



DATAN ANALYSOINTI, ALUSTAVAT PÄÄTELMÄT JA KÄYTÄNNÖN MERKITYS

JOHANNA MUURINEN, DEPARTMENT OF ANIMAL SCIENCES

PURDUE
UNIVERSITY®

**TEHTÄVÄNI LÄKÄ:SSÄ:
“LÄÄKITYSTIETOJEN ANALYSOINTI JA
VERTAAMINEN HERKKYYSTULOSSIIN
SEKÄ TILOJEN BIOTURVATILANTEeseen”**

3.4.2017-30.5.2018

1. Lääkitystietojen käsittely

- **Excel-tiedostoja, (1 / tila)**

- Tarkastaminen
- Käytetyille lääkkeille lisättiin vaikuttavat aineet

- **Tiedostot vietiin R-ympäristöön**

- Parhaimmillaan data sisälsi yli 300 t. riviä
- Käsittelyä jatkettiin: lääkityskerrat jaettiin 3 kk:n ajanjaksoihin
- → 1 kirjauskerta / ajanjakso/ ikäryhmä/ hoitokoodi/ vaikuttava aine / rivi
- Lukuisia haasteita: Excel ei ole paras mahdollinen työkalu datan käsittelyssä...
- Tulevaisuudessa: datan exportointi tekstitiedostona saattaisi auttaa.

1. Lääkitystietojen käsittely

- **Tilat eri kokoisia**

- Isoilla tiloilla tietenkin enemmän lääkityksiä
- Kansainvälisesti käytössä erilaisia normalisointeja

- **Alkuvaiheessa lääkitykset normalisoitiin eläinmäärään:**

- Esim. rivillä oleva luku 3 (tilalla X 3 emakkoa lääkitty niveltulehdukseen penisilliinillä ajanjaksolla maaliskuu 2017-toukokuu 2017) jaettiin luvulla 108 (tilan X emakoiden määrä)
- Kansainvälisesti tunnetuin normalisointi on "Population Correction Unit" (PCU), yksikkö mg vaikuttavaa ainetta/ kg.
 - PCU:ta käyttämällä olisi ollut vaikeata verrata eri mikrobilääkkeiden käyttöä tilojen kesken

Eläinten määrät sikarekisteristä

Tilat ilmoittavat kuukausittain Sikarekisteriin eläinten määrät:

- Porsas: 3kk ikäinen tai nuorempi
- Lihasika: Yli 3kk, mutta alle 8 kk ikäinen
- Nuori siitossika: Yli 3kk, mutta alle 8 kk ikäinen
- Emakko & Karju: 8kk ikäinen tai vanhempi siitossika

- Tilalla syntyneet porsaas

- Vierotettujen porsaiden määrä kuukaudessa laskettiin vähentämällä ilmoitetuista porsaista K.O. kuukauden aikana syntyneiden porsaiden määrä
- Tästä syystä vierotettujen porsaiden määrä voi hieman heittää

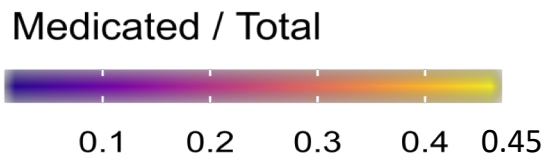
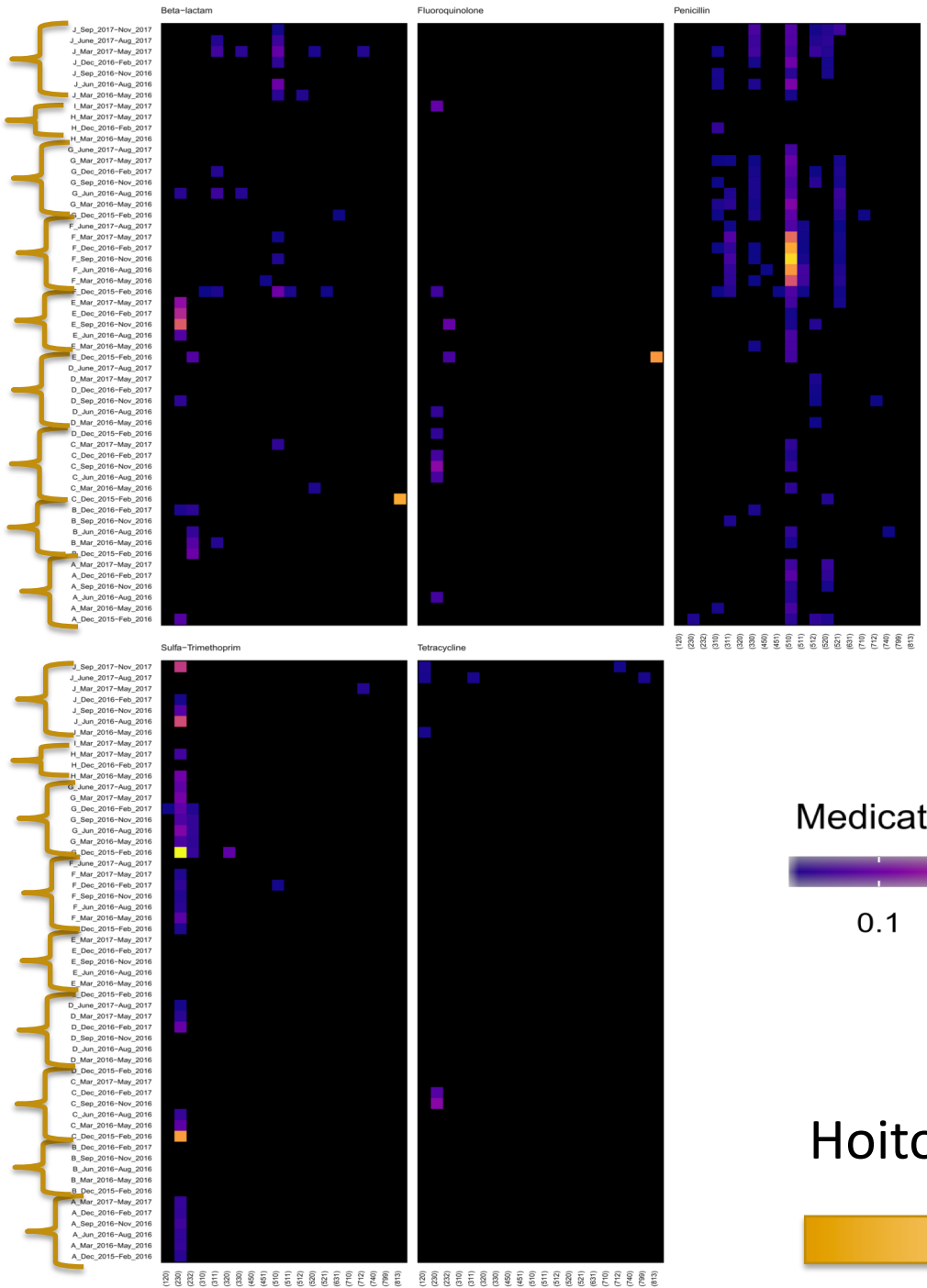


2. LÄÄKITYSTIETOJEN VISUALISOINTI

Pikkuporsaat



Tilat/
3 kk:n
ajanjakso



Hoitokoodit

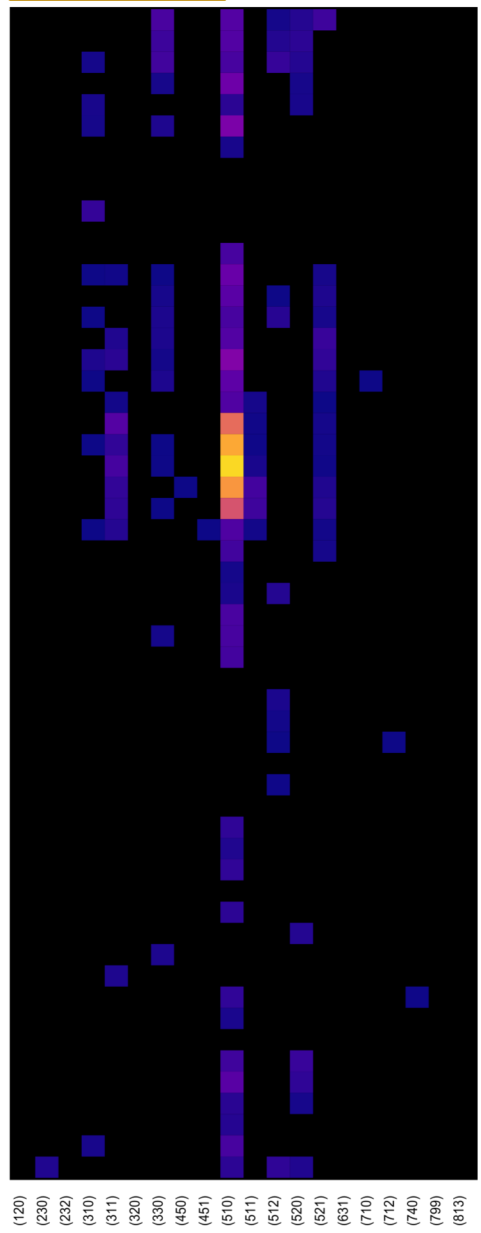
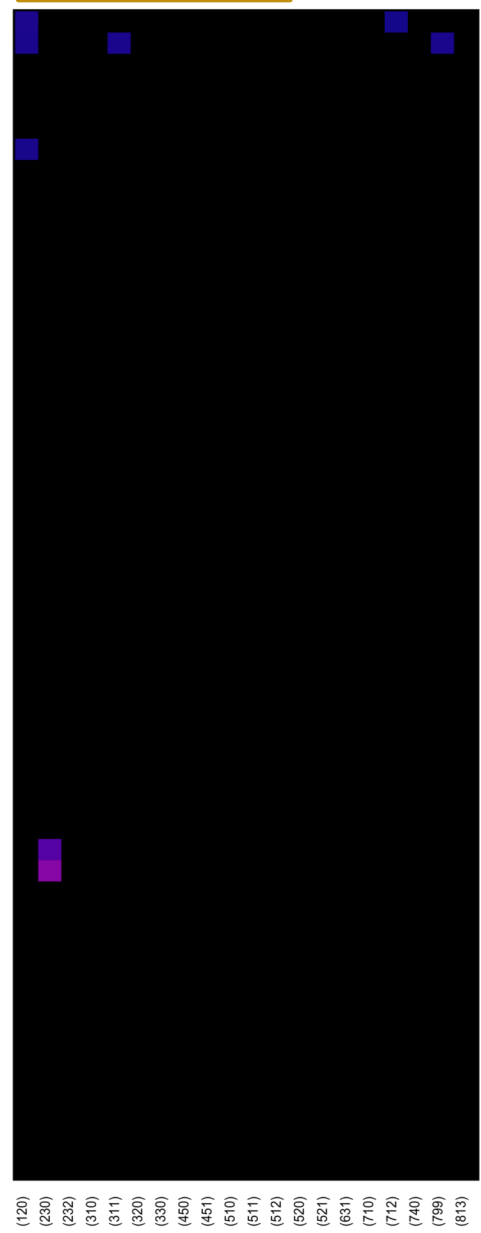
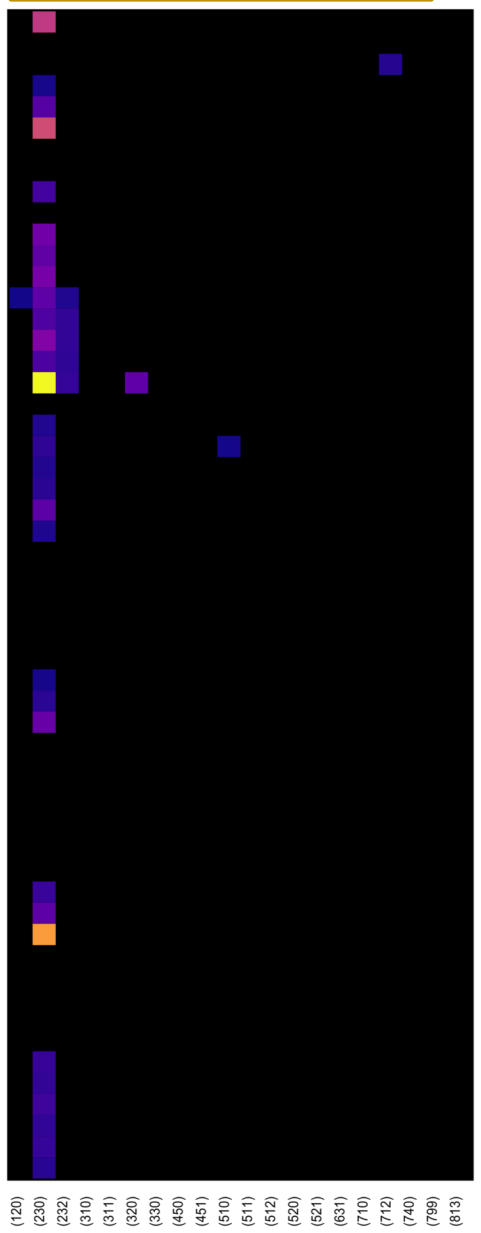


Sulfa-Trimethoprim

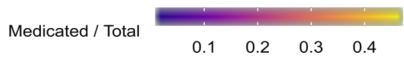
Tetracycline

Penicillin

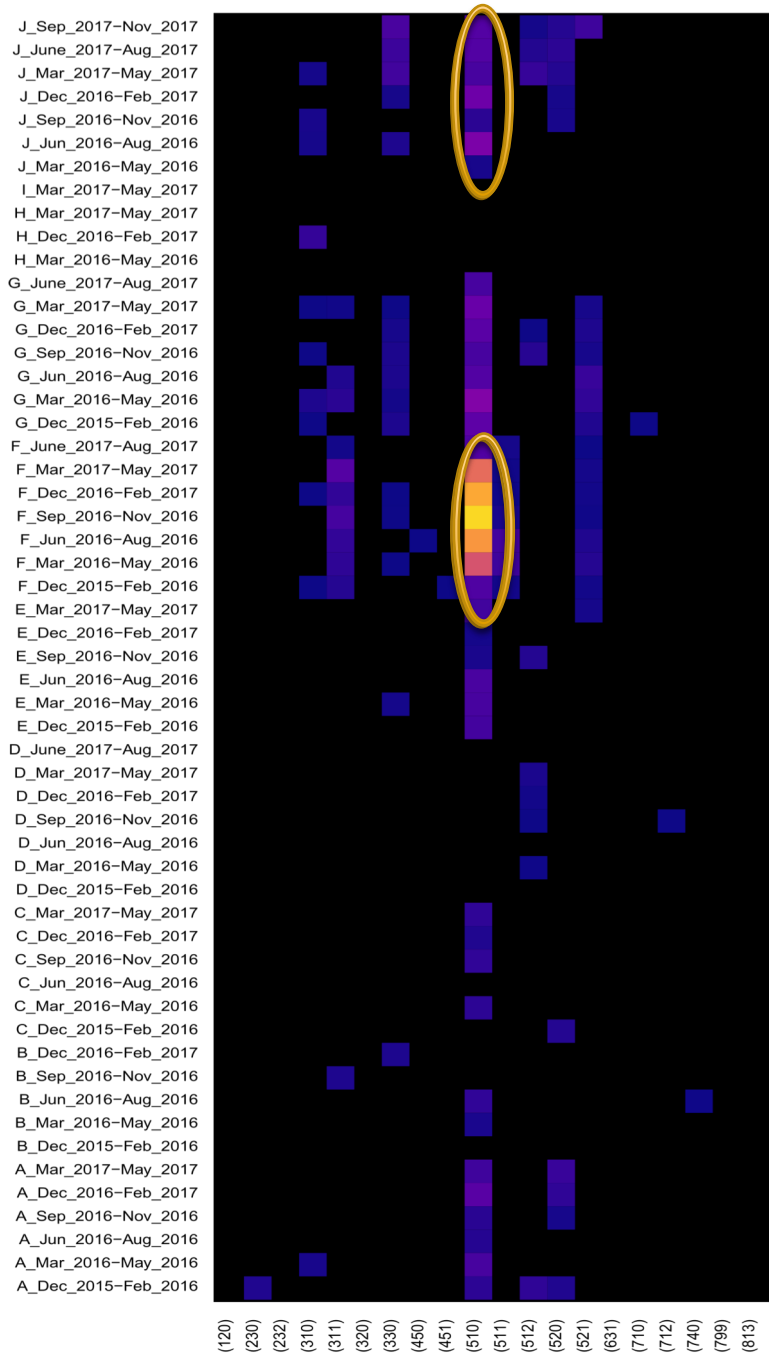
J_Sep_2017–Nov_2017
 J_June_2017–Aug_2017
 J_Mar_2017–May_2017
 J_Dec_2016–Feb_2017
 J_Sep_2016–Nov_2016
 J_Jun_2016–Aug_2016
 J_Mar_2016–May_2016
 I_Mar_2017–May_2017
 H_Mar_2017–May_2017
 H_Dec_2016–Feb_2017
 H_Mar_2016–May_2016
 G_June_2017–Aug_2017
 G_Mar_2017–May_2017
 G_Dec_2016–Feb_2017
 G_Sep_2016–Nov_2016
 G_Jun_2016–Aug_2016
 G_Mar_2016–May_2016
 G_Dec_2015–Feb_2016
 F_June_2017–Aug_2017
 F_Mar_2017–May_2017
 F_Dec_2016–Feb_2017
 F_Sep_2016–Nov_2016
 F_Jun_2016–Aug_2016
 F_Mar_2016–May_2016
 F_Dec_2015–Feb_2016
 E_Mar_2017–May_2017
 E_Dec_2016–Feb_2017
 E_Sep_2016–Nov_2016
 E_Jun_2016–Aug_2016
 E_Mar_2016–May_2016
 E_Dec_2015–Feb_2016
 D_June_2017–Aug_2017
 D_Mar_2017–May_2017
 D_Dec_2016–Feb_2017
 D_Sep_2016–Nov_2016
 D_Jun_2016–Aug_2016
 D_Mar_2016–May_2016
 D_Dec_2015–Feb_2016
 C_Mar_2017–May_2017
 C_Dec_2016–Feb_2017
 C_Sep_2016–Nov_2016
 C_Jun_2016–Aug_2016
 C_Mar_2016–May_2016
 C_Dec_2015–Feb_2016
 B_Dec_2016–Feb_2017
 B_Sep_2016–Nov_2016
 B_Jun_2016–Aug_2016
 B_Mar_2016–May_2016
 B_Dec_2015–Feb_2016
 A_Mar_2017–May_2017
 A_Dec_2016–Feb_2017
 A_Sep_2016–Nov_2016
 A_Jun_2016–Aug_2016
 A_Mar_2016–May_2016
 A_Dec_2015–Feb_2016



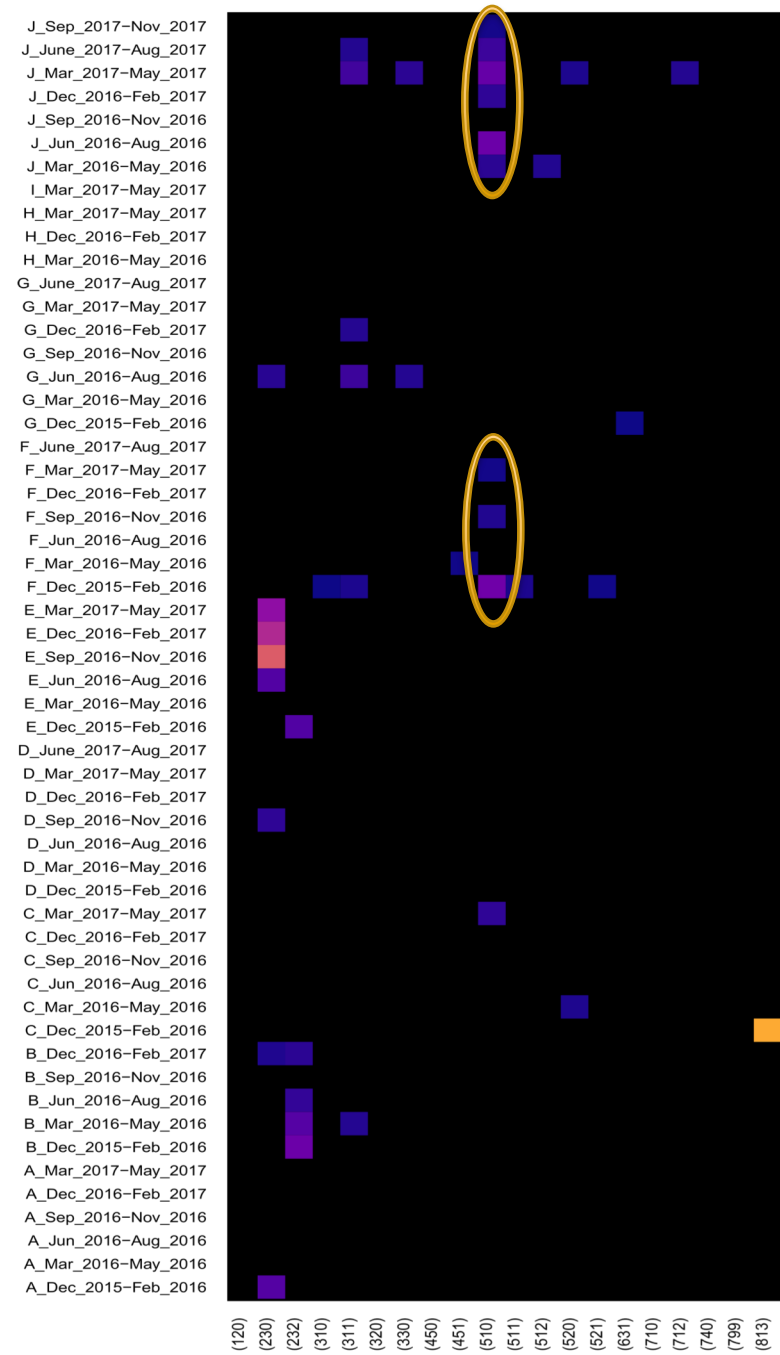
(120) (230) (232) (310) (311) (320) (330) (450) (451) (510) (511) (512) (520) (521) (631) (710) (712) (740) (799) (813)
 (120) (230) (232) (310) (311) (320) (330) (450) (451) (510) (511) (512) (520) (521) (631) (710) (712) (740) (799) (813)
 (120) (230) (232) (310) (311) (320) (330) (450) (451) (510) (511) (512) (520) (521) (631) (710) (712) (740) (799) (813)



Penicillin

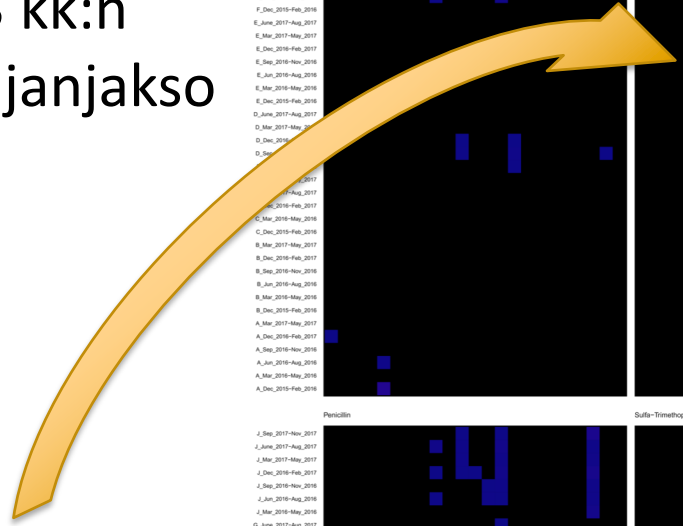


Beta-lactam

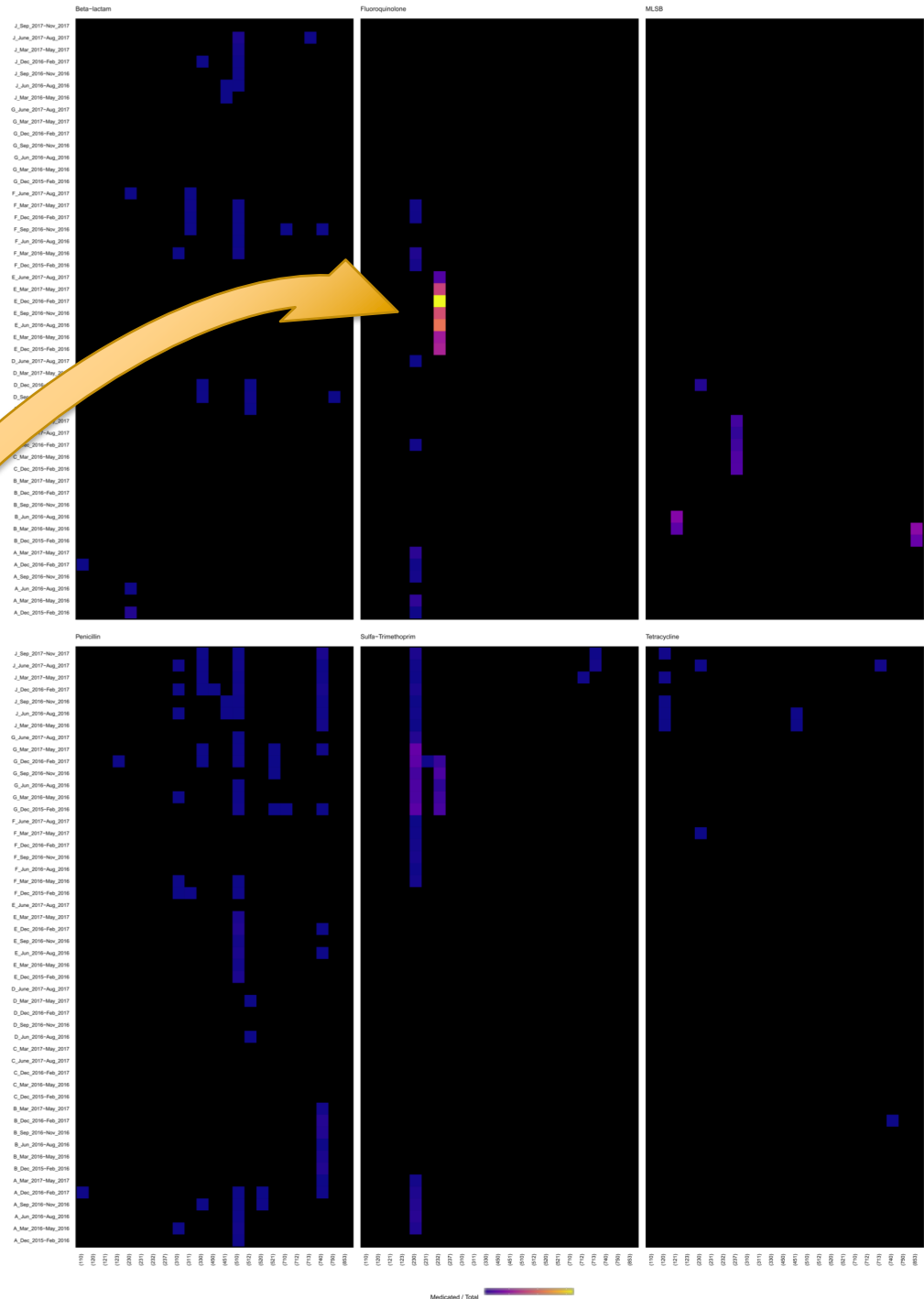




Tilat/
3 kk:n
ajanjakso



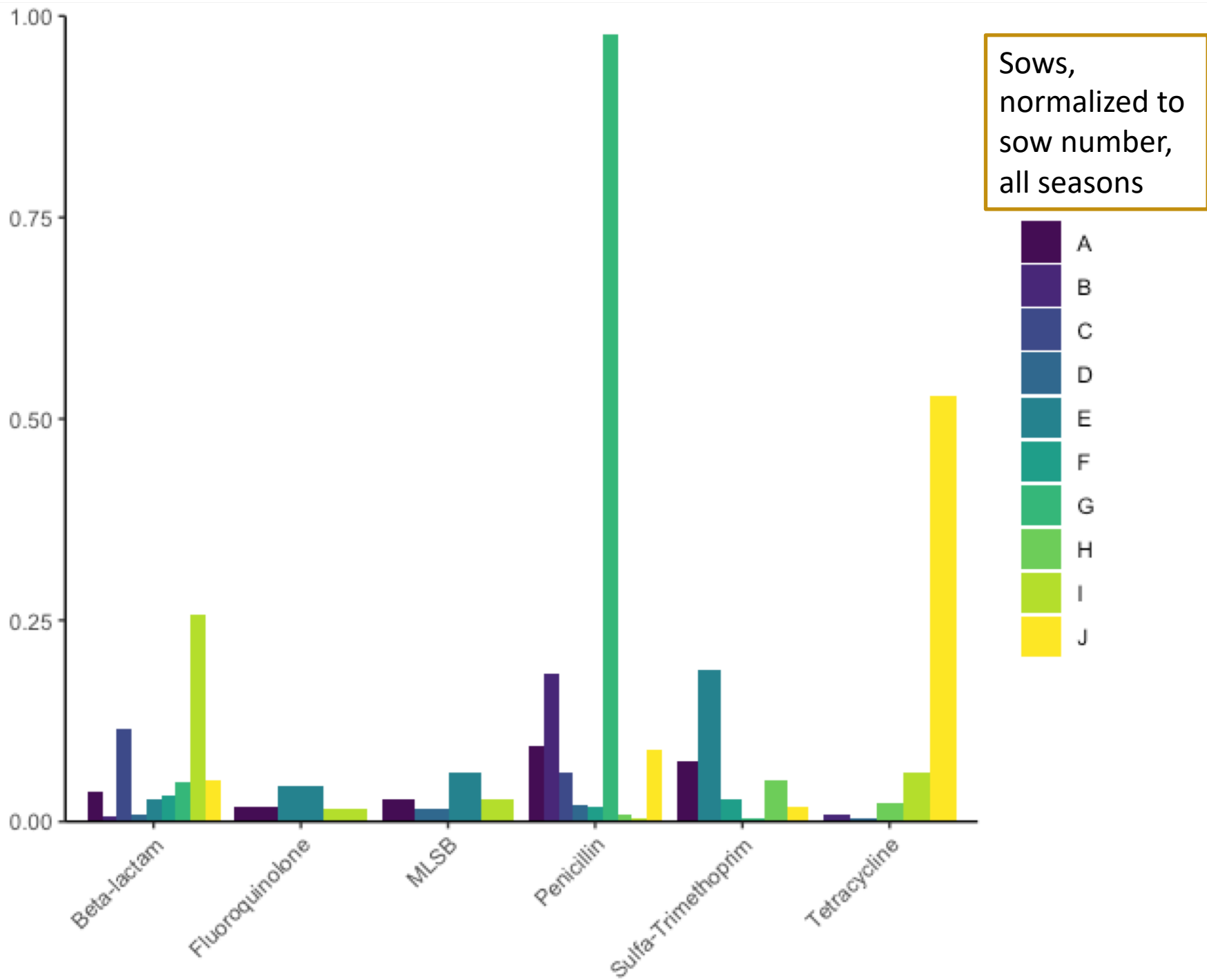
Voi johtua
eläinmäärän
laskutavasta



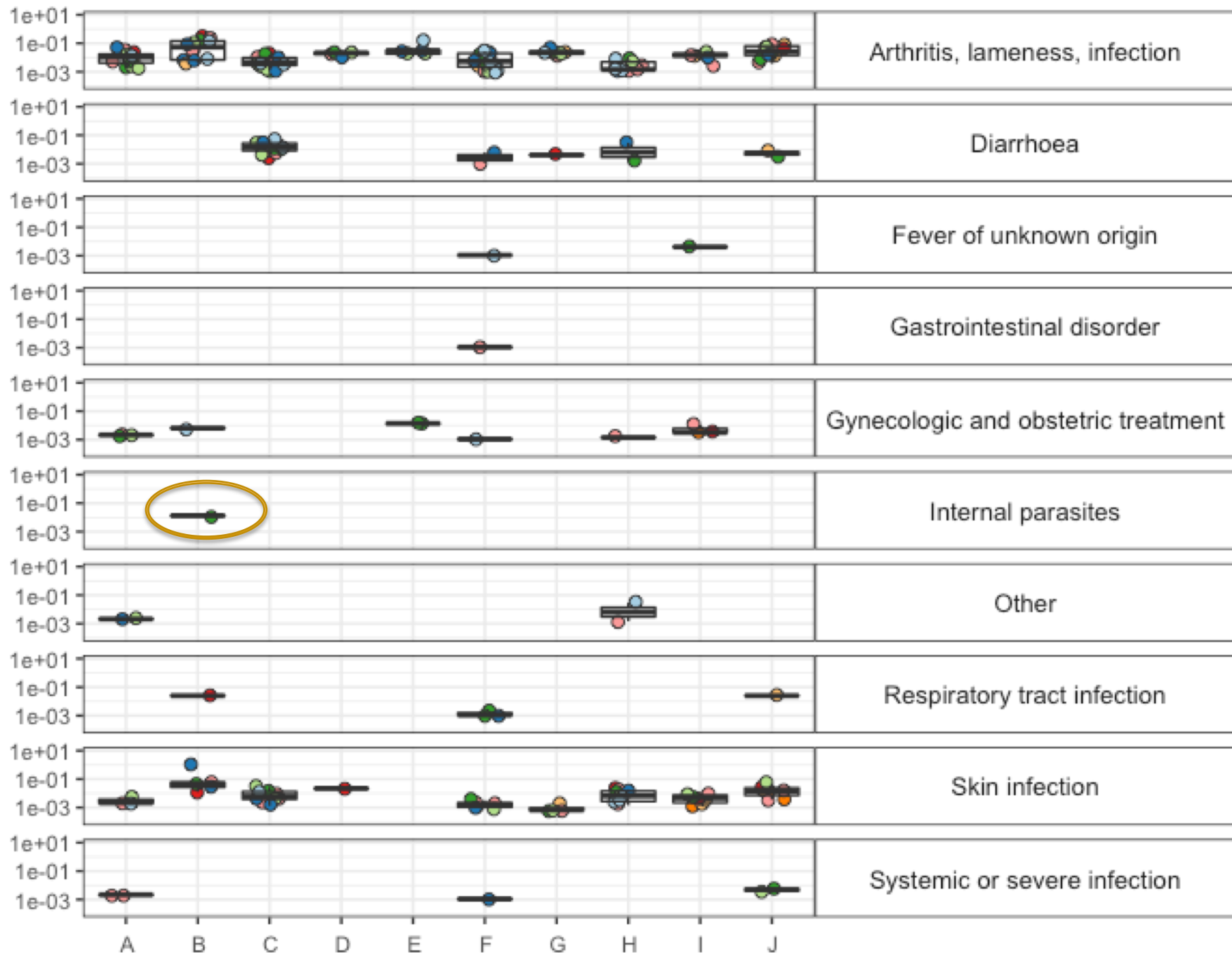
Vierotetut
porsaat

Hoitokoodit



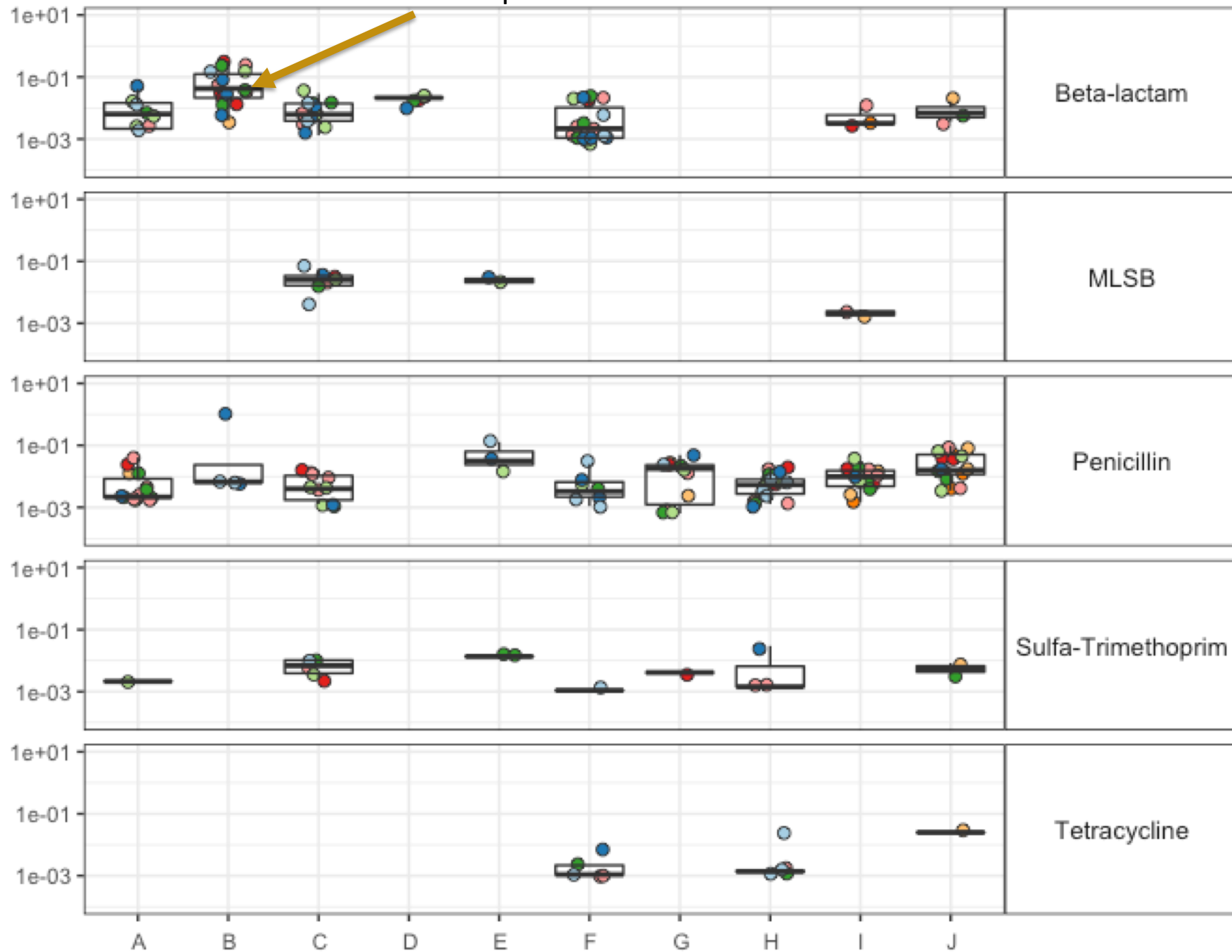


Growers



Growers

Internal parasites



2. Yhteenveto visualisoinnista

- Eniten käytetyt mikrobilääkkeet: Sulfa-Trimetopriimi; Penisilliini ja Fluorokinoloni
- Tavallisimmat hoitokoodit: Suolistotulehdus, ripuli; Nivel tulehdus ja Suolistotulehdus, *E. coli* (vastaavasti)
- Vuodenajoilla ei vaikutusta
- Suolistotulehduksia eniten porsailla, nivel tulehduksia ja ihotulehduksia eniten yli 3 kk ikäisillä
- Korjasin selviä virheitä
- En korjannut niitä mahdollisia virheitä, joista en voinut olla varma että onko väärä koodi vai väärä lääke vai onko todellisuudessa lääkitty juuri näin ja tällä perusteella

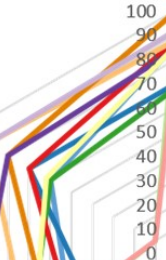
3. Sikava-data ja terveydenhuoltosuunnitelmat

- Suurelta osin lääkevalinnat vastaavat suunnitelmia (esim. hännänpurenta ja ihotulehdukset, niveltulehduksissa kipulääkettä käytetty harvemmin kuin antibioottia)
- Osalla tiloista paljon eri vaikuttavia aineita käytössä
- Osalla tiloista outoja hoitokoodi-laakeyhdistelmiä:
 - Osa varmasti vahinkoja ("lyöntivirheitä")
 - Mutta myös: TILA X: Tulatromysiini ja hoitokoodi "Rokotus muuta hengitystiesairautta vastaan". Kyseessä pitkävaikutteinen lääke, joka annetaan kerta-annos –injektiona, mutta ei ole rokottamista
 - Ja: TILA Z: Tetrasykliiniä käytetty usein emakoille koodilla "Tiinehtymättömyys; kiimavälit normaalit"
- Eläinlääkärit: Hengitystieinfektioiden ohjeistukset hyvin tarkat, suolistotulehdusten ohjeistuksessa parantamisen varaa? (yleisin hoitokoodi tässä aineistossa)

4. Sikava-data ja bioturvallisuus: tilastollisen analysoinnin haasteet

External biosecurity

Purchase of animals and semen



Environment and region

Vermin and bird control

Personnel and visitors

Animal transport, removal of manure and dead animals

Feed, water and equipment supply

- A
- B
- C
- D
- E
- F
- G
- H
- I
- J
- Average

Internal biosecurity

Disease management



Cleaning and disinfection

Separation of compartment

In fattening unit

On farrowing and suckling period

In nursery unit

Figure: Leena Seppä-Lassila



4. Sikava-data ja bioturvallisuus: tilastollisen analysoinnin haasteet

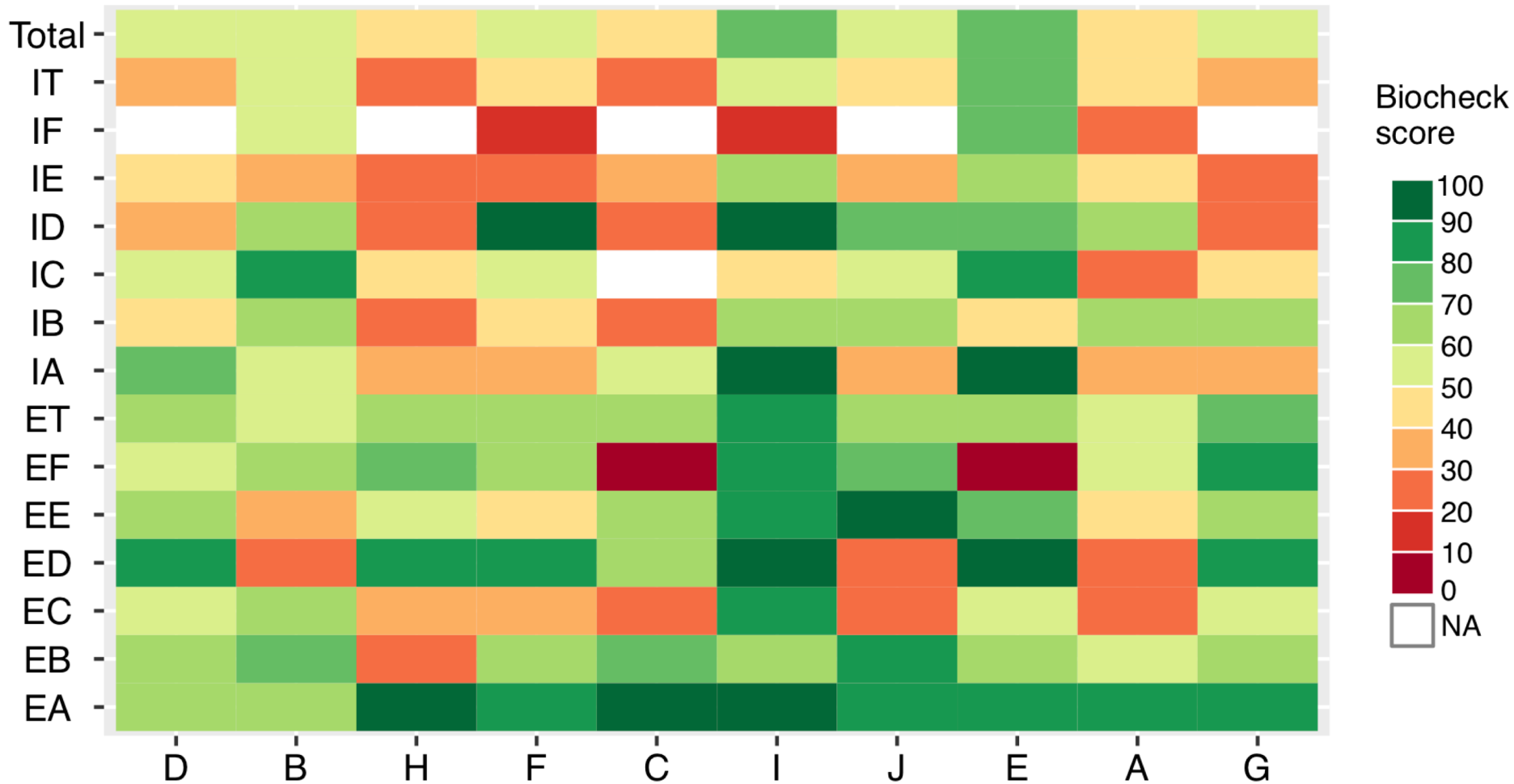
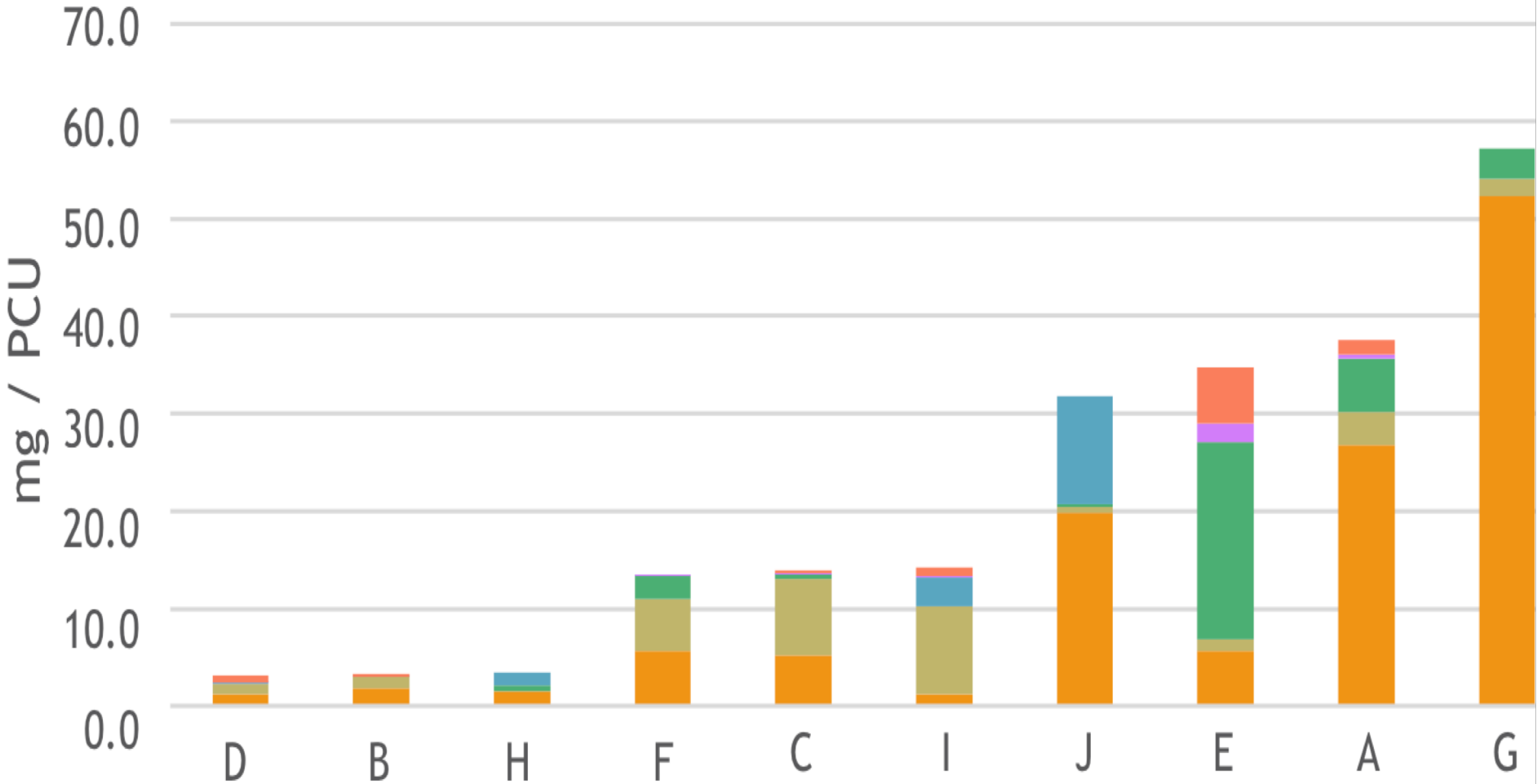
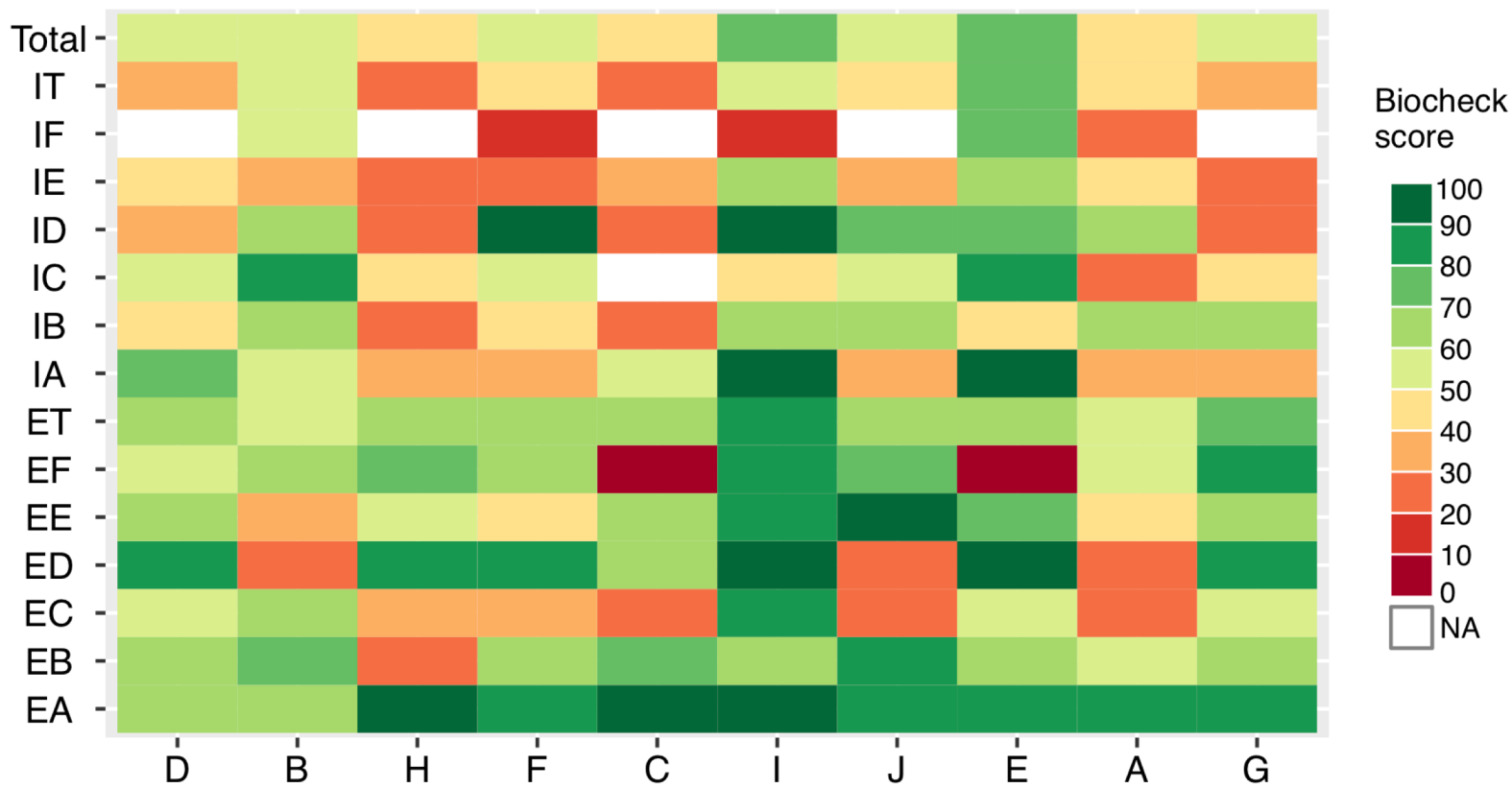
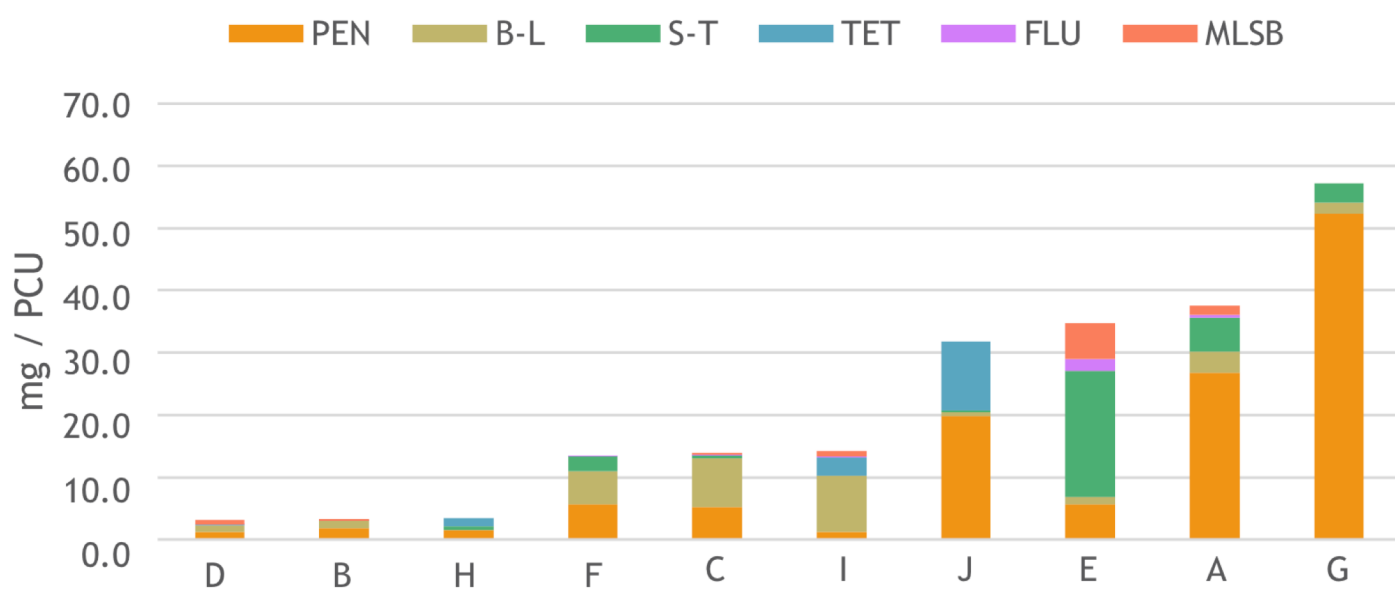


Figure: Jinhyeon Yun

All farms & Antimicrobials

PEN B-L S-T TET FLU MLSB







MIKROBILÄÄKERESISTENSSI

GOV.UK:
GLOBAL

**A failure to address the problem of
antibiotic resistance could result in:**

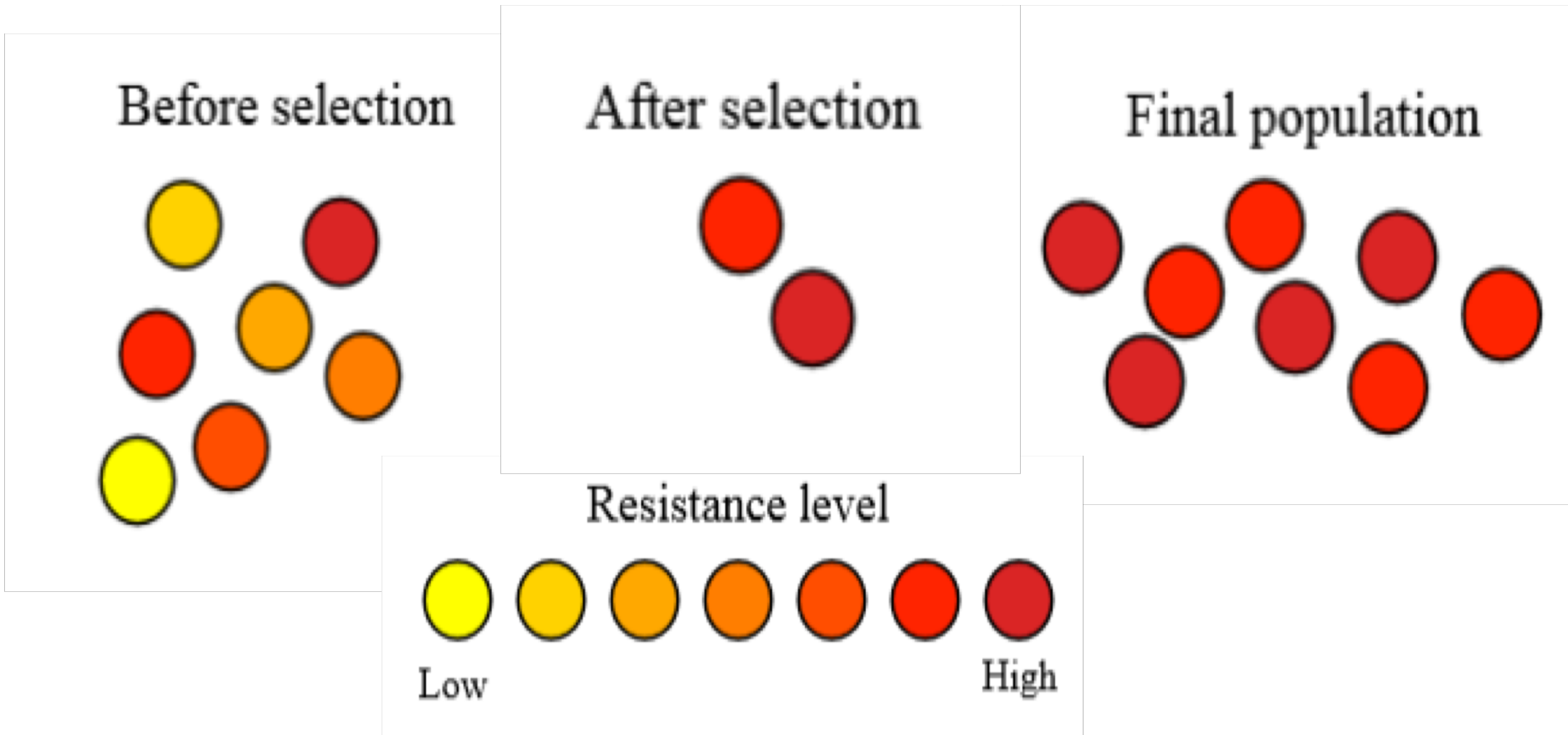


**10m
deaths
by 2050**

<https://www.gov.uk/government/publications/health-matters-antimicrobial-resistance/health-matters-antimicrobial-resistance>

O'Neill J. Review on Antimicrobial Resistance Antimicrobial Resistance: Tackling a crisis for the health and wealth of nations. London: Review on Antimicrobial Resistance; 2014. Available at: https://amr-review.org/sites/default/files/AMR%20Review%20Paper%20-%20Tackling%20a%20crisis%20for%20the%20health%20and%20wealth%20of%20nations_1.pdf

Resistenssin valikoituminen mikrobiääkkeiden käytön seurauksena



https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Antibiotic_resistance.svg



5. Resistenssilöydösten analysointi

Kertauksena:

- Tiloilta otettiin ulostenäytteitä kahdesta ryhmästä eläimiä
 - Lääkityistä porsaista (Group 1)
 - (Tosin, kaikilla tiloilla tämän ryhmän porsaita ei lääkitty)
 - Porsaista joita ei ollut lääkitty (Group 2)
 - (Nämä pidettiin erillään tilan muista eläimistä)
- Näytteet otettiin kun eläimet olivat 5 viikon ja 22 viikon ikäisiä
- Näytteistä eristettiin *E. coli* –bakteereita, joille tehtiin herkkyysmääritykset
- Tarkoituksena oli selvittää, lisääkö mikrobilääkkeiden käyttö indikaattoribakteerien resistenssiä, tai onko mahdollista tunnistaa jokin muu selittävä tekijä

Herd	Antimicrobials used in “medicated group” (Group1)	
	Before the 1 st sampling	Between the 1 st and 2 nd sampling
A	Penicillin	
C	MLSB	
D	MLSB	
E		
F	Penicillin	
G	Sulfa-Trimethoprim, Beta-lactam	
H		Sulfa-Trimethoprim, Beta-lactam
I	Fluoroquinolone	Fluoroquinolone
J	Penicillin	

Tulokset

Tila selittää 18 % varianssista, lääkitys 3 %, ryhmäjako 0,4% ja näytteenottoaika selittää 4 % .

	Tested variables	R ²	P-value
Effect of farm, medication, group and sampling time	Farm	0.18	<0.001
	Medication	0.03	<0.001
	Group	0.004	<0.05
	Sampling time	0.04	<0.001

74,6% varianssista jää selittämättä Tämä on melko tavallista ekologiassa.

Tuloksista ei kuitenkaan voi päätellä että mikrobilakkeiden käyttö ei lisäisi resistenssiä!

Sen sijaan on todennäköistä, että tilojen mikrobilääkkeiden käyttöhistoria selittää resistenssiä ja samankaltainen oli EFFORT-projektin löydös:

ARTICLES

<https://doi.org/10.1038/s41564-018-0192-9>

nature
microbiology

Corrected: Author Correction

Abundance and diversity of the faecal resistome in slaughter pigs and broilers in nine European countries

Patrick Munk¹, Berith Elkær Knudsen¹, Oksana Lukjancen¹, Ana Sofia Ribeiro Duarte¹, Liese Van Gompel², Roosmarijn E. C. Luiken², Lidwien A. M. Smit², Heike Schmitt², Alejandro Dorado Garcia², Rasmus Borup Hansen³, Thomas Nordahl Petersen¹, Alex Bossers^{2,4}, Etienne Ruppé⁵, EFFORT Group⁶, Ole Lund¹, Tine Hald¹, Sünje Johanna Pamp¹, Håkan Vigre¹, Dick Heederik², Jaap A. Wagenaar^{4,7}, Dik Mevius^{4,7} and Frank M. Aarestrup^{1*}

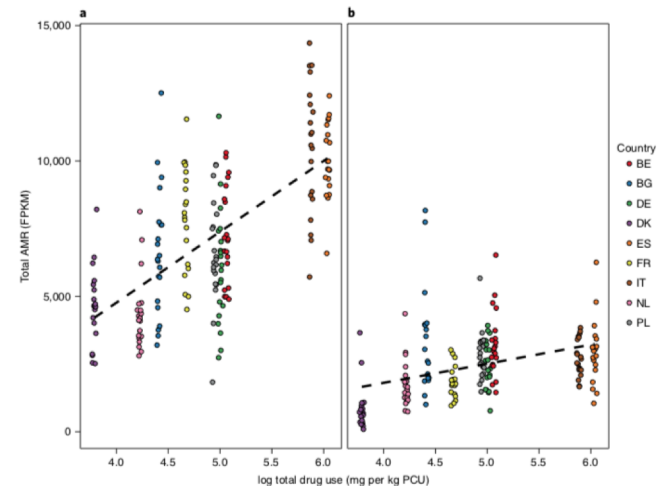
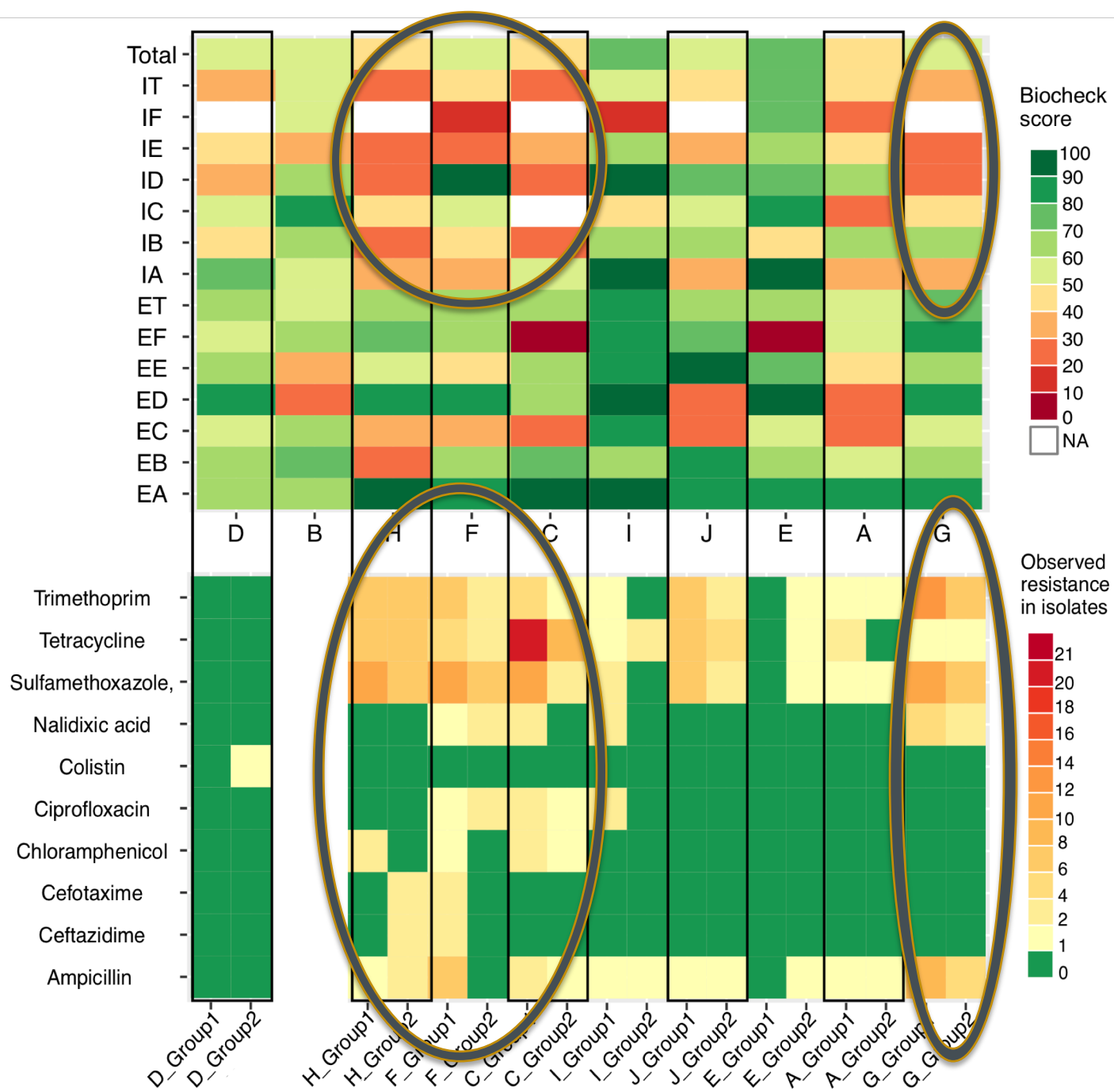


Fig. 6 | National veterinary AMU is associated with total metagenomic AMR. Scatter plots of the average total veterinary AMU (ESVAC) and the pooled sample total AMR. A slight sideways jitter was added to the points to minimize overplotting. **a.** The association between the average veterinary drug use and the total AMR load in pig farms. $n=181$ independent herds. **b.** The association between the average veterinary drug use and the total AMR load in poultry farms. $n=178$ independent herds. See the main text for a description of the trend lines.



Suomessa on asiat hyvin, miksi meidän täytyy vielä puhua antibioottien käytöstä?

Bakteerit eivät tottele valtioiden rajoja, käyttämällä laajakirjoisia antibiootteja valikoidaan moniresistentejä kantoja, joita on mahdollisesti tullut ulkomailta → Nykyinen “tiukka” linja toimii

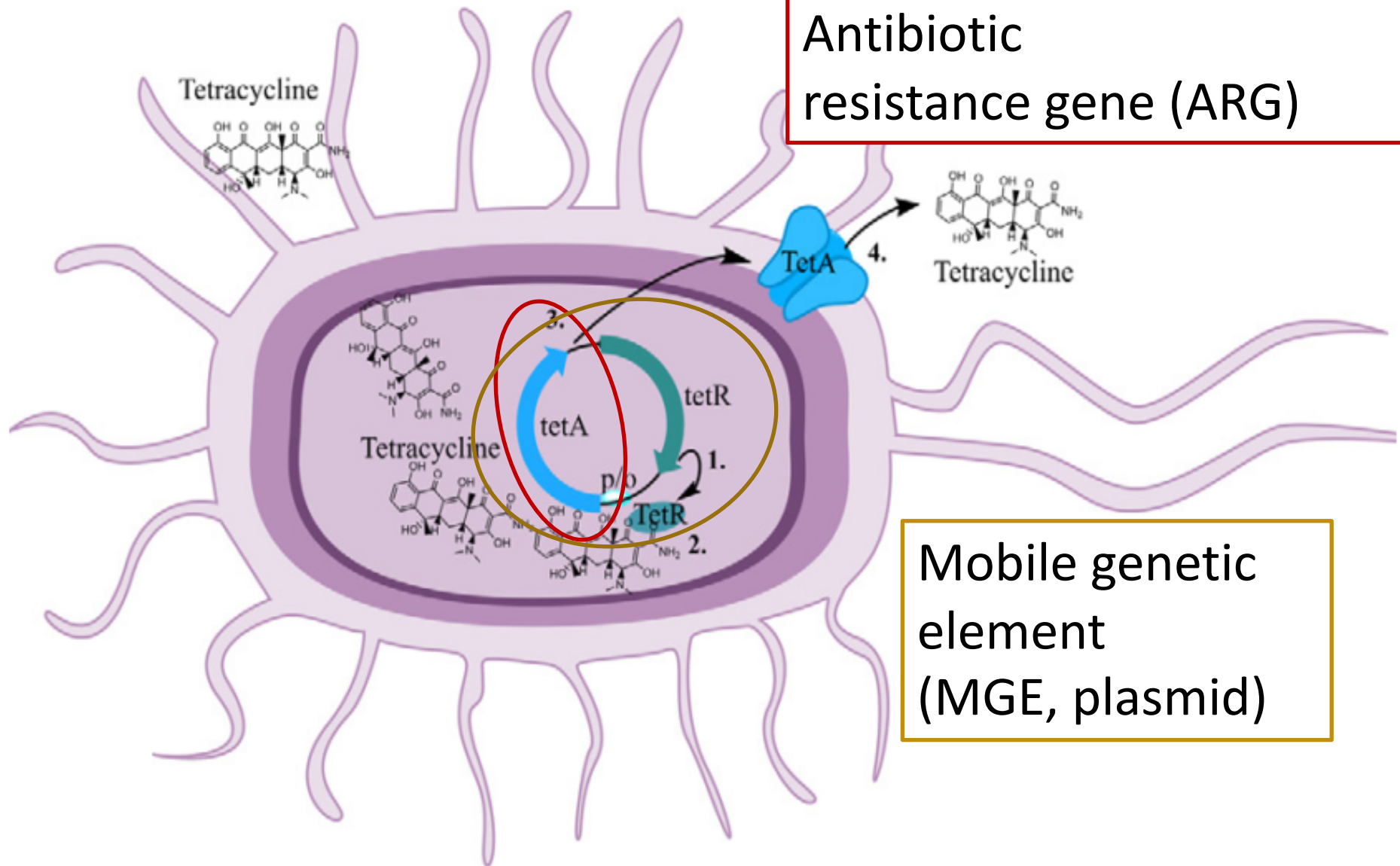
Monissa tutkimuksissa koskien sekä eläimiä että ihmisiä on huomattu, että mikrobilääkkeiden käyttö ei suoraan selitä resistenssiä, jos:

- Käyttö on jo hallitulla tai varsinkin alhaisella tasolla
- On suurempia ongelmia, esim. puutteellinen sanitaatio (Collignon et al., The Lancet Planetary Health: “Anthropological and socioeconomic factors contributing to global antimicrobial resistance: a univariate and multivariable analysis”)
 - Bioturvallisuudella saattaa olla merkitystä, kannattaisi tutkia yhteyttä
 - Ympäristöperäisiä ja eläin- tai ihmisperäisiä bakteereita sekoittamalla mahdollisesti kiihdytetään resistenssin evoluutiota (Gillings & Stokes, 2012), tarkkana esim. kierrätyslannoitteiden kanssa!



ANTIBIOOTTIRESISTENSSI KULKEE GEENIEN MUKANA

Antibiotic
resistance gene (ARG)



Mobile genetic
element
(MGE, plasmid)

Aga, D. S., Lenczewski, M., Snow, D., Muurinen, J., Brett Sallach, J., & Wallace, J. S. (2016). Challenges in the measurement of antibiotics and in evaluating their impacts in agroecosystems: A critical review. *Journal of Environmental Quality*, 45(2), 407–419.
<https://doi.org/10.2134/jeq2015.07.0393>

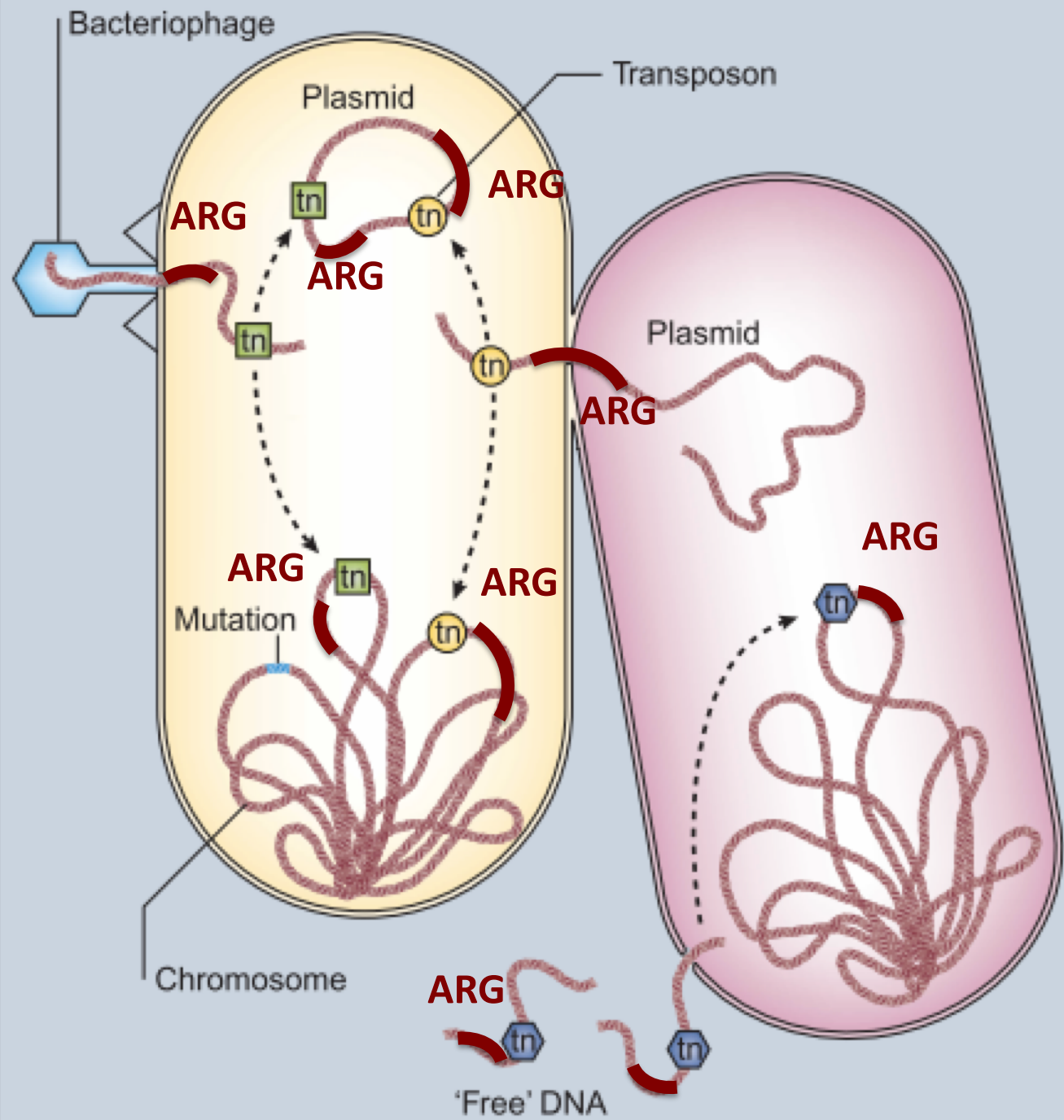
PURDUE
UNIVERSITY®

Pssst! Hey kid! Wanna be a Superbug...?
Stick some of this into your genome...
Even penicillin won't be able to harm you...!



Levy & Marshall:
**Antibacterial
resistance worldwide:
causes, challenges and
responses**

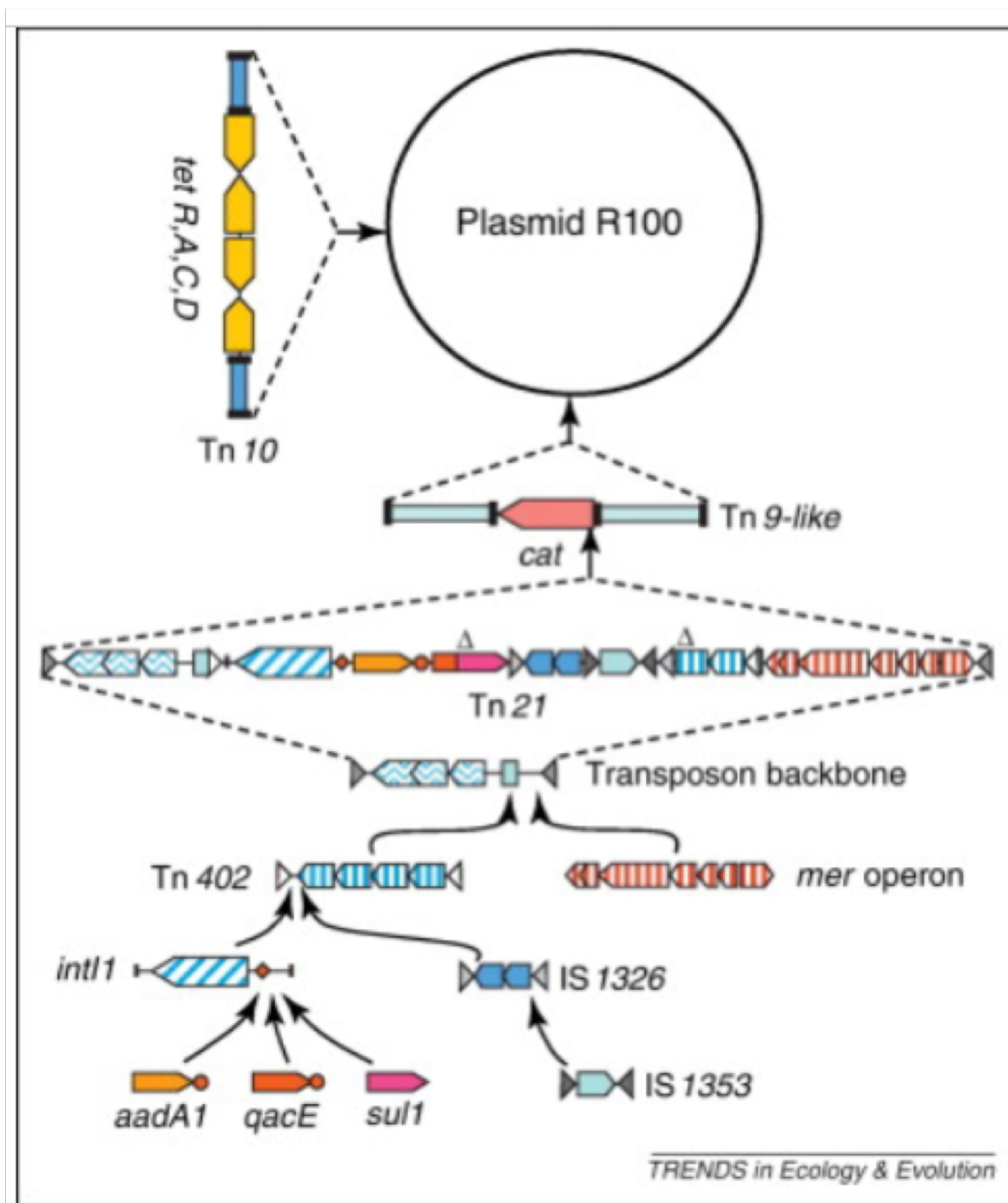
Nature Medicine, 2004
doi:10.1038/nm1145



Gillings and Stokes: Are humans increasing bacterial evolvability?

Plasmid R100 has 8 resistance genes!

Trends in Ecology & Evolution 2012 27, 346-352,
doi:10.1016/j.tree.2012.02.006



Clusters of Antibiotic Resistance Genes Enriched Together Stay Together in Swine Agriculture

Timothy A. Johnson,^{a,b,f} Robert D. Stedtfeld,^{a,c} Qiong Wang,^a James R. Cole,^a Syed A. Hashsham,^{a,c} Torey Looft,^f Yong-Guan Zhu,^{d,e} James M. Tiedje^{a,b}

- Resistenssigeenit esiintyivät genettisissä saarekkeissa
 - Monet eri bakteerit kantoivat resistenssigeenejä, joten ne luultavasti geenit siirtyivät horisontaalisesti bakteereilta toisille

Herkkyytulosten analysointi mikrobiologiasta tutuilla menetelmillä?

Herkkyytulokset pohjimmiltaan kertovat bakteerien geneettisistä ominaisuuksista, vaikka eivät ole geenitietoa

- Isolaatit toimivat ”näytteenä resistenssilanteesta” ja MIC-arvot edustavat näytteen ominaisuuksia aivan kuten geenit eristetyssä DNA:ssa

	A_Group1	A_Group2	C_Group1	C_Group2	D_Group1	D_Group2	E_Group1	E_Group2	F_Group1	F_Group1
Ampicillin	1	1	4	2	0	0	0	1	8	8
Ceftazidime	0	0	0	0	0	0	0	0	2	3
Cefotaxime	0	0	0	0	0	0	0	0	2	3
Chloramphen	0	0	3	1	0	0	0	0	1	2
Ciprofloxacin	0	0	3	1	0	0	0	0	1	1
Colistin	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
Nalidixic acid	0	0	3	0	0	0	0	0	1	2
Sulfamethoxa	1	1	12	3	0	0	0	1	12	12
Tetracycline	3	0	21	10	0	0	0	2	8	6
Trimethoprim	1	1	5	1	0	0	0	1	5	7

Alustavat tulokset ovat lupaavia!

Jos ei tarvisikaan aina eristää DNA:ta ja sekvensoida, pääsisivät myös kehittyvät maat mukaan tutkimaan mikrobilaakeresistenssin epidemiologiaa!

- Jatkotutkimuksissa hyödynnetään koneoppimista ja avoimen lähdekoodin ohjelmistoja

Kiitos työkavereille ja koko LÄKÄ-tiimille!

YEAH, I KEEP TO MYSELF.

**I LEARNED STATS ON THE MEAN
STREETS OF VIOLATED ASSUMPTIONS
AND LIMITED SAMPLE SIZES. I DON'T
LIKE TO TALK ABOUT IT MUCH.**

**I CAN
WORK
WITH THE
MEANS.**

**BUT I'D
RATHER
PARTY
WITH THE
OUTLIERS.**

150 YEARS OF
GIANT LEAPS[™]

THANK YOU

johanna.muurinen@onehealth.fi

smuurine@purdue.edu

+1 (765) 775-3695

WE ARE PURDUE. WHAT WE MAKE MOVES THE WORLD FORWARD.

PURDUE
UNIVERSITY®