paavo Hannuksen Pro Gradu -tutkielmassa käytetyn Seegene Allplex™ Entero-DR- testin tuloksiin. Testien suurin ero on VRE-geenien ja *mcr*-geenien tunnistuksessa. Amplidiag® CarbaR+MCR -testi tunnistaa *mcr*-geenien eri variantit, kun taas Seegene Allplex™ Entero-DR -testi tunnistaa VRE-geenien eri variantit. Tarkoituksena oli osoittaa tunnistavatko testit samat karbapenemaasia tuottavat geenit vai oliko tuloksissa eroavaisuuksia. Tarkoituksena oli myös selvittää, löytyykö kannoista kolistiiniresistenssiä aiheuttavia *mcr*-geenejä. Tavoitteena oli tuottaa vertailukelpoisia ja luotettavia tuloksia.

Tutkittavia näytekantoja oli yhteensä 75. Näistä 22 oli karbapenemaasia tuottavia enterobakteerikantoja, jotka olivat samoja THL:n kantoja kuin Hannuksen käyttämät. Loput 53 näytettä olivat positiivisia ja negatiivisia potilaiden veriviljelynäytteitä. Tulokset saatiin 21:stä karbapenemaasia tuottavasta enterobakteerikannasta sekä 12:sta veriviljelynäytteestä. Näytteet tulee laimentaa 1:100, sillä veri inhiboi reaktiota voimakkaasti.

Testit tunnistivat samat karbapenemaasia tuottavat enterobakteerigeenivariantit eikä tuloksissa ollut eroavaisuuksia. Amplidiag® CarbaR+MCR -testi tunnisti kahdesta GES-kannasta toisen, mutta toista GES-kantaa testi ei tunnistanut. Näin ollen väärää negatiivista tulosta voidaan pitää mahdollisena. Jatkotutkimusaiheena voisi olla kasvattaa testimääriä, jotta voitaisiin poissulkea tai varmistaa väärin negatiivisten testitulosten mahdollisuus.

Asiasanat: karbapenemaasin tuottajat, karbapeneemiresistenssi, kolistiiniresistenssi, polymeerasiketjureaktio

ABSTRACT

Tampereen ammattikorkeakoulu
Tampere University of Applied Sciences
Degree Programme in Biomedical Laboratory Science

FORSBLOM, SAANA & KANKAANPÄÄ, MILLA:
Detection of Carbapenemase-Producing Bacteria with a PCR
A Comparison between the results of the Amplidiag® CarbaR+MCR -test and
the Seegene Allplex™ Entero-DR -test

Bachelor's thesis 42 pages
September 2020

Carbapenems belong to the Beta-Lactam class of antibiotics used to treat infections caused by gram-negative bacteria. Carbapenemase is the enzyme that breaks down Beta-Lactam antibiotics. Colistin resistance in carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* is increasing in Europe. Colistin belongs to the polymyxin class of antibiotics used to treat infections caused by gram-negative bacteria. Colistin is also used against multidrug-resistant infections as a “last chance” antibiotic.

The purpose of this study was to compare the results between the Amplidiag® CarbaR+MCR -test and the Seegene Allplex™ Entero-DR -test used by Paavo Hannus in his master's thesis. The purpose was to determine if the tests detect the same carbapenemase-producing genes from the same samples and if the test results had any differences. The tests detect approximately the same gene variants, but they differ in the detection of VRE (vancomycin-resistant Enterococci) -genes and MCR (mobilized colistin resistance) -genes.

The study included an experimental part in which the same carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* samples were tested with the Amplidiag® CarbaR+MCR -test. The results were then compared to Hannus' results from the Seegene Allplex™ Entero-DR -test. Different tables and charts were used to compare the results.

It was found out that the tests detect the same carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* variants and the results did not vary. As a follow-up study the test quantities should be increased to determine or out rule the chance of false negatives or positives.

Key words: carbapenemase-producers, carbapenem-resistance, colistin-resistance, polymerase chain reaction

SISÄLLYS

1	JOHDANTO	5
2	KARBAPENEMAASIN TUOTTAJAT.....	6
	2.1 Karbapeneemiresistenssin synty.....	6
	2.2 Kliininen merkitys	8
	2.3 Esiintyvyys	9
	2.3.1 Suomessa	9
	2.3.2 Euroopassa	11
	2.3.3 Muualla maailmassa.....	12
3	KOLISTIINIRESISTENSSI.....	13
	3.1 Kolistiiniresistenssin synty.....	13
	3.2 Kliininen merkitys	15
	3.3 Esiintyvyys	15
4	POLYMERAASIKETJUREAKTIO	18
	4.1 Real-Time PCR.....	19
	4.2 Amplidiag® CarbaR+MCR	20
	4.3 Seegene Allplex™ Entero-DR.....	22
5	OPINNÄYTETYÖPROSESSI	23
	5.1 Aikaisemmat tutkimukset	23
	5.2 Tavoite ja tarkoitus	24
	5.3 Tutkimusmenetelmä.....	25
	5.4 Kokeellinen osuus	25
	5.4.1 Tutkimuskannat ja niiden viljely	27
	5.4.2 PCR:n suoritus	29
	5.4.3 Laimennokset.....	29
	5.4.4 1:100 laimennosajot	30
6	TULOKSET	31
7	POHDINTA	38
	LÄHTEET.....	40

1 JOHDANTO

Maailmalla karbapeneemiresistenssi gramnegatiivisissa sauvabakteereissa on kasvanut. Sitä esiintyy eri enterobakteerilajeissa, kuten *Klebsiella pneumoniae* ja *Escherichia coli* sekä non-fermentatiivisissa sauvoissa, kuten *Acinetobacter baumannii* ja *Pseudomonas aeruginosa*. Gramnegatiivisista sauvabakteereista karbapeneemiresistentti *Klebsiella pneumoniae* on levinnein sekä merkittävä myös sairaalahygienisesti. Karbapeneemit kuuluvat beetalaktaamiryhmän antibiootteihin, joilla on ollut huomattava rooli sellaisten infektioiden hoidossa, joita gramnegatiiviset bakteerit aiheuttavat. Karbapeneemeihin kuuluu esimerkiksi ertapeneemi, imipeneemi ja meropeneemi. (Terveyden ja Hyvinvoinninlaitos 2020.) Ihmisellä karbapenemaasia tuottava enterobakteeri voi aiheuttaa infektion tai se voi esiintyä oireettomana ihmisen suolistossa (THL 2019a). Ympäri maailmaa karbapenemaasintuottaja -kannat ovat aikaansaaneet epidemioita ja Euroopassa niitä on eristetty esimerkiksi Italiassa ja Kreikassa (THL 2020.)

Karbapeneemeille resistenttien enterobakteerien (CRE) aiheuttamien infektioiden hoitona käytetään useasti kolistiinia (European Centre for Disease Prevention and Control, 2019a, 4). Myös multiresistenttien infektioiden hoidossa kolistiinia käytetään ”viimeisen keinon” antibioottina (Wang ym. 2018). Suurta osaa gramnegatiivisia bakteereja vastaan kolistiini on aktiivinen, mutta kolistiiniresistenttien kantojen ilmaantuminen multiresistenteissä kannoissa aiheuttaa huolta. Kolistiini on aktiivinen esimerkiksi *Escherichia coli*:a ja *Haemophilus influenzae*:aa vastaan. Vuonna 2015 raportoitiin plasmidivälitteinen geeni *mcr-1*, joka aiheuttaa kolistiiniresistenssiä. (World Health Organization 2018, 8-9.) Kolistiiniresistenssi ei kuitenkaan ole yhtä laajalle levinnyttä, kuin karbapeneemiresistenssi.

Tässä opinnäytetyössä verrataan Amplidiag® CarbaR+MCR -testin tuloksia Paavo Hannuksen Pro Gradu -tutkielmassa käyttämän Seegene Allplex™ EnteroDR -testin tuloksiin. Molempien testien tulokset on saatu samalla Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR-laitteella sekä käyttämällä samoja protokollia ja toimintatapoja, kuin Hannus. Näin tuloksista on saatu vertailukelpoisia ja luotettavia.

2 KARBAPENEMAASIN TUOTTAJAT

Beetalaktaamiantibiootteja pilkkovaa entsyymiä, jota bakteeri tuottaa, kutsutaan karbapenemaasiksi (Kolho, Lyytikäinen & Jalava 2020, 14). Yleisimmät karbapenemaasigeenit ovat *Klebsiella pneumoniae* -karbapenemaasi (KPC), New Delhi -metallobeetalaktamaasi (NDM), Verona integron-encoded -metallobeetalaktamaasi (VIM), imipenemaasi (IMP; active on imipenem) sekä oksasillinaasit -48 ja -181 (OXA; sanoista oxacillin-hydrolyzing) (Jalava ym. 2011; THL 2019b, 70; Kolho ym. 2020, 8). Karbapeneemit kuuluvat beetalaktaamiryhmän antibiootteihin, joita käytetään sellaisten infektioiden hoitoon, joita gramnegatiiviset bakteerit aiheuttavat. Bakteerien solukalvojen välissä on entsyymejä, jotka suorittavat peptidoglykaanisynteesiä. Beetalaktaamiryhmän antibioottien mekanismi perustuu sitoutumiseen juuri näihin entsyymeihin. (Jalava ym. 2011.) Enterobakteerisuvun bakteerista, joka tuottaa karbapenemaasia käytetään nimeä CPE (*Carbapenemase-Producing Enterobacteriaceae*) eli karbapenemaasia tuottava enterobakteeri (THL 2019b, 44).

Grampositiivisia ja gramnegatiivisia bakteereja vastaan karbapeneemeillä on laaja teho. Myös laajakirjoista beetalaktamaasia (ESBL) -tuottavia enterobakteereja vastaan karbapeneemit ovat aktiivisia. Sen vuoksi infektion johtuessa multi-resistantistä enterobakteerista, hoidetaan sairaalahoidossa olevia potilaita yleensä karbapeneemeillä. 1990-luvulta eteenpäin resistenssiä karbapeneemeille on raportoitu kasvavalla tiheydellä. (ECDC 2019a, 3.) Karbapeneemiresistenssin levittäytyminen on huoli kansanterveydelle, koska antibiooteista karbapeneemejä pidetään yhtenä luotettavimmista bakteeri-infektioiden hoitoon (Codjoe & Donkor 2017).

2.1 Karbapeneemiresistenssin synty

Karbapeneemiresistenssi voi syntyä hankinnallisesti, se voi olla luontainen tai se voi syntyä molempien yhteisvaikutuksesta. Tietyille antibioottiryhmille bakteerit voivat olla luontaisesti resistenttejä, joka voi vaikeuttaa hoitoon käytettävien anti-

bioottien valintaa. (Codjoe & Donkor 2017.) Bakterista voi tulla resistentti karbapeneemille kolmella tavalla. Bakteri voi estää karbapeneemin pääsyn soluun sulkemalla ulkomembraaninsa tai se voi vapauttaa karbapeneemin solun ulkopuolelle, jolloin se ei pääse vaikuttamaan kohdemolekyyliinsä. Bakteri voi myös tuottaa karbapenemaasia membraanien väliseen tilaan hajottamaan karbapeneemin. Karbapeneemiresistenssi syntyy tavallisimmin näiden seikkojen yhteisvaikutuksista. (Jalava ym. 2011.) Karbapeneemiresistenssi voi syntyä enterobakteereille myös läpäisevyysmuutoksien vaikuttaessa solun ulkokalvoon. Tätä tapahtuu yleensä bakterikannoissa, jotka tuottavat AmpC-tyyppistä beetalaktamaasia tai ESBL:ää. Tällöin karbapeneemiresistenssi voi syntyä enterobakteerisuvun bakteerille ilman varsinaista karbapenemaasia. Kyseiset kannat eivät vielä ole aikaansaaneet mittavia epidemioita (THL 2019b, 44.)

Bakteerikannat, jotka kantavat karbapenemaasigeenejä, omaavat usein muitakin resistenssigeenejä ja ne voivat olla resistenttejä kaikille käytössä oleville antibiooteille eli panresistenttejä (PDR), resistenttejä suurimmalle osalle antibiootteja (XDR) tai moniresistenttejä (MDR) (THL 2019b, 44). Bakteerit, jotka kantavat eri karbapenemaasigeenejä ovat yleisimmin herkkiä kolistiinille, mutta sille on myös syntynyt resistenssiä. Bakteereilla, jotka omaavat eri karbapenemaasigeenit, on jokaisella omanlaisensa herkkyys. Muita herkkiä antibiootteja voivat olla esimerkiksi fosfomysiini tai meropeneemi-relebaktaami. Kuolleisuus on kuitenkin runsasta ja tartuntojen hoito hankalaa vakavissa infektioissa. (Kolho ym. 2020, 15.)

Karbapenemaasien jako voidaan suorittaa β -laktamaasiluokkiin, joita on kaksi: metallo- β -laktamaasit ja seriini- β -laktamaasit. Yleisesti suurin osa karbapenemaaseista hajottaa β -laktamiantibiootteja. Työssä aiemmin mainitut karbapenemaasit ovat kliinisesti tärkeitä ja ne kuuluvat edellä mainittuihin luokkiin. Seriini- β -laktamaaseihin kuuluvat OXA-karbapenemaasit sekä KPC-karbapenemaasi ja metallo- β -laktamaaseihin kuuluvat IMP-, VIM- ja NDM-karbapenemaasit. Mainittuihin luokkiin kuuluu muitakin tärkeitä karbapenemaaseja, mutta mainittuna on vain opinnäytetyössä mainitut karbapenemaasit. Karbapenemaasien jako näihin ryhmiin on tärkeää uusien lääkkeiden ja laboratoriodiagnostiikan vuoksi. (Jalava ym. 2011.)

Plasmidit pystyvät siirtymään gramnegatiivisten bakteereiden ja enterobakteereiden välillä ja juuri näissä plasmideissa sijaitsee usein karbapenemaasigeenejä. Karbapenemaasigeenit siirtyvät usein myös muiden resistenssigeenien kanssa. Multiresistenssejä kantoja syntyy, kun karbapenemaasigeenit siirtyvät eteenpäin plasmidin avulla, joissa on muita resistenssigeenejä. Karbapeneemien kulutus on yhdistetty karbapeneemiresistenttien enterobakteeri (CRE)-infektioiden lisääntymiseen. Valintapaine karbapeneemiresistenteille enterobakteereille voi aiheutua, kun moniresistenttejä kantoja hoidetaan muilla antibiooteilla, kuin karbapeneemeillä. (ECDC 2019a, 5.) Yksi suurimmista syistä karbapeneemiresistenttien enterobakteerien leviämiseen EU- ja ETA- maissa on karbapenemaasien kantavien korkean riskin kloonien ja plasmidien leviäminen terveydenhuollossa (ECDC 2019a, 1). Potilaiden hoito ja parantuminen voi viivästyä, kun infektion aiheuttaa sellainen bakteeri, joka on resistentti tärkeimmille antibiooteille sairaalahoidossa (Jalava ym. 2011).

2.2 Kliininen merkitys

Muun muassa *Enterobacter sp* ja *Klebsiella pneumoniae* ovat sellaisia bakteereja, jotka voivat omata karbapenemaasigeenin. Kyseiset bakteerit ovat infektioille yleisiä aiheuttajia, ja ulosteesta niitä löytyy jokaiselta ihmiseltä. Karbapeneemaasia tuottava enterobakteeri voi aiheuttaa ihmisellä oireisen taudin eli infektion tai se voi esiintyä oireettoman ihmisen suolistossa eli ihminen toimii kantajana. Karbapenemaasia tuottavat enterobakteerit voivat myös aiheuttaa keuhkoinfektioita, vatsan alueen infektioita, esimerkiksi umpilisäkkeen ja sappirakon tulehduksia, sekä edellä mainituista infektioista yleisimpiä eli virtsainfektioita. (THL 2019a.) Merkityksellisin ja levinnein gramnegatiivinen sauvabakteeri on karbapeneemiresistentti *Klebsiella pneumoniae*. Gramnegatiivisista sauvabakteereista se on sairaalahygieenisesti keskeinen ja maailmalla eri kannat karbapeneemiresistentistä *K. pneumoniae*:sta ovat aikaansaaneet sairepidemioita. Toisin kuin *K. pneumoniae*:n karbapeneemiresistentit kannat, *E. coli*:n eri kannat eivät ole vielä aikaansaaneet mittavia epidemioita. (THL 2020.) Muita kliinisesti merkityksellisiä karbapenemaasia tuottavia enterobakteerilajeja ovat *Citrobacter freundii* ja *Enterobacter cloacae* (THL 2019b, 44).

Rajallisten tehoavien hoitovaihtoehtojen puutteen ja tehokkaan hoidon viivästy-
misen vuoksi CRE (*Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae*) -infektiot yhdis-
tetään suureen kuolleisuuteen (ECDC 2019a, 1). Moniresistenssin ja karbape-
neemiresistenssin vuoksi karbapenemaasia tuottavien enterobakteerien aiheut-
tamien tartunnat luovat vaikean hoidollisen ongelman. Toimivan antibiootin teho
on mahdollisesti huonompi ja tehokkaan antibiootin löytyminen voi viivästyä.
(THL 2019b, 44.)

2.3 Esiintyvyys

2000-luvun alussa alkoi levitä karbapenemaasia tuottava *Klebsiella pneumoniae*.
Karbapenemaasia tuottavista geeneistä VIM oli ensimmäinen, joka aiheutti on-
gelmia ja levisi tehokkaasti etenkin Kreikassa. Sittemmin levisi klonalisesti *K.*
pneumoniae ST258, jolla on karbapenemaasia tuottava KPC-geeni, joka myös
Kreikassa syrjäytti VIM-kannat. Tämä *K. pneumoniae* ST258 klooni on levinnyt
maailmanlaajuisesti ja suurimpia ongelmia se on aikaansaanut Israelissa, Yhdys-
valloissa, Italiassa sekä Kreikassa. Kannat ovat Euroopassa levinneet lähinnä
sairaaloissa sekä hoitolaitoksissa. Karbapenemaasigeeneistä OXA-48 sekä
NDM ovat myös menestyneitä ja näiden geenien isäntiä ovat erilaiset gramnega-
tiiviset sauvabakteerit. OXA-48 sekä NDM -geenit ovat levinneet maailmanlaajui-
sesti Intiasta ja Pakistanista, jossa ne ovat endeemisiä. (Kolho, Lyytikäinen & Ja-
lava 2020, 14-15.)

2.3.1 Suomessa

Bakteerikannat, jotka tuottavat karbapenemaaseja ovat levinneet etenkin sairaa-
lahoitoa ulkomailta saaneiden potilaiden ja ulkomailta tulevien sairaalasiirtojen
välityksellä Pohjoismaissa. Suomessa eristettiin ensimmäiset karbapenemaasia
kantavat *K. pneumoniae* -kannat kesällä 2009. Nämä tapaukset liittyivät sairaa-
lasiirtoihin. (THL 2020.) Suomessa vuonna 2017 löydettiin 48 karbapeneemi-
resistenttiä tapaus ja 73 tapaus vuonna 2018. Näistä yli puoleen liittyy ulko-
maalainen sairaalahoito, mutta seurannassa on kuitenkin todettu yksittäisiä koti-

maisista tartuntoja sekä laajempia epidemioita peräti kolme. Vuoden 2018 tapauksista viisi oli veriviljelypositiivisia. Todetuista tapauksista Suomessa karbapenemaasigeenit KPC-2, OXA-48 ja OXA-181 ovat olleet yleisimmät. Isäntäbakteereina ovat toimineet *K. pneumoniae*, *E. coli* ja *Enterobacter cloacae* lueteltuna yleisyysjärjestyksessä. (Kolho ym. 2020, 15.)

Taulukossa 1 on esitetty vuosien 2015-2018 Suomessa testattujen invasiivisten isolaattien kokonaismäärä (N) sekä niistä karbapenemaasia tuottavien tapauksien määrä prosenttiosuutena (%R) taulukoituna eri isäntäbakteerien mukaan.

TAULUKKO 1. Karbapenemaasien esiintyvyys Suomessa vuosina 2015-2018. (ECDC 2019b, muokattu)

VUOSI	2015		2016		2017		2018	
	N	%R	N	%R	N	%R	N	%R
<i>E. Coli</i>	4425	0.0	4832	0.0	5315	0.0	5057	< 0.1
<i>K. Pneumoniae</i>	658	0.0	770	0.3	758	0.3	810	0.6
<i>P. Aeruginosa</i>	341	4.7	352	6.0	377	6.1	391	4.9
<i>Acientobacter spp.</i>	43	2.3	28	0.0	37	2.7	28	0.0

Karbapeneemille resistentit enterobakteerit ovat Suomessa vielä harvinaisia, mutta määrät ovat nousussa. Suomessa tärkein torjuntatoimi karbapenemaasia tuottavien enterobakteerien osalta on pysäyttää käynnissä olevat epidemiat. (THL 2019c, 3-4.) Koska Suomessa karbapeneemiresistenssi liittyy usein ulkomailla tapahtuneeseen sairaalahoitoon, on torjunnassa tärkeää tunnistaa kaikki potilaat, jotka ovat saaneet sairaalahoitoa ulkomailla. THL listaa torjuntatoimiin myös kosketusvarotoimet, altistuneiden seulonnan sekä toiminnan moniresistenttien bakteerien torjuntaohjeiden mukaisesti. (THL 2020.) Torjuntatoimen onnistumisesta riippuu kuinka suureksi ongelma Suomen karbapeneemiresistenttien enterobakteerien osalta muodostuu lähitulevaisuudessa. (THL 2019c, 4.) Laboratoriot ovat ilmoitusvelvollisia *Enterobacteriaceae* -heimon kannoista, jotka tuottavat karbapenemaaseja. Nämä kannat lähetetään Terveystieteiden ja hyvinvoinnin laitokseen, jotta karbapenemaasigeeni voidaan varmistaa ja sekvenssityypittää.

Tämä mahdollistaa Suomessa karbapenemaaseja tuottavien kantojen seurannan sekä seurantatiedon välittämisen kansainvälisiin seurantajärjestelmiin sekä tartuntatautirekisteriin. (THL 2020.)

2.3.2 Euroopassa

Karbapeneemiresistenssi on potilaille ja terveydenhuollolle merkittävä uhka Euroopan unionissa (EU) sekä Euroopan talousalueen (ETA) maissa (ECDC 2019a, 1). *E.colin* osalta Euroopan mikrobilääkeresistenssin seurantaverkoston (EARS-Net) tiedot osoittavat, että invasiivisista infektioista monissa Euroopan maissa vain < 1% on karbapenemaasikantojen aiheuttamia. Useissa maissa Euroopassa karbapenemaasiherkkyytilanne *K. pneumoniaen* osalta on hyvä. Karbapeneemiresistenssi aiheuttaa kuitenkin ongelmia Italiassa sekä Romaniassa joissa 25-50% *K. pneumoniae* veriviljelypositiivisista infektioista on resistenttejä karbapeneemille. Kreikassa vastaava luku on >50%. Veriviljelylöydöksistä 5-10% oli karbapeneemiresistenttejä Itä-Euroopassa ja Portugalissa. (Kolho ym. 2020, 15.)

Verestä ja aivo-selkäydinnesteestä esiintyvien karbapeneemiresistenttien *K. pneumoniaen* sekä *E. colin* prosenttiosuudet ovat yleisesti ottaen Euroopassa alhaisia. Vuonna 2018 suoritettiin kansallinen itsearviointi Euroopassa koskien karbapeneemiresistenttien bakteerien epidemiologisia vaiheita, jossa otettiin huomioon veren ja aivoselkäydinnesteen lisäksi myös kaikki infektio tyypit sekä kantajuudet. Itsearviointiin osallistuneista maista 16/37 ilmoitti karbapenemaasia tuottavien enterobakteerien leviävän alueellisesti tai alueiden välillä ja neljä maista ilmoitti endeemisestä tilanteesta. Verrattuna aiempaan vuonna 2015 tehtyyn arviointiin, karbapenemaasia tuottavien enterobakteerien korkeammasta epidemiologisesta vaiheesta ilmoitti 11 maata, joka viittaa niiden leviämiseen maiden välillä vuosina 2015-2018. Vuonna 2015 EU:n/ ETA:n alueella arvioidaan karbapeneemiresistentin *K. pneumoniaen* aiheuttaneen 15 947 infektiota ja 2619 infektiota aiheutti karbapeneemille resistentti *E. coli*. (ECDC 2019a, 2)

Taulukossa 2 on esitetty vuosien 2015-2018 EU/ETA maissa testattujen invasiivisten isolaattien kokonaismäärä (N) sekä kokonaismäärästä karbapenemaasia tuottavien tapauksien määrä prosenttiosuutena (%R) taulukoituna eri isäntäbakteerien mukaan.

TAULUKKO 2. Karbapenemaasia tuottavien bakteerien esiintyvyys EU/ETA -maissa vuosina 2015-2018. (ECDC 2019b, muokattu.)

VUOSI	2015		2016		2017		2018	
	N	%R	N	%R	N	%R	N	%R
<i>E. Coli</i>	86325	0.2	121582	0.1	139614	0.1	149725	0.1
<i>K. Pneumoniae</i>	21773	6.8	30127	7.4	32821	7.2	37824	7.5
<i>P. Aeruginosa</i>	12719	19.4	15456	18.2	17029	17.4	19045	17.2
<i>Acientobacter spp.</i>	5036	32.1	5562	32.6	6177	32.2	6501	31.9

2.3.3 Muualla maailmassa

Intian niemimaalla esiintyy karbapeneemiresistensseistä geeneistä NDM:ää, Yhdysvalloissa, Israelissa, Kreikassa ja Italiassa KPC:tä, Turkissa, Lähi-Idässä ja Pohjois-Afrikassa OXA-48:aa. Kaakkois-Aasiassa karbapeneemiresistenssin osuus infektioissa arvioidaan olevan >5%. Vietnamin, Thaimaassa, Indonesiassa sekä Filippiineillä infektioita aiheuttaa karbapeneemille resistentti *K. pneumoniae*. Myanmarissa ja Indonesiassa esiintyy myös *E. colin* aiheuttamia karbapeneemiresistenttejä infektioita. Afrikasta tietoa on hyvin vähän, mutta prosenttimääriä on yritetty arvioida käyttämällä kirjallisuuskatsauksia, jotka johtivat siihen, että kahdessa maassa, Ugandassa ja Madagaskarissa, arvioitiin prosenttiosuuksien olevan >5% karbapeneemiresistentin *K. pneumoniaen* osalta. (ECDC 2019a, 3.)

Karbapeneemiresistenttien enterobakteerien esiintyvyydestä eri alueilla saadaan tietoa myös epäsuorasti, kun näitä bakteereita havaitaan niillä potilailla, jotka ovat siirtyneet sairaalasta toiseen eri maiden välillä sekä Euroopan matkailijoista, jotka palaavat kotimaahansa alueilta, joissa on korkea karbapeneemiresistenssin yleisyysaste. (ECDC 2019a, 3.)

3 KOLISTIINIRESISTENSSI

Paenibacillus polymyxa:n alalaji *colistinus* tuottaa polymyxin E:tä eli kolistiinia, joka kuuluu polymyksiiniluokan antibiootteihin. *Colistinus* tuottaa myös kolistiinia inaktivoivaa kolistinaasia. Gramnegatiivisia bakteereja, kuten enterobakteereja, vastaan kolistiinilla on huomattava teho. Se kuuluu myös polykatonisiin antibiootteihin. Sitä muun muassa käytetään sikojen ja lehmien infektioiden hoidossa maataloudessa. (Caniauax ym. 2016; Aghapour ym. 2019.) 1970-luvulla kolistiinin käytöstä luovuttiin sen myrkyllisyyden vuoksi, mutta nykyään sitä käytetään multiresistenttien infektioiden hoidossa 'viimeisen keinon' antibioottina (Wang, R. ym. 2018). Muita polymyksiiniluokan molekyyliä ovat A, B, C, D, joista kliinisessä käytössä ihmisillä on vain B ja E (kolistiini) (WHO 2018, 8).

Kolistiini on aktiivinen esimerkiksi *Escherichia coli*:a, *Klebsiella* spp:a (species pluralis eli useat lajit), *Pseudomonas aeruginosa*:a ja *Acinetobacter* spp:a vastaan (WHO 2018, 9). Luontaista resistenssiä kolistiinille on havaittu mm. *Proteus* spp:llä sekä *Serratia marcescens*:llä. Myös mm. *Edwardsiella* spp ja *Morganella morganii* ovat resistenttejä kolistiinille. Kolistiinilla ei ole tehoa joitain gramnegatiivisia aerobisia basilleja, kuten *Proteus* spp:tä, gramnegatiivisia aerobisia kokkeja, eukaryoottisia mikrobeja, anaerobisia bakteereja, nisäkässoluja, sieniä tai loisia vastaan. Grampositiivisten bakteerien ulkomembraanin puuteen vuoksi ne ovat luontaisesti resistenttejä polymyksiineille. (Aghapour ym. 2019; WHO 2018, 9.)

3.1 Kolistiiniresistenssin synty

On useita mekanismeja, joita gramnegatiiviset bakteerit käyttävät suojatakseen itseään kolistiinia vastaan, mutta kolistiiniresistenssin päämekanismi on kuitenkin vielä epäselvä. (Aghapour ym. 2019.) Luontaisesti herkkien lajien hankinnainen polymyksiiniresistenssi johtuu yleensä lipopolysakkaridien rakenteen ja bakteerien soluseinän muutoksista. Joistakin *Klebsiella pneumoniae*:n isolaateista on löytynyt resistanssimekanismi, jossa bakteeri levittää kapselipolysakkarideja,

jotka sitovat tai vangitsevat polymyksiinejä. Myös kaksi kromosomivälitteistä kolistiiniresistenssin päämekanismia on kuvattu *Acinetobacter baumannii*:ssa. Mekanismit liittyvät lipopolysakkaridien tuotannon loppumiseen sekä järjestelmään, joka antaa bakteerin vastata ympäristöllisiin tekijöihin ja muuttujiin. Nämä mekani-
nimit vaikuttavat lipidien muutoksiin sekä vähentävästi bakteerin membraanin läpäisevyyteen. (WHO 2018, 9.) Effluksipumppujärjestelmä on yhdistetty myös joissain tutkimuksissa kolistiiniresistenssiin. Kolistiiniresistenssi lisääntyy pump-
pujen aktivoituessa. (Aghapour ym. 2019.) Resistenssi, joka on syntynyt kromo-
somivälitteisesti, ei eri bakteerien välillä yleensä liiku horisontaalisesti (WHO 2018, 9).

Plasmidin levittämistä, kolistiiniresistenssiä koodaavista *mcr-* (*mobilized colistin resistance*) geeneistä on havaittu kahdeksan homogeenistä muotoa (*mcr 1-8*) (Carroll ym. 2019). Kolistiiniresistenssi oli yhdistetty kromosomaalisten geenien säätelemiin säätely- ja mutaatiomuutoksiin vuoteen 2015 asti. Kuitenkin vuoden 2015 lopulla plasmidissa sijainnut *mcr-1* -geeni löydettiin luonnosta ja ihmisistä viljellyistä bakteerikannoista sekä eläinperäisistä kannoista. Horisontaalinen kolistiiniresistenssin siirtyminen mahdollistuu plasmidiin siirtyneen resistenssipiir-
teen avulla. Plasmideissa, joissa on *mcr-1* -geeni, on tavattu myös muita antimik-
robiresistenssigeenejä. Tällaisia geenejä ovat esimerkiksi laajakirjoinen beeta-
laktamaasientsyymi ja karbapenemaasi. (Caniaux ym. 2016; Wang ym. 2018.)
Kolistiiniresistenssigeenien sijaitseminen plasmideissa on lisännyt kolistiiniresis-
tenssin leviämisen riskiä (ECDC 2019a, 4).

Mcr -1 -geeniä on löytynyt, *Klebsiella pneumoniae*:sta, *Escherichia coli*:sta, *Pseu-
domonas aeruginosa*:sta sekä *salmonella*:sta. Liikkuvaa kolistiiniresistenssiä on
löytynyt ihmisten isolaateista, mutta pääosin kyseisiä potilaita ei ole hoidettu ko-
listiinilla. Saastuneen lihan syömisen on epäilty olevan yhteydessä kolistiiniresis-
tenttien kantojen hankintaan. Tämä on johtanut ruuansulatuskanavan oireetto-
maan kolonisaatioon. (Caniaux ym. 2016.)

Ensimmäiset ihmisiltä kerätyt *Escherichia coli* ja *Klebsiella pneumoniae* -isolaatit
kerättiin Kiinassa vuonna 2014. Ruokaa tuottavilla eläimillä kolistiinia on käytetty
laajasti monia vuosia maailmanlaajuisesti. Ennen vuotta 2017 kolistiini ei ollut

Kiinassa saatavana ihmisillä kliniseen käyttöön. Tämä vihjaa kolistiinin eläinperäisen käytön edesauttaneen *mcr-1* -geenin leviämistä valintapaineen vuoksi. Plasmidilevitteinen kolistiiniresistenssi voi siis liikkua bakteerien, sukujen ja lajien välillä. Kolistiiniresistentit *mcr* -geeniä koodaavat isolaatit on tärkeää tunnistaa, jotta geenien leviämistä voidaan rajoittaa. (WHO 2018, 9-10.)

3.2 Kliininen merkitys

Karbakapeneemeille resistenttien enterobakteerien aiheuttamien infektioiden hoitoon käytetään toistuvasti kolistiinia. Tästä voi kuitenkin aiheutua resistenssiä kolistiinia vastaan kyseisissä potilaissa karbakapeneemiresistenssin lisäksi. (ECDC 2019a, 4.) Kolistiinia käytetään myös panresistenttien, laajasti resistenttien ja multiresistenttien bakteerien aiheuttamien infektioiden hoitoon. Potilalle kolistiini voidaan annostella yleensä inhalaationa tai injektiona. (WHO 2018, 8.) Sellaisten karbakapeneemiresistenttien ja kolistiiniresistenttien enterobakteerikantojen kehittyminen, jotka ovat resistenttejä myös kaikille antibiooteille tai melkein kaikille muille antibiooteille, on aiheutunut karbakapeneemiresistenttien enterobakteerikantojen epäonnistuneesta hallinnasta. (ECDC 2019a, 4.) Kolistiinia on käytetty kasvavalla tahdilla resistenttien bakteerien leviämisen vuoksi. Tämän takia moniresistenttien bakteerien kolistiiniresistenssi on huomattava huolenaihe kansanterveydellisesti ja kliinisesti. (WHO 2018, 8.)

3.3 Esiintyvyys

Ensimmäisen kerran vuonna 2015 raportoitiin plasmidivälitteisen *mcr-1* -geenin löytyneen Kiinasta vuosina 2011-2014 tuotantoeläimistä sekä niiden lihasta. Ihmisestä geeni saatiin eristettyä vuonna 2014. *Mcr-1* -geenin löytyminen aiheutti suurta tieteellistä huomiota ja tämän jälkeen *mcr-1* -variaatioita on tunnistettu useita ja *mcr* -geeniperheitä on löydetty seitsemän lisää. Useat *mcr* -geeniperheen geeneistä esiintyvät maailmalla eläimissä. (WHO 2018, 9-10.)

Ihmisellä *mcr* -geeneistä on todettu *mcr-3* -geeniä Aasiassa, Euroopassa ja Etelä-Amerikasta, *mcr-4* -geeniä Belgiassa, Italiassa ja Espanjassa ja *mcr-8* -

geeniä Kiinassa. Näitä geenejä on ilmoitettu esiintyvän myös samanaikaisesti ihmisessä useita. Tätä on havaittu Euroopassa sekä Kiinassa *mcr-1* ja *mcr-3* -geenien samanaikaisella läsnäololla sekä *mcr-1* ja *mcr-4* -geenien samanaikaisella läsnäololla. Pian ensimmäisen raportin jälkeen huomattiin, että *mcr-1* -geeni on jo levinnyt maailmanlaajuisesti niin eläimissä, ympäristössä kuin ihmisissäkin. Epäillään, että ihmisten matkustaminen on huomattavasti edistänyt geenin maailmanlaajuisesta leviämistä. Tätä puoltaa se, että geeniä on löytynyt matkustajilta, jotka ovat vierailleet maanosissa, kuten Aasiassa, Afrikassa ja Etelä-Amerikassa, joissa *mcr-1* -geenin esiintyvyys on korkea. (WHO 2018, 9-10.) EU/ETA -maissa *mcr-1* -geeni on tunnistettu ihmisenäytteestä Tanskassa, Italiassa, Saksassa, Espanjassa, Alankomaissa, Ruotsissa ja Iso-Britanniassa vuodesta 2011 lähtien. Muualla maailmassa *mcr-1* -geeniä on raportoitu löytyneen Malesiasta, Etelä-Afrikasta, Yhdysvalloista, Egyptistä ja Kiinasta. (ECDC 2016, 6.)

Esimerkiksi Tanskassa ihmiseltä on löytynyt *mcr-3* -geeniä 10 tapauksessa kun tutkittiin Salmonellakokoelmaa vuosilta 2009-2017. Näytteitä oli n. 2500 kappaletta. Neljä kymmenestä tutkittavasta olivat äskettäin matkustaneet Thaimaahan ja yksi Vietnamiin. Kolmella tutkittavasta matkustushistoria ei ollut tiedossa. Kaksi oli saanut tartunnan kotimaassa. Yksi näyte vuodelta 2017 osoittautui positiiviseksi sekä *mcr-1* -geenin että *mcr-3* -geenin osalta. (Litrup ym. 2017.) Hollannissa puolestaan tutkittiin Aasiaan tai Etelä-Afrikkaan vuosina 2011-2012 matkustaneiden 122 terveen hollantilaisen ulostenäytteitä ennen ja jälkeen matkan. Kuudella näistä matkustajista löydettiin *mcr-1* -geeni ulosteesta matkan jälkeen. Yhdellä kuudesta matkustajista geeni löytyi jo ennen matkaa. Tarkkailtaessa hankita-astetta saadaan viitteitä siitä, että *mcr-1* on levinnyt nopeasti tietyissä maanosissa ja näille alueille matkustaminen onkin riskitekijä saada ja näin ollen myös levittää edelleen *mcr-1* -geeniä. (von Wintersdorff ym. 2016.)

Vaikka tiedot kolistiiniresistenssistä ovat vajavaisia, etenkin Aasiasta tietoja on vähän, kuitenkin useiden eri indikaattorien mukaan antibioottiresistenssi, mukaan lukien kolistiiniresistenssi, on Aasiassa yleisempää kuin Euroopassa. (Kluytmans 2017.) Jotkin maat ja etenkin ne maat, joissa karbapenemaasiresistenssin esiintyvyys on korkea, ovat raportoineet suuria määriä kolistiiniresistenssejä isolaatteja. Euroopassa kolistiiniresistenssi on kasvussa karbapenemaasia tuottavissa enterobakteereissa. Italiassa niistä veriviljelyistä, joista *K. pneumoniae* on

tunnistettu karbapeneemiresistentti KPC -geeni, 43% on resistenttejä kolistiinille. Puolestaan kaikista karbapeneemiresistenteistä *K. pneumoniae*ista 13% oli resistenttejä myös kolistiinille. Veriviljelynäytteet oli kerätty 11/2013 – 4/2014 välisenä aikana. Vuonna 2014 raportointiin EARS-Net:lle Romaniassa ja Kreikassa veriviljelynäytteistä löydetyistä karbapeneemiresistenteistä *K. pneumoniae* iso-laateista 20 % oli resistenttejä kolistiinille. (ECDC 2016, 7.)

Kolistiiniresistenssin kasvu seuraa kolistiinin kulutuksen kasvua ihmislääketeessä. Kolistiinin käyttö Euroopassa on lähes kaksinkertaistunut vuosien 2010-2014 välillä, ollen korkein maissa, joissa karbapeneemiresistenssin esiintyvyys on korkea ja moniresistenttien bakteerien osuus gramnegatiivisissa bakteereissa on suuri. EARS-net ei kuitenkaan kerää molekyyli tietoja *mcr-1* -geenin tai muun kolistiiniresistenssimekanismin läsnäolosta. (ECDC 2016, 7.)

Ensimmäisen kerran Suomessa todettiin bakteerista toiseen siirtyvää kolistiiniresistenttiä bakteeria ihmisessä vuonna 2016 (Gröndhal-Yli-Hannuksela ym. 2018, 413-414). Tällöin tutkijat Turun yliopistossa tutkivat kliinisessä seulontatutkimuksessa oireettomien suomalaisten aikuisten ulostenäytteistä moniresistenttibakteerien oireetonta kantajuutta. (Keränen 2018). Ulostenäytteitä kerättiin 176:ta terveeltä vapaaehtoiselta anonyymiltä henkilöltä. Yhdessä näytteessä havaittiin usealle antibiootille resistentti *E. coli*, joka oli myös resistentti kolistiinille ja kantoi *mcr-1* -geeniä. Kolistiiniresistenssi varmistettiin sekä gradienttiliuskates-tillä että mikrolaimennusmenetelmällä. Kanta löytyi 26-vuotiaalta terveeltä mieheltä. Tutkimuksen taustatietojen selvittelystä selvisi, että kyseinen henkilö oli matkustanut Keski-Euroopassa sekä Etelä-Amerikassa edellisen kuuden kuu-kauden aikana ennen näytteen keräämistä. (Gröndhal-Yli-Hannuksela ym. 2018, 414.) Tämä löydös näyttää, että siirtyvää kolistiiniresistenssiä esiintyy myös, vaikka maassa olisi hyvä mikrobilääkeresistenssitilanne. Matkailu maihin, joissa mikrobilääkeresistenssitilanne on huonompi lisää näiden bakteerien kantajuutta ja vaikuttaa myös Suomen mikrobilääkeresistenssitilanteeseen. (Keränen 2018.)

4 POLYMERAASIKETJUREAKTIO

Polymeraasiketjureaktio- eli PCR -tekniikasta on tullut mikrobiologian laboratoriossa rutiiniväline, jonka avulla voidaan havaita ja tunnistaa potilasnäytteistä sairauksia aiheuttavia organismeja (James 2010, 3). PCR mahdollistaa minkä tahansa valitun DNA-jakson monistamisen ilman kloonamista. Valittua DNA:ta ei myöskään tarvitse ennen monistusta erottaa näytteen muusta DNA:sta (Campbell, Farrell & McDougal 2016, 401).

PCR on määrittämenetelmä, joka mahdollistaa spesifisen DNA-fragmentin monistamisen DNA-poolista. Templaatti-DNA:ta voidaan saada monista eri kudoksista sekä organismeista kuten, perifeerisestä verestä, hiuksista, syljestä, ihosta ja mikrobeista. PCR vaatii vain vähäisen määrän DNA:ta tuottaakseen riittävän määrän kopioita analysoitavaksi laboratoriomenetelmillä. Tämä ominaisuus tekee PCR:stä herkän määrittämenetelmän. (Garibyan & Avashia 2013.)

Jotta PCR toimisi, tarvitsee se templaatti-DNA:n, alukkeita, nukleotideja sekä DNA-polymeraasin läsnäolon. DNA-polymeraasi yhdistää yksittäiset nukleotidit toisiinsa luoden PCR-tuotteen. Alukkeet ovat lyhyitä DNA-fragmentteja, joilla määritetään se DNA-sekvenssi, joka on tarkoitus havaita ja monistaa. Edellä mainitut komponentit sekoitetaan 96-kuoppalevyyn tai koeputkeen ja asetetaan PCR-laitteeseen, joka toistaa kolmea perusvaihetta, jotta DNA-monistus voisi tapahtua. (Garibyan & Avashia 2013.)

Laitteelle on ohjelmoitu vaiheet minkä mukaan se nostaa ja laskee lämpötilaa. Reaktioseos ensin kuumennetaan DNA-juosteen sulamispisteen yläpuolelle, mikä saa DNA-juosteet erottumaan. Tätä vaihetta kutsutaan denaturaatioksi. Tämän jälkeen lämpötilaa lasketaan, jotta spesifiset alukkeet pystyvät sitoutumaan kohde-DNA:han. Alukkeiden kiinnittyminen tapahtuu vain, jos se on komplementaarinen kohde-DNA:n sekvenssin kanssa. Jotta DNA-polymeraasi kykenee pidentämään alukkeita lisäämällä vapaita nukleotideja nostetaan lämpötilaa uudelleen. Näitä kolmea vaihetta toistetaan tietty määrä, jotta saadaan haluttu määrä kopioituja DNA-molekyylejä. Jokainen sykli kasvattaa kopioitujen DNA-molekyylien määrää kaksinkertaiseksi. (Garibyan & Avashia 2013.)

PCR-menetelmällä on monia etuja. Se on erittäin herkkä ja pystyy tuottamaan miljoonista jopa miljardeihin kopioita analysointia varten. Menetelmällä on kuitenkin rajoituksensa. Koska menetelmä on erittäin herkkä, on se myös hyvin herkkä kontaminaatioille, joten näytteen kontaminoituminen edes pienellä määrällä DNA:ta voi johtaa virheelliseen tulokseen. (Garibyan & Avashia 2013.)

4.1 Real-Time PCR

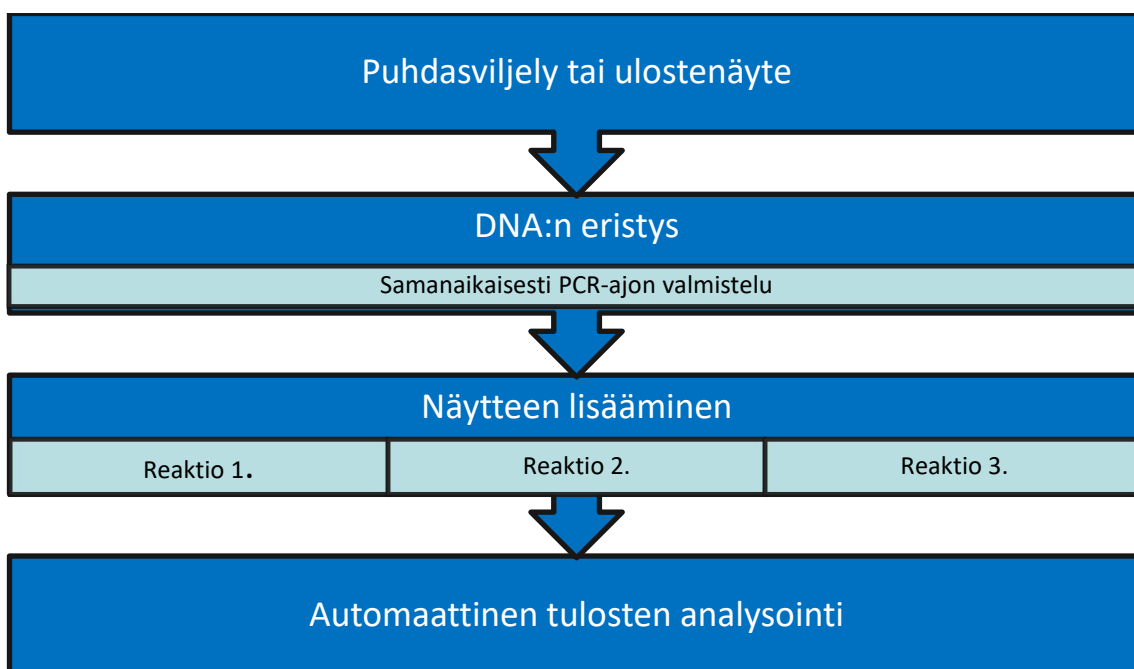
Real-Time PCR -tekniikalla voidaan havainnoida reaaliaikaisesti monistettua DNA-tuotetta. Tämä reaaliaikainen havainnointi on mahdollista lisäämällä reaktioon fluoresoivaa molekyyliä, joka sisältää DNA:ta sitovia väriaineita sekä fluoresoivalla merkkiaineella leimattuja sekvenssispesifisiä alukkeita tai koettimia. Laitteessa on moduuli, joka havaitsee fluoresenssisignaalin sen vahvistuttua. Mitatun fluoresenssin arvo on verrannollinen DNA:n kokonaismäärään. (BioRad n.d.)

Real-Time PCR:n suurin etu verrattuna tavalliseen PCR-menetelmään on se, että reaaliaikaisen mittauksen avulla voidaan määrittää alkuperäinen templaatti-DNA:n määrä (BioRad n.d.). Nukleiinihappojen monistus- ja havaitsemisvaiheet suoritetaan suljetussa tilassa, jolloin monistettujen nukleiinihappojen riski vapautua ympäristöön tai tuleviin analysoitaviin näytteisiin on pienempi verrattuna tavanomaisiin PCR-menetelmiin. Perinteisiin PCR-menetelmiin nähden Real-Time PCR on myös yksinkertaisempi suorittaa sekä sen käyttö vaatii vähemmän aikaa. Koska Real-Time PCR sisältää kiihdytetyn lämpösyklityksen ja se havainnoi reaaliaikaisesti monistuvaa tuotetta, saadaan sillä paljon nopeammin testituloksia verrattuna tavanomaiseen PCR-menetelmään. Erinomaisen herkkyyden, spesifisyyden, alhaisen kontaminaatoriskin sekä nopeuden yhdistelmä tarjoaa monien tartuntatautien diagnosointiin hyvän vaihtoehdon. (Espy ym. 2006.) Real-Time PCR tulokset voivat olla kvantitatiivisia (kopioiden lukumäärä) tai kvalitatiivisia (haluttua sekvenssiä esiintyy tai ei esiinny) (BioRad n.d.) Opinnäytetyössä käytettiin Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR:ää ja saadut tulokset ovat kvalitatiivisia.

4.2 Amplidiag® CarbaR+MCR

Amplidiag® CarbaR+MCR -testi on kvalitatiivinen diagnostinen *in vitro* testi, joka perustuu nukleiinihappoihin. Testin avulla näytteestä pystytään havaitsemaan karbapenemaasi- ja/tai kolistiiniresistenttejä bakteereja niitä osoittavien nukleiinihappomarkkerien avulla. Havaitseminen perustuu monien karbapenemaasia koodaavien geenien ja kolistiiniresistenssiä koodaavien geenien tunnistamiseen. Testi tunnistaa karbapenemaasia koodaavat geenit KPC, VIM, NDM, IMP ja GES. GES-geenistä se tunnistaa vain karbapenemaasivariantit. Se tunnistaa karbapenemaasia koodaavista geeneistä myös *Acinetobacter* OXA -ryhmän sekä OXA-48 -kaltaiset -ryhmän. Kolistiiniresistenssiä koodaavista MCR-geeneistä se tunnistaa *mcr-1* ja *mcr-2* -geenit. Testi ilmoittaa tulostuloksissa kaikki muut geenit samoilla lyhenteillä paitsi GES-geenin GES-CPO:na, OXA-48 -kaltaiset OXA48/181:nä ja *Acinetobacter* OXA -ryhmän AcOXA:na. Testi tunnistaa KPC-geenistä 24 varianttia, VIM-geenistä 45 varianttia, NDM-geenistä 16 varianttia, IMP-geenistä 47 varianttia, GES-geenistä 12 varianttia ja OXA-48 kaltaisista 8 varianttia. *Acinetobacter* OXA -ryhmään kuuluu neljä ryhmää, joihin kuuluu variantteja seuraavasti: OXA-23-kaltaiset -ryhmässä on 19 varianttia, OXA-24/40-kaltaiset -ryhmässä on 8 varianttia, OXA-51-kaltaiset -ryhmässä, jossa on promootori ISAb1, on 89 varianttia ja OXA-54-kaltaiset -ryhmässä 4 varianttia. Testimateriaalina voidaan käyttää DNA:ta, joka on eristetty peräsuolitikkunäytteestä, ulosteesta tai bakteeripuhdasviljelmästä. (Mobidiag 2018, 6.)

Amplidiag® CarbaR+MCR -testiin kuuluu reagensseja 96 näytteelle. Jokainen näyte tutkitaan kolmessa eri reaktiossa, joten reagensseja on 3x96. (Mobidiag 2018, 9.) Testin työnkulku on esitetty kuviossa 1. Puhdasviljelmästä tai uloste-näytteestä eristetään DNA. Samanaikaisesti PCR-ajoa voidaan alkaa valmistelemaan esimerkiksi lämmittämällä PCR-laitetta ja pipetoimalla reagenssit oikeille paikoilleen juuri ennen näytteiden lisäystä. Näytteen lisäämisen jälkeen PCR-laitte suorittaa näytteiden analysoinnin triplikaattina. Tulokset analysoidaan automaattisesti.



KUVIO 1. Amplidiag® CarbaR+MCR -testin työnkulku. (Mobidiag 2018, 7, muokattu.)

Taulukossa 3. on kuvattuna Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR:n käyttämä protokolla, kun käytetään Amplidiag® CarbaR+MCR -testiä. Taulukossa on näkyvillä Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR- laitteen käyttämä lämpötila, kuinka kauan tiettyä lämpötilaa käytetään ja kuinka monta kertaa kyseistä lämpötila-aika-sykliä käytetään. (Mobidiag 2018, 34, muokattu.)

TAULUKKO 3. Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR käyttämä protokolla käytettäessä Amplidiag® CarbaR+MCR -testiä (Mobidiag 2018, 34, muokattu).

Lämpötila	Aika	Syklien määrä
95 °C	15 min	1 x
95 °C	15 s	45 x
60 °C	1 min	
Fluoresenssi luetaan jokaisen 60 °C syklin jälkeen		

4.3 Seegene Allplex™ Entero-DR

Seegene Allplex™ Entero-DR -testi on multiplex real-time PCR:ää käyttävä *in vitro* -diagnostinen kvalitatiivinen testi. Testillä voidaan havaita karbapenemaasigeeneistä KPC, NDM, VIM, OXA-48 ja IMP, vankomysiiniresistenssiin liittyvistä geeneistä vanA ja vanB sekä laajakirjoiseen beetalaktamaasiin liittyvästä geenistä CTX-M. Testi voidaan suorittaa bakteeriviljelystä tai peräsuolitikkunäytteestä. Resistenssigeenimarkkerien avulla testillä voidaan seurata CTX-M-geeniä tuottavien enterobakteerien, karbapenemaasia tuottavien enterobakteerien ja vankomysiiniresistenttien enterokokkien (VRE) aiheuttamien infektioiden leviämistä terveydenhuoltojärjestelmässä. Muiden diagnostisten laboratoriotestien, kuten herkkyysmäärityksien kanssa testiä suositellaan käytettäväksi samanaikaisesti. (Seegene 2018a, 4.) Seegene Allplex™ Entero-DR -testi havaitsee tunnistamistaan geeneistä useita variantteja. KPC-geenistä 25 varianttia, IMP-geenistä 57 varianttia, NDM-geenistä 18 varianttia, OXA-48-geenistä 20 varianttia, VIM-geenistä 48 varianttia ja CTX-M-geenistä 5 varianttia. (Seegene 2018b.)

Taulukossa 4. on esitetty Bio-Rad CFX96 Real-Time PCR-laitteen protokolla Seegene Allplex™ Entero-DR -testille. Taulukossa on näkyvillä protokollan eri vaiheet, niihin liittyvät lämpötilat ja ajat sekä syklien lukumäärät. Taulukosta selviää myös missä vaiheessa PCR-levyä luetaan. (Seegene 2018a, 14, muokattu.)

Taulukko 4. Seegene Allplex™ Entero-DR -testin protokolla Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR-laitteelle. (Seegene 2018a, 14, muokattu.)

Vaihe	Lämpötila	Aika	Syklien määrä
1.	95°C	15 min	1
2.	95°C	10 s	45
3.	60°C	15 s	
4.	72°C	10 s	
5.		GOTO vaiheeseen 2, 44 kertaa	
PCR-levy luetaan vaiheissa 3 ja 4. Fluoresenssi detektoidaan 60°C ja 72°C.			

5 OPINNÄYTETYÖPROSESSI

Opinnäytetyön aiheen saimme valmiina keväällä 2019. Sovimme tapaamisen ohjaavan opettajamme Marja Kuparisen sekä työelämäkontaktimme erikoistuvan sairaalamikrobiologi Bruno Luukisen kanssa, jolloin opinnäytetyön sisältö alkoi hahmottumaan. Tämän perusteella aloimme työstämään opinnäytetyösuunnitelmaa sekä opinnäytetyösopimusta, jonka lopullinen versio valmistui kesäkuun alussa vuonna 2019. Kesän 2019 aikana suoritimme tiedonhakuja opinnäytetyömme kirjallista osuutta varten ja luonnostelimme sen sisältöä. Opinnäytetyön kokeellista osuutta varten olimme tutustumassa päivän Fimlab Laboratoriot Oy:n mikrobiologian laboratoriossa erilaisiin toimintatapoihin ja käytäntöihin syksyllä 2019. Samana syksynä suoritimme opinnäytetyön kokeellisen osuuden mikrobiologian laboratoriossa viikolla 42 ja siitä saadut tulokset kirjattiin seuraavana viikolla yhteen.

5.1 Aikaisemmat tutkimukset

Tässä opinnäytetyössä verrataan Amplidiag® CarbaR+MCR -testin tuloksia Paavo Hannuksen Pro Gradu tutkielmassa käytetyn Seegne Allplex™ Entero-DR -testin saamiin tuloksiin. Hannuksen (2020) Pro Gradu -tutkielma: ”Rapid detection of carbapenemase, ESBL and vancomycin resistance genes directly from positive blood cultures – Validating the Seegene Allplex™ Entero-DR kit with low-prevalence patient samples” valmistui keväällä 2020. Hannuksen (2020) mukaan tutkimuksen tavoitteena oli:

Tutkimuksen tavoitteena oli koestaa ja validoida Seegene™ Entero-DR -antibiottiresistenssigenipaneeli, käytettäväksi veriviljelyssä löytyneiden Gram-negatiivisten enterobakteerien ja enterokokkien resistenssigenien osoittamiseksi nopealla yksivaiheisella PCR-pohjaisella menetelmällä. (Hannus 2020).

Tutkielmassa käydään läpi myös muita siihen sopivia aihealueita, kuten sepsistä ja antibiottiresistenssiä. Hannus oli käyttänyt bakteerien kasvatukseen ja ajojen valmisteluun tiettyjä toimintatapoja, joita seurasimme tehden tuloksista vertailukelpoisia.

5.2 Tavoite ja tarkoitus

Tämän opinnäytetyön tarkoituksena on verrata käyttämämme Amplidiag® CarbaR+MCR -testin tuloksia Paavo Hannuksen Pro Gradu tutkielmassa käytetyn Seegene Allplex™ Entero-DR -testin saamiin tuloksiin. Tarkoituksena on selvittää tunnistaako käyttämämme Amplidiag® CarbaR+MCR -testi joitain muita bakteerikantoja kuin mitä Seegene Allplex™ Entero-DR -testi tunnistaa, vai ovatko tulokset keskenään yhtenäisiä. Tarkoituksena oli myös nähdä, löytyykö käyttämämme kannoista *mcr*-geenejä, jotka aiheuttavat kolistiiniresistenssiä.

Opinnäytetyön tavoitteena oli tuottaa luotettavia ja vertailukelpoisia tuloksia. Jotta tuloksista saataisiin vertailukelpoisia, tavoitteena oli vakioida kokeellisessa osassa työtapamme vastaamaan Hannuksen käyttämiä työtapoja sekä käytimme samaa PCR laitetta, Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR:ää, jotta mahdolliset testien tunnistuksen eroavaisuudet voitaisiin olettaa johtuvan testeistä itsestään eikä poikkeavista työtavoista tai laiteeroista.

Yksi tavoitteistamme opinnäytetyölle oli luoda selkeä ja luotettava työ, josta on hyötyä, mikäli käyttämämme testi päätetään joskus ottaa diagnostiseen käyttöön. Koska antibioottiresistenssi yleistyy maailmanlaajuisesti, tavoitteena oli myös luoda informatiivinen katsaus karbapenemaasintuottajien sekä kolistiiniresistenssin kliinisestä merkityksestä sekä niiden esiintyvyydestä. Yhtenä tavoitteena oli myös kirjoittaa kirjallinen osuus niin, että se antaa riittävät pohjatiedot lukijalle ymmärtää opinnäytetyön tarkoitusta ja tuloksia sekä tulkita niitä.

Omia tavoitteitamme oli hakea tietoa luotettavista lähteistä sekä koota yhteen lähteistä opinnäytetyöhön keskeisimmät asiat luontevasti sekä yhdistää lähteiden tietoa selkeiksi kokonaisuuksiksi. Kokeellisessa osassa tavoitteenamme oli sisäistää mikrobiologian laboratorion toimintatavat ja käytännöt sekä toimia niiden mukaisesti. Halusimme kehittää omaa osaamistamme käytännön työssä, kuten pipetoinnin saralla. PCR:n käyttö oli meille suhteellisen tuntematon osa-alue, joten tavoitteenamme oli oppia käyttämään PCR-laitetta ja sen käyttöjärjestelmää sekä tulkitsemaan sen antamaa dataa käyttämämme Amplidiag® CarbaR + MCR -testin osalta.

5.3 Tutkimusmenetelmä

Opinnäytetyössä käytetään kvantitatiivista eli määrällistä tutkimusmenetelmää. Kvantitatiivinen tutkimus tutkii suhteita ja eroja mitattavien ominaisuuksien eli muuttujien välillä. Kvantitatiivisessa tutkimuksessa dataa analysoidaan numeroiden avulla. (Vilkkä 2007, 13-14.) Kvantitatiivinen tutkimus tunnetaan myös nimellä tilastollinen tutkimus ja siihen tarvittavan tutkimusotoksen tulee olla riittävän edustava ja suuri. Tutkimustuloksia pystytään selkeyttämään erilaisilla kuvioilla ja taulukoilla. (Heikkilä 2014, 15.) Kuvioiden ja taulukoiden avulla tekstiä pystytään parantamaan siten, että se on ymmärrettävämmässä ja luettavammassa muodossa (Hirsjärvi, Remes & Sajavaara 2018, 322). Toisin kuin tekstillä tai kuviolla, taulukolla laajat massat tietoa saadaan hallittavampaan ja järjestyneempään asetelmaan. Hyvässä kuviossa tiedon etsimistä muualta pyritään pitämään mahdollisimman vähäisenä. Keskeisen tiedon hyvä kuvio pystyy myös ilmaisemaan itsekseen. (Heikkilä 2014, 144 & 149.)

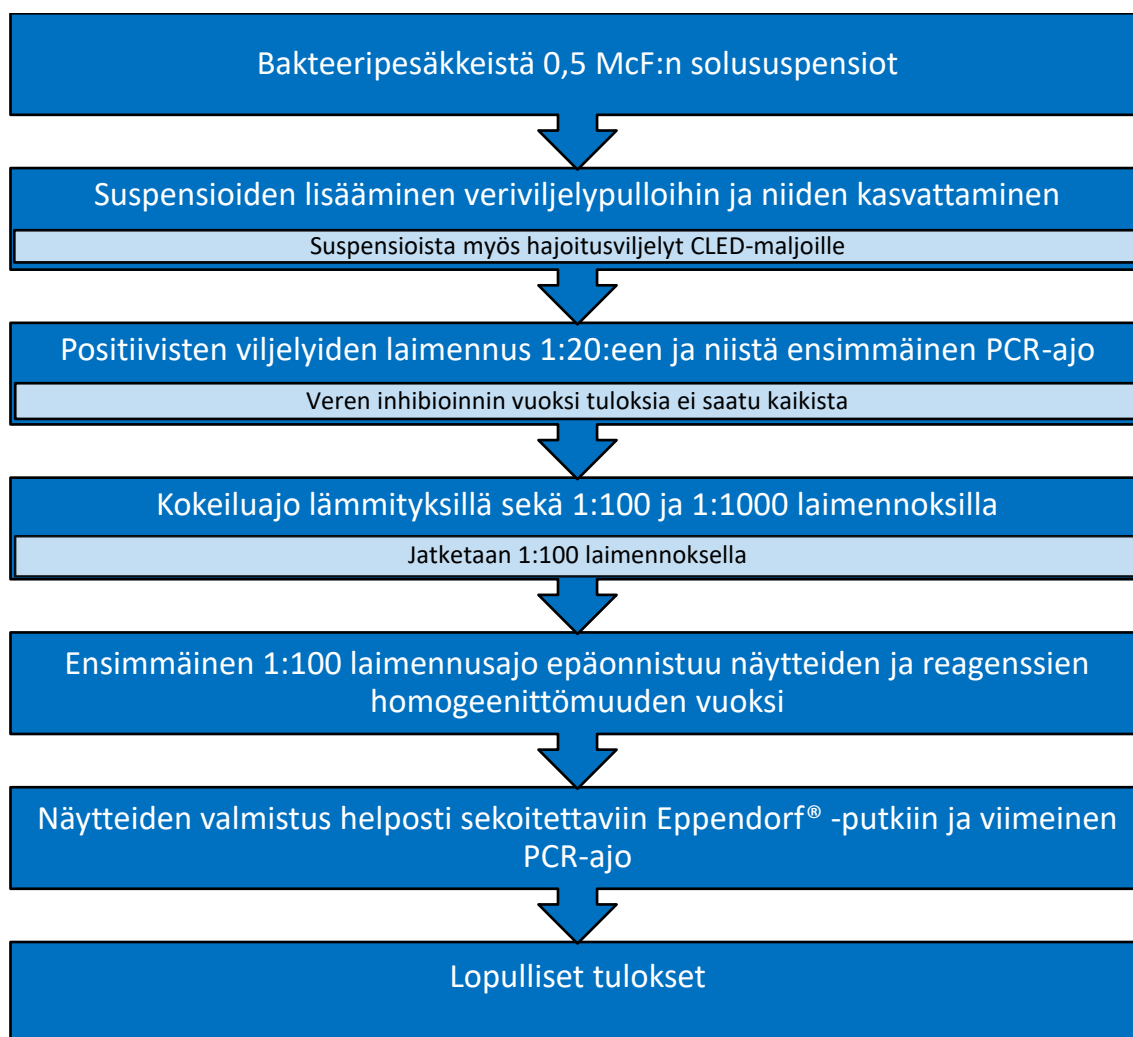
Opinnäytetyöhön kuuluu myös kokeellinen osuus, joka suoritettiin Fimlab Laboratoriot Oy:n mikrobiologian laboratoriossa Tampereella. Heikkilän (2014) mukaan kokeellisessa tutkimuksessa pyritään selvittämään esimerkiksi laboratorioolosuhteissa jonkun olettamuksen oikeellisuutta. Kokeellisessa tutkimuksessa pyritään myös vakioimaan kaikki muut tekijät paitsi tutkittava muuttuja. Näin pystytään tarkastelemaan tutkittavan muuttujan vaikutusta. Kokeellisen osuuden aikana käytimme samoja tutkimusasetelmia ja toimintatapoja, kuin Paavo Hannus käytti Pro Gradu -tutkielmassaan. Näin pystyimme varmistamaan luotettavan vertailun Hannuksen käyttämää Seegene Allplex™ Entero-DR -testiä vastaan.

5.4 Kokeellinen osuus

Opinnäytetyön kokeellinen osuus suoritettiin yhteistyössä Fimlabin mikrobiologian laboratorion kanssa. Opinnäytetyön kokeellinen osuus aloitettiin tekemällä käyttämistämme kannoista 0,5 McFarlandin (McF) solususpensiot, joista siirsimme 100 µl veriviljelypulloihin kasvamaan yön yli. Tutkittavina kantoina käytimme Fimlabilla valmiina olleita Terveiden ja hyvinvoinninlaitoksen (THL) kar-

bapenemaasia tuottavia enterobakteerikantoja, positiivisia potilasnäytteitä ja negatiivisia potilasnäytteitä. Positiiviset potilasnäytteet olivat veriviljelypositiivisia, mutta karbapenemaasia tuottavien enterobakteerien suhteen kuitenkin negatiivisia. Negatiivisina potilasnäytteinä käytimme veriviljelynäytteitä, jotka olivat negatiivisia. Karbapenemaasia tuottavia enterobakteerikantoja oli yhteensä 22. Potilasnäytteitä oli yhteensä 54, joista positiivisia potilasnäytteitä oli 44 ja negatiivisia potilasnäytteitä 10. Näytteet käsiteltiin anonyymisti. Käyttämämme karbapenemaasia tuottavat enterobakteerikannat oli viljelty valmiiksi CLED-maljoille. Positiivisista veriviljelypulloista siirrettiin Eppendorf® -putkiin verta, joista viljeltiin CLED-maljat. Ensimmäinen PCR-ajo suoritettiin 1:20 laimennoksella ja laimentamattomalla verellä, mutta tässä veri inhiboi voimakkaasti. Tämän vuoksi lähdimme laimennossarjoilla ja lämmityksillä etsimään sopivaa tapaa käsitellä näytteitä, jotta veri ei inhiboisi ajon aikana. Päädyimme 1:100 laimennokseen, jolla saimme lopuista ajoista tuloksia. Lopulliset tulokset taulukoitiin.

Kuviossa 2. on esitettynä opinnäytetyön kokeellisen osuuden vaiheet graafisessa muodossa. Kuvioista nähdään mihin toimenpiteisiin ryhdyttiin silloin, kun huomattiin, että ensimmäinen PCR-ajo epäonnistui. Kuvion tarkoituksena on selkeyttää kokeellisen osuuden työvaiheita.



KUVIO 2. Graafinen kuvaus opinnäytetyön kokeellisen osuuden etenemisestä.

5.4.1 Tutkimuskannat ja niiden viljely

Karbapenemaasia tuottavista enterobakteerikannoista valmistimme noin 0,5 McF:n solususpension ottamalla viljelysauvalla maljalta 1-2 pesäkettä ja siirtämällä se yhteen milliin suolaliuokseen. Suspensioiden sameus mitattiin densitometrillä. Valmistamiemme suspensioiden sameudet vaihtelivat 0,39 ja 0,68 McF:n välillä. Lisäsimme veriviljelypulloihin pullon desinfioidun kumikorkin läpi ruiskulla 10 ml hevosenverta. Hannus oli käyttänyt lampaanverta tutkielmassaan. Tämän jälkeen lisäsimme ruiskulla kumikorkin läpi jokaiseen veriviljelypulloon 100 µl tekemäämme solususpensiota. Kaikki näytteet kasvatettiin anaerobi -veriviljelypulloihin. Sen lisäksi kasvatimme viiteen aerobi -veriviljelypulloon viittä eri karbapenemaasia tuottavaa enterobakteerikantaa todentaaksemme, että ne kasvavat molemmissa. Yhteensä viljelimme 70 veriviljelypulloa. Veriviljelypulloihin

tehtiin tunnistetarrat juoksevalla numeroinnilla, jonka mukaan näytteet jatkossa identifioitiin. Veriviljelypullot laitettiin veriviljelykaappiin yön ajaksi. 67 veriviljelypulloa olivat seuraavana päivänä positiivisia. Kahdessa anaerobipullossa oli virheellisesti aerobibakteeria, jolloin pullot jäivät negatiivisiksi. Yksi karbapenemaasia tuottavista enterobakteerikannoista ei tuntemattomasta syystä kasvanut.

Koska käyttämämme bakteerikannat eivät ole anaerobisia, veriviljelypullot ilmatettiin ennen näytteenvetoa ruiskuun. Kaikista veriviljelypulloista siirsimme näytettä 200-300 µl Eppendorf® -putkiin. Samalla teimme hajotusviljelyn CLED -maljoille todentaaksemme, että halutut bakteerit kasvavat ja etteivät negatiiviset potilasnäytteet kasva. Maljat siirrettiin +37 asteiseen lämpökaappiin kasvamaan ja vuorokauden kuluttua todettiin, että halutut maljat kasvoivat ja negatiiviset potilasnäytteet eivät.

Lisäksi molempien GES-kantojen solususpensiosta tehtiin herkkyysmääritykset kefuroksiimi (CXM), keftatsidiimi (CAZ), keftriaksoni (CRO), piperasilliini-tatsobaktaami (PTZ), augmentiini (AUG), meropeneemi (MEM), levofloksaani (LEV), trobamsiini (TN) sekä trimetopriimi/sulfametoksatsoli (TS) antibioottikiekoilla. Näiden tulokset luettiin 24 tunnin kuluttua. Taulukossa 5. on herkkyysmäärityksien tulokset listaamalla määrityksessä käytetyt antibiootit sekä ilmoitettu mille antibiootille CPE 20 ja CPE 21 kannat olivat resistenttejä (R) ja herkkiä (S)

TAULUKKO 5. GES-kantojen herkkyysmäärityksien tulokset.

	CPE 20	CPE 21
Kefuroksiimi (CXM)	R	R
Keftatsidiimi (CAZ)	R	R
Keftriaksoni (CRO)	R	R
Piperasilliini-Tatsobaktaami (PTZ)	R	R
Augmentiini (AUG)	R	R
Meropeneemi (MEM)	S	S
Levofloksaani (LEV)	R	S
Trobamsiini (TN)	S	S
Trimetopriimi/ Sulfametoksatsoli (TS)	R	S

5.4.2 PCR:n suoritus

Ensimmäistä PCR-ajoa varten näytteet laimennettiin 1:20. Laimennokseen käytettiin 200 µl fosfaattipuskuroitua suolaliuosta (PBS) ja 10 µl näytettä. Lisäksi ajoon laitettiin 5 karbapenemaasia tuottavaa enterobakteerinäytettä sekä kolme positiivista potilasnäytettä laimentamattomana. Ajoa varten laadittiin kaavio näytepaikoista kuoppalevyllä. Näytteet pipetoitiin ja laimennettiin kuoppalevyille kaavion mukaan. Puhdastilassa valmistimme Amplidiag® CarbaR+MCR -testin reagensseista MasterMix 1,-2, ja -3, jotka pipetoitiin niille tarkoitetuille paikoille PCR-kuoppalevyssä. Jokaiseen näytekuoppaan pipetoitiin 15 µl niille tarkoitettua MasterMix:ä. Ajoon valittuja näytteitä sekä positiivista ja negatiivista kontrollia pipetoitiin vetokaapissa 5 µl triplikaattina näytekuoppiin kaavion mukaan. Näytekaivojen päälle laitettiin suojakorkit ja ennen PCR-ajoa kuoppalevy pyöritettiin nopeasti eli spinnattiin, jotta näytteet siirtyvät kaivojen pohjalle. Kuoppalevy asetettiin Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR-laitteeseen. PCR:ää ohjattiin tietokoneohjelman kautta, johon näytekaivot nimettiin. Tuloksista havaittiin, että veri inhiboi reaktiota, siten että sisäinen kontrolli ei osunut vaihteluvälillensä. Positiivinen ja negatiivinen kontrolli onnistuivat.

5.4.3 Laimennokset

Koska veri inhiboi reaktiota voimakkaasti, päädyttiin tekemään laimennossarja sekä kuumennus. Tähän valittiin yksi karbapenemaasia tuottava enterobakteerikanta ja yksi positiivinen potilasnäyte. Molemmista kannoista tehtiin 1:100 sekä 1:1000 laimennokset. Näiden lisäksi kokeiltiin näytteen kuumentamista ja supertantin suoraa käyttöä PCR-ajoon sekä supertantin laimentamista samoilla laimennoksilla. Näytteet laimennettiin fosfaattipuskuroituun suolaliuokseen. 90 µl näytettä kuumennettiin 96°C:ssa lämpölevyllä 10 minuuttia. Tämän jälkeen näytteitä sentrifugoitiin 5 minuuttia 12 000 rpm:ssä. Supertanttia pipetoitiin erillisiin Eppendorf® -putkiin 30 µl. Tästä tehtiin edellä mainitut laimennokset. Suoritimme kuoppalevyille pipetoinnit tekemämme kaavion mukaan, jonka jälkeen suoritimme PCR-ajon. Tuloksista havaittiin, että kaikki laimennokset antoivat oikean tuloksen. Suoraan supertantista tehty PCR-ajo antaa hälytyksen, että sisäinen kont-

rolli on juuri ja juuri vaihteluvälillä. Tuloksien kannalta ei ollut merkitystä käyttääkö 1:100 vai 1:1000 laimennosta. Työn sujuvuuden kannalta oli järkevämpää käyttää 1:100 laimennosta, sillä se pystytään tekemään ilman sarjalaimennosta. Kuumennuksella ei ole merkitystä laimennoksissa, joten sen poisjättäminen nopeuttaa työvaiheita.

5.4.4 1:100 laimennosajot

Ensimmäiset 1:100 laimennokset tehtiin kuoppalevyille, josta ne pipetoitiin PCR-kuoppalevyille. PCR-ajo aloitettiin. Vain osasta näytteistä saatiin tulokset, sillä osan näytteiden sisäiset kontrollit eivät olleet vaihteluvälillä. Positiivinen ja negatiivinen kontrolli olivat onnistuneet, jolloin ajon tuloksia voidaan pitää luotettavina. Näytteissä, joissa sisäinen kontrolli ei ollut vaihteluvälillä on todennäköisesti tapahtunut pipetointivirhe tai näytteet eivät ole sekoittuneet kuoppalevyllä kunnolla. Kuoppalevyllä näytteet sekoitettiin pipetin avulla, jolloin suuri näytemäärä ei kaikissa kuopissa ole suurella todennäköisyydellä sekoittunut riittävästi. Tämän vuoksi seuraava ajo suoritettiin tekemällä laimennokset Eppendorf® -putkiin varmistaksemme näytteiden homogeenisuuden.

Eppendorf® -putkiin tehdyt laimennokset pystyttiin sekoittamaan kunnolla eli vortexoimaan ja näin pystyttiin varmistamaan näytteiden homogeenisuus. Tämä ajo jouduttiin tekemään eri valmistuserää olevalla Amplidiag® CarbaR+MCR -testillä, koska aikaisemmasta testistä loppui tarvittavat reagenssit. Kaikista ajossa olleista näytteistä saatiin tulokset. Tämä vahvisti epäilyämme siitä, että edellisessä ajossa olleet näytteet eivät olleet homogeenisiä.

6 TULOKSET

Näytekantoja oli tutkittavana yhteensä 75. Näistä 75:stä karbapenemaasia tuottavia enterobakteerikantoja oli 22, karbapenemaasia tuottavia enterobakteerinegatiivisia, mutta veriviljelypositiivisia potilasnäytteitä 43 ja veriviljelynegatiivisia potilasnäytteitä 10. Kaikkia kantoja käsiteltiin anonyymisti. Tulokset saatiin lopulta 21:stä karbapenemaasia tuottavasta enterobakteerikannasta, 8:sta veriviljelypositiivisesta potilasnäytteestä ja 4:stä veriviljelynegatiivisesta potilasnäytteestä. Lisäksi saimme selville, että pelkkää verta ei voida käyttää PCR-ajossa, sillä se inhiboi reaktiota voimakkaasti. Tämä huomattiin, kun näytteen sisäiset kontrollit eivät pysyneet niille asetetuissa vaihteluväleissä. Pelkkää verta sisältäviä näytteitä PCR-ajossa oli yhteensä 8. Myöskään 1:20 laimennos ei ollut riittävän laimea. Epäonnistuneiden ajojen seurauksena tuloksemme jäivät odotettua vähäisimmiksi. Prioriteettinamme oli saada kaikkien karbapenemaasia tuottavien enterobakteerikantojen tulokset, jotta pystyisimme vertailemaan niitä luotettavasti Paavo Hannuksen saamiin tuloksiin Seegene Allplex™ Entero-DR -testillä.

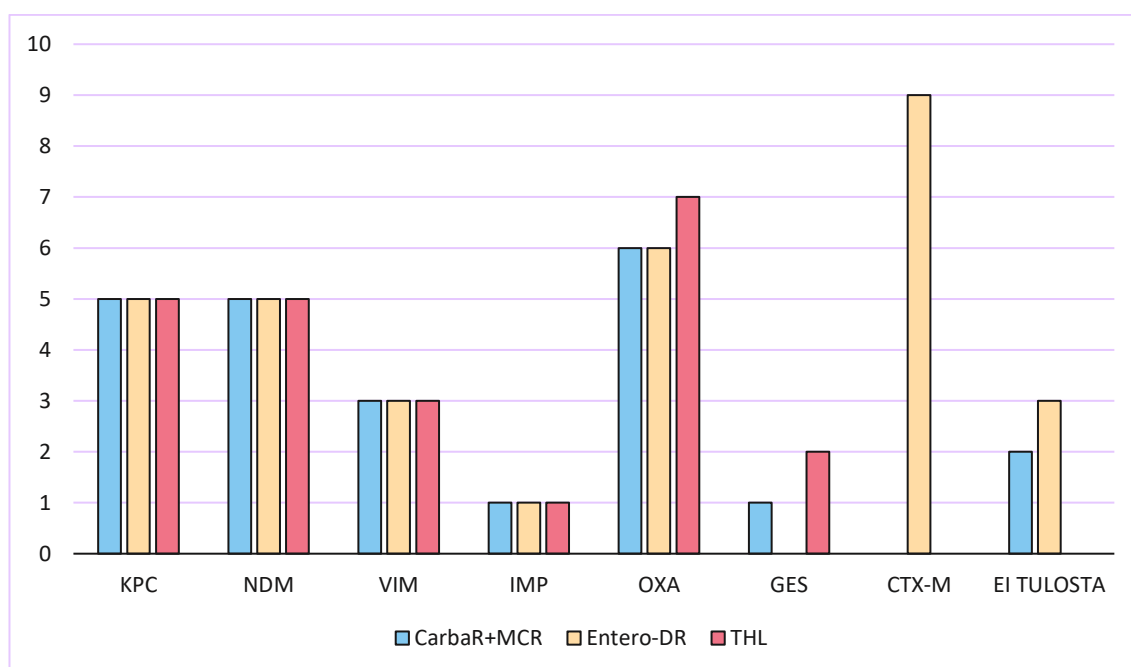
Taulukossa 6. on esitettyä käyttämiemme CPE-kantojen bakteerilajit, Amplidiag® CarbaR+MCR -testillä saamamme geenitulokset, Hannuksen saamat geenitulokset Seegene Allplex™ Entero-DR -testillä sekä THL:n ilmoittamat geenit. Amplidiag® CarbaR+MCR -testi ja Seegene Allplex™ Entero-DR -testi tunnistavat samat karbapenemaasigeenit ja ne ovat yhtäläiset THL:n toimittamien tulosten kanssa. THL on ilmoittanut myös geenien variantit. Kumpikaan testi ei erottele geenien variantteja toisistaan vaan ne ilmoittavat pelkästään tietyn geeniryhmän. Amplidiag® CarbaR+MCR -testi ei erottele OXA -geenin variantteja toisistaan vaan se antaa tulokseksi OXA-48/181. Seegene Allplex™ Entero-DR -testi tunnistaa CTX-M -kannat, mutta ei GES-CPO -kantoja. Amplidiag® CarbaR+MCR -testi tunnistaa MCR -kannat, joita ei käyttämissämme kannoissa havaittu, sekä GES-CPO -kannat, mutta ei CTX-M -kantoja. Amplidiag® CarbaR+MCR -testi tunnistaa GES-CPO -geenin CPE 22 -kannasta, mutta ei CPE 21- kannasta, joka THL:n mukaan on GES-5. CPE 21 -kanta tutkittiin kahdesti ja molemmilla kerroilla se antoi tuntemattomasta syystä negatiivisen tuloksen.

TAULUKKO 6. CPE-kantojen tulokset

No.	Laji	Geeni Amplidiag® CarbaR+MCR	Geeni Seegene Allplex™ Entero- DR	THL
CPE 1	<i>K. pneumoniae</i>	KPC	KPC	KPC-3
CPE 2	<i>K. pneumoniae</i>	KPC	KPC	KPC-3
CPE 3	<i>E. coli</i>	NDM	CTX-M, NDM	NDM-1
CPE 4	<i>E. coli</i>	NDM	CTX-M, NDM	NDM-5
CPE 5	<i>E. coli</i>	OXA-48/181	OXA-48	OXA-48
CPE 6	<i>E. coli</i>	KPC	KPC	KPC-2
CPE 7	<i>K. pneumoniae</i>	OXA-48/181, NDM	CTX-M, NDM, OXA-48	OXA-48, NDM-5
CPE 8	<i>K. pneumoniae</i>	OXA-48/181	CTX-M, OXA-48	OXA-232
CPE 9	<i>C. freundii</i>	KPC	KPC	KPC-2
CPE 10	<i>K. pneumoniae</i>	OXA-48/181	OXA-48	OXA-181
CPE 11	<i>K. pneumoniae</i>	KPC	KPC	KPC-3
CPE 12	<i>E. cloacae</i>	OXA-48/181	CTX-M, OXA-48	OXA-48
CPE 13	<i>K. pneumoniae</i>	IMP	CTX-M, IMP	IMP-14
CPE 14	<i>C. freundii</i>	VIM	CTX-M, VIM	VIM-2
CPE 15	<i>P. mirabilis</i>	VIM	VIM	VIM-1
CPE 16	<i>E. coli</i>	NDM	NDM	NDM-4
CPE 17	<i>K. oxytoca</i>	VIM	VIM	VIM-1
CPE 18	<i>E. coli</i>	NDM	CTX-M, NDM	NDM-7
CPE 19	<i>A. baumannii</i>	EI KASVANUT	-	OXA-23
CPE 20	<i>C. freundii</i>	GES-CPO	-	GES-5
CPE 21	<i>E. cloacae</i>	-	-	GES-5
CPE 22	<i>E. coli</i>	OXA-48/181	CTX-M, OXA48	OXA-181

Kuten taulukossa 6. on havaittavissa, Amplidiag® CarbaR+MCR -testi ja Seegene Allplex™ Entero-DR -testi tunnistavat samat geenit. Kuviossa 3. ja 4. sekä taulukossa 8. tätä on pyritty vielä selkeyttämään. Kuviossa 3. on esiteltyä geenien lukumäärät, jotka on saatu Amplidiag® CarbaR+MCR -testillä sekä Seegene Allplex™ Entero-DR -testillä. Näkyvillä on myös vertailuksi THL:n ilmoittamien

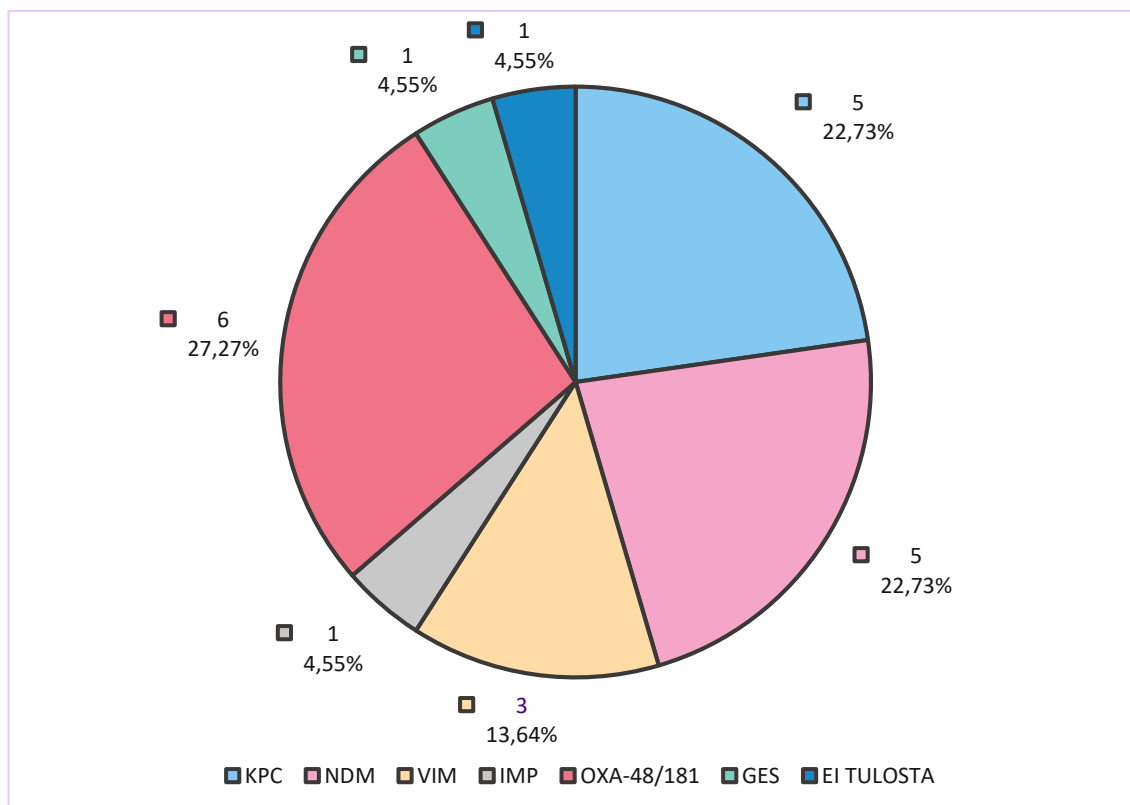
geenien lukumäärät, mutta eri geenivariantteja ei ole eritelty. Kuvion on tarkoitus auttaa hahmottamaan paremmin tulosten samankaltaisuus. Kuvioista nähdään, että KPC-, NDM-, VIM- ja IMP- geenien lukumäärät ovat samat kaikissa muuttujissa. Seegene Allplex™ Entero-DR -testi ei tunnista GES -kantoja, mutta tunnistaa taas CTX-M -kannat, mitä Amplidiag® CarbaR+MCR- testi ei taas tunnista. Amplidiag® CarbaR+MCR -testi ei ole tunnistanut tuntemattomasta syystä toista GES -kantaa. THL ei ole erikseen ilmoittanut CTX-M -kantoja, jotka näistä kahdesta testistä vain Seegene Allplex™ Entero-DR -testi tunnistaa. Tällä testillä ei ole saatu tuloksia kolmesta kannasta, joista kaksi oli GES -kantoja, joita testi ei tunnista. Amplidiag® CarbaR+MCR -testi ei saanut tulosta aiemmin mainitun toisen GES -kannan lisäksi yhdestä kannasta, joka ei kasvanut veriviljelyssä.



KUVIO 3. Kuviossa on eriteltyä Amplidiag® CarbaR+MCR -testin ja Seegene Allplex™ Entero-DR -testin saamien geenien lukumäärä. Näkyvillä on myös THL:n ilmoittamien geenien lukumäärä.

Kuviossa 4. on esitettyä Amplidiag® CarbaR+MCR -testillä karbapenemaasia tuottavista enterobakteerikannoista saatujen karbapenemaasigeenien jakautuminen. Kaaviossa on näkyvissä kannan esiintymisen lukumäärä ja prosentti. CPE-kantoja oli tutkittavana 22 kappaletta, joista eri genejä havaittiin 21 kappaletta. Tuloksissa havaittiin 5 KPC -kantaa, 5 NDM -kantaa, 3 VIM -kantaa, 1 IMP -kanta, 6 OXA -kantaa ja 1 GES -kanta. CPE 7:ssä havaittiin kaksi eri geeniä: NDM ja

OXA-48/181. CPE 21:stä, joka THL:n mukaan oli GES -kanta, ei saatu tuntemattomasta syystä tulosta.



KUVIO 4. Amplidiag® CarbaR+MCR -testillä löydettyt geenit 22 CPE-kannasta.

Negatiivisten potilasnäytteiden sekä CPE-negatiivisten veriviljelypositiivisten potilasnäytteiden avulla pyrimme todentamaan, ettei Amplidiag® CarbaR+MCR-testi anna väärää positiivisia tuloksia täysin negatiivisilla näytteillä tai näytteillä, joissa on bakteereja. Kuitenkin jotta voitaisiin poissulkea väärin positiivisten ja negatiivisten mahdollisuus, pitäisi CPE-negatiivisten veriviljelypositiivisten potilasnäytteiden sekä veriviljelynegatiivisten potilasnäytteiden määrää lisätä.

Taulukossa 7. on esitettyä käyttämämme CPE-negatiiviset, mutta veriviljelypositiiviset sekä veriviljelynegatiiviset potilasnäytteet. EB:t ovat potilasnäytteitä, jotka ovat veriviljelypositiivisia, mutta CPE-negatiivisia ja N 80-83 ovat veriviljelynegatiivisia potilasnäytteitä. Taulukossa EB-kannat on numeroitu alkuperäisellä tunnistetiedolla sekä sen perässä suluissa on ilmoitettu omaa kirjanpitoamme varten luodut juoksevat numerot.

TAULUKKO 7. Veriviljelypositiiviset sekä veriviljelynegatiiviset potilasnäytteet

No.	Laji	Geeni
EB 1 (23)	<i>C. freundii</i>	NEG
EB 3 (25)	<i>K. pneumoniae</i>	NEG
EB 6 (28)	<i>K. oxytoga</i>	NEG
EB 9 (31)	<i>K. pneumoniae, ESBL</i>	NEG
EB 10 (32)	<i>K. pneumoniae</i>	NEG
EB 11 (33)	<i>Raultella rithinolytica</i>	NEG
EB 12 (34)	<i>C. freundii</i>	NEG
EB 14 (36)	<i>C. koseri</i>	NEG
N 80	-	NEG
N 81	-	NEG
N 82	-	NEG
N 83	-	NEG

Taulukossa 8. on esitettyinä Amplidiag® CarbaR+MCR -testin ja Seegene Allplex™ Entero-DR -testin saamat tulokset. Taulukossa on pystyakselilla kannat CPE 1:stä CPE 22:teen ja vaaka-akselilla molempien testien havaitsemat geenit KPC, NDM, VIM, IMP ja OXA. Taulukossa on vaaka-akselilla myös mukana Amplidiag® CarbaR+MCR -testin tunnistama GES -geeni, mutta ei Seegene Allplex™ Entero-DR -testin tunnistamaa CTX-M -kantaa. Taulukko on värikoodattu siten, että punaisella taulukossa on näkyvillä Amplidiag® CarbaR+MCR -testin saamat tulokset ja sinisellä taas Allplex™ Entero-DR -testin saamat tulokset.

Taulukosta 8. pystytään havaitsemaan, että molemmat testit ovat saaneet samat geenitulokset CPE 1:stä CPE 18 asti. Molemmat testit ovat saaneet saman tuloksen vielä CPE 22:sta. THL on ilmoittanut CPE 19 geenivariantiksi OXA-23. Seegene Allplex™ Entero-DR -testi ei tunnista kyseistä geenivarianttia, joten siitä ei olla saatu vastausta. CPE 19 -kanta ei kasvanut tämän opinnäytetyön kokeellisessa osuudessa, joten Amplidiag® CarbaR+MCR -testillä siitä ei voitu saada tulosta. CPE 20 ja CPE 21 olivat molemmat THL:n mukaan GES -kantoja, joita Seegene Allplex™ Entero-DR -testi ei tunnista. Amplidiag® CarbaR+MCR tunnisti GES -kannan CPE 20:stä, mutta ei tunnistanut sitä tuntemattomasta syystä CPE 21:stä. CPE 21 oli mukana kahdessa eri onnistuneessa PCR- ajossa, mutta kummastakaan ajosta siitä ei saatu tulosta.

TAULUKKO 8. Amplidiag® CarbaR+MCR -testin ja Seegene Allplex™ Entero-DR -testin saamat tulokset

KANNAT	GEENIT					
	KPC	NDM	VIM	IMP	OXA	GES
CPE 1	■	■				
CPE 2	■	■				
CPE 3		■	■			
CPE 4		■	■			
CPE 5					■	■
CPE 6	■	■				
CPE 7		■	■		■	■
CPE 8					■	■
CPE 9	■	■				
CPE 10					■	■
CPE 11	■	■				
CPE 12					■	■
CPE 13				■	■	
CPE 14			■	■		
CPE 15			■	■		
CPE 16		■	■			
CPE 17			■	■		
CPE 18		■	■			
CPE 19						
CPE 20						■
CPE 21						
CPE 22					■	■
	CarbaR+ MCR	■		Entero- DR	■	

Yhteensä tutkittavia kantoja oli 22 ja mahdollisia löydettäviä geenejä oli 23. Hannuksen käyttämä Seegene Allplex™ Entero-DR -testi tunnisti 22 karbapenemaasia tuottavasta enterobakteerikannasta 20 eri geeniä. Kolmea kantaa kysei-

sellä testillä ei voitu tunnistaa, sillä niiden geenivariantit eivät kuuluneet sen tunnistusalueeseen. Amplidiag® CarbaR+MCR -testillä tunnistettiin 22 eri karbapenemaasia tuottavasta enterobakteerikannasta 21 geeniä. Kahdesta kannasta testillä ei saatu tuloksia. CPE 19 ei tuntemattomasta syystä kasvanut, joten se ei päässyt PCR-ajoihin asti. Testi ei myöskään tuntemattomasta syystä tunnistanut CPE 21 GES -geeniä, vaikka se oli mukana kahdessa eri PCR-ajossa. Koska testi kuitenkin tunnisti GES -geenin CPE 20 kannasta on mahdollista, että CPE 21 kannan kohdalla negatiivinen on virheellinen tulos. Näin ollen väärää negatiivista tulosta voidaan tämän otannan perusteella pitää mahdollisena.

7 POHDINTA

Tämän opinnäytetyön tarkoituksena oli verrata Amplidiag® CarbaR+MCR -testiä sekä Seegene Allplex™ Entero-DR -testiä, jota Paavo Hannus oli käyttänyt omassa Pro gradu -tutkielmassaan. Jotta opinnäytetyömme tulokset olisivat vertailukelpoisia, vakioimme omat käytäntömme siten että noudatimme Hannuksen käytäntöjä. Tämän vuoksi käytimme samaa BioRad CFX96™ Real-Time PCR-laitetta, samoja Terveysten ja hyvinvoinninlaitoksen tarjoamia CPE -kantoja ja samoja mikrobien kasvatusmenetelmiä ja työvaiheita. Tavoitteena oli selvittää tunnistaako käyttämämme Amplidiag® CarbaR+MCR -testi samoja CPE -geenejä, kuin Hannuksen käyttämä Seegene Allplex™ Entero-DR -testi. Halusimme myös selvittää löytääkö käyttämämme testi, joitain muita CPE -geenivariantteja, joita Hannuksen käyttämä testi ei ollut löytänyt. Testit tunnistivat osittain samoja geenejä, mutta ne erosivat mcr -geenien ja VRE -geenien tunnistuksessa.

Eettisistä näkökulmista katsottuna opinnäytetyö on kirjoitettu hyvää kirjoitustapaa noudattaen ja siinä on käytetty luotettavia lähteitä. Kokeellisessa osassa käytetyt potilasnäytteet on käsitelty täysin anonyymisti. Jokainen työvaihe on suoritettu tarkasti ja huolellisesti, jotta opinnäytetyön tuloksien oikeellisuudesta voitiin varmistua. Koska opinnäytetyötä tehtiin samanaikaisesti kuin lähteenä käyttämämme Hannuksen Pro Gradu -tutkielmaa, on Hannuksen kanssa tehty salassapitosopimus. Tässä sopimuksessa on määritelty oikeutemme käyttää julkaisematonta materiaalia lähdemateriaalina. Tämä sopimus raukesi Hannuksen Pro Gradu -tutkielman julkaisemisen myötä.

Kokeellisen osuuden tuloksista havaittiin, että molemmat testit tunnistavat samat karbapenemaasia tuottavat geenivariantit. Tuloksissa ei ollut eroavaisuuksia ja ne olivat yhteneväiset. Amplidiag® CarbaR+ MCR -testi ei tunnistanut THL:n kannoista CPE 21:tä joka oli GES -kanta, toisen THL:n GES-kannan CPE 20 -kannan testi kuitenkin tunnisti, joten se miksi CPE 21 jäi negatiiviseksi kahdessa testijossa on tuntematon ja näin ollen väärän negatiivinen tulos on mahdollinen. Testin luotettavuus tulee varmistaa, mikäli testi otetaan käyttöön diagnostisissa tarkoituksissa. Amplidiag® CarbaR+MCR -testi ei ole tällä hetkellä käytössä Fimlab Laboratoriot Oy:n kliinisessä diagnostiikassa.

Koska emme ole aikaisemmin käyttäneet PCR-laitetta tai muita välineitä, joita mikrobiologian laboratoriossa oli käytössä, työtapamme eivät olleet sillä tasolla, että olisimme kyenneet käytetyssä ajassa ja testimäärien puitteissa saamaan riittävästi tuloksia. Osa PCR-ajoista eivät onnistuneet toivotulla tavalla, sillä näytteidensä käsittelyssä tapahtui todennäköisesti meistä johtuva pipetointi- tai sekoitusvirhe. Näistä käytännön virheistä johtuen emme voineet täysin poissulkea väärien negatiivisten ja positiivisten tuloksien mahdollisuutta, koska emme saaneet riittävästi tuloksia CPE -negatiivisista potilasnäytteistä. Näin ollen emme voi varmentaa täysin testin antamien tuloksien luotettavuutta. Jatkotutkimuksena voisi olla Amplidiag® Carba+MCR -testin verifiointi käyttöohjeissa mainituilla eri näyttemateriaaleilla, sekä sulkea mahdolliset virheelliset positiiviset ja negatiiviset tulokset pois kasvattamalla tutkittavien näytteiden määrää.

Tämän opinnäytetyön aihe oli mielenkiintoinen sekä ajankohtainen, mutta meille tuntematon ja koemme oppineemme prosessin aikana paljon. Teoriapohjalta saimme kattavasti kartutettua tietoaamme karbapeneemi- ja kolistiiniresistenssistä. Molempien esiintyvyys Suomessa on suhteellisen vähäistä ja näin ollen tietoaakaan niistä ei ole yhtä hyvin saatavilla kuten esimerkiksi MRSA:sta tai ESBL:stä, jotka ovat yleisempiä ja laajemmin tunnettuja. Koska teimme kokeellisen osan aikana käytännön työtavoissa joitakin virheitä, jouduimme ratkaisemaan, kuinka saamme työtavoistamme toimivia ja sujuvia, jotta saamme luotettavia tuloksia. Kehityimme pipetoimaan tarkasti hyvin pieniä tilavuuksia sekä sekoittamaan reaktioseokset homogeenisiksi kuoppalevyn kuopissa, jotka ovat erittäin oleellisia PCR-ajon onnistumiseksi. Työskentelimme myös puhdastilassa, joka oli aivan uutta. Opimme myös toimimaan ja pukeutumaan aseptisesti oikein sekä pudistamaan puhdastilan niin, ettei meidän toiminnastamme koidu kontaminaatiovaaraa.

Opinnäytetyö toimii hyvänä pohjamateriaalina, mikäli Amplidiag® CarbaR + MCR -testi joskus verifioidaan käyttöön tai testille tehdään jatkotutkimuksia. Opinnäytetyömme aihe on erittäin ajankohtainen, sillä antibioottiresistenssi on maailmanlaajuinen sekä kasvava ongelma. Opinnäytetyömme tarjoaakin ajankohtaista tietoa karbapeneemi- ja kolistiiniresistenssin esiintyvyydestä sekä niiden kliinisestä merkityksestä.

LÄHTEET

Aghapour, Z., Gholizadeh, P., Ganbarov, K., Bialvaei, A.Z., Mahmood, S.S., Tanomand, A., Yousefi, M., Asgharzadeh, M., Yousefi, B. & Kafil, H.S. 2019. Molecular mechanisms related to colistin resistance in Enterobacteriaceae. *Infection and Drug Resistance* vol. 12. 965-975.

BioRad. N.d. What is Real-Time PCR (qPCR)?. n.d. Luettu. 26.3.2020. <https://www.bio-rad.com/en-fi/applications-technologies/what-real-time-pcr-qpcr?ID=LUSO4W8UU#1>

Campbell, M., Farrell, S. & McDougal, O. 2016. *Biochemistry*. 9th edition. Boston: Cengage Learning.

Caniaux, I., van Belkum, A., Zambardi, G., Poirel, L. & Gros, M. F. 2016. MCR: modern colistin resistance. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* 36, 415-420 (2017).

Carroll, L.M., Gaballa, A., Guldemann, C., Sullivan G., Henderson, L.O. & Wiedmann, M. 2019. Identification of Novel Mobilized Colistin Resistance Gene *mcr-9* in a Multidrug-Resistant, Colistin-Susceptible *Salmonella enterica* Serotype Typhimurium Isolate. *mBio* May 2019, 10 (3).

Codjoe, F.S & Donkor, E.S. 2018. Carbapenem Resistance: A review. *Medical sciences* 2018, 6 (1).

Espy, M. J., Uhl, J. R., Sloan, L. M., Buckwalter, S. P., Jones, M. F., Vetter, E. A., Yao, J. D. C., Wengenack, N. L., Rosenblatt, J. E., Cockerill, F. R. 3rd, & Smith, T. F. (2006). Real-time PCR in clinical microbiology: applications for routine laboratory testing. *Clinical microbiology reviews*, 19 (1), 165–256.

European centre for disease prevention and control (ECDC). 2016. Plasmid-mediated colistin resistance in Enterobacteriaceae. Julkaistu 13.6.2016. Luettu 23.4.2020. <https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/media/en/publications/Publications/enterobacteriaceae-risk-assessment-diseases-caused-by-anti-microbial-resistant-microorganisms-europe-june-2016.pdf>

European centre for disease prevention and control (ECDC). 2019a. Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae -second update. Julkaistu 26.9.2019. Luettu 22.4.2020. <https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/carbapenem-resistant-enterobacteriaceae-risk-assessment-rev-2.pdf>

European centre for disease prevention and control (ECDC). 2019b. Surveillance of antimicrobial resistance in Europe 2018. Julkaistu 10/2019. Luettu 22.4.2020. <https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/surveillance-antimicrobial-resistance-Europe-2018.pdf>

Gariyban, L. & Avashia, N. 2013. Polymerase chain reaction. *The Journal of investigative dermatology* 133 (3), 1-4.

Gröndahl-Yli-Hannuksela, K., Lönnqvist, E., Kallonen, T., Lindholm, L., Jalava, J., Rantakokko-Jalava, K. & Vuopio, J. 2018. The first human report of mobile colistin resistance gene, *mcr-1*, in Finland. *Journal of pathology, Microbiology and immunology. APMIS* 125; 413-417.

Heikkilä, T. 2014. Tilastollinen tutkimus. Edita Publishing Oy.

Hirsjärvi, S., Remes, P. & Sajavaara, P. 2018. Tutki ja kirjoita. 22. painos. Kustannusosakeyhtiö Tammi. Helsinki.

Jalava, J., Österblad, M., Hakanen, A., Rissanen, A-M., Kirveskari, J. & Vaara, M. 2011. Ulkomailta saapuu vaikeasti hoidettavia infektioita – gramnegatiivisten sauvabakteerien resistenssi uhkaa. *Lääkärilehti* 18/2011, vsk 66. 1477-1482.

James, G. 2010. PCR basics. Teoksessa: Schuller, M., Sloots, T., James, G., Halliday, C. & Carter, I. PCR for Clinical Microbiology. An Australian and international perspective. Springer.

Keränen, T. 2018. Suomessa löydettiin kolistiiniantibiootille vastustuskykyinen bakteerikanta. *Lääkärilehti*. Julkaistu 7.5.2018. Luettu 1.5.2020.

<https://www.laakarilehti.fi/ajassa/ajankohtaista/suomessa-loydettiin-kolistiini-antibiootille-vastuskykyinen-bakteerikanta/>

Kluytmans, J. 2017. Plasmid-encoded colistin resistance: *mcr*-one, two, three and counting. *Euro Surveill* 22 (31).

Kolho, E., Lyytikäinen, O. & Jalava, J. 2020. Terveiden ja hyvinvoinnin laitos. Ohje moniresistenttien mikrobien tartunnantorjunnasta. Luettu 22.4.2020.

http://www.julkari.fi/bitstream/handle/10024/139220/THL%20OHJ_2_2020_17.2.2020.pdf?sequence=4&isAllowed=y

Litrup, E., Kiil, K., Hammerum, A., Roer, L., Nielsen, E. & Torpdahl, M. 2017. Plasmid-borne colistin resistance gene *mcr-3* in *Salmonella* isolates from human infections, Denmark, 2009-17. *Euro Surveill*. 22 (31).

Mobidiag. 2018. Amlidiag® CarbaR+MCR User Manual. Document version 2-1. Julkaistu 09/2018.

Seegene. 2018a. Allplex™ Entero-DR Assay V1.1. (4 & 14) 04/2018.

Seegene. 2018b. Allplex™ Entero-DR Assay. Simultaneous detection and identification of 8 antibiotic resistance genes using multiplex Real-time PCR.

Terveiden ja hyvinvoinnin laitos. 2019a. CPE. Päivitetty 28.11.2019. Luettu 14.5.2020. <https://thl.fi/fi/web/infektiotaudit-ja-rokotukset/taudit-ja-torjunta/taudit-ja-taudinaiheuttajat-a-o/cpe>

Terveyden ja hyvinvoinnin laitos. 2019b. Ohje moniresistenttien mikrobien diagnostiikasta. Toteaminen, resistanssimekanismit ja kantajuusseulonnat. Luettu 22.4.2020. http://www.julkari.fi/bitstream/handle/10024/139220/THL%20OHJ_2_2020_17.2.2020.pdf?sequence=4&isAllowed=y&fbclid=IwAR0mZDhTKHMHCAh6eJLnsk-X4yWNG-nNgn3FSAjLsUIQslWe9SNW84Lnu_2U

Terveyden ja Hyvinvoinninlaitos. 2019c. Työpäperi 24/2019. Yhteenveto mikrobilääkeresistenssin torjunnan kansallisen toimintaohjelman (2017-2021) edistymisestä. Luettu 23.4.2020. https://www.julkari.fi/bitstream/handle/10024/138534/URN_ISBN_978-952-343-387-8.pdf?sequence=1&isAllowed=y

Terveyden ja hyvinvoinnin laitos. 2020. Lisätietoa karbapeneemiresistenssistä. Päivitetty 9.3.2020. Luettu 14.5.2020. <https://thl.fi/fi/web/infektiotaudit-ja-rokotukset/taudit-ja-torjunta/taudit-ja-taudinaiheuttajat-a-o/cpe/lisatietoa-karbapeneemiresistenssista>

Vilka, H. 2007. Tutki ja mittaa – *Määrällisen tutkimuksen perusteet*. Kustannusosakeyhtiö Tammi. Helsinki.

von Wintersdoeff, C., Wolffs, P. van Niekerk, J., Beuken, E., van Alphen, L., Stobberingh, E., Lashof, A., Hoebe, C., Savelkoul, P & Penders, J. 2016. Detection of the plasmid-mediated colistin-resistance gene *mcr-1* in faecal metagenomes of Dutch travellers. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 71 (21).

Wang, R., van Dorp, L., Shaw, L.P., Bradley, P., Wang, Q., Wang, X., Jin, L., Zhang, Q., Liu, Y., Rieux, A., Dorai-Schneiders, T., Weinert, L.A., Iqbal, Z., Didelot, X., Wang, H. & Balloux, F. 2018. The global distribution and spread of the mobilized colistin resistance gene *mcr-1*. *Nature Communications* 9, Article number 1179 (2018).

World Health Organization (WHO). 2018. Global Antimicrobial Resistance Surveillance System (GLASS). The detection and reporting of colistin resistance. Julkaistu 12/2018. Luettu 23.4.2020. <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/277175/WHO-WSI-AMR-2018.4-eng.pdf>