

Opinnäytetyö (AMK)

Bioanalytikkokoulutus

NBIOAS14

2017

Elena Ahola

# SELEKTIIVISTEN VILJELYMALJOJEN TESTAUS KARBAPENEEMIRESIS- TENTTIEN BAKTEERIEIN SEULONNASSA

– CHROMagar™ mSuperCARBA™- ja Brilliance  
CRE -viljelymaljojen vertailu kliinisessä käytössä

Elena Ahola

# SELEKTIIVISTEN VILJELYMALJOJEN TESTAUS KARBAPENEEMIRESISTENTTIEN BAKTEERIEN SEULONNASSA

- CHROMagar™mSuperCARBA™- ja Brilliance CRE -viljelymaljojen vertailu  
kliinisessä käytössä

Bakteerin karbapeneemiresistenssillä tarkoitetaan bakteerin vastustuskykyä beetalaktaameihin kuuluvia antibiootteja, karbapeneemeja vastaan. Sairaalahygieenisesti tärkein karbapeneemiresistenssin mekanismi on bakteerien karbapenemaasien, eli karbapeneemeja pilkkovien entsyymien tuotanto. Karbapeneemiresistenssi on Suomessa vielä melko harvinainen, mutta sitä raportoidaan maailmalla lisääntyvissä määrin. Karbapenemaaseja tuottavien bakteerikantojen seulontaan soveltuvin menetelmä on viljely selektiiviselle viljelymaljalle, eli maljalle, jolla kykenevät kasvamaan vain tietyt, kyseisellä maljalla seulottavat bakteerikannat.

Tämän opinnäytetyön tarkoituksena oli testata karbapenemaaseja tuottavien bakteerien seulontaan tarkoitettua CHROMagarin valmistamaa CHROMagar™mSuperCARBA™ -viljelymaljaa ja verrata sitä vastaavaan, Oxoidin valmistamaan Brilliance CRE -maljaan. Työssä selvitettiin maljojen selektiivisyyttä ja herkkyyttä, eli miten hyvin seulontamaljat pystyvät estämään muiden kuin seulottavien bakteerikantojen kasvun ja miten hyvin seulottavat kannat kasvoivat maljoilla. Opinnäytetyön tavoitteena oli selvittää, soveltuuko CHROMagar™mSuperCARBA™ -viljelymalja Brilliance CRE-maljan korvaavaksi tuotteeksi klinisen mikrobiologian laboratoriossa.

Seulontamaljojen testauksessa käytettiin 33:a ennalta tunnettua karbapenemaaseja tuottavaa kontrollikantaa sekä noin kolmen viikon aikana Tyks-Sapa-liikelaitoksen klinisen mikrobiologian laboratorioon saapuvia ResGNS-Vi -potilasnäytteitä. Kontrollikannoilla oli tarkoitus vertailla maljojen herkkyyttä ja selektiivisyyttä, potilasnäytteillä puolestaan lähinnä selektiivisyyttä. Tulosten perusteella pääteltiin, että kumpikaan testattavista maljoista ei yksin riitä havaitsemaan kaiken tyyppisiä karbapenemaaseja tuottavia bakteerikantoja.

Opinnäytetyön tulokset voivat toimia klinisen mikrobiologian laboratoriossa apuna uutta seulontamaljaa valittaessa. Laboratoriossa suoritetaan testauksia vielä muillakin kaupallisilla karbapeneemiresistenttien bakteerikantojen seulontaan tarkoitetuilla viljelymaljoilla ennen päätöksen tekoa. Koska yhden maljan herkkyys ei välttämättä riitä havaitsemaan kaikkia mahdollisia karbapenemaaseja tuottavia bakteerikantoja, voi kahden maljan käyttäminen seulonnassa olla tarpeellista.

## ASIASANAT:

Antibioottiresistenssi, karbapeneemiresistenssi, karbapenemaasi, selektiivinen viljelymalja

BACHELOR'S THESIS | ABSTRACT

TURKU UNIVERSITY OF APPLIED SCIENCES

Biomedical Laboratory Science

2017 | 32 pages + 2 attachments

Elena Ahola

# EVALUATION OF SELECTIVE AGAR PLATES USED FOR SCREENING OF CARBAPENEM-RESISTANT BACTERIA

- Comparing CHROMagar™mSuperCARBA™- and Brilliance CRE -agar plates in clinical use

Carbapenem-resistant bacteria have the ability to resist beta-lactam antibiotics called carbapenems. The most important mechanism for carbapenem resistance is the produce of enzymes that are able to break down carbapenems, carbapenemases. Resistance to carbapenems is relatively uncommon in Finland, but is constantly increasing in other countries around the world. The most suitable way of screening carbapenemase producing bacteria is inoculation to a selective growth medium that prevents the growth of any carbapenem susceptible bacteria. Selective agar plates are mostly used in Finland.

The purpose of this thesis was to evaluate CHROMagar™mSuperCARBA™, an agar plate used for screening of carbapenem-resistant bacteria, and compare it to a similar agar plate called Brilliance CRE agar. The sensitivity and selectivity of the two agar plates were compared, sensitivity meaning the ability of the agar plates to grow carbapenemase producing bacteria and selectivity meaning the ability of the plates to prevent the growth of any other bacteria. The aim of this study was to find out if the CHROMagar™mSuperCARBA™ is suitable to replace Brilliance CRE in a clinical microbiology laboratory.

33 different carbapenem producing bacterial strains as well as patient samples were used for testing the sensitivity and selectivity of the two agar plates. The bacterial strains were used for testing both sensitivity and selectivity while the patient samples were mainly used for testing the selectivity. Based on the results it was found out that neither of the agar plates tested was not able to detect all types of carbapenem producing bacteria.

The results of this thesis can be used when choosing a new selective agar plate for the clinical microbiology laboratory. Further tests are conducted in the laboratory with a couple of different commercial agar plates before the decision is made. Since the sensitivity of one agar plate was not enough to detect all types of carbapenem producing bacteria, the use of two different media might be useful.

## KEYWORDS:

Antibiotic resistance, carbapenem resistance, carbapenemase, selective agar plate

# SISÄLTÖ

<b>1 JOHDANTO</b>	<b>6</b>
<b>2 ANTIBIOOTTIRESISTENSSI</b>	<b>7</b>
2.1 Beetalaktamaasit	8
2.2 Enterobakteerien antibioottiresistenssi	8
<b>3 KARBAPENEEMIRESISTENSSI</b>	<b>10</b>
3.1 Karbapenemaasit	10
3.2 Karbapenemaaseja tuottavien enterobakteerien esiintyminen Suomessa	11
3.3 Karbapenemaaseja tuottavien enterobakteerien seulonta	11
<b>4 SELEKTIIVISET VILJELYMALJAT</b>	<b>13</b>
4.1 CHROMagar™mSuperCARBA™	13
4.2 Brilliance CRE Agar	14
<b>5 OPINNÄYTETYÖN TARKOITUS, TAVOITE JA TEHTÄVÄT</b>	<b>16</b>
<b>6 OPINNÄYTETYÖN KÄYTÄNNÖN TOTEUTUS</b>	<b>17</b>
6.1 Tutkimusaineisto	17
6.2 Tilat, välineet ja laitteet	19
6.3 Seulontamaljojen herkkyuden ja selektiivisyyden testaus kontrollikannoilla	19
6.4 Seulontamaljojen selektiivisyyden testaus potilasnäytteillä	21
6.5 Opinnäytetyön metodologiset lähtökohdat	21
6.6 Opinnäytetyön eettiset näkökohdat	22
<b>7 TUTKIMUKSEN TULOKSET JA NIIDEN TARKASTELU</b>	<b>23</b>
7.1 Kontrollikannat	23
7.2 Potilasnäytteet	26
7.3 Lopputulos	26
<b>8 POHDINTA</b>	<b>29</b>
<b>LÄHTEET</b>	<b>31</b>

## LIITTEET

Liite 1. Taulukko 4. Tutkimuksessa käytetyt kontrollikannat.

Liite 2. Taulukko 5. Pesäkkeiden määrä tutkimuksessa käytetyillä seulontamaljoilla.

## KUVIOT

Kuvio 1. Yhden kontrollikannan laimennossarja. 21

## TAULUKOT

Taulukko 1. Beetalaktamaasien luokittelu. (FiRe-standardi, liite 5) 8

Taulukko 2. Valmistajan ilmoittamat bakteeripesäkkeiden värit  
CHROMagar™mSuperCARBA™-viljelymaljalla (CHROMagar 2017). 14

Taulukko 3. Valmistajan ilmoittamat bakteeripesäkkeiden värit Brilliance CRE -  
viljelymaljalla (Oxoid 2017). 15

Taulukko 4. Tutkimuksessa käytetyt kontrollikannat. 17

Taulukko 5. Pesäkkeiden määrä tutkimuksessa käytetyillä seulontamaljoilla. 23

Taulukko 6. MALDI-TOF -laitteella varmistetut ORI-maljoilla kasvaneet morfologialtaan  
eroavat pesäkkeet. 25

# 1 JOHDANTO

Karbapeneemeille resistenttien sauvabakteereiden yleistyminen aiheuttaa huolta maailmanlaajuisesti. Tähän ryhmään kuuluvat erityisesti kliinisesti tärkeät Enterobacteriaceae-heimon lajit, kuten *Escherichia coli* ja *Klebsiella pneumoniae* sekä non-fermentatiivisia sauvoja, kuten *Pseudomonas aeruginosa* ja *Acinetobacter baumannii*. (THL 2017.) Beetalaktaameihin kuuluvilla antibiooteilla, etenkin karbapeneemeilla, on merkittävä rooli vakavien, gramnegatiivisten sauvabakteerien aiheuttamien infektioiden hoidossa. Tästä syystä karbapeneemiresistenssin kehittyminen ja yleistyminen maailmalla on merkittävä huolenaihe. (Lutgring ym. 2016.)

Suomessa karbapenemaasia tuottavat enterobakteerit ovat vielä melko harvinaisia ja karbapeneemiresistenssiä tavataan useimmiten ulkomaisissa sairaaloissa oleskeleilta potilailta (Jalava 2016). Harvinaisuudestaan huolimatta karbapeneemiresistenssi on varteenotettava uhka myös Suomessa ja resistenttejä kantoja on tavattu vuoden 2009 jälkeen lisääntyvässä määrin (Vuopio 2017). Karbapeneemiresistenttien bakteerien seulontaan soveltuvin menetelmä on bakteeriviljely selektiiviselle elatusaineelle. Paras näyttemateriaali on ulostenäyte tai peräsuolesta otettu pyyhkäisynäyte. (NordicAST 2017.)

Tämän opinnäytetyön tarkoituksena on testata karbapenemaaseja tuottavien bakteerien seulontaan tarkoitettua CHROMagar™mSuperCARBA™-viljelymaljaa (CHROMagar, Ranska, Pariisi) ja verrata sitä vastaavaan, Oxoidin valmistamaan Brilliance CRE -maljaan (Oxoid, UK). Työssä selvitetään maljojen selektiivisyyttä ja herkkyyttä, eli miten hyvin seulontamaljat pystyvät estämään muiden kuin seulottavien bakteerikantojen kasvun ja miten hyvin seulottavat kannat kasvavat maljalla. Opinnäytetyön tavoitteena on selvittää, soveltuuko CHROMagar™mSuperCARBA™ -viljelymalja Brilliance CRE-maljan korvaavaksi tuotteeksi kliinisen mikrobiologian laboratoriossa.

## 2 ANTIBIOOTTIRESISTENSSI

Antibiootteja käytetään bakteeri-infektioiden hoidossa. Niillä voidaan infektioiden parantamistarkoituksessa tappaa bakteereita tai ehkäistä niiden kasvua ja leviämistä ihmisten ja eläinten elimistössä sekä kasveissa. Antibiootti ei ole käsitteenä sama kuin mikrobi-lääke, sillä jälkimmäinen pitää sisällään myös virusten, sienien ja arkkeliöiden aiheuttamien infektioiden hoidossa käytetyt lääkeaineet. (Lumio 2016.)

Kun bakteereja vastaan suunnatut antibiootit eivät enää vaikuta niiden kasvuun ja elämiseen, bakteereista on tullut resistenttejä kyseisille antibiooteille (ECDC 2017). Antibioottiresistenssi kehittyi useimmiten ajan kuluessa bakteerisolun geneettisten muutosten kautta ja on bakteereille luonnollinen ilmiö. Liiallinen ja vääränlainen antibioottien käyttö kuitenkin kiihdyttää tätä prosessia, luoden antibioottiresistenttiydestä vakavan ongelman. Bakteerien kyky vastustaa antibiootteja kuuluu nykyään tärkeimpien globaalien yhteiskunnallisten uhkien joukkoon. (WHO 2017.) Kamppailu antibioottiresistenssiä vastaan perustuu antibioottien ja muiden mikrobilääkkeiden käytön vähentämiseen sekä toimenpiteisiin, kuten rokotukset ja eristyskäytännöt, joilla ehkäistään bakteerikantojen leviämistä (Huovinen 2016).

Antibioottiresistenssi voi olla luonnollinen tai hankittu. Luonnollisessa resistenssissä on kyse bakteerilajille ominaisesta ilmiöstä, jolloin resistenssissä eri antibiootteja kohtaan esiintyy runsaasti vaihtelua. Esimerkiksi osa gramnegatiivisista bakteerilajeista on luonnostaan resistenttejä penisilliineille, kun taas grampositiiviset lajit ovat sille herkkiä. Luonnollinen resistenssi huomioidaan aina antibioottihoitoa suunniteltaessa. Hankitulla resistenssillä puolestaan tarkoitetaan tapauksia, jolloin antibiooteille luonnostaan herkät bakteerilajit muuttuvat resistenteiksi. Tällainen resistenssi on joko kromosomaalisten geenien muutoksien tai siirtyvien geenien aiheuttamaa ja perustuu useisiin eri mekanismeihin. Bakteerien jakautuessa resistenssimekanismi siirtyy uusiin bakteereihin. (Huovinen & Vaara 2011.)

Bakteerien antibioottiresistenssi voi perustua useisiin erilaisiin mekanismeihin. Bakteerit voivat esimerkiksi muunnella antibiootin vaikutuskohtia, jolloin antibiootti ei enää kykene sitoutumaan niihin. Myös kohteena olevan entsyymin ylituotanto, soluseinän tai ulkokalvon läpäisemättömyys ja antibiootin pumppaaminen ulos bakteerisolusta kuuluvat edellä mainittuihin resistenssimekanismeihin. Kliinisesti tärkein resistenssi perustuu kuitenkin bakteerien kykyyn inaktivoida antibiootti, joka tapahtuu yleensä antibioottiin sitoutumalla

tai sitä modifioimalla. Bakteerien beetalaktamaasientsyymien tuotanto on tästä yksi esimerkki. (Huovinen & Vaara 2011.)

## 2.1 Beetalaktamaasit

Beetalaktamaasit ovat gramnegatiivisten sauvabakteerien tuottamia entsyymejä, joilla on kyky hajottaa beetalaktaamiryhmän antibiootteja, kuten esimerkiksi penisilliinejä, kefalosporiineja ja karbapeneemeja. Beetalaktaamiryhmän antibiooteilla on rakenteessaan beetalaktaamirengas, jonka beetalaktamaaseja tuottavat bakteerit kykenevät avaamaan, eivätkä beetalaktaamiryhmän antibiootit täten tehoa näihin bakteereihin. (Queenan & Bush 2007.) Yksinkertaisin tapa luokitella beetalaktamaaseja on jakaa ne neljään eri ryhmään (A-D) niiden toisistaan poikkeavien aminohappojärjestysten perusteella. Ryhmien A, C ja D beetalaktamaasit pilkkovat beetalaktaamirengasta niiden aktiivisessa kohdassa olevan seriiniaminohapon avulla. B-ryhmän beetalaktamaasit puolestaan ovat metallobeetalaktamaaseja, jotka hyödyntävät aktiivisen kohtansa sinkkiä beetalaktamien hydrolysoinnissa. (Bush & Jacoby 2009.) Beetalaktamaasien luokittelu on esitetty taulukossa 1.

Taulukko 1. Beetalaktamaasien luokittelu. (FiRe-standardi, liite 5)

Luokka	Entsymin aktiivinen kohta	Esimerkkejä
A	Seriini	TEM-1, SHV-1, KPC, useimmat ESBL:t, ml. CTX-M
B	Sinkki	Metallobeetalaktamaasit: VIM, IMP, SPM
C	Seriini	AmpC
D	Seriini	OXA

## 2.2 Enterobakteerien antibioottiresistenssi

Enterobakteereihin, eli Enterobacteriaceae-heimoon, kuuluu laaja valikoima erilaisia gramnegatiivisia sauvabakteereita, jotka aiheuttavat monia erilaisia infektoita. Tärkeimpiä enterobakteereita ovat *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Shigella* ja *Yersinia*. Myös esimerkiksi *Klebsiella*-, *Proteus*-, *Citrobacter* ja *Enterobacter*-lajit kuuluvat Enterobacteriaceae-heimon bakteereihin. (Delost 2015.) Kaikki Enterobacteriaceae-heimon lajit ovat



kasvuominaisuuksiltaan sekä rakenteeltaan samankaltaisia ja useimmat niistä kuuluvat elimistön normaaliflooraan. Esimerkiksi edellä mainitut *Klebsiella*-, *Enterobacter*- ja *Proteus*-lajit aiheuttavat harvoin infektiota perusterveillä henkilöillä, mutta ovat kuitenkin merkittäviä sairaalainfektioiden aiheuttajia. Vaikeisiin infektioiden liittyy endotoksiinisin riski, joka johtuu enterobakteerien ulkomembraanin sisältämästä endotoksiinista. (Siitonen & Vaara 2011.)

Enterobakteerit omaavat tehokkaan ulkomembraanin, jonka ansiosta niillä on luonnollinen resistenssi monia antibiootteja vastaan. Ulkokalvon pinta on hydrofiilinen, jolloin hydrofobiset antibiootit, kuten erytromysiini ja klindamysiini eivät pääse kalvon läpi. Enterobakteerien ulkokalvo hidastaa myös muiden antibioottien, esimerkiksi beetalaktamien läpäisevyyttä, mutta kannan ollessa herkkä beetalaktaameille kykenevät nämä silti pääsemään kalvon läpi vaihtelevalla tahdilla. Myös hankittu antibioottiresistenssi on enterobakteereilla mahdollinen ja lääkehoidon valitsemista varten suositellaankin bakteerin antibioottiherkkyden määrittämistä. Enterobakteerien tärkein beetalaktaamiresistenssin mekanismi on plasmidiperäiset beetalaktamaasit. Kromosominulkoiset resistenssitekijät tuottavat laajaspektrisiä beetalaktamaaseja, joista yleisin on TEM-1. Bakteerin plasmidissa voi olla resistenssigeenejä samanaikaisesti useampia antibiootteja kohtaan, jolloin kyseistä kantaa kutsutaan moniresistentiksi. (Huovinen & Vaara 2011.)

### 3 KARBAPENEEMIRESISTENSSI

Karbapeneemit ovat beetalaktaameihin kuuluva antibioottien ryhmä, johon kuuluvat muun muassa imipeneemi ja meropeneemi (Järvinen ym. 2011). Karbapeneemiresistenssi voi syntyä useilla eri tavoilla, joista sairaalahygieenisesti tärkein on karbapeneemaasien, eli karbapeneemeja hajottavien entsyymien tuotanto. Myös muutokset bakteerisolun ulkokalvon proteiineissa ja erilaisten solupumppujen aktivoituminen yhdessä muiden entsyymien kanssa, jotka hajottavat beetalaktaamiryhmän antibiootteja, voivat aiheuttaa karbapeneemiresistenssiä. (THL 2017.) Karbapeneemeja on yleisesti pidetty viimeisenä keinona moniresistenttien enterobakteerien hoidossa ja karbapeneemaasia tuottavien kantojen lisääntyminen aiheuttaakin huolta maailmanlaajuisesti (Huovinen & Vaara 2011).

#### 3.1 Karbapeneemaasit

Karbapeneemaasit ovat beetalaktamaaseja, joilla on monipuolisia hydrolysoivia ominaisuuksia. Ne ovat entsyymejä, joilla on kyky avata beetalaktaameihin kuuluvien antibioottien beetalaktaamirenkaita, täten hajottaen esimerkiksi penisilliinejä, kefalosporiineja ja karbapeneemeja. (Queenan & Bush 2007.) Karbapeneemaasien kyky hajottaa beetalaktaamiryhmän antibiootteja vaihtelee, mutta yleisesti ottaen voidaan todeta, että karbapeneemaaseja tuottavilla bakteereilla on kyky vastustaa kaikkien beetalaktaamiryhmän antibioottien vaikutusta (Vuopio 2017). Karbapeneemaaseja tuottavia enterobakteerilajeja kutsutaan CPE-bakteereiksi (Carbapenemase producing enterobacteriaceae), mutta myös lyhennettä CRE (Carbapenem-resistant enterobacteriaceae) voidaan käyttää.

Karbapeneemaasit kuuluvat ryhmien A, B ja D beetalaktamaaseihin. Ryhmän A beetalaktamaaseihin kuuluvat muun muassa IMI-, NCM- ja KPC- tyyppin karbapeneemaasit. B-ryhmään kuuluu puolestaan IMP-, VIM- ja SMP-tyypin ja D-ryhmään OXA-tyypin karbapeneemaaseja. (Queenan & Bush 2007.) Yleisimmät karbapeneemaasit ovat tyyppiä KPC, VIM, IMP, NDM ja OXA-48 (Nordmann ym. 2012).

### 3.2 Karbapenemaaseja tuottavien enterobakteerien esiintyminen Suomessa

Gramnegatiivisten sauvabakteerien karbapeneemiresistenssiä tavataan maailmalla lisääntyvässä määrin. Karbapenemaasia tuottavat kannat ovat aiheuttaneet laajoja sairaalaepidemiaa ympäri maailman, mutta pohjoismaissa ne ovat toistaiseksi melko harvinaisia. Resistenttejä kantoja tavataan Suomessa lähinnä ulkomaisista sairaaloista siirrettyiltä potilailta. (THL 2017.) Suomen ensimmäinen karbapenemaasia tuottava enterobakteerikanta todettiin vuonna 2009 (Vuopio 2017).

Viimeisimmän Finres raportin mukaan bakteerikantojen herkkyys karbapeneemeja kohtaan on Suomessa edelleen hyvä ja resistentit kannat ovat harvinaisia. Esimerkiksi vuonna 2015 löydetyistä akinetobakteerikannoista vain alle prosentti oli karbapeneemille resistenttejä ja THL:n lähetetyistä 30:stä *Klebsiella pneumoniae* kannasta 17 oli karbapenemaasigeenin omaavia. Sekä *Escherichia coli*- että *Enterobacter cloacae*-kantojen herkkyystilanne oli Suomessa maailmanlaajuisesti verrattuna erinomainen. (Jalava 2016.)

### 3.3 Karbapenemaaseja tuottavien enterobakteerien seulonta

Karbapeneemiresistenssien bakteerien kantajuuden seulontaan parhaiten soveltuva näyte on ulostenäyte tai vanutikulla peräsuolesta otettu sivelynäyte. Seulonta perustuu bakteerin alentuneen karbapeneemiherkkyyden osoittamiseen ja seulontamenetelmänä toimii useimmiten kaupalliset tai laboratorion itse valmistamat antibiootteja sisältävät selektiiviset elatusaineet. Antibiootteja sisältävien kromogeenisten viljelymaljojen on tutkimuksissa havaittu olevan seulontamenetelmistä käytännöllisin. Myös antibioottikiekot elatusaineilla, jotka eivät sisällä antibiootteja, ovat laajasti käytössä karbapeneemiresistenttien enterobakteerien seulonnassa, mutta menetelmä ei pärjää vertailussa selektiivisille elatusaineille. (NordicAST 2017.)

Kannat, joiden karbapeneemi-MIC, eli pienin bakteerien kasvun estävä lääkepitoisuus (Minimum inhibitory concentration), on alhainen, eivät välttämättä kasva kaikilla kromogeenisillä viljelymaljoilla. Etenkin OXA-48 ja sitä läheisesti muistuttavia entsyymejä tuottavien kantojen toteamisen on havaittu olevan haastavaa ja niiden seulonnassa voidaan tarvita juuri OXA-48 karbapenemaaseja tuottaville bakteereille suunnattua seulontamaljaa. (NordicAST 2017.)

Bakteerikasvun esiintyessä selektiivisellä elatusaineella, määritetään bakteerin herkkyys meropeneemille. Mikäli herkkyys on alentunut, karbapenemaasigeeni varmistetaan vielä geenimonistusmenetelmää käyttäen. Karbapeneemaasia tuottavien enterobakteerien kantajuus voidaan määrittää myös suoraan potilasnäytteestä ilman elatusaineelle viljelystä, mutta tätä ei Suomessa yleisesti suositella. Syynä on se, että karbapeneemaasia tuottavien enterobakteerien seulonnassa käytettyjen geenimonistusmenetelmien toivuudesta maissa, joissa karbapeneemiresistenssin esiintyvyys on vähäistä ei ole saatu vielä tarpeeksi tietoa. (Jalava 2016.)

## 4 SELEKTIIVISET VILJELYMALJAT

Bakteriologiset näytteet viljellään elatusaineille, jotka voivat olla joko kiinteitä tai neste-mäisiä. Viljelymaljat sisältävät kiinteitä tai geelimäisiä, agarilla hydytettyjä ja petrimal-jalle valettuja elatusaineita. Erilaiset maljat sisältävät erilaisia ravintoaineita riippuen tut-kittavien patogeenisten bakteerien kasvuvaatimuksista. Antibiootteja tai muita bakteeri-myrkkyjä lisäämällä viljelymaljalla voidaan etsiä vain tiettyä taudinaiheuttajaa ja samalla estää muiden, ylimääräisten, bakteerien kasvu. Tällaisia maljoja kutsutaan selektiivisiksi viljelymaljoiksi. (Carlson & Koskela 2011.)

CHROMagar™mSuperCARBA™ ja Brilliance CRE -viljelymaljat ovat kromogeenisia, eli väriä muodostavia yhdisteitä sisältäviä viljelymaljoja, jotka on tarkoitettu karbapenee-meja tuottavien bakteerien seulontaan. Molemmat maljat sisältävät antibiootteja, joiden avulla maljoilla tulisi kasvaa vain seulottavat, karbapenemaaseja tuottavat bakterikan-nat. Kromogeenien ansiosta eri bakteerilajien pesäkkeet värjäytyvät maljoilla eri värein, mikä helpottaa bakteerien tunnistamista. (CHROMagar 2017; Oxoid 2017.)

### 4.1 CHROMagar™mSuperCARBA™

CHROMagar™mSuperCARBA™ -viljelymalja on kromogeeninen, karbapeneemiresis-tenttien bakteerien seulontaan tarkoitettu selektiivinen viljelymalja, joka voidaan valmis-taa laboratoriossa CHROMagarin tarjoamista ainesosista. Valmistaja, CHROMagar, lu-paa maljan herkkyden olevan erinomainen useimpien karbapenemaasityyppien havait-semisessa. Jopa heikkoja karbapenemaaseja, kuten OXA-48 ja sitä läheisesti muistut-tavia entsyymejä tuottavien kantojen havaitseminen on valmistajan mukaan helppoa. Kromogeenien ansiosta maljalla kasvavat kannat voidaan helposti tunnistaa pesäkkeen värin perusteella. Bakteeripesäkkeiden värjäytyvyys on esitetty taulukossa 2. CHROMa-gar™mSuperCARBA™-viljelymaljan luvataan olevan erittäin selektiivinen ja sen kerro-taan inhiboivan beetalaktaameille herkkien kantojen lisäksi myös esimerkiksi ESBL-kan-tojen kasvuun. Maljalle suositeltavat näytteet ovat ulostenäyte, virtsanäyte tai vanutikulla peräsuolesta otettu sivelynäyte. (CHROMagar 2017.)

Taulukko 2. Valmistajan ilmoittamat bakteeripesäkkeiden värit CHROMagar™mSuper-CARBA™-viljelymaljalla (CHROMagar 2017).

Karbapenemaasia tuottava laji	Pesäkkeen väri maljalla
<i>E. coli</i>	Pinkki/punertava
<i>Klebsiella, Enterobacter, Citrobacter</i>	Metallinhohto sininen
<i>Pseudomonas</i>	Vaalea/kerman värinen, läpikuultava
<i>Acinetobacter</i>	Vaalea/kerman värinen, läpikuultamaton
Karbapeneemeille herkät kannat	Ei kasvua

Amar ym. (2017) suorittivat tutkimuksen, jossa testattiin CHROMagar™mSuper-CARBA™-viljelymaljaa ja verrattiin sitä kahteen muuhun karbapenemaaseja tuottavien enterobakteerien seulontaan tarkoitettuun viljelymaljaan (CHROMagar™-KPC ja Mac-Conkey). Tulokset osoittivat, että CHROMagar™mSuperCARBA™ oli maljoista herkin, etenkin OXA-48 tyyppisten karbapenemaasien tunnistamisessa. Kaikkien kolmen testatun maljan selektiivisyys oli melko alhainen. CHROMagar™mSuperCARBA™ jäi selektiivisyydessä toiseksi.

#### 4.2 Brilliance CRE Agar

Brilliance CRE Agar on Oxoidin valmistama karbapeneemeille resistenttien bakteerikantojen seulontaan tarkoitettu viljelymalja, joka on CHROMagar™mSuperCARBA™:n tavoin kromogeeninen. Maljat toimitetaan laboratorioihin valmiina ja niiden pohjaväri on vaalean turkoosi. Brilliance CRE-maljalla voidaan seuloa tavallisimpia karbapenemaaseja tuottavia bakteerikantoja, kuten *E. coli*-kantoja sekä *Klebsiella*-, *Enterobacter*-, *Serratia*- ja *Citrobacter* -ryhmän (KESC) kantoja. Bakteeripesäkkeiden värjäytyvyys maljalla on esitetty taulukossa 3. Suoraan ulostetta tai verta sisältävistä näytteistä viljellyillä maljoilla saattaa esiintyä paikallisia värimuutoksia, joita ei tule sekoittaa bakteeripesäkkeen aiheuttamaan kromogeeniseen reaktioon. (Oxoid 2017.)

Taulukko 3. Valmistajan ilmoittamat bakteeripesäkkeiden värit Brilliance CRE -viljelymaljalla (Oxoid 2017).

Karbapenemaasia tuottava laji	Pesäkkeen väri maljalla
<i>E. coli</i>	Vaalea/hyvin vaalea pinkki
KESC-ryhmän bakteeri	Sininen
<i>Proteus, Morganella, Providencia</i>	Keltaisenruskea, ruskea halo
<i>Acinetobacter</i> +muut	Valkoinen/vaalea

Braccon ym. (2013) tutkimuksessa pyrittiin arvioimaan Brilliance CRE-maljan soveltuvuutta kliiniseen käyttöön. Tutkijat halusivat selvittää maljan herkkyyttä karbapenemaasia tuottavien enterobakteerien seulonnassa. Karbapeneemeille herkät kannat eivät kasvaneet maljoilla ja resistenttien kantojen herkkyys oli hyvä. Tulokset osoittivat, että Brilliance CRE on hyvä elatusaine sekä karbapenemaaseja tuottaville enterobakteereille että non-fermentativisille bakteereille.

Brilliance CRE-maljaa ja SUPERCARBA-elatusainetta sisältävää maljaa on vertailtu aiemmissa tutkimuksissa. Girlich ym. (2012) suorittivat tutkimuksen, jossa verrattiin silloin uutta SUPERCARBA-elatusainetta kahteen jo pidemmän aikaa käytössä olleeseen elatusmaljaan. Vertailukohteina toimivat CHROMagar KPC ja Brilliance CRE maljat. Tutkimuksessa käytettiin 142:ta enterobakteerikantaa, joista 131 oli karbapenemaaseja tuottavia. Jokaista kantaa viljeltiin kolmelle maljalle, jonka jälkeen maljoja inkuboitiiin vuorokausi. Tulokset osoittivat, että SUPERCARBA-elatusainetta sisältävän maljan herkkyys oli kolmesta maljasta paras (96,5%), Brilliance CRE –maljan herkkyys toiseksi paras (76,3%) ja CHROMagar KPC:n huonoin (43%). Elatusaineiden selektiivisyydet noudattivat samaa kaavaa. SUPERCARBA -malja oli siis tutkimuksen mukaan Brilliance CRE-maljaa soveltuvampi karbapeneemiresistenttien enterobakteerien seulontaan.

## 5 OPINNÄYTETYÖN TARKOITUS, TAVOITE JA TEHTÄVÄT

Tämän opinnäytetyön tarkoituksena on testata karbapeneemiresistenttien bakteerien seulontaan tarkoitettua CHROMagar™mSuperCARBA™ -viljelymaljaa ja verrata sitä vastaavaan, Brilliance CRE, maljaan. Työssä selvitetään maljojen selektiivisyyttä ja herkkyyttä, eli miten hyvin seulontamaljat pystyvät estämään muiden kuin seulottavien bakteerikantojen kasvun ja miten hyvin seulottavat kannat kasvavat maljalla.

CHROMagar™mSuperCARBA™ -seulontamalja on mahdollisesti tulossa Tyks-Sapa -liikelaitoksen klinisen mikrobiologian laboratorion käyttöön Brilliance CRE -maljan korvaavana tuotteena. Tämän opinnäytetyön tavoitteena on selvittää, soveltuuko uusi malja kliniseen käyttöön vanhan tilalle. Tutkimustehtävät ovat seuraavat:

- CHROMagar™mSuperCARBA™- ja Brilliance CRE -maljojen selektiivisyyden ja herkkyiden vertailu.
- CHROMagar™mSuperCARBA™- maljan soveltuvuuden arvioiminen Tyks-Sapa -liikelaitoksen klinisen mikrobiologian laboratorion tarpeisiin.



## 6 OPINNÄYTETYÖN KÄYTÄNNÖN TOTEUTUS

Opinnäytetyön aihe saatiin Tyks-Sapa-liikelaitoksen klinisen mikrobiologian laboratorion osasto 938:lta tammikuussa 2017. Tutkimuslupa työlle saatiin maaliskuussa 2017 ja käytännön työ aloitettiin huhtikuun lopussa. Työ valmistui toukokuussa 2017. Tutkimus suoritettiin Tyks-Sapa-liikelaitoksen klinisen mikrobiologian laboratoriossa.

### 6.1 Tutkimusaineisto

Tutkimusaineisto koostui Tyks-Sapa-liikelaitoksen klinisen mikrobiologian kantakokoelmaan talletetuista kontrollikannoista sekä laboratorioon noin viikon aikana tulleista potilasnäytteistä. Kontrollikannoilla ja potilasnäytteillä oli tarkoitus testata maljojen herkkyyttä ja selektiivisyyttä, eli sitä, miten hyvin seulottavat kannat kasvavat maljoilla ja miten hyvin seulontamaljat pystyvät estämään muiden kuin seulottavien bakteerikantojen kasvun.

Tutkimuksessa käytettiin 33:a ennalta tunnettua kontrollikantaa, joista 28 oli karbapeneemiresistenttejä ja 5 karbapenemaasien tuoton suhteen negatiivisia. Kontrollikantojen avulla testattiin ja vertailtiin maljojen herkkyyttä ja selektiivisyyttä. Suurin osa käytetyistä kontrollikannoista kuuluu NordicAST:n (Nordic Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) CPE-kokoelmaan, ja niiden tarkka beetalaktamaasiprofiili on tiedossa. Kannoista kolme olivat vanhoja laaduntarkkailunäytteitä vuosilta 2014-2016 ja myös niiden tuottamien karbapenemaasien tyypit tiedettiin. Käytetyt kannat ja niiden tuottamat beetalaktamaasit on esitetty taulukossa 4.

Taulukko 4. Tutkimuksessa käytetyt kontrollikannat.

Numero	Laji	Beetalaktamaasiprofiili
LT-15	<i>K. pneumoniae</i>	<b>OXA-48</b> , CTX-M-15, SHV-76, TEM-1B
LT-16	<i>K. pneumoniae</i>	<b>NDM-1</b> , <b>OXA-181</b>
LT-17	<i>E. cloacae complex</i>	<b>IMI-9</b>
LT-18	<i>K. pneumoniae</i>	<b>KPC-2</b> , SHV-11
LT-19	<i>K. pneumoniae</i>	<b>NDM-1</b> , CMY-6, CTX-m-15, SHV-11, OXA-1

(jatkuu)

Taulukko 4 (jatkuu)

LT-20	<i>K. pneumoniae</i>	<b>OXA-48</b> ; LEN-16
LT-21	<i>E. coli</i>	<b>VIM-29</b> , CMY-4, CTX-M-15, OXA-1
LT-22	<i>P. mirabilis</i>	<b>NDM-1</b> , CMY-16, OXA-10
LT-23	<i>E. coli</i>	<b>NDM-5</b> , SHV-12, TEM-1B
LT-24	<i>K. pneumoniae</i>	<b>OXA-48</b> ; LEN-16
LT-25	<i>Citrobacter sp.</i>	<b>NDM-1</b>
LT-26	<i>K. pneumoniae</i>	CTX-M gr. 1
LT-27	<i>E. coli</i>	CMY
LT-28	<i>K. pneumoniae</i>	<b>OXA-48</b> , SHV-11
LT-29	<i>K. pneumoniae</i>	CTX-M gr. 1
LT-30	<i>E. cloacae complex</i>	Negatiivinen
LT-31	<i>E. coli</i>	<b>OXA-48</b> , CTX-M-24, TEM-1B
LT-32	<i>E. coli</i>	CTX-M gr. 1
LT-33	<i>E. cloacae complex</i>	<b>KPC-2</b> , CTX-M-15
LT-34	<i>P. mirabilis</i>	Negatiivinen
LT-35	<i>E. aerogenes</i>	Negatiivinen
LT-36	<i>Providencia rettgeri</i>	Negatiivinen
LT-37	<i>E. coli</i>	<b>OXA-181</b> , CMY-2, CTX-M-15, TEM-1B, OXA-1
LT-38	<i>E. coli</i>	<b>IMP-26</b>
LT-39	<i>K. pneumoniae</i>	<b>OXA-48</b> ; LEN-16
LT-40	<i>K. pneumoniae</i>	<b>OXA-162</b> , CTX-M-15, SHV-28/-100, TEM-1B
LT-41	<i>K. pneumoniae</i>	<b>VIM-1</b> , SHV-39/LEN-11
LT-42	<i>E. cloacae complex</i>	<b>KPC-2</b>
LT-43	<i>K. pneumoniae</i>	<b>VIM-27</b> , SHV-11
LT-44	<i>E. coli</i>	Negatiivinen
14LT00089	<i>K. pneumoniae</i>	OXA-48
16LT00202	<i>E. coli</i>	OXA-48, ESBL
16LT00047	<i>K. pneumoniae</i>	KPC

Lisäksi käytettiin osastolle 938 noin viikon aikana saapuneita ResGNS-Vi -potilasnäytteitä. ResGNS-viljelyllä seulotaan poikkeavan resistenttejä gramnegatiivisia sauvabak-

teereja ja viljelyt tehdään normaalisti sekä ESBL-maljalle että tällä hetkellä käytössä olevalle Brilliance CRE Agar-maljalle. Näytemateriaalina toimii ulostenäyte tai pumpulitikulla otettu sivelynäyte rektumista, haavasta, kyljistä, kainaloista tai nivusista. (Tyks-Sapa-liikelaitos 2016.) Työssä käytetyistä potilasnäytteistä oli tehty diagnostiset viljelyt, joiden tulos oli vastattu ennen näytteiden tutkimuskäyttöön ottamista. Koska karbapeneemi-resistenssi on Suomessa yhä harvinainen, potilasnäytteillä haluttiin testata lähinnä viljelymaljojen selektiivisyyttä. Potilasnäytteissä on usein mukana näytteenottokohdan normaaliflooraa ja muita karbapenemaasien tuoton suhteen negatiivisia bakteereita, joiden ei kuuluisi kasvaa testattavilla seulontamaljoilla.

## 6.2 Tilat, välineet ja laitteet

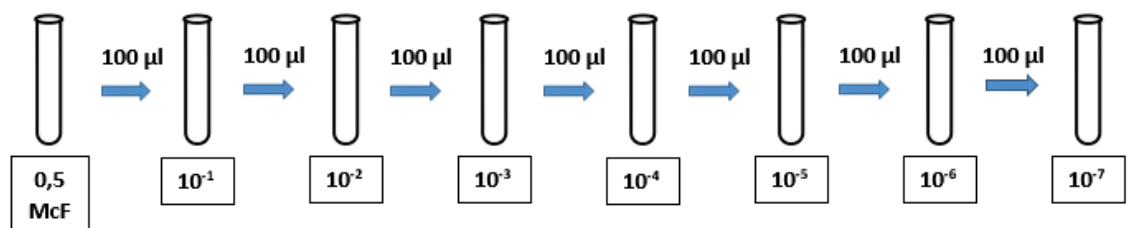
Tutkimus suoritettiin kokonaisuudessaan Tyks-Sapa-liikelaitoksen klinisen mikrobiologian laboratorion tiloissa, josta saatiin myös työssä tarvittavat välineet ja materiaalit. CHROMagar™mSuperCARBA™-viljelymaljat valmistettiin elatusaineosastolla muutama päivä ennen tutkimuksen alkua. Pakastettujen kontrollikantojen viljely sekä laimennussarjojen teko ja laimennoksien maljoille viljely suoritettiin laminaarivirtauskaapissa. Nestemäisiä bakteerisuspensioita ja laimennoksia käsitellessä syntyy helposti aerosoleja, joiden leviäminen työn tekijän päälle ja muualle laboratorion tiloihin haluttiin estää. Viljelymaljojen inkuboinnissa käytettiin laboratorion +35 °C inkubaattoria.

## 6.3 Seulontamaljojen herkkyyden ja selektiivisyyden testaus kontrollikannoilla

Työ aloitettiin etsimällä kontrollikannat pakkasesta ja viljelemällä ne CHROMagar Orientation-maljoille, eli ORI-maljoille. Kullekin kannalle merkattiin oma malja. Jäistä bakteerisuspensiota siirrettiin viljelysauvan avulla maljalle ja suspensio viljeltiin hajotustekniikalla. Maljoja inkuboitii +35 °C vuorokauden ajan, jonka jälkeen tarkistettiin, kasvavatko kannat puhtaina. Osalla maljoista huomattiin kasvavan useampia kuin yhden näköisiä bakteeripesäkkeitä. Näiden maljojen erinäköisistä bakteeripesäkkeistä tehtiin puhtasviljelyt sekä ORI-maljalle että Brilliance CRE-maljalle. Yhdelle maljalle viljeltiin erikseen kaikkia samalla alkuperäisellä ORI-maljalla kasvaneita erinäköisiä pesäkkeitä. Brilliance CRE-maljan toivottiin auttavan karbapenemaaseja tuottavien bakteerikantojen erottamisessa mahdollisia kontaminaatioita aiheuttaneista bakteereista. Kasvatuksen jälkeen

tarkistettiin, olivatko erinäköisenä kasvavat bakteeripesäkkeet kuitenkin samaa bakteerilajia. Kaikki kasvoivat hyvin Brilliance CRE-maljalla. Ainoastaan yhden kannan (LT-21) kahdesta erinäköisestä pesäkkeestä tehdyt puhtasviljelyt eivät kasvaneet Brilliance CRE-maljalla. ORI-maljalla kasvaneiden pesäkkeiden ulkonäön perusteella pesäkkeet voitiin kuitenkin todeta saman bakteerilajin edustajaksi. Kolmella maljalla pesäkkeitä ei voitu silmin todeta samaksi bakteeriksi, joten tunnistamisessa käytettiin apuna MALDI-TOF (Matrix assisted laser desorption ionization-time of flight) massaspektrometria. Maljoilla kasvaneet pesäkkeet osoittautuivat samaksi lajiksi, kuin muut samalla maljalla olevat pesäkkeet. Testausvaiheessa selvästi erinäköisistä bakteeripesäkkeistä tehtiin vielä varmuuden vuoksi omat laimennokset, jotka viljeltiin eri maljoille, jotta voitiin varmistua, ettei niiden kasvukyvyssä seulontamaljoilla ole eroja.

Jokaisesta kontrollikannasta valmistettiin 0,5 McFarlandin vahvuinen bakteerisuspensio, josta tehtiin maljoille viljeltävät kolme eri laimennosta ( $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$  ja  $10^{-7}$ ). 0,5 McFarlandin suspension valmistaminen tapahtui siirtämällä ORI-maljalta bakteeripesäkettä viljelysauvan avulla 1ml:aan 0,9 %:sta NaCl:a. Suspension vahvuus arvioitiin silmämääräisesti. Laimennokset tehtiin laimennossarjan avulla valmiisiin 1 ml:n NaCl-putkiin. Käytettävissä olevan pipetin pipetointitilavuus oli 100-1000  $\mu$ l, joten laimennokset tehtiin sen mukaan. Laimennossarja on esitetty kokonaisuudessaan kuviossa 1. Sekaannusten välttämiseksi bakteerikantojen laimennokset ja viljelyt tehtiin yksi kerrallaan. Kun noin puolet kontrollikannoista oli viljelty, 1 ml:n NaCl-putket loppuivat ja siirryttiin käyttämään putkia, joissa NaCl:a oli 2 ml. Laimennossarjat tehtiin samalla periaatteella, mutta bakteerisuspensiota siirrettiin 100  $\mu$ l:n sijaan 200  $\mu$ l.



Kuvio 1. Yhden kontrollikannan laimennossarja.

Laimennoksia  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$  ja  $10^{-7}$  siirrettiin 100  $\mu$ l sekä CHROMagar™mSuperCARBA™-että Brilliance CRE -maljoille. Suspensiot levitettiin maljoille kulmasauvaa apuna käyttäen. Suspensioiden levittäminen CHROMagar™mSuperCARBA™-maljalle oli selkeästi helpompaa, kuin Brilliance CRE-maljalle; CHROMagar™mSuperCARBA™-maljalla suspensio liukui helposti eri puolille maljaa, kun taas Brilliance CRE:llä suspensio alkoi ikään

kuin imeytyä agariin ja sen levittäminen oli hankalampaa. Maljoja inkuboitiin vuorokausi, jonka jälkeen maljoilla kasvavien bakteeripesäkkeiden määrä laskettiin. Maljoilla, joilla pesäkkeitä oli yli 200 laskeminen ei ollut enää tarkkaa, vaan määrä ilmoitettiin >200 tai >300.

#### 6.4 Seulontamaljojen selektiivisyyden testaus potilasnäytteillä

Potilasnäytteiden viljely tapahtui diagnostisen viljelyn suorittamisen aikana klinisen mikrobiologian laboratorion henkilökunnan toimesta. Jokainen ResGNS-Vi -näyte viljeltiin Brilliance ESBL-, Brilliance CRE- sekä CHROMagar™mSuperCARBA™-viljelymaljoille, jonka jälkeen niitä kasvatettiin +35 °C kaksi vuorokautta. Toisen vuorokauden jälkeen laboratorion henkilökunta antoi lopulliset vastaukset tutkimuksen tuloksista maljoilla esiintyvän bakteerikasvun perusteella. Brilliance CRE- ja CHROMagar™mSuper-CARBA™ -maljat säästettiin opinnäytetyön tekijälle tarkasteltaviksi ja maljoilla mahdollisesti kasvavien pesäkkeiden määrä laskettiin. Samalla tarkasteltiin, kasvoiko maljoilla muita kuin karbapenemaaseja tuottavia bakteerikantoja.

#### 6.5 Opinnäytetyön metodologiset lähtökohdat

Kvantitatiivisessa eli lähestymistavaltaan määrällisessä tutkimuksessa keskeistä on käsitteiden määrittely sekä aiempien teorioiden ja tutkimusten hyväksi käyttäminen johtopäätösten tekemisessä. Kvantitatiivisen tutkimuksen aineiston keruussa tärkeää on sen soveltuvuus numeeriseen mittaamiseen. Myös analyysimenetelmä on tarkasti määritelty. Tulokset esitetään useimmiten taulukoiden ja tilastojen avulla, joiden avulla muodostetaan lopulliset päätelmät tutkimuksen tuloksista. (Hirsjärvi ym. 2009.) Tämä opinnäytetyö voidaan luokitella semikvantitatiiviseksi, sillä työssä on kvantitatiivisen tutkimuksen piirteitä, mutta kaikki kriteerit eivät täyty. Työssä oli tarkoitus laskea kahdella eri elatusaineella kasvavien bakteeripesäkkeiden määrä mahdollisimman tarkasti, mutta erittäin runsaskasvuisilla maljoilla silmämääräinen pesäkkeiden laskeminen ei ollut täysin tarkkaa. Bakteerisuspensioiden ja laimennosten tekoakaan ei voida kutsua tarkaksi, sillä suspensioiden vahvuus arvioitiin ainoastaan silmämääräisesti. Tulokset esitettiin taulukkomuodossa, mutta tilastollisia analyyseja tai syvempiä laskelmia ei tulosten perusteella tehty. Analyysimenetelmänä toimi bakteeriviljely erilaisille selektiivisille elatusaineille.

## 6.6 Opinnäytetyön eettiset näkökohdat

Eettisesti hyvän tutkimuksen edellytyksenä on hyvän tieteellisen käytännön noudattaminen tutkimuksenteossa. Hyvään tieteelliseen käytäntöön kuuluu muun muassa rehellisyys, huolellisuus ja tarkkuus tutkimustyössä, tutkimustulosten todenmukainen raportointi sekä muiden tutkijoiden työn ja saavutusten asianmukainen huomiointi. (Tutkimuseettinen neuvottelukunta 2012; Hirsjärvi ym. 2009.) Tämä tutkimus suoritettiin hyvää tieteellistä käytäntöä noudattaen. Tulokset esitettiin vääristelemättä ja arvioitiin niiden vaatimalla kriittisyydellä. Plagiointia vältettiin ja toisten työlle annettiin asianmukainen arvo.

Tässä opinnäytetyössä käytettiin vanhoja potilasnäytteitä, joista tehtävien tutkimusten tulokset oli vastattu ennen tutkimuskäyttöön ottamista. Lisäksi käytettiin vanhoja positiivisia kontrollikantoja. Potilaiden henkilötietoja ei työssä tarvittu, vaan näytteet oli nimetty laboratorion työjonojen mukaan juoksevalla numeroinnilla. Potilaille ei koitunut tutkimuksesta ylimääräistä vaivaa. Kyseessä ei ollut ihmiseen kohdistuva lääketieteellinen tutkimus, joten potilailta ei täytynyt pyytää erillistä suostumusta, eikä heitä täytynyt informoida tutkimuksesta. (Laki tieteellisestä tutkimuksesta 488/199, 6 §.) Opinnäytetyölle haettiin ja saatiin tutkimuslupa Turun kliiniseltä tutkimuskeskukselta, Turku CRC:ltä.

## 7 TUTKIMUKSEN TULOKSET JA NIIDEN TARKASTELO

### 7.1 Kontrollikannat

Puolet seulontamaljoille laimennoksina viljellyistä 28:sta karbapenemaaseja tuottavista kontrollikannoista kasvoi hyvin molemmilla maljoilla. Vain neljän (~14 %) karbapenemaaseja tuottavan kannan kohdalla yksikään kolmesta laimennoksesta ei kasvanut kummallakaan maljalla. Kuusi (~21 %) bakteerikantaa kasvoi ainoastaan CHROMagar™mSuperCARBA™-maljalla ja neljä (~14 %) ainoastaan Brilliance CRE-maljalla. Yksikään viidestä karbapenemaasien tuoton suhteen negatiivisesta kontrollikannasta ei kasvanut kummallakaan testattavista seulontamaljoista. Maljoilla kasvaneiden pesäkkeiden määrät eri pitoisista laimennoksista viljellyillä maljoilla on esitetty taulukossa 5.

Taulukko 5. Pesäkkeiden määrä tutkimuksessa käytetyillä seulontamaljoilla.

Numero	Pesäkkeiden määrä seulontamaljoilla					
	CHROMagar™mSuperCARBA™			Brilliance CRE		
	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-7</sup>	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-7</sup>
LT-15	126	41	1	122	22	-
LT-16	136	15	-	128	15	-
LT-17	-	-	-	-	-	-
LT-18	>200	35	4	>200	27	2
LT-19*	59	24	2	81	11	2
LT-20	-	-	-	77	3	1
LT-21	>200	49	20	-	-	-
LT-22	-	-	-	-	-	-
LT-23	>300	60	36	-	-	-
LT-24	-	-	-	107	18	1
LT-25	>300	62	25	>200	67	31
LT-26*	>200	31	1	145	27	1
LT-27	70	10	-	106	17	-
LT-28	-	-	-	-	-	-
LT-29	>300	107	34	>200	101	29
LT-30	-	-	-	-	-	-

(jatkuu)

Taulukko 5 (jatkuu)

LT-31	12	2	-	-	-	-
LT-32	-	-	-	1	-	-
LT-33	>300	60	23	>300	105	52
LT-34	-	-	-	-	-	-
LT-35	-	-	-	-	-	-
LT-36	-	-	-	-	-	-
LT-37	141	45	18	163	58	23
LT-38	-	-	-	-	-	-
LT-39*	-	-	-	157	81	10
LT-40	57	5	1	124	17	4
LT-41	28	1	-	102	22	3
LT-42	160	25	3	127	28	3
LT-43	>200	39	5	138	3	3
LT-44	-	-	-	-	-	-
14LT00089	166	20	5	-	-	-
16LT00202	3	-	-	-	-	-
16LT00047	16	3	-	-	-	-

\*Näiden kantojen bakteeripesäkkeissä oli ulkonäöllisiä eroja. Kannoista enemmän taulukossa 6.

Mielenkiintoista oli, että yksikään kontrollikannoista, joiden tuottama beetalaktamaasiyhdistelmä oli OXA-48, LEN-16 (LT-20, LT-24 ja LT-39), eivät kasvaneet CHROMagar™mSuperCARBA™-seulontamaljalla, mutta Brilliance CRE-maljalla kasvua esiintyi jopa pitoisuudeltaan pienimmästä laimennoksesta viljellyillä maljoilla. Moniresistenttien bakteerikantojen laaduntarkkailukierroksella olleet kannat (14LT00089, 16LT00202 ja 16LT00047) puolestaan kasvoivat ainoastaan CHROMagar™mSuperCARBA™-maljalla, vaikkakin kahden kannan kohdalla kasvu oli melko heikkoa.

Bakteeripesäkkeiden määrissä ei ollut huomattavasti eroa tapauksissa, joissa kannoista tehdyt laimennokset kasvoivat hyvin kummallakin testattavista seulontamaljoista. Suurin ero oli kantojen LT-40 ja LT-41 kohdalla Brilliance CRE-maljan eduksi. Kannasta LT-21 tehdyistä laimennoksista yksikään ei kasvanut Brilliance CRE-maljalla, mikä oli odotettavissa aiemmin tehdyn puhtasviljelmän kasvamattomuuden perusteella. CHROMagar™mSuperCARBA™-maljalla LT-21 puolestaan kasvoi runsaana kaikilla kolmesta eri pitoisesta laimennoksesta viljellyillä maljoilla.

Bakteeripesäkkeiden ulkonäkö erosi hieman testattavien seulontamaljojen välillä. Väriin lisäksi myös pesäkkeiden koot vaihtelivat; CHROMagar™mSuperCARBA™-maljalla



kasvat pesäkkeet olivat suurempia ja levinneet laajemmalle alueelle, kuin Brilliance CRE-maljalla kasvatat pesäkkeet. Poikkeuksena tästä oli kuitenkin *E. cloacae* complex (LT-33 ja LT-42), joka kasvoi CHROMagar™mSuperCARBA™-maljalla hyvin pienikokoisena ja hieman suurempipesäkkeisenä Brilliance CRE-maljalla. Viljelyvaiheessa laimennosten levittäminen oli helpompaa CHROMagar™mSuperCARBA™-maljalle kuin Brilliance CRE-maljalle, mikä saattaa selittää eroa bakteeripesäkkeiden levinneisyydessä maljoilla.

Työn alkuvaiheessa MALDI-TOF-laitteella samaksi bakteeriksi todettujen kantojen erinäköisistä pesäkkeistä tehtyjen laimennoksien kasvussa testattavilla maljoilla ei havaittu merkittäviä eroja. Kasvatat pesäkkeet olivat yhä väritykseltään eri näköisiä, mutta kasvun määrä maljoilla oli lähestulkoon sama. Pesäkkeiden määrät ja ulkonäöt näillä rinnakkaisilla maljoilla on esitetty taulukossa 6. Taulukkoon 5, jossa on esitettyä kaikkien kantojen bakteeripesäkkeiden määrä, valittiin ainoastaan LT-19.1, LT-26.1 ja LT-39.1 tulokset, sillä näiden pesäkkeiden ulkonäkö vastasi eniten muiden tässä työssä käytettyjen saman lajin kantojen ulkonäköä.

Taulukko 6. MALDI-TOF -laitteella varmistetut ORI-maljoilla kasvaneet morfologialtaan eroavat pesäkkeet.

Nu- mero	Pesäkkeiden morfologia	Bakteeripesäkkeiden määrä seulontamaljoilla					
		CHROMagar™mSuper- CARBA™			Brilliance CRE		
		10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-7</sup>	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-7</sup>
LT-19.1	Tumma sininen	59	24	2	81	11	2
LT-19.2	Vaaleampi sininen	74	16	4	79	14	2
LT-26.1	Tumma sininen	>200	31	1	145	27	1
LT-26.2	Vaaleampi sininen	>200	38	2	161	34	1
LT-39.1	Tumma sininen, tasaisen pyöreä	-	-	-	157	81	10
LT-39.2	Tumma sininen, levähtänyt pesäke	-	-	-	121	54	6
LT-39.3	Vaaleampi sininen, levähtänyt pesäke	-	-	-	159	80	16

## 7.2 Potilasnäytteet

Potilasnäytteitä viljeltiin testattaville karbapeneemiresistenttien bakteerien seulontaan tarkoitetuille viljelymaljoille yhteensä 133. Näistä suurimman osan kohdalla seulontamaljoilla ei esiintynyt minkäänlaista bakteerikasvua. ESBL positiivisia näytteitä oli useampi, mutta niistäkin suurin osa oli kykenemätön kasvamaan kummallakaan testattavista maljoista. Yhteensä yhdeksällä (~7%) CHROMagar™mSuperCARBA™-viljelymaljalla ja neljällä (~3%) Brilliance CRE-maljalla kasvoi muita kuin karbapeneemiresistenttejä bakteereita.

Yksi ESBL positiivinen, karbapenemaasien tuoton suhteen negatiivinen kanta kasvoi melko hyvin (23 pesäkettä) CHROMagar™mSuperCARBA™-maljalla, mutta ei Brilliance CRE-maljalla. Kolmella Brilliance CRE- ja seitsemällä CHROMagar™mSuperCARBA™-maljalla kasvoi karbapenemaasien tuoton suhteen negatiivisia bakteereita alle viisi pesäkettä per malja. Yhdessä tapauksessa sekä Brilliance CRE -maljalla että CHROMagar™mSuperCARBA™-maljalla esiintyi homekasvua muutaman pesäkkeen verran. Kaikki karbapenemaasien tuoton suhteen negatiivinen kasvu esiintyi kohdassa, johon näytetikku oli koskenut, eikä yksikään bakteeripesäke kasvanut viljelyn hajotusalueella. Pienellä osalla maljoista esiintyi värjäytymistä alueella, johon näytetikku oli koskenut.

Näytteistä vain yksi oli positiivinen karbapenemaasien tuoton suhteen. Tämän näytteen kohdalla bakteerikasvua esiintyi runsaasti sekä CHROMagar™mSuperCARBA™-maljalla että Brilliance CRE-maljalla. Toisin kuin aikaisempien näytteiden kohdalla, positiivisesta näytteestä viljellyillä maljoilla kasvua esiintyi koko viljelyalueella. Karbapenemaasigeeni oli varmistettu laboratorion henkilökunnan toimesta.

## 7.3 Lopputulos

Kontrollikantojen kasvukyvyssä maljoilla oli pieniä eroja. Kolmesta laaduntarkkailunäytteestä yksikään ei kasvanut Brilliance CRE-maljalla, kun taas CHROMagar™mSuperCARBA™-maljalla kasvua esiintyi jonkin verran. Kontrollikannat, joiden tuottama beeta-laktamaasi oli tyyppiä OXA-48, LEN-16, eivät kasvaneet CHROMagar™mSuperCARBA™-maljalla, mutta Brilliance CRE:llä kasvua esiintyi runsaastikin. Lisäksi muutamien kontrollikannan kasvussa oli eroavaisuuksia eri seulontamaljoilla, mutta niistä ei

voida tehdä yleistyksiä pelkän beetalaktamaasistatuksen perusteella. Tulosten perusteella ei myöskään voida selkeästi osoittaa toisen maljoista olevan toista parempi karbapeneemiresistenttien bakteerien havaitsemisessa. CHROMagar™mSuperCARBA™-maljalla kasvoi kaksi kantaa enemmän, kuin Brilliance CRE-maljalla, mutta sekään ei kyennyt havaitsemaan kaikkia karbapenemaaseja tuottavia bakteerikantoja. Negatiivisista kontroleista yksikään ei kasvanut kummallakaan maljoista, mikä osoittaisi maljojen selektiivisyyden olevan hyvä. Eri kantojen kasvukykyä testattavilla seulontamaljoilla ei voida luotettavasti verrata, sillä maljoille viljellyt laimennokset tehtiin bakteerisuspensiosta, jonka vahvuus arvioitiin ainoastaan silmämääräisesti. Tästä syystä laimennosten pitoisuudet eivät välttämättä olleet täysin samat eri kantojen kohdalla.

Kontrollikannoilla saatujen tulosten perusteella näyttäisi siltä, että kumpikaan testattavista seulontamaljoista ei yksin riitä löytämään eri tyyppisiä karbapenemaaseja tuottavia enterobakteereita. Kummankin seulontamaljan herkkyys oli melko hyvä niiden kantojen kohdalla, jotka kykenivät kasvamaan kyseisellä maljalla ja kasvua esiintyi useimmiten jopa pitoisuudeltaan pienimmästä laimennoksesta viljellyillä maljoilla. Yhteensä kymmenen karbapenemaaseja tuottavaa kantaa kasvoi kuitenkin vain toisella testattavista seulontamaljoista ja neljä ei kasvanut kummallakaan. Karbapeneemiresistenttien bakteerien seulonnassa voisi mahdollisesti käyttää kahta eri seulontamaljaa; käytössä voisi olla yksi laajasti beetalaktamaaseja tunnistava malja, jonka lisäksi näytteitä voisi viljellä yleensä vaikeasti havaittavien OXA-48 -beetalaktamaasia tuottavien kantojen havaitsemiseen tarkoitettulle maljalle. Näin tuloksista voitaisiin saada luotettavampia, sillä vaikka yhden maljan kasvatuskyky olisikin olematon, voisivat bakteerikannat mahdollisesti kasvaa paremmin toisella maljalla.

Karbapeneemiresistenssi on Suomessa harvinainen, joten jo ennen potilasnäytteiden viljelyä osattiin olettaa suurimman osan viljellyistä seulontamaljoista olevan täysin negatiivisia karbapenemaaseja tuottavien enterobakteerien suhteen. Potilasnäytteitä viljelemällä haluttiin kuitenkin saada enemmän tietoa maljojen selektiivisyydestä, sillä näytteissä on mahdollisesti mukana paljon näytteenottokohdan normaaliflooraa ja muita karbapenemaasien tuoton suhteen negatiivisia bakteerikantoja, joiden ei kuuluisi kasvaa testattavilla seulontamaljoilla. Potilasnäytteiden viljelytulosten perusteella molempien testattavien maljojen selektiivisyyden voidaan sanoa olevan hyvä, sillä ne pystyivät estämään muiden kuin karbapenemaaseja tuottavien bakteerikantojen kasvun suurimassa osassa tapauksista. Näytteiden joukossa oli ESBL positiivisia näytteitä, joista suurin osa ei myöskään kasvanut kummallakaan testattavista karbapeneemiresistenttien

bakteerien seulontaan tarkoitetuista viljelymajoista. Poikkeuksia oli muutama ja Brilliance CRE-malja osoittautui hieman CHROMagar™mSuperCARBA™-maljaa selektiivisemmäksi. Molemmat seulontamaljat kykenivät havaitsemaan yhdessä näytteessä olleen karbapenemaasien tuoton suhteen positiivisen bakteerikannan.

Tulosten voidaan olettaa olevan luotettavia ja monipuolisia, sillä opinnäytetyössä käytetty tutkimusaineisto oli melko laaja ja kontrollikantojen tuottamat beetalaktamaasiyhdistelmät olivat hyvin erilaisia. Käytettävissä olevia CHROMagar™mSuperCARBA™-maljoja oli yhteensä vain noin 200 kappaletta, jonka vuoksi kontrollikannat viljeltiin testattaville seulontamaljoille vain kerran. Tutkimustulosten luotettavuuden lisäämiseksi tarvittaisiin useampia rinnakkaisia viljelyjä, jotta voidaan varmistua, etteivät saadut tulokset johtuneet sattumasta tai tutkimuksen aikana mahdollisesti tapahtuneista virheistä.

## 8 POHDINTA

Tämän opinnäytetyön tarkoituksena oli testata karbapeneemiresistenttien bakteerien seulontaan tarkoitettua CHROMagar™mSuperCARBA™ -viljelymaljaa ja verrata sitä vastaavaan, Brilliance CRE, maljaan. Tarkoituksena oli vertailla maljojen herkkyyttä ja selektiivisyyttä tunnettujen karbapenemaaseja tuottavien kontrollikantojen sekä Tyks-Sapa-liikelaitoksen klinisen mikrobiologian laboratorioon tulevien potilasnäytteiden avulla. Tulosten perusteella ei voitu selkeästi osoittaa toista seulontamaljaa paremmaksi karbapeneemiresistenttien bakteerikantojen seulonnassa, sillä kummankaan testattavan maljan herkkyys ei riittänyt havaitsemaan kaikkia karbapenemaaseja tuottavia kontrollikantoja. Maljojen selektiivisyys oli potilasnäytteistä tehtyjen viljelyjen perusteella melko hyvä, sillä suurimmalla osalla maljoista ei kasvanut ylimääräisiä, karbapenemaasien tuoton suhteen negatiivisia bakteereja.

Eroa maljojen välillä ei ollut kovinkaan paljon. CHROMagar™mSuperCARBA™ havaitsi kaksi kontrollikantaa enemmän, kuin Brilliance CRE, mutta Brilliance CRE-seulontamaljan selektiivisyys puolestaan osoittautui hieman paremmaksi, kuin CHROMagar™mSuperCARBA™-maljan. Tulokset ovat hieman ristiriidassa Girlichin ym. (2012) tutkimuksen kanssa, jossa SUPERCARBA-elatusainetta sisältävä seulontamalja oli sekä herkempi että selektiivisempi, kuin Brilliance CRE-malja. Tässä tutkimuksessa havaitut eroavaisuudet testattavien maljojen välillä olivat kuitenkin tutkimusaineiston määrään verrattuna hyvin pieniä. Työn semikvantitatiivisen luonteen vuoksi tuloksia ei voi tarkkaan vertailla luonteeltaan kvantitatiivisemmän tutkimuksen tuloksien kanssa.

Opinnäytetyön tavoitteena oli selvittää, soveltuuko CHROMagar™mSuperCARBA™-seulontamalja kliniseen käyttöön Brilliance CRE-maljan tilalle. Tulosten perusteella voitiin todeta, että kumpikaan testattavista maljoista ei yksin riitä kaikkien eri tyyppisten karbapeneemiresistenttien bakteerien löytämiseen. Kahden eri seulontamaljan käyttäminen voisi olla karbapeneemiresistenttien bakteerien seulonnassa hyödyllistä, sillä tällöin karbapenemaaseja tuottavien kantojen havaitseminen olisi mahdollisesti helpompaa ja luotettavampaa. Tämän opinnäytetyön tulokset toivat vahvistusta jo aikaisemmin Tyks-Sapa-liikelaitoksen klinisen mikrobiologian laboratoriossa heränneisiin pohdintoihin kahden seulontamaljan tarpeellisuudesta. Laboratoriossa tullaan testaamaan vielä muitakin kaupallisia karbapeneemiresistenttien bakteerien seulontaan tarkoitettuja viljelymaljoja ennen päätöksen tekemistä.

Tutkimus suoritettiin huolellisuutta noudattaen ja mahdollisia sekaannuksia kaikin tavoin välttämällä. Kontrollikannoista tehtiin laimennokset ja viljelyt yksi kerrallaan ja joka välissä tarkistettiin, että maljoille kirjoitetut numerot täsmäsivät viljeltävän bakteerikannan numeroon. Laimennokset aloitettiin 0,5 McFarlandin vahvuisesta bakteerisuspensiosta, jonka vahvuus arvioitiin silmämääräisesti. Silmämääräisesti arvioimalla ei voitu taata, että jokainen suspensio on täsmälleen yhtä vahva. Samasta suspensiosta tehtyjä laimennoksia kuitenkin pipetoitiin kummallekin testattavasta maljosta ja työssä oli tarkoitus verrata maljojen välistä kasvueroa eikä niinkään kantojen välistä, joten mahdollisilla eroilla suspensioiden vahvuuksissa ei pitäisi olla merkittävää vaikutusta tutkimustuloksiin. Bakteerikantojen väliseen vertailuun pitoisuuserot vaikuttaisivat enemmän.

Tutkimuksissa käytetyillä kontrollikannoilla ja potilasnäytteillä voi olettaa saavan luotettavia ja monipuolisia tuloksia, sillä tutkimusaineisto oli melko laaja ja kontrollikantojen tuottamat karbapenemaasit hyvin erilaisia. CHROMagar™mSuperCARBA™-maljojen vähyyden vuoksi kontrollikannat viljeltiin testattaville seulontamaljoille vain kerran. Tutkimuksen luotettavuuden lisäämiseksi tarvittaisiin useampia rinnakkaisia viljelyjä, jotta saadaan varmistus siitä, etteivät tulokset johtuneet sattumasta tai tutkimuksen aikana mahdollisesti tapahtuneista virheistä. 0,5 McFarlandin suspensioiden tekovaiheessa suspension vahvuuden tarkka mittaaminen toisi myös lisäarvoa tutkimukselle, sillä silloin eri kantojen välisiä kasvueroja voisi luotettavammin verrata

Opinnäytetyö edisti bioanalytikkokoulutuksessa opittuja taitoja klinisen mikrobiologian käytäntöjen suhteen ja antoi tutkimuksen tekijälle lisää varmuutta itsenäiseen laboratoriotyöskentelyyn. Teoriatiedon etsimisen ja kirjoittamisen ansiosta tekijä sai paljon uutta tietoa moniresistenttien bakteerien tilasta ja pystyi soveltamaan aikaisempia teorioita omaan työhönsä. Myös tulosten kriittisessä tarkastelussa saatiin harjoitusta.

Tärkein tähän tutkimukseen liittyvä jatkotutkimusaihe olisi toistaa tutkimus käyttäen useampaa rinnakkaista viljelyä samoista bakteerikannoista. Tutkimuksen voisi suorittaa samalla periaatteella kuin tämäkin tutkimus tehtiin, ainoana erona se, että kontrollikantoja viljellessä kannoista tehtäisiin rinnakkaiset 0,5 McFarlandin vahvuiset suspensiot, joista puolestaan tehtäisiin erilliset laimennossarjat. Tällä tavalla saataisiin enemmän verrattavia tuloksia, joiden ansiosta tutkimuksen luotettavuus paranisi. Mikäli tutkimuksen haluttaisiin olevan enemmän kvantitatiivinen, voisi bakteerisuspensioiden ja laimennosten vahvuudet mitata tarkasti. Tällöin tulosten perusteella voitaisiin arvioimisen sijaan osoittaa erot maljojen selektiivisyydessä ja herkkydessä laskennallisesti ja tulosten luotettavuutta voitaisiin tarkastella numeerisesti.

## LÄHTEET

Amar, M.; Shalom, O. & Adler, A. 2017. Comparative evaluation of a new commercial media, the CROMagar™mSuperCARBA™, for the detection of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. Volume 88, Issue 1, 20-22. Viitattu 29.4.2017. Saatavilla osoitteessa <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0732889317300470>

Bracco, S.; Migliavacca, R.; Pini, P.; Corbo, N.; Nucleo, E.; Brigante, G.; Piazza, A.; Micheletti, P. & Luzzaro, F. 2013. Evaluation of Brilliance CRE Agar for the detection of carbapenem-resistant Gram-negative bacteria. *New Microbiologica* 36, 181-186. Viitattu 16.2.2017. Saatavilla osoitteessa [http://www.newmicrobiologica.org/PUB/allegati\\_pdf/2013/2/181.pdf](http://www.newmicrobiologica.org/PUB/allegati_pdf/2013/2/181.pdf)

Bush, K. & Jacoby, G. 2009. Updated Functional Classification of  $\beta$ -lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 54(3). Viitattu 4.5.2017. Saatavilla osoitteessa <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2825993/>

Carlson, P. & Koskela, M. 2011. Bakteriologian perustekniikat. Teoksessa Hedman, K.; Heikkinen, T.; Huovinen, P.; Järvinen, A.; Meri, S. & Vaara, M. (Toim.). *Mikrobiologia, immunologia ja infektiosairaudet: Infektiosairaudet*. Helsinki: Kustannus oy Duodecim.

CHROMagar www-sivut Viitattu 24.4.2017 www.chromagar.com

Delost, M. 2015. *Introduction to Diagnostic Microbiology for the Laboratory Sciences*. Massachusetts: Jones & Bartlett Learning.

European Centre for Disease Prevention and Control www-sivut. Viitattu 16.2.2017. [www.ecdc.europa.eu/fi](http://www.ecdc.europa.eu/fi)

European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). 2013. EUCAST guidelines for detection of resistance mechanisms and specific resistances of clinical and/or epidemiological importance. Viitattu 24.4.2017 Saatavilla osoitteessa [http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST\\_files/Resistance\\_mechanisms/EUCAST\\_detection\\_of\\_resistance\\_mechanisms\\_v1.0\\_20131211.pdf](http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Resistance_mechanisms/EUCAST_detection_of_resistance_mechanisms_v1.0_20131211.pdf)

Girlich, D.; Poirel, L. & Nordmann, P. 2012. Comparison of the SUPERCARBA, CHROMagar KPC and Brilliance CRE screening media for detection of Enterobacteriaceae with reduced susceptibility to carbapenems. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. Volume 75, issue 2, 214-217. Viitattu 16.2.2017 Saatavilla osoitteessa <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0732889312004300>

Hirsjärvi, S.; Remes, P & Sajavaara, P. 2009. *Tutki ja kirjoita*. 15. uud. p. Helsinki: Tammi.

Huovinen, P. & Vaara, M. 2011. Bakterilääkehoidon perusteet. Teoksessa Hedman, K.; Heikkinen, T.; Huovinen, P.; Järvinen, A.; Meri, S. & Vaara, M. (Toim.). *Mikrobiologia, immunologia ja infektiosairaudet: Infektiosairaudet*. Helsinki: Kustannus oy Duodecim.

Huovinen, P. 2016. *Mikrobilääkkeiden käytön ekologia. Lääkärin käsikirja*. Kustannus Oy Duodecim. Viitattu 24.4.2017

Jalava, J. 2015. *Finres 2015: Bakteerien mikrobilääkeresistenssi Suomessa*. Tampere: Terveyden ja hyvinvoinnin laitos, THL. Viitattu 24.4.2017. Saatavilla osoitteessa [http://www.julkari.fi/bitstream/handle/10024/131299/URN\\_ISBN\\_978-952-302-716-9.pdf?sequence=1](http://www.julkari.fi/bitstream/handle/10024/131299/URN_ISBN_978-952-302-716-9.pdf?sequence=1)

Jalava, J. 2016. *Ohje moniresistenttien bakteerien diagnostiikasta – Toteaminen, resistenssimekanismit ja kantajuusseulonnat*. Turku: Terveyden ja hyvinvoinnin laitos, THL. Viitattu

24.4.2017. Saatavilla osoitteessa [https://www.julkari.fi/bitstream/handle/10024/130258/THL\\_OHJ3\\_2016\\_web.pdf](https://www.julkari.fi/bitstream/handle/10024/130258/THL_OHJ3_2016_web.pdf)

Järvinen, A. Huovinen, P. & Vaara, M. 2011. Beetalaktaamit. Teoksessa Hedman, K.; Heikkinen, T.; Huovinen, P.; Järvinen, A.; Meri, S. & Vaara, M. (Toim.). Mikrobiologia, immunologia ja infektiosairaudet: Infektiosairaudet. Helsinki: Kustannus oy Duodecim.

Laki lääketieteellisestä tutkimuksesta 9.4.1999/488. [www.finlex.fi](http://www.finlex.fi)

Lumio, J. 2016. Antibiootit. Lääkärikirja Duodecim. Viitattu 24.4.2017. Saatavilla osoitteessa [http://www.terveyskirjasto.fi/terveyskirjasto/tk.koti?p\\_artikkeli=dlk01177](http://www.terveyskirjasto.fi/terveyskirjasto/tk.koti?p_artikkeli=dlk01177)

Lutgring, J. & Limbago, B. 2016. The Problem of Carbapenemase-Producing-Carbapenem-Resistant-Enterobacteriaceae Detection. Journal of Clinical Microbiology. Viitattu 22.2.2017. Saatavilla osoitteessa <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26739152>

Nordic Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (NordicAST). 2017. Screening for carbapenemase-producing Enterobacteriaceae (CPE). Viitattu 24.4.2017. Saatavilla osoitteessa [http://www.nordicast.org/d/4288?store\\_referer=true](http://www.nordicast.org/d/4288?store_referer=true)

Nordmann, P.; Gniadkowski, M.; Giske, C.; Poirel, L.; Woodford, N. & Miriagou, V. 2012. Identification and screening of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. CMI – Clinical Microbiology and Infection. Viitattu 22.2.2017. Saatavilla osoitteessa <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22507110>

Oxoid www-sivut Viitattu 24.4.2017 [www.oxid.com](http://www.oxid.com)

Queenan, A. & Bush, K. 2007. Carbapenemases: the Versatile  $\beta$ -Lactamases. Clinical Microbiology Reviews 20(3), 440-458. Viitattu 29.4.2017. Saatavilla osoitteessa <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1932750/>

Siitonen, A. & Vaara, M. 2010. Escherichia, Salmonella, Shigella ja Yersinia. Teoksessa Hedman, K.; Heikkinen, T.; Huovinen, P.; Järvinen, A.; Meri, S. & Vaara, M. (Toim.). Mikrobiologia, immunologia ja infektiosairaudet: Mikrobiologia. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim.

THL:n www-sivut. Viitattu 19.2.2017. [www.thl.fi](http://www.thl.fi)

Tutkimuseettinen neuvottelukunta. 2012. Hyvä tieteellinen käytäntö ja sen loukkausepäilyjen käsitteleminen suomessa. Viitattu 12.3.2017. Saatavilla osoitteessa <http://www.tenk.fi/fi/htk-ohje>

Tyks-Sapa-liikelaitos. 2016. Resistentit gramnegatiiviset sauvabakteerit, viljely, ESBL-viljely. Tyks Mikrobiologia ja genetiikka, laatukäsikirja.

World Health Organization www-sivut. Viitattu 16.2.2017. [www.who.int](http://www.who.int)

Vuopio, J. 2017. Resistentit sairaalabakteerit. Lääkärin käsikirja. Kustannus Oy Duodecim. Viitattu 3.5.2017



## Taulukko 4. Tutkimuksessa käytetyt kontrollikannat.

Numero	Laji	Beetalaktamaasiprofiili
LT-15	<i>K. pneumoniae</i>	<b>OXA-48</b> , CTX-M-15, SHV-76, TEM-1B
LT-16	<i>K. pneumoniae</i>	<b>NDM-1</b> , <b>OXA-181</b>
LT-17	<i>E. cloacae complex</i>	<b>IMI-9</b>
LT-18	<i>K. pneumoniae</i>	<b>KPC-2</b> , SHV-11
LT-19	<i>K. pneumoniae</i>	<b>NDM-1</b> , CMY-6, CTX-m-15, SHV-11, OXA-1
LT-20	<i>K. pneumoniae</i>	<b>OXA-48</b> ; LEN-16
LT-21	<i>E. coli</i>	<b>VIM-29</b> , CMY-4, CTX-M-15, OXA-1
LT-22	<i>P. mirabilis</i>	<b>NDM-1</b> , CMY-16, OXA-10
LT-23	<i>E. coli</i>	<b>NDM-5</b> , SHV-12, TEM-1B
LT-24	<i>K. pneumoniae</i>	<b>OXA-48</b> ; LEN-16
LT-25	<i>Citrobacter sp.</i>	<b>NDM-1</b>
LT-26	<i>K. pneumoniae</i>	CTX-M gr. 1
LT-27	<i>E. coli</i>	CMY
LT-28	<i>K. pneumoniae</i>	<b>OXA-48</b> , SHV-11
LT-29	<i>K. pneumoniae</i>	CTX-M gr. 1
LT-30	<i>E. cloacae complex</i>	Negatiivinen
LT-31	<i>E. coli</i>	<b>OXA-48</b> , CTX-M-24, TEM-1B
LT-32	<i>E. coli</i>	CTX-M gr. 1
LT-33	<i>E. cloacae complex</i>	<b>KPC-2</b> , CTX-M-15
LT-34	<i>P. mirabilis</i>	Negatiivinen
LT-35	<i>E. aerogenes</i>	Negatiivinen
LT-36	<i>Providencia rettgeri</i>	Negatiivinen
LT-37	<i>E. coli</i>	<b>OXA-181</b> , CMY-2, CTX-M-15, TEM-1B, OXA-1
LT-38	<i>E. coli</i>	<b>IMP-26</b>
LT-39	<i>K. pneumoniae</i>	<b>OXA-48</b> ; LEN-16
LT-40	<i>K. pneumoniae</i>	<b>OXA-162</b> , CTX-M-15, SHV-28/-100, TEM-1B
LT-41	<i>K. pneumoniae</i>	<b>VIM-1</b> , SHV-39/LEN-11
LT-42	<i>E. cloacae complex</i>	<b>KPC-2</b>
LT-43	<i>K. pneumoniae</i>	<b>VIM-27</b> , SHV-11
LT-44	<i>E. coli</i>	Negatiivinen
14LT00089	<i>K. pneumoniae</i>	OXA-48
16LT00202	<i>E. coli</i>	OXA-48, ESBL
16LT00047	<i>K. pneumoniae</i>	KPC

## Taulukko 5. Pesäkkeiden määrä tutkimuksessa käytetyillä seulontamaljoilla.

Numero	Pesäkkeiden määrä seulontamaljoilla					
	CHROMagar™m SuperCARBA™			Brilliance CRE		
	10 <sup>5</sup>	10 <sup>6</sup>	10 <sup>7</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>6</sup>	10 <sup>7</sup>
LT-15	126	41	1	122	22	-
LT-16	136	15	-	128	15	-
LT-17	-	-	-	-	-	-
LT-18	>200	35	4	>200	27	2
LT-19*	59	24	2	81	11	2
LT-20	-	-	-	77	3	1
LT-21	>200	49	20	-	-	-
LT-22	-	-	-	-	-	-
LT-23	>300	60	36	-	-	-
LT-24	-	-	-	107	18	1
LT-25	>300	62	25	>200	67	31
LT-26*	>200	31	1	145	27	1
LT-27	70	10	-	106	17	-
LT-28	-	-	-	-	-	-
LT-29	>300	107	34	>200	101	29
LT-30	-	-	-	-	-	-
LT-31	12	2	-	-	-	-
LT-32	-	-	-	1	-	-
LT-33	>300	60	23	>300	105	52
LT-34	-	-	-	-	-	-
LT-35	-	-	-	-	-	-
LT-36	-	-	-	-	-	-
LT-37	141	45	18	163	58	23
LT-38	-	-	-	-	-	-
LT-39*	-	-	-	157	81	10
LT-40	57	5	1	124	17	4
LT-41	28	1	-	102	22	3
LT-42	160	25	3	127	28	3
LT-43	>200	39	5	138	3	3
LT-44	-	-	-	-	-	-
14LT00089	166	20	5	-	-	-
16LT00202	3	-	-	-	-	-
16LT00047	16	3	-	-	-	-

