

Ville Härkönen

SUUN *CAPNOCYTOPHAGA* -LAJIT JA NIIDEN
BEETALAKTAMAASIN TUOTTOKYKY

Syventävien opintojen kirjallinen työ

Kevätlukukausi 2023

Ville Härkönen

SUUN *CAPNOCYTOPHAGA* -LAJIT JA NIIDEN
BEETALAKTAMAASIN TUOTTOKYKY

Hammaslääketieteen laitos

Kevätlukukausi 2023

Vastuhenkilö: Mervi Gürsoy

TURUN YLIOPISTO

Lääketieteellinen tiedekunta, Hammaslääketieteen laitos

HÄRKÖNEN, VILLE: Suun *Capnocytophaga* -lajit ja niiden beetalaktamaasin tuottokyky
Syventävien opintojen kirjallinen työ, 20 s.

Parodontologia

Huhtikuu 2023

Tämä tutkielma koostuu erillisestä kirjallisuuskatsauksesta sekä tutkimusosuudesta. Opinnäytetyössä perehdytään *Capnocytophagan* bakteerilajiperheeseen, β -laktamaasiin ja mikrobilääkeresistenssiyteen. Kirjallisuuskatsauksessa *Capnocytophaga* pyritään käymään perusteellisesti läpi tuoden samalla myös kliinistä näkökulmaa sekä farmakologista oppia mukaan tarkasteluun. Suuria kokonaisuuksia kootaan osin taulukkomuotoon tilanteen hahmottamisen ja kokonaiskuvan muodostamisen helpottamiseksi.

Tutkimusosuudessa oli tarkoituksena kartoittaa raskaudenaikaisten fysiologisten muutosten vaikutusta suuontelon *Capnocytophaga*-lajien määriin ja β -laktamaasia tuottavien isolaattien yleisyyteen. β -laktamaasi on tiettyjen bakteerilajien tuottama entsyymi, joka pilkkoo mm. penisiilliinin ja kefalosporiinien sisältämän proteiinirakenteen, beetalaktaamirenkaan, jolloin ko. mikrobilääke muuttuu tehottomaksi.

Kolmeltakymmeneltä raskaana olevalta naiselta viidellä eri tutkimuskäyntikerralla kerätyistä sylki- ja plakkinäytteistä aiemmin eristettyjä ja säilöttyjä *Capnocytophaga*-isolaatteja valikoitiin tähän tutkimukseen. *Capnocytophaga*-isolaateista (n=691) tehtiin ensin puhdasviljelmät, jonka jälkeen nitrosefiinikiekkotestimenetelmän avulla testattiin niiden β -laktamaasin tuottokykyä ja yleisyyttä.

Tutkimuksemme mukaan *Capnocytophagojen* tuottamaa β -laktamaasia esiintyy laajalti eri yksilöillä ja eri isolaattien välillä on suurta vaihtelua. Raskauden eri vaiheilla ei havaittu merkittävää eroa valittujen isolaattien β -laktamaasin tuotantoon, vaan tämä jakautui raskauden eri vaiheiden kesken verrattain tasaisesti.

Suun mikrobiston beetalaktamaasituottokyvyn kartoitus sekä mikrobilääkeherkkyysmääritykset ovat tärkeitä nyt ja

tulevaisuudessa, sillä mikrobilääkeresistenssiysoingelman
ennustetaan tulevaisuudessa pahenevan entisestään.
Asiasanat: *Capnocytophaga*, β -laktamaasi,
mikrobilääkeresistenssi

SISÄLLYS

1. Johdanto	1
1.1 <i>Capnocytophaga</i>	1
1.1.1 Yleistä	1
1.1.2 Morfologia	1
1.1.3 <i>Capnocytophagan</i> kasvatus	1
1.1.4 <i>Capnocytophaga</i> -lajien tunnistus ja fenotyypit	2
1.1.5 Patogeneesin tutkiminen ja eri lajien virulenssikyky	4
1.1.6 Infektion ehkäisy	5
1.1.7 Antibioottiherkkyys	5
1.1.8 Oikean antibiootin valinta	5
1.1.9 Potilastapauksia	6
1.2 β -laktamaasi	7
1.2.1 Yleistä	7
1.2.2 Geenin koodaus ja luokittelu	7
1.2.3 Inhibiittorit ja laajakirjoiset β -laktamaasit	7
1.3 Nitrosefiini	7
1.4 Antimikrobiresistenssi	8
1.4.1 Ilmiön ongelma ja perusta	8
1.4.2 Ilmiön laajuus	8
2. Tutkimusprojekti	10
2.1 Tutkimuksen tarkoitus	10
3. Aineisto ja menetelmät	10
3.1 Koehenkilöt ja isolaatit	10
3.2 Bakteeriviljely	10
3.3 Nitrosefiinitestaus	11
4. Tulokset	11
4.1 Yleistä	11
4.2 Raskauden vaikutus	11
5. Päätelmät	13
5.1 Yleistä	13
5.2 Vertailu	13
5.3 Kliininen merkitys	14
6. Kokoavaa tarkastelua	14
6.1 Yleistä	14
6.2 Tutkimus ja tulokset	14
6.3 Pohdintaa	14
7. Lähteet	16

1. JOHDANTO

1.1 *Capnocytophaga*

1.1.1 Yleistä

Capnocytophaga on *Bacteroidetes*-pääjakson *Flavobacteriaceae* -heimoon kuuluva bakteerisuku (Leadbetter ym. 1979; Vandamme ym. 1996), johon kuuluu seuraavat *Capnocytophaga*-lajit: ihmisen suuontelosta eristetyt *C. gingivalis*, *C. granulosa*, *C. haemolytica*, *C. leadbetteri*, *C. ochracea*, *C. periodontitidis* ja *C. sputigena* sekä eläinperäisinä löydöksinä identifioituneet *C. canimorsus*, *C. canis*, *C. catalasegens*, *C. cynodegmi* ja *C. felis* (Brenner ym. 1989; Frandsen ym. 1987; Frandsen ym. 2008; Suzuki ym. 2020; Suzuki ym. 2023; Zhang ym. 2021). Valtaosa ihmisperäisistä *Capnocytophaga* -lajeista kuuluu suun normaaliin mikrobistoon (Ciantar ym. 2005), näistä tyypillisimpänä löydöksenä *C. ochracea* (Frandsen ym. 1987). *Capnocytophaga*-lajeja voidaankin usein eristää mm. syljestä tai hammaspinnalla kasvavasta biofilmistä, ja jo yli 30 %:lla viisivuotiaista esiintyy *C. gingivalista*, *C. ochraceaa* ja *C. sputigenaa* hammasplakissa (Hayashi ym. 2001, Kobayashi ym. 2008). Osa *Capnocytophaga*-lajeista omaa erityistä virulenssikykyä, ja ne on yhdistetty mm. parodontiittiin ja eläinperäisiin raapima- tai puremavammoja seuranneisiin haavainfektioihin, jotka voivat erityisesti immunosuppressiopotilailla johtaa sairaalahoitoa vaatiiviin bakteremia- ja sepsistapauksiin (Alugupalli ja Kalfas 1996). Infektioiden hoito β -laktaamipohjaisilla antibiooteilla voi aiheuttaa haasteita, sillä *Capnocytophaga*-lajeilla ilmenee myös β -laktamaasia ilmentäviä kantoja (Singh 2013, Popeda ym. 2014).

1.1.2 Morfologia

Capnocytophaga-lajit ovat kapnofiilisiä fakultatiivisia anaerobeja sekä gram-negatiivisia sukkulamaisia sauvoja tai filamentteja (Frandsen ym. 1987). Niiden koko vaihtelee läpimitaltaan 0,42-0,6 μm ja pituudeltaan 2,5-5,7 μm . Päistään ne ovat usein joko pyöreitä tai suippomaisia (Leadbetter ym. 1979). Elektronimikroskooppitutkimuksissa *Capnocytophaga* ei ole havaittu hapsuja, karvoja tai muita liikkumiseen tarkoitettuja jatkeita, vaikka ne ovatkin liikkumiskykyisiä (Laughon ym. 1982). Kasvupesäke on morfologialtaan tasainen, matala ja kasvu keskittyy sisältä ulkoreunoille päin, toisinaan upoten myös osin agarin sisään (Leadbetter ym. 1979). Väriykseltään kasvupesäke voi olla pilkullinen tai pigmentoitunut, ja lajista riippuen väri voi vaihdella sinisen, vihreän, keltaisen, kullan, pinkin ja harmaan sävyissä (Kobayashi ym. 2008).

1.1.3 *Capnocytophagan* kasvatus

Laboratorio-olosuhteissa *Capnocytophagan* kasvatukseen suotuisa kasvualusta on trypsiini-soija-agar, mihin on lisätty 5 % lampaan verta, mutta veri ei ole välttämätön *Capnocytophagan* kasvuille (Leadbetter ym. 1979). Vaihtoehtoisesti *Capnocytophaga*-lajeja voidaan eristää Thayer-Martin -selektiivisellä elatusaineella tai aikaisemmin mainitulla trypsiini-soija -veriagarielatusaineella, johon on lisätty basitrasiniä (50 $\mu\text{g/ml}$) ja polymiksiini B:tä (100 $\mu\text{g/ml}$) (Mashimo ym. 1983). *Capnocytophagan* eristys ja kasvatus elatusmaljassa

tarvitsee pääsääntöisesti hiilidioksidia, vaikkakin joidenkin kantojen on raportoitu kasvavan myös ilman sitä. Kasvulle optimilämpötila on 35-37 °C (Kobayashi ym. 2008).

Capnocytophaga viljellään kolme-viisi päivää optimilämpötilassa anaerobisessa kasvatuskaapissa (5 % CO₂, 10 % H₂ ja 85 % N₂). Puhdasviljelmää varten eristettyjä pesäkkeitä voidaan uudelleen viljellä esimerkiksi Thayer-Martin tai TS veriagar-maljoilla (Kobayashi ym. 2008.)

1.1.4 *Capnocytophaga*-lajien tunnistus ja fenotyypit

Capnocytophaga tarkoittaa terminä hiilidioksidin syöjää (Frandsen ym. 1987). *C. ochracean* nimi tulee alun perin ”ochrasta”, joka tarkoittaa keltaista, kyseistä lajia kutsuttiin aikaisemmin nimellä *Bacteroides ochraceus*. *C. sputigenan* nimi viittaa sen alkuperäiseen paikkaan ja käännettynä se tarkoittaa ”limasta tuotettua”. Myös *C. gingivalis* viittaa nimellään sen löytöpaikkaan ja voidaan kääntää termiin ”ikenestä”. *C. haemolytica* viittaa sen β-hemolyysikykyyn veriagarkasvualustoilla, *C. haemolytica* lisäksi *Capnocytophaga*-suvun lajeista vain eläinperäinen *C. cynodegmi* ilmentää toisinaan β-hemolyysiä. *C. granulosa* on puolestaan nimetty granulaarisen ulkonäkönsä vuoksi. *C. leadbetter* nimenä osoittaa kunnioitusta E. R. Leadbetterille, amerikkalaiselle mikrobiologille. (Frandsen ym. 1987.) *C. leadbetter* on metaboliaaltaan vähemmän aktiivinen kuin muut *Capnocytophaga*-suvun lajit (Kazuyuki ym. 2011).

Eri *Capnocytophaga*-lajien fenotyyppejä on vertailtu **taulukossa 1**. Eri kasvupesäkkeiden välisiä- ja sisäisiä eroja voidaan tunnistaa parhaiten molekyyli-tutkimuksen avulla (Kobayashi ym. 2008.) *Capnocytophaga*-lajien erottaminen toisistaan voi olla haasteellista fenotyyppiin perustuvien testien perusteella (Laughon ym. 1982, Kristiansen ym. 1984, Khwaja ym. 1990) ja esimerkiksi *C. ochracea* ja *C. sputigena* ovat geneettisesti hyvin lähellä toisiaan, vaikka ne ovatkin kaksi eri lajia (Frandsen ym. 2008).

Kasvussaan *Capnocytophaga*-lajit kykenevät hyödyntämään useita eri hiilihydraatteja muun muassa käymisreaktioihin ja energiantuottoon (Holt ym. 1989). Useat *Capnocytophaga*-lajit voivat käyttää polysakkarideja kuten dekstraania, glykokeenia, inuliinia tai tärkkelystä. Glukoosista tuotettu pääasiallisia lopputuotteita ovat meripihkahappo ja etikkahappo. Ohessa syntyy pieniä määriä propaanihappoa ja isovaleriaanahappoa. Ihmisistä eristetyt *Capnocytophaga*-kannat eivät kykene tuottamaan katalaasia tai oksididaasia. (Brenner ym. 1989.)

Capnocytophaga-lajeilla on tunnistettu oligopeptidaasiaktiivisuutta. Voimakasta aktiivisuutta esiintyy etenkin lysiini-alaniinia ja lysiini-proliini-4-metoksi-β-naftyyliamidia sekä tripeptidisubstraatteja kuten alaniini-alaniini-fenyylialaniini-4-metoksia ja glysiini-proliini-leusiini-β-naftyyliamidia vastaan. Aminopeptidaasiaktiivisuutta havaittiin käyttämällä myös alaniini-β-naftyyliamidia, arginiini-β-naftyyliamidi, leusiini-β-naftyyliamidia, metioniini-β-naftyyliamidia ja seriini-β-naftyyliamidia. (Suido ym. 1986, Suido ym. 1988.)

C. ochracean ja *C. sputigenan* tunnistus toisistaan onnistuu vertaamalla aktiivisuutta selloosin fermentoinnin ja β-glukosidaasin ilmentämisen suhteen (Frandsen ym. 2008). *C. gingivalis* ja *C. granulosa* voidaan erottaa *C. ochraceasta* ja *C. sputigenasta* amygdaliinin fermentaatio- ja dekstraanin hydrolyysiaktiivisuuden perusteella. Vaikka *C. gingivaliksen* ja

C. granulosa erottaminen toisistaan on vaikeaa, voidaan tämä toteuttaa laktoosin ja raffinoosin fermentaation, trypsiinin tuoton sekä β -glukosidaasi-aktiivisuuden pohjalta. *C. leadbetteri* hajottaa sokeria huonosti sekä on fermentointitehokkuudeltaan heikko ja eroaa näiltä osin muista *Capnocytophaga*-lajeista. *Capnocytophagan* taksoni AHN8471 ilmentää samoja fenotyyppisiä ominaisuuksia kuin *C. ochracea* ja *C. sputigena*, mutta geneettisiä eroavaisuuksia lajien välillä on havaittu. (Frandsen ym. 2008). *C. haemolytica* voidaan erottaa muista lajeista β -hemolyysiaktiivisuuden ja aminopeptidaasiaktiivisuuden vähäisyyden vuoksi (Yamamoto ym. 1994).

Taulukko 1. Eri *Capnocytophaga*-lajien fenotyyppien vertailua, ihmisperäiset kannat (Kazuyuki ym. 2011).

Ominaisuus	<i>C. le</i>	AHN8471	<i>C. oc</i>	<i>C. sp</i>	<i>C. gi</i>	<i>C. gr</i>	<i>C. ha</i>
Hemolyysi	-	-	-	-	-	-	+
Katalaasi	-	-	-	-	-	-	-
Oksidaasi	-	-	-	-	-	-	-
Fermentointi							
Amygdaliini	-	+	+	+	-	-	h
Selloosi	-	+	+	+	+	-	-
Fruktoosi	-	+	+	+	+	+	-
Galaktoosi	h	+	+	+	+	+	+
Glukoosi	h	+	+	+	+	+	+
Laktoosi	h	+	+	+	+	+	+
Raffinoosi	-	+	+	+	+	h	+
Sakkarooosi	-	+	+	+	+	+	+
Hydrolyysi							
Aeskuliini	-	+	+	+	-	+	+
Dekstraani	-	+	+	+	-	-	-
Tärkkelys		+	+	+	+	+	+
API ZYM							
C4-esteraasi		+	+	h	+	h	-
C8-esteraasi lipaasi	h	h	h	h	h	h	+
Trypsiini	-	h	h	h	+	h	+
α -kymotrypsiini		h	h	h	h	h	h
Happo fosfataasi	+	+	+	+	h	+	+
β -galaktosidaasi	+	h	h	h	+	+	h
β -glukosidaasi	-	h	h	h	h	+	-
N-asetyyli- β -glu- kosiaminidaasi	+	+	+	+	h	-	+
IgA1 jakau- tuminen	+	+	+	+	+	+	-

C. le: *C. leadbetteri*, *C. oc*: *C. ochracea*, *C. sp*: *C. sputigena*, *C. gi*: *C. gingivalis*, *C. gr*: *C. granulosa*, *C. ha*: *C. haemolytica*. h: heikko positiivinen.

1.1.5 Patogeneesin tutkiminen ja eri lajien virulenssikyky

Patogeneesin tutkiminen on aiemmin keskittynyt pääasiassa *C. gingivalis*, *C. ochracea* ja *C. sputigena* -lajeihin, mutta nykyisin tietoa on enemmän myös *C. leadbetteriin*, *C. granulosaan* ja *C. haemolyticaan* liittyen. *Capnocytophaga*-lajien esiintyminen suuontelossa on yhdistetty mm. nuoruusiän nopeasti etenevään parodontiittiin (Newman ym. 1976). Myös vastakkaista tietoa on esitetty, jonka mukaan *Capnocytophaga* ei ole merkityksellinen patogeeni nopeasti etenevässä parodontiitissa (Dzink ym. 1998, Moore ja Moore 1994, Combo ym. 1998, Paster ym. 2001, Kumar ym. 2003). Toisaalta *Capnocytophagan* esiintyminen suuontelossa yhdistetään limakalvojen haavaumiin, ienverenvuotoon ja ientulehdukseen. Voidaankin sanoa, että *Capnocytophaga* on opportunistinen patogeeni, joka voi aiheuttaa systeemi-infektioita immunopuutteilla, esimerkiksi neutropeniasta kärsivillä, potilailla. Patogeneesiä on raportoitu toisaalta myös tavallisilla potilailla. (Campbell ja Edwards 1991.)

Capnocytophagan virulenssi ei ole täysin selvä, mutta näitä bakteereita voidaan toistuvasti eristää muun muassa keuhkoleesioista ja -absesseista, mutta myös terveistä suuonteloista (Frandsen ym. 1987). Epidemiologisen datan mukaan diabetes lisäsi parodontiittipotilailla *Capnocytophaga*-lajien sekä muiden anaerobien esiintyvyyttä. Diabeteksen vaikutus lajikirjoon näkyi parodontiitissa myös ientaskuttomilla ja verta vuotamattomilla alueilla (Ciantar ym. 2005). Myös esimerkiksi syöpäpotilailla, jotka saavat kemoterapiaa, on havaittu *Capnocytophagan* levinneisyyttä (Campbell ja Edwards 1991).

Capnocytophaga-infektiot eivät rajoitu vain immunopuutteisille potilaille, mutta immunokompetenteilla henkilöillä anatomiset poikkeavuudet saattaa olla infektioita edesauttava tekijä (Parenti ja Snyderman 1987). Koska nämä infektiot ovat usein sekainfektioita, *Capnocytophagan* tarkka merkitys on edelleen infektioissa epäselvä (Goudreau ym. 1986).

Capnocytophagan virulenssikykyyn on esitetty useita eri tekijöitä. *C. haemolyticaa* lukuunottamatta (Frandsen ym. 2008) *Capnocytophaga*-lajien on raportoitu mahdollisesti tuottavan soluvälitteistä immunoglobuliini IgA-proteaasia glykosidaasituotannon ohella (Frandsen 1987). *C. ochracean*, *C. gingivaliksen* ja *C. sputigenan* proteaasiaktiivisuutta kyettiin inhiboimaan metallikelaattorin avulla, joka viittaa proteeasin olevan metalliproteaasi (Ochiai ym. 1998).

Virulenssia lisäävien tekijöiden heterogeenisyys eri isolaattien kesken viittaa siihen, että *Capnocytophagan* patogeneisyys vaikuttaa vain joihinkin lajeihin ja mahdollisesti jopa vain joihinkin osiin lajien sisällä (Irving ym. 1978, Laughon ym. 1982). Koska eri *Capnocytophaga*-lajien erottaminen toisistaan fenotyypin perusteella on haasteellista, tulisi tähän yhdistää myös molekyyliperusteisia tunnistusmenetelmiä virulenssitekijöiden tunnistamiseksi (Holt ym. 1989).

Capnocytophaga-lajit voivat tuottaa ekstrasellulaarisia entsyymejä, jotka kykenevät hajottamaan ihmisten proteiineja kuten immunoglobuliineja, komplementtitekijöitä ja laktoferriineja (Alugupalli ja Kalfas 1996). *C. gingivaliksen* aminopeptidaasi arvellaan olevan tärkeä tekijä patogeneesissä. *C. sputigenan* lipopolysakkaridit aiheuttavat polyklonaalista β -

soluaktivaatiota ja voivat aktivoida interleukiini-1 β -tuotantoa ihmisten perifeerisissä monosyyteissä. (Kim ym. 1994.)

1.1.6 Infektion ehkäisy

Koska *Capnocytophagan* pääasiallinen esiintymispaikka on suuontelo, leviää *Capnocytophaga* pääsääntöisesti alun perin suusta. *Capnocytophaga*-peräisten infektioiden ennaltaehkäisyssä tärkeää on hyvä suuhygienia ja vähäinen hampaiden biofilmin määrä, sillä tällä tavoin hillitään suussa esiintyvien *Capnocytophagojen* määrää. (Rosenman ym. 2003). Parodontaalisia leesioita omaavilla immunovajeisilla potilailla käytössä on usein klooriheksidiinipohjainen suuvesi, mutta niiden tehoa ei voida taata (Addy ja Wade 1989, 1995 ja Luc ym. 1998).

1.1.7 Antibioottiherkkyys

B-laktamaasia erittävät kannat rajoittavat β -laktaamipohjaisten antibioottien käyttöä, mistä syystä kliinisissä tapauksissa kannan herkkyys antibiooteille tulee varmistaa in vitro -tutkimuksella. Imipeneemi/silastatiini -yhdistelmälääke, klindamysiini sekä β -laktamaasi-inhibiittori -kombinaatiot ovat tehokkaita ja niiden käyttöä voidaan suositella kaikkien *Capnocytophaga*-peräisten infektioiden hoitoon. *Capnocytophagan* herkkyys eri antibiooteille ja antibioottiryhmille on koottu **taulukkoon 2**, tulokset ovat osaltaan kiistanalaisia ja myös taulukosta poikkeavia tuloksia on raportoitu. *Capnocytophaga* on testattu usealla eri antibiootilla. B-laktamaasin tuotanto *Capnocytophagoilla* on yleistymässä ja nitrosefiintestaus on korvaamaton nopeaan β -laktamaasin ilmentyvyyden tulkintaan. Herkkyystestaukset ovat tosin vaikeita toteuttaa hitaan *Capnocytophagan* kasvun vuoksi. Vaikka *Capnocytophaga*-infektioista on tehty kliinisiä tutkimuksia, selvä konsensus antibiootin valinnasta ja hoidon pituudesta puuttuu. Myöskään penisilliiniallergiselle potilaalle ei ole vakiintunutta vaihtoehtolääkitystä imipeneemi/silastatiini -yhdistelmälääkkeen tilalle. (Jolivet-Gougeon 2007.)

1.1.8 Oikean antibiootin valinta

Hoito *Capnocytophaga*-peräisessä endokardiitissa tai sepsiksessä on usein empiiristä, sillä *Capnocytophagan* kasvatus herkkyystestauksia varten on liian hidasta. Useimmat potilaat onnistutaan hoitamaan onnistuneesti laajakirjoisilla antibiooteilla, sillä useat kannat ovat edelleen herkkiä kaikille antibiooteille. (Sandoe 2004.) Infektioherkillä neutropeniasta kärsivillä potilailla tulee oikean antibiootin valintaan paneutua enemmän käyttäen apuna muun muassa kantakohtaista antibioottiherkkyysmittausta. Esimerkiksi imipeneemi/silastatiini -yhdistelmälääkettä tulee usein harkita, sillä *Capnocytophagan* on havaittu olevan tälle yhdistelmälle aina herkkä. (Jolivet-Gougeon ym. 2007.) Mikäli taas immunokompetentilta potilaalta saadaan eristettyä β -laktamaasia tuottava kanta antibioottihoitoa käytettäessä, tulee β -laktamaasi-inhibiittorikombinaatiota tai klindamysiinia suosia hoidossa (Sabbatani ym. 2004).

Mikrobilääkeherkkyysmäärittämiin perustustuvat bakteerilajikohtaiset MIC -arvot (minimal inhibitory concentration eli pienin bakteerin kasvun estävä pitoisuus) tulisi ohjata antibioottihoidon valintaa (Jolivet-Gougeon 2007). Hoitolinjauksiin vaikuttavat myös infektiokokon sijainti, infektion vakavuus ja muut potilaskohtaiset tekijät, kuten immuunivaje tai alkoholismi. Molekulaarinen infektioiden diagnostiikka ei anna infektiolle MIC -arvoa. Antibioottihoidon tehokkuus tulisikin aina varmistaa in vitro -viljelyllä ja herkkyysmäärittämisellä. (Bonatti ym. 2003, Sabbatani ym. 2004, Stefanopoulos ja Tarantzopoulou 2005).

Taulukko 2. *Capnocytophagan* mikrobilääkeherkkyys eri antibiooteille ja antibioottiryhmille (Jolivet-Gougeon ym. 2007).

Mikrobilääke	Herkkä (S)	Resistentti (R)	Vaihteleva (I)
Klindamysiini	x		
Linetsolidi	x		
Tetrasykliini	x		
Kloramfenikoli	x		
Imipeneemi	x		
B-laktamaasi-inhibiittorit	x		
Polymyksiini		x	
Fusidihappo		x	
Fosfomysiini		x	
Kolimysiini		x	
Trimetopriimi		x	
Erytromysiini			x
Rifampisiini			x
Kinolonit			x
Metronidatsoli			x
Vankomysiini			x
Aminoglykosidit			x
Moksalaktaami			x
Atstreonaami			x
Penisilliini			x
Kefalosporiini			x

1.1.9 Potilastapauksia

Capnocytophagojen infektiokyvystä on raportoitu lukuisia potilastapauksia (Kazuyuki ym. 2011). Suuontelon limakalvojen tulehdukset sekä leesiot voivat toimia *Capnocytophagalle* pääsynä elimistöön aiheuttaen esimerkiksi sepsistä, endokardiittia tai osteomyeliittia (Jolivet-Gougeon ym. 2007.) Eräessä potilastapauksessa *C. ochracea* sekä *C. sputigenaa* on tavattu kahdella syöpäpotilailla, jotka sairastivat selkänikaman osteomyeliittia (Duong ym. 1996). Myös *C. ochracea* ja *C. gingivalis* -peräistä bakteremiaa on tavattu leukemiaa ja Hodgkin lymfoomia sairastavilla potilailla (Bilgrami ym. 1992, Mantadakis ym. 2003,

Garcia-Cia ym. 2004, Matsumoto ym. 2008). *C. ochracea* -peräistä sepsistä ja fulminanttia purppuraa on raportoitu immunokompetentilla potilaalla (Desai ym. 2007). *C. haemolytica* on taas tavattu bakteeriperäisessä endokardiitissa potilaalla, jolle oli tehty kahdesti aorttaläpän leikkaus (Gutierrez-Martin ym. 2007).

1.2 β -laktamaasi

1.2.1 Yleistä

B-laktamaasit ovat gram-negatiivisille bakteereille tärkeä antibiootiresistenssiä tuottava entsyymiperhe (Wilke ym. 2005). B-laktamaasit hydrolysoivat β -laktaamirenkaan β -laktaamipohjaisissa antibiooteissa, minkä vaikutuksesta kyseessä oleva antibiootti muuttuu tehottomaksi. Ensimmäiset kuvaukset β -laktamaasiaktiiviteetista ovat peräisin 1940-luvulta *E. Coli* bakteereilla pian penisilliinin kliinisen käytön aloittamisen jälkeen (Abrahaman ja Chain 1988.)

1.2.2 Geenin koodaus ja luokittelu

B-laktamaasin koodausta tapahtuu *Capnocytophagan* kromosomissa sekä plasmidissa, geenit ovat nimeltään CfxA3 (Jolivet-Gougeon ym. 2004) ja CfxA2 (Handal ym. 2005). Nämä geenit ovat koodaavat laajakirjoisen resistenssin β -laktaamipohjaisille antibiooteille, esimerkiksi kolmannen sukupolven kefalosporiineille 80 % *Capnocytophagoista* (Jolivet-Gougeon ym. 2007).

B-laktamaasit voidaan jakaa luokkiin A – D, missä A, B ja D -luokissa ensyymin aktiivisessa keskuksessa on seriini, kun taas C -luokan β -laktamaaseissa aktiiviseen keskukseseen kuuluu sinkki. B-laktamaaseja tavataan pääasiassa gramnegatiivisilla bakteereilla, mutta niitä on havaittu myös *S. aureus* -bakteerilla. (Livemore 1995, Bradford 2001.) AmpC - β -laktamaasit indusoituvat β -laktamipohjaisten antibioottien läsnäollessa. Primäärästi β -laktamaasista vastaavat geenit ovat tällöin kromosomissa hiljennetty ja transkriptoituvat tehokkaasti vasta β -laktamipohjaisten antibioottien myötä. AmpC:tä tavataan muun muassa enterobakteereilla ja acinetobakteereilla. (Jones 1998.)

1.2.3 Inhibiittorit ja laajakirjoiset β -laktamaasit

B-laktamaasi-inhibiittorit kuten klavulaanihappo, sulbaktaami ja tatsobaktaami otettiin käyttöön selvittämään β -laktamaaseihin liittyviä ongelmia. Nämä inhibiittorit toimivat sitoutumalla β -laktamaasin aktiiviseen keskukseseen, mikä estää β -laktaamiantibiootin hydrolyysin, sitoutumisen ja siten normaalin toiminnan. (Babic 2006.) Laajennetulla kirjolla β -laktamaaseja (ESBL) on resistanssikyky penisilliinien lisäksi myös kolmannen sukupolven kefalosporiineihin ja atstreonaamiin. Ensimmäiset ESBL:llät löydettiin pian näiden laajakirjoisten antibioottien tultua kliiniseen käyttöön (Kliebe ym. 1985.)

1.3 Nitrosefiini

Nitrosefiini ($C_{21}H_{16}N_4O_8S_2$) on kromogeeninen kefalosporiini ja β -laktaamipohjainen antibiootti, jolla on diagnostisia käyttökohteita. B-laktamaasin vaikutuksesta nitrosefiinin amidisisidos hydrolysoituu, jolloin nitrosefiini muuttaa väriään haalean keltaisesta punaiseksi, mitä voidaan käyttää hyväksi esimerkiksi β -laktamaasin ilmentymistä tutkittaessa. Nitrosefiinin etuja ovat vähäinen materiaalien ja tutkimusvälineistön tarve. Kuitenkin indusoituvien β -laktamaasien tapauksessa nitrosefiini saattaa antaa väärän negatiivisen testituloksen. (2023. Compound Summary for Nitrocefin. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Nitrocefin>)

1.4 Antimikrobiresistenssi

1.4.1 Ilmiön ongelma ja perusta

Antimikrobiresistenssi (AMR) on globaali uhka niin yksilön terveydelle, terveydenhuoltojärjestelmälle kuin myös taloudelle (Morrison ja Zembower 2020). AMR liitetään tyypillisesti pidentyneisiin sairaalajaksoihin, kohonneisiin sairaanhoitokuluihin ja lisääntyneeseen kuolleisuuteen. Vaikka AMR on ilmiönä luonnollista kehitystä ja osa bakteerin evoluutiota, kiihdyttää ongelmaa globaalisti huono hygienia ja antimikrobilääkkeiden runsas käyttö.

Useat infektiot ovat tulleet vaikeammiksi hoitaa ja normaali antibioottihoito on osaltaan menettänyt tehoaan. Myös mikrobi-infektioiden määrä on viime vuosikymmeninä kasvanut, osasyynä arvellaan olevan mikrobilääkkeiden käyttö. Arvioiden mukaan vuonna 2019 tapahtui noin 1,27 miljoonaa tapausta, missä bakteeriperäinen infektio ei vastannut normaaliin antibioottihoitoon ja infektio aiheutti tästä syystä potilaan kuoleman. (Tanwar ym. 2014.)

1.4.2 Ilmiön laajuus

Antibioottien käyttöönoton jälkeen antibioottiresistenssigeenit ovat lisääntyneet patogeenisissä bakteereissa huomattavasti. Merkittävimmät mikrobi-mikrobilääkeresistenssi -parit on koottu **taulukkoon 3** tautiesimerkkeineen. Kyseiset geenit leviävät horisontaalisen geenisiirtymän avulla eri mikrobipopulaatioiden välillä sekä ympäristön geenipoolista kliinisesti merkittäviin isäntiin. (Jolivet-Gougeon 2007.) Fluorokinolonit sekä β -laktaamit ovat usein kliinisesti ensimmäisenä käytettäviä antibiootteja ja noin 70 % kuolemista liittyykin näihin antibioottiperheisiin (Morrison ja Zembower 2020).

Tyypillisin kuolemaan johtava antimikrobilääkeresistenssiin liitettävä infektiotfokus on alahengitystien infektio. Tyypillisimmät bakteerit liittyen antimikrobiresistenssiperäisiin kuolemiin olivat *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii* ja *Pseudomonas aeruginosa*. Myös esimerkiksi tuberkuloosin hallinta on vaikeampaa. Vuonna 2012 6 % nykyisistä tuberkuloositapauksista ja 20 % aiemmin hoidetuista tuberkuloositapauksista liittyi monilääkeresistenssi kanta. (Tanwar ym. 2014.)

Taulukko 3. Eri mikrobien saavuttama raportoitu mikrobilääkeresistenssi sekä infektiosta aiheutuva tauti (Tanwar ym. 2014).

Bakteerit	Lääke tai lääkeryhmä, jolle resistentti	Tauti
<i>Escherichia coli</i>	Kefalosporiinit ja fluorokinolonit	Virtsatietulehdus, bakteremia
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Kefalosporiinit ja karbapeneemit	Virtsatietulehdus, bakteremia, keuhkokuume
<i>Staphylococcus aureus</i>	Metisilliini	Bakteremia, haavan infektio
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Penisilliini	Keuhkokuume, aivokalvontulehdus, korvatulehdus
Salmonella, ei lavantautiin liittyvä	Fluorokinolonit	Elintarvikevälikteinen ripuli, bakteremia
Shigellalajit	Fluorokinolonit	Bakteeripunatauti
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	Kefalosporiinit	Tippuri
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Rifampisiini, isoniatsidi, fluorokinoloni	Tuberkuloosi
Sienet		
Candidalajit	Flukonatsoli, ekinokandiini	Kandidaasi
<i>Cryptococcus neoformans</i>	Flukonatsoli	Cryptococcosis
Aspergilluslajit	Atsolit	Aspergillosis
Scopulariopsislajit	Amfoterisiini B, flusytosiini, atsolit	Kynsien sienitauti
Virukset		
<i>Cytomegalovirus</i> (CMV)	Gansikloviiri ja foscarnet	AIDS:issa ja onkologisilla potilailla
<i>Herpes simplex virus</i> (HSV)	Asykloviiri, famsikloviiri, valasykloviiri	Herpes simplex
<i>Human immunodeficiency virus</i> (HIV)	Antiretroviraaliset lääkkeet	AIDS
Influenza virus	Adamantaanijohdannaiset, neuraminidaasin estäjät	Influenssa
<i>Varicella zoster virus</i>	Asykloviiri, valasykloviiri	Vesirokko
<i>Hepatitis B virus</i> (HBV)	Lamivudiini	Hepatiitti B
Parasiitit		
Plasmodialajit	Klorokiini, artemisiniini, atovakviini	Malaria
Leishmanialajit	5-arvoiset antimonit, miltefosiini, paromomysiini, amfoterisiini B	Leishmaniasis

<i>Schistosomes</i>	Pratsikvanteli, oksamnikiini	Schistosomiasis
<i>Entamoeba</i>	Metronidatsoli	Amoebiasis
<i>Trichomonas vaginalis</i>	Nitroimidatsoli	Trichomoniasis
<i>Toxoplasma gondii</i>	Artemisiniini, sulfadiatsiini	atovakviini, Toksoplasmoosi

2. TUTKIMUSPROJEKTI.

2.1 Tutkimuksen tarkoitus

Tutkimuksen tarkoituksena oli kartoittaa β -laktamaasia ilmentävien *Capnocytophaga*-lajien esiintyvyyttä. Lisäksi pyrittiin selvittämään tarkemmin raskauden ja synnytyksen jälkeisen tilan vaikutusta *Capnocytophaga*-lajien esiintyvyyteen. Suuren otannan johdosta pystyttiin valitsemaan erilaisia isolaatteja mahdollisimman monipuolisesti kiinnittämällä samalla huomiota esimerkiksi *Capnocytophaga*-lajiin, näytteenottoaikkaan suuontelossa ja näytteenottoajankohtaan raskauden eri vaiheet huomioiden.

Mikrobilääkeresistenssi on kasvava ongelma, joka uhkaa globaalisti muun muassa terveydenhuoltoa ja ihmisten terveyttä (Singh 2013 ja Popeda ym. 2014). Mikrobilääkkeille resistenttien kantojen kartoittaminen on tärkeää aiheeseen liittyvän tilannetiedon ylläpitämiseksi ja siihen reagoimiseksi. Esimerkiksi infektio-tilanteissa hoitovasteen voidaan odottaa paranevan, mikäli mikrobilääkkeille resistenttien kantojen esiintyvyyttä voidaan ennustaa yhä luotettavammin esimerkiksi hormonimuutosten tai tietyn *Capnocytophaga*-lajin perusteella.

3. AINEISTO JA MENETELMÄT

3.1 Koehenkilöt ja isolaatit

Testattavat *Capnocytophaga*-isolaatit ovat peräisin lokakuun 2002 ja lokakuun 2006 välisenä aikana toteutuneesta Raskaus ja parodontium -väitöskirjaprojektista, jossa koehenkilöinä olleilta 30 yleisterveeltä, parodontiittia sairastamattomalta, raskaana olevalta naiselta kerättiin sylki- ja plakkinäytteet viidellä eri käynnillä eri raskauden vaiheessa: I raskausviikolla 12-14, II raskausviikolla 25-27, III raskausviikolla 34-38, IV 4-6 viikkoa raskauden jälkeen ja V imetyksen loputtua (Gürsoy 2012).

β -laktamaasin testaus toteutettiin vuoden 2019 kesän aikana Turun yliopiston hammaslääketieteen laitoksen Dentalian-rakennuksen laboratoriossa. Suunäytteistä eristettyjä *Capnocytophaga*-isolaatteja oli yhteensä 1344 kappaletta, joista noin puolet (n=691) valittiin tähän tutkimukseen. Yhtäältä alkuperäistä isolaattimäärää karsittiin, jotta viljelymenetelmään perustuva testausmenetelmä olisi kohtuudella toteutettavissa kesän aikana, jolloin avustavaa henkilökuntaa ei ollut juuri paikalla. Toisaalta valittujen isolaattien otanta haluttiin säilyttää mahdollisimman edustavana. Isolaattien valinnassa huomioituja tekijöitä olivat näytteenottoajankohta raskauden suhteen, vankomysiini- ja penisilliiniherkkyys. Kaikkia *Capnocytophaga*-lajeja pyrittiin valitsemaan mahdollisimman monipuolisesti siten, että esimerkiksi harvinaisemmista lajeista lopulliseen tutkimukseen

valittiin jokainen isolaatti. Lisäksi jokaiselta koehenkilöltä pyrittiin valitsemaan vähintään yksi isolaatti sekä syljestä että hampaan biofilmistä jokaisessa raskauden eri vaiheessa.

3.2 Bakteeriviljely

Alunperin eristetyt *Capnocytophaga*-isolaatit oli säilötty elatusaineputkiin, joita säilytettiin –70 °C:n lämpötilassa Turun yliopiston hammaslääketieteen laitoksella. Tutkimukseen valitut 691 isolaattia viljeltiin kahteen kertaan, primaariviljelmänä ja puhdasviljelmänä. Ensimmäinen viljelmä siirrostettiin kasvatusmaljoille, missä elatusaineena käytettiin epäselektiivistä Brucella-agaria, joka sisälsi hemiiniä (5 µg/ml) ja K1-vitamiinia (10 µg/ml). Agarmaljojen inkubaatio 48-72 tunnin ajan toteutettiin anaerobisessa kasvatuskaapissa (37 °C, 10 % H₂, 5 % CO₂ ja 85 % N₂, Whitley A35 Anaerobic Workstation, Don Whitley Scientific Ltd., Shipley, Länsi-Yorkshire, Yhdistynyt Kuningaskunta). Inkubaation jälkeen tehtiin puhdasviljelmät, valiten pesäkemorfologian perusteella *Capnocytophaga*-pesäke, joka uudelleen viljeltiin kuten edellä pelkästään *Capnocytophaga* edustavan bakteerikasvuston kasvattamiseksi.

3.3 Nitrosefiinitestaus

Jokaisesta puhdasviljelmästä valittiin 3-5 edustavinta pesäkettä visuaalisen tarkastelun perusteella. Pesäkkeet levitettiin nitrosefiinikiekoille (49862 Nitrocefin disks, Sigma-Aldrich Co. LLC, 3050 Spruce Street, St. Louis, Missouri, Yhdysvallat) ja 17 µl tislattua vettä pipetoitiin nitrosefiinikiekon päälle. Viiden minuutin ja uudelleen tulosten varmistamiseksi 30 minuutin kuluttua nitrosefiinikiekkujen ilmentämä kasvupesäkkeiden β-laktamaasin tuotanto oli tulkittavissa värinmuutoksella, missä nitrosefiinikiekon alkuperäinen väri muuttui haalean kellertävästä vaalean tai tumman punaiseksi. Tulokset dokumentoitiin kirjaamalla sekä valokuvaamalla nitrosefiinikiekot neljän kiekon ryhmissä välittömästi testin jälkeen.

Isolaattimäärä oli alunperin 691 ja lopulliseen nitrosefiinikiekkotestiin valittiin 628 isolaattia. Otskoon lopulliseen valintaan vaikutti isolaattien liian vähäinen kasvu tai kontaminaatio, jolloin nitrosefiinikiekkotestiä ei voitu enää pitää luotettavana.

4. TULOKSET

4.1 Yleistä

628 näytteestä β-laktamaasia ilmentävien isolaattien määräksi saatiin 37 eri isolaattia, eli 5,9 % testatuista isolaateista ilmensi β-laktamaasia. Tulokset on koottu **taulukkoon 5**. β-laktamaasia ilmentäviä isolaatteja esiintyi koehenkilöiden välillä kohtalaisen tasaisesti. Tutkimuksessa olevien koehenkilöiden määrä oli 30 ja vähintään yksi β-laktamaasia ilmentävä isolaatti esiintyi 20:llä eli 67 %:lla koehenkilöistä. **Taulukosta 5** ilmenee, että β-laktamaasia ilmentävien hampaan biofilmistä valittujen *C. haemolytica*-isolaattien määrä on suhteellisesti korostunut, sillä *C. haemolytica*-isolaattien määrä oli kokonaisuudessaan pieni.

4.2 Raskauden vaikutus

Raskauden eri vaiheissa I-V ei havaittu huomattavaa eroa β -laktamaasin ilmentymisen suhteen: I-trimesterin aikana 6, II-trimesterin aikana 11 kappaletta, III-trimesterin aikana 9, synnytyksen jälkeen (IV-käynti) 4 ja imetyksen päätyttyä (V-käynti) 7 kappaletta. Tämän tiedon mukaan raskauden eri vaiheissa ei ilmene merkittävää vaihtelua β -laktamaasia tuottavien *Capnocytophaga*-kantojen välillä.

Taulukko 5. *Capnocytophaga*-isolaattien herkkyysmittaukset nitrosefiinille äideiltä (1–30) raskauden eri vaiheissa (I–V). Tulokseen merkitty *Capnocytophaga*-laji sekä näytteenottoaika suuontelossa (sylki tai plakki).

Äiti	I	II	III	IV	V	Yhteensä
1		<i>C. ochracea</i> sylki				1
2		<i>C. haemolytica</i> plakki	<i>C. haemolytica</i> plakki	<i>C. ochracea</i> plakki		4
			<i>C. haemolytica</i> plakki			
3			<i>C. ochracea</i> plakki			1
4	<i>C. ochracea</i> plakki		<i>C. ochracea</i> plakki			2
5	<i>C. sputigena</i> sylki	<i>C. ochracea</i> plakki	<i>C. ochracea</i> sylki			4
		<i>C. ochracea</i> plakki				
6		<i>C. ochracea</i> sylki				2
		<i>C. ochracea</i> sylki				
7						0
8	<i>C. ochracea</i> sylki					1
9						0
10	<i>C. sputigena</i> plakki			<i>C. ochracea</i> sylki		2
11	<i>C. ochracea</i> sylki	<i>C. sputigena</i> plakki	<i>C. sputigena</i> plakki			3
12					<i>C. ochracea</i> plakki	2
					<i>C. ochracea</i> plakki	
13		<i>C. ochracea</i> plakki	<i>C. ochracea</i> plakki			2
14		<i>C. ochracea</i> plakki				1
15			<i>C. ochracea</i> sylki			1
16			<i>C. ochracea</i> plakki			1
17						0
18						0
19					<i>C. ochracea</i> sylki	1
20	<i>C. ochracea</i> plakki				<i>C. haemolytica</i> plakki	2
21						0
22		<i>C. ochracea</i> plakki			<i>C. haemolytica</i> plakki	2
23						0
24						0
25				<i>C. ochracea</i> sylki	<i>C. ochracea</i> plakki	2
26						0
27		<i>C. ochracea</i> sylki			<i>C. ochracea</i> plakki	2

28				C. <i>haemolytica</i> plakki		1
29						0
30						0
Yhteensä	6	11	9	4	7	37

5 PÄÄTELMÄT

5.1 Yleistä

67 %:lla äideistä esiintyvä β -laktamaasia tuottava *Capnocytophaga*-isolaatti on merkittävä osuus. Toisaalta 628 isolaatista positiivisten osuus 37, eli yhteensä 5,9 %, on kokonaisuutena pieni määrä. Huomionarvoista onkin β -laktamaasia tuottavien kantojen laaja levinneisyys koehenkilöiden kesken. Koehenkilöt eivät sairastaneet parodontiittia, joten plakkiperäisen *C. haemolytica*-isolaattien osuuden voidaan olettaa jääneen suhteellisen vähäiseksi. Kuitenkin raskaudenaikaisen ientulehduksen voidaan olettaa nostavan myös patogeenisten bakteerien määrää suuontelossa raskauden aikana, mutta tulosten mukaan tämä ei suoraan näy β -laktamaasia tuottavien *Capnocytophaga*-isolaattien määrässä.

Kliinisessä työssä antibioottiherkkyyssmittausten merkitys korostuu antibioottihoitoa harkitessa. Guiney ym. (1990) sekä Walkerin ja Buenon (1997) mukaan parodontiitin laaja-alaisen mikrobikantaominaisuutensa vuoksi parodontiitin hoidon ennuste antibiootihoidossa saattaa heikentyä β -laktamaasia tuottavien bakteerikantojen suojellessa myös lähtökohtaisesti käytetyille antibiootille alttiita bakteerikantoja. Tämän mukaan huolenaiheena ei välttämättä ole pelkästään *Capnocytophaga* ja sen virulenssikyky, vaan ainoastaan β -laktamaasia tuottavan kannan läsnäolo isännässä saattaa aiheuttaa ongelmia toisen bakteerilajin primaari-infektion hoidossa.

Tutkimuksen koehenkilöt olivat yleisterveitä, eivätkä he sairastaneet parodontiittia. Parodontiittia sairastavilla suun bakteeristoon kuuluu tyypillisesti suhteellisesti enemmän anaerobeja bakteereita ja esimerkiksi usein *C. haemolytican* osuus suhteellisesti suurenee *C. ochraceaan* verrattuna. Koehenkilöitä heikompaan terveydentilaan voi liittyä esimerkiksi useampia tai pidempiä antibioottihoitajaksoja ja muita tekijöitä, jotka saattavat osaltaan selittää yksilön β -laktamaasia ilmentävien kantojen mahdollisesti suurempaa osuutta.

5.2 Vertailu

Tämän tutkimuksen alkuperäisestä näytemäärästä laajemmalla otannalla valittujen isolaattien β -laktamaasia ilmentävien näytteiden *Capnocytophagan* lajikohtainen vaihtelu oli merkittävää. *C. haemolytica* ilmensi β -laktamaasia 22 %:lla isolaateista ja *C. ochracea* 5 %:lla isolaateista. Vuonna 2014 julkaistussa tutkimuksessa terveillä koehenkilöillä esiintyi β -laktamaasia ilmentäviä *Capnocytophaga*-kantoja 11 %:lla. Koehenkilöillä, joilla oli meneillään kemoterapia, esiintyi β -laktamaasia tuottavia *Capnocytophaga*-kantoja 50 %lla. Parodontiittia sairastavilla koehenkilöillä vastaava osuus oli 82 %. (Ehrmann ym. 2014.) Samantyyppinen tutkimus on tehty myös vuonna 1992, jolloin 32 %:lla koehenkilöistä onnistuttiin eristämään nitrosefiinilla testatessa β -laktamaasia tuottava *Capnocytophaga*-kanta (Diane ym. 1992). Otannat edellä mainituissa tutkimuksissa ovat pienet, mutta tutkimustulokset ovat linjassa tämän tutkielman tutkimuksen kanssa, β -laktamaasia tuottavien kantojen esiintyminen suuontelossa on verrattain yleistä.

5.3 Kliininen merkitys

Raskauden ja puberteetin seurauksena syntyvillä hormonitasapainon ja muilla fysiologisilla muutoksilla on vaikutusta henkilön parodontaaliterveyteen ja esimerkiksi *Capnocytophagan* vallitsevuus lisääntyy puberteetin myötä (Gusberti ym. 1990, Saadaoui ym. 2021). Raskaudenaikaisissa suun bakteeriperäisissä infektioiden tulisi ottaa huomioon raskaudenaikaiset muutokset suun bakteeritasapainoon ja mahdolliseen vallitsevaan antibioottiresistenttiin kantaan. Antibioottia valitessa voi olla perusteltua valita mahdollisimman laaja, mutta raskauden kannalta turvallinen vaihtoehto. Kliinisesti ongelmaa lisää *Capnocytophaga*-isolaattien hidas (48-72 tuntia) kasvu. Tilanteissa, missä antibioottien käyttö on luonteeltaan enemmän harkinnanvaraista - kuten parodontiitin hoidossa, voi yhä useammin antibiootihoidosta pidättäytyminen olla perusteltua.

6. KOKOAVAA TARKASTELUA

6.1 Yleistä

Capnocytophaga on suun normaali kommensaalibakteerisuku, jolla on myös patogeenisiä vaikutuksia. Koska se on toisinaan kykenevä tuottamaan β -laktamaasia, voi kliinisesti antibiootihoidon tehokas toteuttaminen ajoittain vaikeutua. Mikrobilääkeresistenssi on laaja-alainen ja edelleen kasvava globaali uhka, minkä vuoksi ilmiön tutkiminen on tärkeää.

6.2 Tutkimus ja tulokset

Tutkimuksessa tutkittiin vuosien 2002-2006 -välisenä aikana raskaana olevien naisten *Capnocytophaga*-isolaatteja ja niiden kykyä tuottaa β -laktamaasia. Isolaatteja viljeltiin kaksinkertaisesti puhtasviljelmänä ja β -laktamaasin ilmentymistä testattiin nitrosefiinikiekkotestillä.

Tuloksena oli, että β -laktamaasin tuotantokyky eri äitien välillä on levinnyt laajalti pieneen määrään isolaatteja. Toisin sanoen 20/30 äidistä saatiin ainakin yksi, mutta enimmillään neljä isolaattia jotka ilmensivät β -laktamaasin tuotantoa. Määrää voi pitää suurena, sillä kliinisesti pienikin määrä antibiootille resistenttejä kantoja voi olla hoidon kannalta ongelmallinen. Aikaisemman tutkimustiedon perusteella voidaan olettaa, että immunopuutteisilla tai parodontiittia sairastavilla β -laktamaasia tuottavien kantojen määrä koehenkilöillä saattaa olla tässä tutkimuksessa saatuja tuloksia suurempi. Raskauden eri vaiheella ei näin pienellä positiivisella isolaattiotannalla voida katsoa olevan merkitystä, vaikka raskaudella sinänsä on ollut todennäköisesti vaikutusta koehenkilöiden *Capnocytophagojen* esiintymiseen ja lajikirjoon.

6.3 Pohdintaa

Tutkimuksen koehenkilöt olivat yleisterveitä ja parodontiittia sairastamattomia. Voidaan olettaa, että monipuolisemman, suhteellisesti enemmän anaerobeja sisältävän ja patologisesti monimuotoisemman suun mikrobiston tulokset poikkeaisivat tässä

tutkimuksessa esiin tulleista tuloksista. Myös yleisterveydellä, henkilön puolustuskyvyllä ja esimerkiksi toistuvilla antibioottihoidoilla on mahdollisesti vaikutusta myös *C. Capnocytophagan* β -laktamaasia ilmentävien kantojen laajempaan esiintyvyyteen suuontelossa.

Mikrobilääkeresistenssi on kasvava ongelma ja sen tutkimista tulee jatkaa edelleen. Tärkeää on muun muassa kartoittaa mahdollisimman laajasti minkälaiset mikrobit omaavat mikrobilääkeresistenssin ja minkälaiset fysiologiset tai ympäristön olosuhteet tähän saattavat vaikuttaa.

6. LÄHTEET

- Abraham EP, Chain E. An enzyme from bacteria able to destroy penicillin. *Rev Infect Dis* 1988;10; 677-678.
- Addy M, Wade W. An approach to efficacy screening of mouthrinses: studies on a group of French products (I). Staining and antimicrobial properties in vitro. *J Clin Periodontol* 1995;22:718-722.
- Alugupalli KR, Kalfas S. Degradation of lactoferrin by periodontitis-associated bacteria. *FEMS Microbiol Lett* 1996;145:209-214.
- Ambler RP. The structure of beta-lactamases. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 1980; 289:321-331.
- Babic M, Hujer A, Bonomo R. What's new in antibiotic resistance? Focus on beta-lactamases. *Drug Resist Update* 2006;9:142-156.
- Bilgrami S, et al. *Capnocytophaga* bacteremia in a patient with Hodgkin's disease following bone marrow transplantation: Case report and review. *Clin Infect Dis* 1992;14:1405.
- Bonatti H, Rossboth DW, Nachbaur D, et al. A series of infections due to *Capnocytophaga* spp. in immunosuppressed and immunocompetent patients. *Clin Microbiol Infect* 2003; 9:380-387.
- Bradford PA. Extended-spectrum -lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. *Clin Microbiol Rev* 2001;14:933-951.
- Brenner DJ, et al. *Capnocytophaga canimorsus* sp. nov. a cause of septicemia following dog bite, and *C. cynodegmi* sp. nov., a cause of localized wound infection following dog bite, *J Clin Microbiol* 1989;27:231.
- Campbell JR, Edwards MS. *Capnocytophaga* species infections in children. *Pediatr Infect Dis J* 1991;10:944-948.
- Ciantar M, et al. *Capnocytophaga* spp. in periodontitis patients manifesting diabetes mellitus. *J Periodontol* 2005;76:194.
- Colombo AP, et al. Clinical and microbiological features of refractory periodontitis subjects, *J Clin Periodontol* 1998;25:169.
- Desai SS, et al. *Capnocytophaga ochracea* causing severe sepsis and purpura fulminans in an immunocompetent patient. *J Infect* 1998;54:e107.
- Duong M, et al. Vertebral osteomyelitis due to *Capnocytophaga* species in immunocompromised patients: report of two cases and review. *Clin Infect Dis* 1996;22:1099.
- Dzink JL, et al. The predominant cultivable microbiota of active and inactive lesions of destructive periodontal diseases-disease, *J Clin Periodontol* 1988;15:316.
- Ehrmann E, Handal T, Tamanai-Shacoori Z, Bonnaure-Mallet M, Fosse T. High prevalence of β -lactam and macrolide resistance genes in human oral *Capnocytophaga* species. *J Antimicrobial Chemother* 2014;69:381-384.

- Frandsen EV, et al. Enzymatic and antigenic characterization of immunoglobulin A1 proteases from *Bacteroides* and *Capnocytophaga* spp, Infect Immun 1987;55:631.
- Frandsen EV, et al. Diversity of *Capnocytophaga* species in children and description of *Capnocytophaga leadbetteri* sp. nov. and *Capnocytophaga* genospecies AHN8471. Int J Syst Evol Microbiol 2008;58:324.
- Frandsen EV, et al. Enzymatic and antigenic characterization of immunoglobulin A1 proteases from *Bacteroides* and *Capnocytophaga* spp, Infect. Immun 1987;55:631.
- Garcia-Cia JI, Esteban J, Santos-O'Connor F, Román A, Soriano F. Mixed bacteremia with *Capnocytophaga sputigena* and *Escherichia coli* following bone marrow transplantation: Case report and review. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2004;23:139-141.
- Goudreau E, Comtois R, Bayardelle P, et al. *Capnocytophaga ochracea* and group F beta-hemolytic *Streptococcus* suppurative thyroiditis. J Otolaryngol 1986;15:59-61.
- Guiney DG, Bouic K. Detection of conjugal transfer systems in oral, black-pigmented *Bacteroides* spp. J Bacteriol 1990;23:495-497.
- Gusberti FA, Mombelli A, Lang NP, Minder CE. Changes in subgingival microbiota during puberty. A 4-year longitudinal study. J Clin Periodontol 1990;17:685-692.
- Gutierrez-Martin MA, et al. Aortic valve endocarditis by *Capnocytophaga haemolytica*. Ann Thorac Surg 2007;84:1008.
- Handal T, Giraud-Morin C, Caugant DA, et al. 2005. Chromosome- and plasmid-encoded beta-lactamases in *Capnocytophaga* spp. Antimicrob Agents Chemother 49:3940-3943.
- Hayashi F, et al. PCR detection of *Capnocytophaga* species on dental plaque samples from children aged 2 to 12 years. Microbiol Immunol 2001;45:17.
- Holt SC, Kinder SA. Genus II. *Capnocytophaga*. In Staley, J.T. et al. (Editors). Bergy's Manual of Systematic Bacteriology, 1989 vol. 3, pp. 2050.
- Irving JT, et al. Histological changes in experimental periodontal disease in rats mono-infected with gram-negative organisms. J Periodontal Res 1978;13:326.
- Jolivet-Gougeon A, Tamanai-Shacoori Z, Desbordes L, et al. Genetic analysis of an amber class A extended-spectrum beta-lactamase from *Capnocytophaga ochracea*. J Clin Microbiol 2004;42:888-890.
- Jolivet-Gougeon A, et al. Antimicrobial treatment of *Capnocytophaga* infections. International J Antimicrobial Agents 2007;29:367-373.
- Jones RN. Important and emerging β -lactamase-mediated resistances in hospital-based pathogens: the amp c enzymes. Diagn Microbiol Infect Dis 1998;31:461-466.
- Ishihara K, Inagaki S, Saito A. Molecular Detection of Human Bacterial Pathogens, 2007. CRC Press, Florida, Yhdysvallat.
- Khwaja KJ, et al. Protein profiles of *Capnocytophaga* species. J Appl Bacteriol 1990;68:385.

- Kim SJ, Kato T, Naito Y, et al. B-cell mitogenecity and IL-1 beta production of lipopolysaccharides from various *Capnocytophaga* strains. Bull Tokyo Dent Coll 1994;35:79-83.
- Kliebe C, Nies BA, Meyer JF, et al. Evolution of plasmid-coded resistance to broad-spectrum cephalosporins. Antimicrob Agents Chemother 1985;28:302-307.
- Kobayashi N, et al. Colonization pattern of periodontal bacteria in Japanese children and their mothers. J Periodontal Res 2008;43:156.
- Kristiansen JE, et al. Rapid identification of *Capnocytophaga* isolated from septicemic patients. Eur J Clin Microbiol 1984;3:236.
- Kumar PS, et al. New bacterial species associated with chronic periodontitis. J Dent Res 2003;82:338.
- Laughon BE, et al. API ZYM system for identification of *Bacteroides* spp., *Capnocytophaga*., and spirochetes of oral origin. J Clin Microbiol 1982;15:97.
- Leadbetter ER, et al. *Capnocytophaga*: New genus of gramnegative gliding bacteria. I. General characteristics, taxonomix considerations and significance. Arch Microbiol 1979; 122:9.
- Livermore DM. Beta-lactamases in laboratory and clinical resistance. Clin Microbiol Rev 1995;8:557-584.
- Luc J, Mroz C, Roques C, et al. Activité bactéricide de bains de bouche contenant 0, 10%, 0, 12% et 0, 20% de digluconate de chlorhexidine. J Parodontol Implantol Orale 1998; 17:441-446.
- Mantadakis E, et al. *Capnocytophaga gingivalis* bacteremia detected only on quantative blood cultures in a child with leukemia. Pediatr Infect Dis J 2003;22:202.
- Mashimo PA, et al. Selective recovery of oral *Capnocytophaga* spp. with sheep blood agar containing bacitracin and polymyxin B. J Clin Microbiol 1983;17:187.
- Matsumoto T, et al. First case of bacteremia due to chromosome-encoded CfxA3-beta-lactamase-producing *Capnocytophaga sputigena* in a pediatric patient with acute erythroblastic leukemia. Eur J Med Res 2008;13:133.
- Moore WE, Moore LV. The bacteria of periodontal diseases. Periodontol 2000 1994;5:66.
- Morrison L, Zembower TR. Antimicrobial resistance. Gastrointest Endosc Clin N Am 2020;30:619-635.
- National Center for Biotechnology Information. 2023. PubChem Compound Summary for CID 6436140, Nitrocefin. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Nitrocefin>.
- Newman MG, et al. Studies of microbiology of periodontosis. J Periodontol 1976;47:373.
- Ochiai K, et al. Purification of immunosuppressive factor from *Capnocytophaga ochracea*. J Med Microbiol 1998;47:1087.
- Parenti DM, Snyderman DR. *Capnocytophaga* species: infections in non immunocompromised and immunocompromised hosts. J Infect Dis 1987;151:140-147.

- Paster BJ, et al. Bacterial diversity in human subgingival plaque. *J Bacteriol* 2001;183:3770.
- Popęda M, Płuciennik E, Bednarek AK. Proteins in cancer resistance. *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej* 2014;68:616–632.
- Rosenman JR, Reynolds JK, Kleiman MB. *Capnocytophaga canimorsus* meningitis in a newborn: an avoidable infection. *Pediatr Infect Dis J* 2003;22:204-205.
- Roscoe DL, Zemcov SJ, Thornber D, Wise R, Clarke AM. Antimicrobial susceptibilities and β -lactamase characterization of *Capnocytophaga* species. *Antimicrob Agents Chemother* 1992; 36:2197-2200.
- Saadaoui M, Singh P, Al Khodor S. Oral microbiome and pregnancy: A bidirectional relationship. *J Reprod Immunol* 2021;145:103293.
- Sabbatani S, Manfredi R, Frank G, et al. *Capnocytophaga* spp. brain abscess in an immunocompetent host: problems in antimicrobial chemotherapy and literature review. *J Chemother* 2004;16:497-501.
- Sandoe JA. *Capnocytophaga canimorsus* endocarditis. *J Med Microbiol* 2004;53:245-248.
- Singh V. Microbial pathogens and strategies for combating them: Science, technology and education. Formatex Research Center. *Antimicrobial resistance* 2013;1:291-296.
- Sixou JL, Aubry-Leuliette A, De Medeiros-Battista O, et al. *Capnocytophaga* in the dental plaque on immunocompromised children with cancer. *Int J Paediatr Dent* 2006;16:75-80.
- Stefanopoulos PK, Tarantzopoulou AD. Facial bite wounds: management update. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2005;34:464-472.
- Suido, H. et al. Arylaminopeptidase activities of oral bacteria. *J Dent Res* 1986;65:1335.
- Suido, H. et al. Identification of periodontopathic bacteria based upon their peptidase activities. *Adv Dent Res* 1988;2:304.
- Suzuki M, Imaoka K, Kimura M, Morikawa S, Maeda K. *Capnocytophaga catalasegens* sp. nov., isolated from feline oral cavities. *Int J Syst Evol Microbiol* 2023;73:5731.
- Suzuki M, Umeda K, Kimura M, Imaoka K, Morikawa S, Maeda K. *Capnocytophaga felis* sp. nov. isolated from the feline oral cavity. *Int J Syst Evol Microbiol* 2020;70:3355-3360.
- Tanwar J, Das S, Fatima Z, Hameed S. Multidrug resistance: an emerging crisis. *Interdiscip Perspect Infect Dis* 2014:2014;541340.
- Vandamme, P. et al. Polyphasic analysis of strains of the genus *Capnocytophaga* and Centers for disease Control group DF-3. *Int J Syst Bacteriol* 1996;46:782.
- Wade WG, Addy M. In vitro activity of chlorhexidine-containing mouthwash against subgingival bacteria. *J Periodontol* 1989;60:521-525.
- Walker CB, Bueno LC. Antibiotic resistance in an oral isolate of *Prevotella intermedia*. *Clin Infect Dis* 1997;25: 281-283.

Wilke MS, Lovering AL, Strynadka NC. β -Lactam antibiotic resistance: a current structural perspective. *Curr Opin Microbiol* 2005; 8:525-533.

Wilson ME, Jonak-Urbanczyk JT, Bronson PM, et al. *Capnocytophaga* species: increased resistance of clinical isolates to serum bactericidal action. *J Infect Dis* 1989;156:99-106.

Yamamoto, T. et al. *Capnocytophaga haemolytica* sp. nov. and *Capnocytophaga granulosa* sp. nov., from human dental plaque, *Int. J. Syst. Bacteriol* 1994;44:324.

Zhang Y, Qiao D, Shi W, Wu D, Cai M. *Capnocytophaga periodontitidis* sp. nov., isolated from subgingival plaque of periodontitis patient. *Int J Syst Evol Microbiol* 2021;71:4979.