



TAMPEREEN
AMMATTIKORKEAKOULU

**S. AUREUS -KANTOJEN
KEFOKSITIINIKIEKKO-
HERKKYYSMÄÄRITYKSEN VERIFIOINTI**

Heidi Ikäläinen

Jonna Sääsö

Opinnäytetyö
Elokuu 2016
Bioanalytikkokoulutus



TIIVISTELMÄ

Tampereen ammattikorkeakoulu
Bioanalytikkokoulutus
13BIO

IKÄLÄINEN, HEIDI & SÄÄSKÖ, JONNA:

S. aureus -kantojen kefoksitiinikiekkoherkkyysmäärityksen verifiointi

Opinnäytetyö 47 sivua, joista liitteitä 3 sivua
Elokuu 2016

Staphylococcus aureus kuuluu ihon normaaliflooraan, mutta on myös merkittävä taudinaiheuttaja ihmisellä. Viime vuosina bakteerien mikrobilääkeresistenssi on kasvanut merkittävästi kaikkialla maailmassa. Suurella osalla *S.aureus*-kantoja on kehittynyt vastustuskyky penisilliiniryhmän antibiootteja kohtaan. Terveysthuollossa haasteen on kehittänyt erityisesti metisilliiniresistentti *Staphylococcus aureus* eli MRSA. MRSA-tartunnat ovat lisääntyneet viime vuosien aikana nopeasti. Leviämisen estämiseksi mahdolliset infektiotapaukset ja oireettomat MRSA-kantajat on tärkeä havaita nopeasti.

Opinnäytetyön aiheena on *S.aureus*-bakteerikantojen kefoksitiinikiekkoherkkyysmäärityksen verifiointi. Kefoksitiinikiekkoherkkyysmääritys on EUCAST:n standardien mukainen herkkyysmenetelmä, jota tulisi käyttää *S.aureus*-kantojen tunnistamisessa. Opinnäytetyön toimeksiantaja on Fimlab Laboratoriot Oy:n kliinisen mikrobiologian vastuualue. Tarkoituksena on vertailla kefoksitiini- ja oksasilliinikiekkomenetelmää, oksasilliini-E-testiä ja kefoksitiinimaljaa (MRSA-malja). Opinnäytetyön tavoitteena on tuottaa tietoa Fimlab Laboratoriot Oy:lle ja selvittää riittääkö pelkkä kefoksitiinikiekkoherkkyysmääritys *S.aureus*-kantojen diagnostiikassa.

Opinnäytetyö suoritettiin kvantitatiivisena kokeellisena tutkimuksena. Tutkimusta varten analysoitavaksi varattiin 50 potilasnäytettä. Jokainen näyte tutkittiin neljällä eri herkkyysmenetelmällä. Näytteistä 26 kappaletta oli MRSA-positiivisia. Tuloksia käsiteltiin Microsoft Excel-taulukkolaskentaohjelmalla. Vertailuparista kefoksitiini- ja oksasilliinikiekkoherkkyys tuotettiin hajontakaavio ja laskettiin korrelaatio. Mitattuja kiekkoherkkyys-tuloksia verrattiin MRSA-maljan tuloksiin.

Tulosten perusteella kefoksitiinikiekkoherkkyysmenetelmä toimii *S.aureuksen* ja MRSA:n diagnostiikassa herkemmin kuin aiemmin käytössä ollut oksasilliinimenetelmä. Kefoksitiinikiekkoherkkyysmenetelmän tulokset ovat yhteneviä MRSA-maljan tuloksen kanssa.

Asiasanat: *Staphylococcus aureus*, MRSA, kefoksitiini, verifiointi, kiekkoherkkyysmenetelmä

ABSTRACT

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

IKÄLÄINEN, HEIDI & SÄÄSKÖ, JONNA:
Verification of *S.aureus* Strains Using the Cefoxitin Disc Diffusion Method

Bachelor's thesis 47 pages, appendices 3 pages
August 2016

Antimicrobial susceptibility tests are used to determine the antimicrobial resistance of bacteria. Identifying *Staphylococcus aureus* and methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) can be done using the disc diffusion method. Using the disc diffusion method is simple and affordable. Due to the increasing amounts of MRSA-infections, Pirkanmaa Hospital District has been using a combination of three different susceptibility methods for detecting MRSA.

The purpose of this study was to examine if Fimlab Medical Laboratories Ltd could switch from their current detection method to the cefoxitin disc diffusion method. This method is in accordance with the standards set by EUCAST. Existing methods were compared to the cefoxitin disc diffusion method. This study was quantitative and experimental method was employed.

The sample of the study consisted of 50 patient specimens. These patient specimens were selected by Fimlab Medical Laboratories Ltd in year 2015. The research experiments were conducted in the Laboratory of Microbiology of Fimlab Medical Laboratories Ltd during one week. The results were analysed with statistical software.

The results of the experimental section indicate that the cefoxitin disc diffusion method is sufficient on its own for detecting MRSA. Additionally, the results of the cefoxitin disc diffusion method are easier to read than those of the previous methods. The results indicate that Fimlab Laboratories Ltd could transition from their current method to the standardized cefoxitin disc diffusion method.

Key words: *Staphylococcus aureus*, MRSA, cefoxitin, verification, disc diffusion method

SISÄLLYS

1	JOHDANTO.....	5
2	<i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i> JA MRSA.....	7
	2.1 <i>Staphylococcus aureus</i>	7
	2.2 Metisilliiniresistentti <i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA)	8
	2.3 <i>Staphylococcus aureuksen</i> ja MRSA:n rakenne	9
3	<i>STAPHYLOCOCCUS AUREUKSEN</i> LABORATORIODIAGNOSTIIKKA. 12	
	3.1 Näytteenotto ja viljely.....	12
	3.2 <i>Staphylococcus aureuksen</i> tunnistaminen	13
	3.3 MRSA:n toteaminen	14
	3.4 Herkkyysmääritykset	17
	3.4.1 Kiekkoherkkyysmääritys.....	17
	3.4.2 E-testi	19
4	β -LAKTAAMIT	21
	4.1 Kefalosporiinit ja kefoksitiini	21
	4.2 Stafylokokkipenisilliinit.....	22
5	VERIFIOINTI	23
6	TYÖN TARKOITUS JA TAVOITTEET	25
7	MENETELMÄLLISET LÄHTÖKOHDAT	26
8	KOKEELLINEN OSUUS	28
9	TUTKIMUSTULOKSET.....	32
	9.1 Kiekkoherkkyysmenetelmien vertailu	32
	9.2 Tulosten yhteneväisyys menetelmien välillä	33
10	TULOSTEN YHTEENVETO.....	36
11	POHDINTA.....	38
	LÄHTEET.....	41
	LIITTEET	45
	Liite 1. Tulostaulukko	45
	Liite 2. Muutosprosentit	46
	Liite 3. Kefoksitiinin ja oksasilliinin herkkyysarvojen erot kiekkomittauksella.....	47

1 JOHDANTO

Staphylococcus aureus on yksi merkittävimpiä taudinaiheuttajia ihmisillä. Se aiheuttaa monia erilaisia infektioita niin terveille kuin sairaalapotilaillekin. Hankaluuksia terveydenhuollossa aiheuttaa metisilliiniresistentti *Staphylococcus aureus*, eli MRSA. MRSA ei ole vaarallisempi taudinaiheuttajana kuin tavallinen *S.aureuksen* aiheuttama infektio, ongelmana on bakteerin mikrobilääkeresistenssi. (Vuopio-Varkila, Kuusela & Kotilainen 2010, 83, 90.) 2010-luvun alussa Pirkanmaalla MRSA-tartuntoja on ollut jopa kymmenkertainen määrä muuhun Suomeen verrattuna. Vuonna 2011 kaikista MRSA-bakteremi-oista Suomessa 52 % sai alkunsa Pirkanmaalta. (Huttunen & Timonen 2012.)

Herkkyysmääritysten tavoitteena on arvioida, onko tutkittavalla antimikrobilääkkeellä saavutettavissa hyvä hoitovaste tutkittavan mikrobin aiheuttaman infektion hoidossa. Jokaisen mikrobilajin herkkyysmäärittämiseen valitaan tietty ryhmä lääkkeitä, joita suositellaan käytettäväksi kyseisessä infektiossa. (Katila 2004, 357.) Kiekkoherkkyysmenetelmä on yleisimmin käytetty, yksinkertaisin ja edullisin herkkyysmäärittäytapa. Menetelmässä bakteerikantaa levitetään elatusainemaljalle, jolle asetetaan eri lääkkeitä sisältäviä kiekkoja. Bakteri alkaa kasvaa ja samanaikaisesti lääke diffundoitua kiekosta elatusaineeseen. Kiekon ympärille syntyy estorengas, jonka halkaisija on sitä suurempi mitä herkempi bakteerikanta on kyseiselle lääkkeelle. (Carlson & Koskela 2011.)

Opinnäytetyön aihe saatiin keväällä 2015. Aihe on työelämälähtöinen ja sen toimeksiantaja on Fimlab Laboratoriot Oy:n mikrobiologian yksikkö. Opinnäytetyösuunnitelma tehtiin toukokuussa 2015, ja virallinen lupa työlle myönnettiin elokuussa 2015. Opinnäytetyön aloittamishetkellä Fimlabin mikrobiologian laboratorio käytti stafylokokkien herkkyysmäärittäyksissä ja MRSA:n seulonnassa oksasilliinikiekkoa ja kefoksitiinimaljaa, eli MRSA-maljaa. Kahden eri antibiootin ja määritysmenetelmän käyttöön oli päädytty lähinnä MRSA-tartuntojen määrän takia.

EUCAST (The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) on kolmen järjestön muodostama komitea, jonka yhtenä päätehtävänä on yhdistää antibioottil herkkyysrajoja eri Euroopan maiden kesken (EUCAST). Aiemmin Suomessa toimittiin FiRe:n (Finnish study group for antimicrobial resistance eli Suomalainen mikrobilääkeresistenssin tutkimusryhmä) standardin mukaan, mutta EUCAST-standardiin siirryttiin

vuonna 2011. EUCASTin standardin mukaan kefoksitiini on suositeltavin antibiootti kiekkotestaukseen, sillä se on herkkä ja spesifinen *mecA*-välitteisen metisilliiniresistenssin havaitsemiseen. Näin ollen oksasilliinin käytöstä tulisi luopua kiekkotestauksessa.

Tämän opinnäytetyön kokeellisessa osuudessa määritetään rinnakkain bakteerikantojen herkkyyttä kefoksitiini- ja oksasilliinikiekoilla, oksasilliini-E-testillä ja kefoksitiinimaljalla. Tarkoituksena on verifioida kefoksitiinikiekon käyttö, eli osoittaa sen toimivuus Fimlab Laboratoriot Oy:n mikrobiologian laboratoriossa. Tutkimusmateriaaliksi valikoitui 50 kliinisistä näytteistä eristettyä bakteerikantaa. Valitut kannat sekä niiden määrä tulivat suoraan toimeksiantajalta. Näytteiden määrä on riittävä, jotta tutkimuksen luotettavuutta ja toimivuutta voidaan arvioida. Opinnäytetyön tulosten perusteella Fimlab Laboratoriot Oy arvioi, onko kefoksitiinikiekon käyttäminen yksinään riittävä *S.aureuksen* herkkyysmäärittämisessä.

Opinnäytetyön raporttiosuus selvittää *Staphylococcus aureuksen* sekä metisilliiniresistentin *Staphylococcus aureuksen* keskeisimpiä ominaisuuksia ja rakenteita. Laboratoriodiagnostiikassa käydään läpi *S.aureuksen* erotusdiagnostiikkaa muista *Staphylococcus*-bakteereista. Eräs tärkeä osa laboratoriodiagnostiikkaa on myös metisilliiniresistenssin löytyminen. Avaamme raporttiosuudessa työllemme merkitykselliset mikrobilääkkeet β -laktaamit. Opinnäytetyössä raportoidaan kokeellinen osuus, aineiston analysointi sekä tulokset.

2 STAPHYLOCOCCUS AUREUS JA MRSA

Stafylokokit kuuluvat ihon normaaliflooraan, mutta taudinaiheuttajina ne saavat aikaan ihoinfektioita, leikkaus- ja haavainfektioita sekä sepsiksiä. Potilasnäytteitä tutkittaessa stafylokokkien merkitystä voi olla joskus vaikea arvioida, sillä normaaliflooraan kuuluvana niitä löytyy muun muassa kainaloiden alueelta, nenän ja sukupuolielinten limakalvoilta ja korvakäytävistä. (Jonsson & Karhumäki 2005, 143.)

Nykypäivänä antibioottihoitojen ollessa yleisiä, bakteerit kehittävät helposti mikrobilääkeresistenssiä. Näin ollen sairaalamaailmassa yksi merkittävimmistä stafylokokeista on paljon sairaalainfektioita aiheuttava metisilliiniresistentti *Staphylococcus aureus*.

2.1 *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus on muista stafylokokeista poiketen koagulaasipositiivinen stafylokokki. *S.aureus* on tärkeä taudinaiheuttaja niin terveillä ihmisillä kuin vaikeasti sairailta. Ihminen voi muiden stafylokokkien tavoin kantaa *S.aureusta* aika ajoin nenässään, iholla ja toisinaan emättimen tai peräsuolen alueella. Bakteeri leviää iholle tai limakalvoille kosketus- tai aerosolitartuntana. Bakteerin nimi juontuu pesäkkeiden keltaisesta väristä. (Vuopio-Varkila, Kuusela & Kotilainen 2003, 98-99.) *S.aureus* tuottaa karotenoidipigmenttiä nimeltään *staphyloxanthin*, joka muodostaa värin pesäkkeisiin (Levinson 2014, 111). Väriä ei kuitenkaan voida yksinään käyttää tunnistuskriteerinä, sillä väritys voi puuttua ja muutkin stafylokokit voivat muodostaa keltaisia pesäkkeitä. (Vuopio-Varkila, Kuusela & Kotilainen 2003, 98-99.) *S. aureuksen* tarkempaa erotusdiagnoosiikkaa käsitellään luvussa 3.

Merkittävimpiä *S. aureuksen* ominaisuuksia on sen resistenssi penisilliiniryhmän antibioottivalmisteita kohtaan. Suurin osa *S.aureus*-kannoista pystyy tuottamaan β -laktamaasia, joka hajottaa penisilliiniä. Ensimmäiset havainnot penisilliiniresistenssistä tehtiin 1940-luvun alkupuolella, pian sen jälkeen, kun penisilliini oli otettu kliniseen käyttöön. Bakteerin resistenssi metisilliiniä sekä muita β -laktameja (stafylokokkipenisilliinit) kohtaan löydettiin piakkoin metisilliinin käyttöönoton jälkeen Britanniassa. (Peacock 2006,

77.) EUCASTin tulkinnallisten sääntöjen mukaan *S.aureus* on resistentti kaikille β -lakteemeille, mikäli se on resistentti oksasilliinille tai kefoksitiinille.

2.2 Metisilliiniresistentti *Staphylococcus aureus* (MRSA)

Bakteerien resistenssi mikrobilääkkeille on viime vuosien aikana kasvanut merkittävästi kaikkialla maailmassa. Etenkin sairaalapotilaiden kohdalla moniresistentit bakteerit ovat lisääntyneet huolestuttavan paljon. Metisilliiniresistenttejä *Staphylococcus aureus*-kantoja tavattiin maailmalla ensimmäistä kertaa 1960-luvulla. Alkuun tartunnat havaittiin sairaaloissa, mutta myöhemmin 1990-luvulla MRSA-kantoja alkoi esiintyä myös avohoidossa. MRSA-tartunnat ovat lisääntyneet monissa maissa viimeisimpien vuosien aikana nopeasti. Suomessa MRSA-tartuntojen määrä on kasvanut merkittävästi viimeisen kymmenen vuoden aikana. (Vuopio-Varkila, Kuusela & Kotilainen 2003, 102; Jonsson & Karhumäki 2005, 145.)

Pirkanmaan alueella MRSA-ilmaantuvuus on suurinta koko Suomessa. Pirkanmaalla MRSA-tartuntojen määrä oli korkeimmillaan vuonna 2011. Leviämisen ehkäisemiseksi otettiin käyttöön kattava MRSA-seulonta, jossa hyödynnettiin uusia PCR-menetelmiä. Lisäksi henkilökuntaa koulutettiin myös erityisesti parempaan käsihygieniaan. (Huttunen & Timonen 2012.) Vuonna 2015 Pirkanmaan sairaanhoitopiirin alueella todettiin 20 prosenttia vähemmän uusia MRSA-tartuntoja kuin vuonna 2014. MRSA:n ilmaantuvuus laski aiempiin vuosiin verrattuna. Merkittävin lasku uusien MRSA-tapausten määrässä on Tampereen yliopistollisen sairaalan lisäksi Tampereen kaupungin hoitoyksiköissä, lukuun ottamatta Hatanpään sairaalaa. MRSA-verenmyrkytysten ilmaantuvuus laski Pirkanmaalla vuonna 2015 maan keskitasolle ensimmäistä kertaa vuosikymmeneen. (Pirkanmaan sairaanhoitopiiri 2015, 32-35.)

MRSA-tartuntojen leviämisen estämiseksi mahdolliset MRSA-infektiotapaukset ja oireettomat kantajat on tärkeä havaita nopeasti. Erityisesti ulkomailla sairaalahoidossa olleet potilaat voivat kuulua riskiluokkaan. Keski- ja Etelä-Euroopan, Aasian ja Lähi-idän sairaaloissa MRSA-tapauksia on paljon. Ulkomailla matkustaneiden lisäksi MRSA-näytteitä on suositeltavaa ottaa potilailta, joilla on aikaisemmin löytynyt MRSA. Useat sairaalajaksot ja antibioottikuurit altistavat tartunnan saamiselle. Potilaat, joilla todetaan

MRSA-positiivisuus, pidetään kosketuseristyksessä, kunnes heidät voidaan todeta negatiiviseksi MRSA:n suhteen. Potilaalle kerrotaan, mikä hänen sairastamansa tauti on, kuinka se tarttuu ja miksi hänet on eristetty. Leviämisen estämisessä oikeanlainen ohjaus on erityisen tärkeää sekä hyvällä käsihygienialla on keskeinen rooli. Potilaalla on oikeus liikkua ja hänellä saa käydä vierailijoita. Vierailijoille kerrotaan tartunnasta ja siitä, kuinka heidän tulee suojautua, jotta bakteeri ei leviäisi eteenpäin. (Kurki & Pammo 2010, 14-15, 19, 23-24.)

Kolonisaatio eli MRSA-kantajuus tarkoittaa, että henkilö kantaa kyseistä bakteeria esimerkiksi ihollaan, mutta bakteeri ei ole aiheuttanut kantajalleen infektiota. Kantajaksi toteaminen vaatii, että henkilöltä on löydetty MRSA-bakteeri kahdesta viikon välein otetusta näytteestä. Sairaaloissa ja terveydenhuollossa työskentelevät voivat olla myös kantajia bakteerille. Yleensä henkilökunnan kolonisaatio on lyhytaikaista, mutta on mahdollista, että työntekijä jää pitkäaikaiskantajaksi. Altistavia tekijöitä pitkäaikaiselle kantajuudelle ovat ihosairaudet, kuten esimerkiksi atooppinen iho. (Kurki & Pammo 2010, 15, 25.)

2.3 *Staphylococcus aureuksen* ja MRSA:n rakenne

Grampositiivisen *S. aureuksen* soluseinän rakentavat peptidoglykaani ja teikkohapot (Vuopio-Varkila, Kuusela & Kotilainen 2003, 99). Peptidoglykaanikerros ympäröi bakteerisolun, grampositiivisilla bakteereilla peptidoglykaanikerroksia on jopa useita kymmeniä päällekkäin. Stafylokokin peptidoglykaanikerrokselle on ominaista viiden glysiiniyksikön muodostamat sillat. Glysiinisillan voi hajottaa lysostafiini-niminen entsyymi, mikä lopulta johtaa bakteerisolun lyysiin eli hajoamiseen. Tästä syystä peptidoglykaanin synteesiä estävät antibiootit ovat tehokkaita stafylokokkibakteereja vastaan. (Vaara, Skurnik & Sarvas 2003, 59, 61-62; Vuopio-Varkila, Kuusela & Kotilainen 2010.) Estääkseen peptidoglykaanikerroksen hajoamisen, bakteeri suojaa itsensä elimistön immuunijärjestelmältä joko kapselilla tai bakteerin pinnalla olevilla valkuaisilla. *S.aureus*-kantojen polysakkaridikapselit voidaan jakaa 11 erilaiseen serotyyppiin, joista yleisimmät ovat tyypit 5 ja 8. Kapselin avulla bakteeri tekee itsensä vastustuskykyiseksi fagosytoosille. (Vuopio-Varkila, Kuusela & Kotilainen 2010.)

Teikkohappojen sivuhaarat, jotka koostuvat erilaisista sokereista tai D-aminohapoista, määrittelevät bakteerien antigeenisen spesifisyyden. Happamuutensa ansiosta teikkohapot huolehtivat solun mikroympäristön ionitasapainosta. Happamuus auttaa bakteeria myös pitämällä fagosyytit loitolla. (Vaara, Skurnik & Sarvas 2003, 59, 61-62.) *S.aureuksella* teikkohappoja löytyy kahta eri tyyppiä: seinämateikkohappoa ja solukalvoon kiinnittynyttä lipoteikkohappoa (Vuopio-Varkila, Kuusela & Kotilainen 2010). Lipoteikkohapon perustama rakenne voi antaa bakteerille suojaa antimikrobisia lääkkeitä vastaan. Vaikka lipoteikkohapon tarkka rooli on vielä osin tuntematon, se on tärkeä osa grampositiivisen bakteerin soluseinämää. (Pecy & Gründling 2014.) Stafylokokkiserologiassa hyödynnetään vasta-aineita, joita elimistö muodostaa teikkohappoja kohtaan etenkin syvissä *S.aureus*-infektioissa (Vuopio-Varkila, Kuusela & Kotilainen 2010).

S.aureus kiinnittyy elimistön solujen ja rakenteiden pintaan useilla eri adhesiineilla, jotka sijaitsevat bakteerisolun pinnalla. Nämä adhesiinit ovat pintaproteiineja kiinnittyneinä soluseinämän peptidoglykaaniin kovalenttisen sidoksen avulla. Adhesiineja voidaan kutsua myös nimellä MSCRAMM (microbial surface component reacting with adherence matrix molecules). Yksi *S.aureuksen* tärkeimmistä ja parhaiten tutkituista adhesiineista on proteiini A, joka sitoutuu immunoglobuliinien Fc-osaan. Proteiini A:n avulla bakteeri estää spesifisten vasta-aineiden pääsyä kohteeseen sitomalla ne pintaansa väärin päin. Siten kyseinen adhesiini suojaa bakteerin rakenteita elimistön aiheuttamilta puolustusreaktioilta. (Vuopio-Varkila, Kuusela & Kotilainen 2010.)

S.aureukselta löytyy superantigeneja, toiselta nimeltään eksotoksiineja. Eksotoksiinit kiinnittyvät T-solun reseptoriin, joka aiheuttaa T-solujen aktivaation. Tunnetuin *S.aureuksen* eksotoksiini on TSST-1 (toxic shock syndrome toxin). Nimensä mukaisesti TSST-1 aiheuttaa toksista sokkioireyhtymää. Oireyhtymän voi aiheuttaa mikä tahansa *S.aureuksen* aiheuttama infektio, mutta yleensä se on seurausta emättimen kolonisaatiosta liittyen tamponin käyttöön. (Vuopio-Varkila ym. 2010, 86, 88-89.)

MRSA:n metisilliiniresistenssi on peräisin kannan *mecA*- tai *mecC*-geenin koodaamasta ylimääräisestä muuntuneesta penisilliiniä sitovasta proteiinista (penicillin-binding protein, PBP2a). Se muodostuu bakteerin soluseinämään, ja β -laktaamit sitoutuvat siihen hyvin heikosti. *S.aureuksella* on yhteensä neljä erilaista PBP:a. MRSA:n muuntunut PBP2a on kykenevä käyttämään kaikkien näiden neljän ominaisuuksia haastaessaan β -laktaami-

antibiootteja. MRSA on resistentti kaikille penisilliineille, karbapeneemeille ja kefalosporiineille. MRSA-kannat voivat hankkia resistenssitekijöitä myös muita mikrobilääkkeitä kohtaan. Tutkimusten myötä lääketieteellisyys on onnistunut kehittämään muutamia uuden sukupolven kefalosporiineja, jotka soveltuvat MRSA:n hoitamiseen. (Fuda, Suvoros, Vakulenko & Mobashery 2004; Jalava 2016, 15.; Peacock, 77; Vuopio-Varkila, 102.) Uusille antibiooteille on akuutti tarve. On kulunut pitkä aika siitä, kun uuden toimintamekanismin antibiootti on tullut markkinoille. Uusien lääkkeiden toimintakyky tulisi säilyttää mahdollisimman pitkään. (Dobric 2014, 14-15.)

3 STAPHYLOCOCCUS AUREUKSEN LABORATORIODIAGNOSTIIKKA

Bakteerien laboratoriodiagnostiikan tärkeä lähtökohta on oikeaoppinen näytteenotto. Mikrobiologisessa näytteenotossa huolellisuus, oikea ajoitus ja kontaminaation välttäminen ovat avainasioita diagnostiikan kannalta. Mikrobiologian laboratoriossa diagnostiikka aloitetaan bakteerin tunnistamisesta, jossa selvitetään aluksi kyseessä oleva infektionaiheuttaja. Bakteerista tehdään jatkotunnistuksia tarkempaa selvittelyä varten, esimerkiksi mikrobilääkeherkkyyden tunnistamiseksi.

3.1 Näytteenotto ja viljely

Mikrobiologinen näyte tulee ottaa niin, että infektiokohteesta saadaan edustava otos. Infektiokohde on paikka, jossa taudinaiheuttaja esiintyy. Näyte tulee ottaa ennen mikrobilääkehoidon alkamista. Pienikin määrä antibakteerista valmistetta voi estää taudinaiheuttajan löytämisen. Vakavissa infektioiden mahdollinen mikrobilääkehoito ei ole este näytteenottamiselle. (Katila 2004, 343; Tykslab 2010.) Näytteet tulee toimittaa laboratorioon mahdollisimman pian siten, että mikrobien määrä ei nouse tai laske kuljetuksen aikana. Liian pitkä säilytys tai kuljetus saattaa lisätä normaaliflooran mikrobeja ja näin vaikeuttaa taudinaiheuttajan määrittämistä näytteestä. Samoin itse taudinaiheuttajat voivat tuhoutua liian pitkän säilytyksen tai kuljetuksen vuoksi. Jos näytettä ei pystytä lähettämään heti, säilytysohjeet tulee tarkistaa laboratorion ohjeista. (Katila 2004, 344; Saros 2005, 177.)

Bakteeriviljelynäytteissä esiintyy usein monia erilaisia bakteerikantoja, joiden erottelemiseksi tarvitaan puhdasviljelyä. Puhdasviljelyn periaatteena on saada yksittäinen bakteerisolun erilleen toisista hajotusmenetelmällä. Hajotusviljelyssä (kuva 1) tutkittavaa bakteeria levitetään aluksi 1/3 - 1/2 elatusainemaljan pinnasta, jonka jälkeen tehdään viljelysauhalla ensimmäinen hajotus. Näyte levitetään asteittain koko maljalle ja viimeiselle hajotusalueelle tehdään niin sanottu häntä, jotta yksittäiset bakteerit saadaan irralleen. Bakteerit lisääntyvät nopeasti ja useimmat patogeeniset bakteerit kasvavat parhaiten +35 °C:n lämpötilassa. Jokainen muodostuva pesäke on lähtöisin yhdestä bakteerisolusta. (Saros 2005, 202; Carlson & Koskela 2011.)



KUVA 1. Hajotusviljelmä (Kuva: Heidi Ikäläinen & Jonna Sääskö 2016)

MRSA-näyte otetaan yleensä nenästä, nielusta ja mahdollisista infektiolueista, esimerkiksi haavoista. Näyte voidaan ottaa vastasyntyneeltä myös navasta. Kantajilta otetaan lisäksi seurantanäytteet paikasta, josta MRSA:ta on aikaisemmin löytynyt (Tuokko, Rautajoki & Lehto 2008, 97). Pirkanmaalla MRSA-näytteet otetaan molemmista sieraimista nukkatikulla sentin syvyydeltä pyöräyttäen. Näyte irrotetaan tikusta pyörittelemällä sitä Copanin eMRSA Broth -viljelyputken nesteessä. Samaan putkeen otetaan näyte nieluri-soista ja takanielusta. Näytteet muista infektioporteista otetaan kaikki samaan putkeen. (Fimlab Laboratoriot Oy 2016c.) Viljelyputket laitetaan suoraan inkuboitumaan niiden saapuessa laboratorioon (Hirvonen 2016). Kanta-Hämeessä ja Keski-Suomessa MRSA-näytteenotossa on käytössä kuljetusgeeliputki tai juoksevassa muodossa oleville näytteille steriili korkillinen astia (Fimlab Laboratoriot Oy 2016c).

3.2 *Staphylococcus aureuksen* tunnistaminen

S. aureus on helposti ja yksinkertaisesti tunnistettavissa. Se on ainoa stafylokokkilaji, joka on koagulaasipositiivinen, mikä tarkoittaa, että bakteeri kasvaessaan hyödyttää plasmaa. Mikroskoopissa se esiintyy stafylokokkeille tyypillisesti pieninä ryhminä, pareina tai yksittäisinä grampositiivisinä kokkibakteereina. (Vuopio-Varkila, Kuusela & Kotilainen

2003, 98-99.) *S. aureuksen* tunnistus perustuu koagulaasin ohella sen kykyyn tuottaa katalaasia ja DNA:ta hajottavaa deoksiribonukleaasia (Katila 2004, 354). Stafylokokkikasvuston voi tunnistaa varsin luotettavasti *S. aureukseksi* pika-agglutinaatiotesteillä, jonka avulla saadaan selville bakteerin koagulaasipositiivisuus. *S. aureus* kasvaa helposti tavallisilla elatusaineilla, ja se kestää kuljetusta sekä jopa kuivumista hyvin. (Vuopio-Varkila, Kuusela & Kotilainen 2011.) Nykypäivän laboratorioissa *S. aureuksen* tunnistamisessa voidaan käyttää myös automaatiomenetelmiä. Pirkanmaalla käytössä on massaspektrometri VITEK MS MALDI-TOF. (Hirvonen 2016.) Tutkittavat molekyylit ionisoidaan matriisiavusteisella laserdesorptioionisaattorilla, jonka jälkeen ne erotellaan toisistaan niiden massa/varaus -suhteen perusteella lentoaika-analysaattorissa. Laite soveltuu etenkin proteiinien ja peptidien tunnistamiseen. MALDI-TOF tarjoaa paljon etuja muihin tutkimustekniikoihin nähden. Menetelmä on teknisesti helppo, nopea ja matalakustanteinen ja sitä voidaan soveltaa myös muille mikrobilajeille ja -suvuille. (Kärpänoja 2014, 143.)

S. aureuksen pienipesäkkeisiä SCV-variantteja (small colony variants) voi olla vaikea havaita maljalla ja ne voidaan helposti tulkita kontaminanteiksi. SCV-kannoilla on mutaatio hengitysketjun komponenteissa, jonka vuoksi bakteeri kasvaa hitaasti, bakteeripinnan varaus muuttuu ja resistenssi useita antibiootteja kohtaan kasvaa. (Vuopio-Varkila, Kuusela & Kotilainen 2011.)

3.3 MRSA:n toteaminen

EUCAST:n suosituksen perusteella MRSA todetaan testaamalla *S. aureus* -kannan herkkyys kefoksitiinille. Herkkyys voidaan testata kiekkoherkkyysmenetelmällä. EUCAST:n menetelmäohje ei edellytä kefoksitiinilla todetun MRSA-kannan varmistamista muilla menetelmillä, mutta siitä huolimatta MRSA:n varmistamiseksi ja luotettavuuden vuoksi suositellaan geenimonistukseen perustuvien varmistustestien tekemistä kaikille kefoksitiinitestillä löydetuille kannoille. Geenitestien on tunnistettava *mecA*- ja *mecC*-geenit. Jos kanta on kefoksitiiniherkkyydeltään alentunut, mutta jää geenitesteissä negatiiviseksi, se lähetetään THL:een (Terveystieteiden ja hyvinvoinnin laitos) varmistustestaukseen. (Jalava 2016, 16.)

MRSA:n seulontaviljelyissä suositellaan rikastusviljelyn käyttöä, koska sen voidaan katsoa olevan herkin menetelmä. Pirkanmaalla näytteet tulevat laboratorioon rikastavissa

Copan eMRSA Broth -nestekuljetusputkissa. Kyseinen rikastusputki sisältää nestepohjaista mediumia. Mediumissa on väriyhdistettä, joka vaihtaa väriä keltaisesta vihreään tai siniseen *S. aureuksen* kasvaessa siinä. 24 tunnin inkuboinnin jälkeen putken väriä tarkastellaan. Mikäli putki on 24 tunnin jälkeen keltainen, se jätetään inkuboitumaan vielä toiset 24 tuntia. Jos putki on edelleen keltainen, se vastataan negatiivisesti. Vihertäväksi tai sinertäväksi muuttunut putki on positiivinen ja se siirretään jatkoviljelyyn. Kaikki positiivisiksi muuttuneet putket viljellään selektiiviselle kromogeeniselle MRSA-maljalle. Jos näytteet viljellään suoraan selektiiviselle kromogeenimaljalle, tulee käyttää pitkää inkubaatioaikaa (42 - 48 h) riittävän herkkyuden saavuttamiseksi. (Hirvonen & Kaukoranta 2014; Fimlab Laboratoriot Oy 2016b; Hirvonen 2016; Jalava 2016, 17.)

MRSA kasvaa kromogeenimaljalla värillisinä pesäkkeinä. Malja sisältää MRSA-kantoja valikoivia antibiootteja sekä väriaineeseen sidottuja yhdisteitä, joita stafylokokeista vain *S. aureus* käyttää kasvaessaan. Maljan toiminta perustuu liukenevaan värittömään molekyyliin eli kromogeeniin. Tämä on kiinnitetty spesifiseen substraattiin, joka reagoi entsyymiaktiivisuuteen. Kun maljalla kasvava spesifinen mikrobikanta kasvaa, se tuottaa entsyymiä, jolloin substraatti irtoaa kromogeenistä. Kromogeenin irtoaminen saa aikaan sille tyypillisen värin ja saostuman muodostumisen. Menetelmä on erittäin spesifi ja sen avulla bakteerikantoja voidaan erottaa toisistaan yksilöllisten värien perusteella. MRSA-kannat kasvavat spesifisillä maljoilla vaaleanpunaisesta roosan väriseen (kuva 2). (Rantakokko-Jalava 2011; CHROMagar™.) Näytteestä MRSA-maljalla kasvanut *S. aureuksen* sopiva pesäkekasvu tunnistetaan Pirkanmaalla MALDI-TOF:lla, sille tehdään herkkyysmääritys ja varmistetaan *mecA/mecC*-geenin läsnäolo (Hirvonen 2016).



KUVA 2. Positiivinen tulos MRSA-maljalla (Kuva: Heidi Ikäläinen & Jonna Säaskö 2016)

Mec-geeni osoitetaan geenimonistusmenetelmällä eli PCR-menetelmällä (polymeraasi-ketjureaktiomenetelmä) (Vuopio-Varkila, Kuusela & Kotilainen 2011). Geenimonistusmenetelmiä voidaan käyttää myös MRSA-kantojen osoittamiseen suoraan potilasnäytteestä. MRSA-PCR:t kohdistuvat liitoskohtaan, jossa *mecA*-geenin sisältävä geenikasetti SCCmec yhdistyy *S.aureuksen* genomiin. Tämän lisäksi osoitetaan usein itse *mecA* ja jokin lajintunnistuksen varmistava geeni. Nämä menetelmät ovat herkempiä kuin suora viljely selektiiviselle kromogeenimaljalle ja suunnilleen yhtä herkkiä kuin rikastukseen perustuvat viljelymenetelmät. Ne antavat kuitenkin myös vääriä positiivisia tuloksia, sillä testi ei tunnista kaikkien MRSA-kantojen liitoskohdan signaalia. Menetelmiä voidaan siis käyttää MRSA-kantajuuden poissulkemisessa, mutta kaikki positiiviset löydökset on aina varmistettava myös viljelyllä. (Rantakokko-Jalava 2013, 162; Jalava 2016, 17.)

MRSA-kannat tyypitetään ensisijaisesti spa-tyypityksellä. Menetelmä on FINAS-akkreditoitu. Tyypityksen kohteena on spa-geeni, joka koodaa *S. aureuksen* pinnalla sijaitsevaa proteiini A:ta, *mecA*-geeniä ja kohtaa, jossa *mecA*-geenin geenikasetti SCCmec yhdistyy *S.aureuksen* genomiin. Spa-geenissä on vaihteleva määrä toistojaksoja, joiden sekvenssin ja lukumäärän perusteella määräytyy, mikä spa-tyyppi on kyseessä. (Rantakokko-Jalava 2011; THL 2016.) Testi tulkitaan positiiviseksi, kun puhtaasta bakteeripesäkkeestä saadaan oikea spa-signaali sekä *mecA*-signaali. SCCmec-signaali nousee esiin usein vasta

PCR:n loppuvaiheessa. Pienellä näytemäärällä tämän toteaminen voi olla hankalaa. SCC-negatiiviset kannat ilmenevät lähinnä tietyissä spa-tyypeissä. (Rantakokko-Jalava 2011.)

3.4 Herkkyysmääritykset

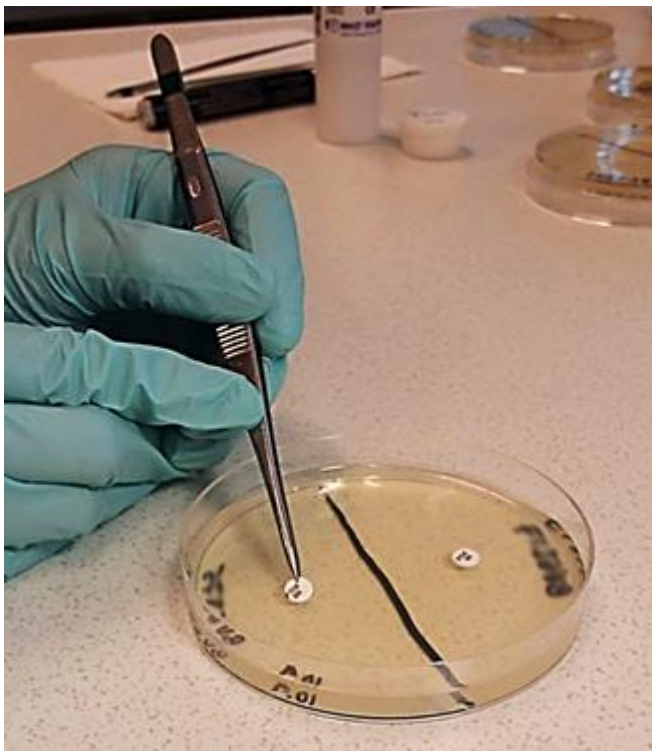
Mikrobiologian laboratorio määrittää erilaisista kliinisistä näytteistä eristettyjen patogeeneiden herkkyden mahdollisille infektion hoidossa käytettäville mikrobilääkkeille. Bakteerien todellinen herkkyys elimistössä riippuu bakteerien määrästä ja kasvunopeudesta, sekä ympäristötekijöistä (märkäeritteen määrä, kudoksen pH ja happiosapaine). (Carlson & Koskela 2011.) Herkkyysmääritysten tulee olla standardoitu sen määrittämenetelmän mukaan, jonka tulkintakriteerit ovat käytössä. Lääkemäärien, elatusainekoostumuksen, maljan agarpaksuuden ja suositellun bakteerisuspensiovahvuuden tulee olla valitun menetelmän mukaisia. (Katila 2004, 358.) EUCAST määrittelee herkkyysmäärityksien tulkintarajat tämänhetkisten resistenssimekanismien tuntemisen mukaan. Uusin EUCAST:n taulukko herkkyysrajoista (versio 6.0) on tullut voimaan vuoden 2016 alusta.

Herkkyysmäärityksissä käytettävä bakteerisuspensio pyritään tekemään saman vahvuiseksi kuin MacFarland 0.5 standardi. Viljelysauvalla poimitaan muutama erillinen pesäke koskettamalla bakteerimassaa tuoreelta viljelmältä, jonka jälkeen pesäkkeet lisätään steriiliin 0.9 % keittosuolaan. Suspension tiheyden määrittämiseen tarvitaan hyvä valaistus ja tumma tausta. Parhaan tuloksen saa vertaamalla standardi- ja bakteerisuspensioita rinnakkain. Valmista suspensiota siirretään huoneenlämpöiselle ja pintakuivalle maljalle koko pinta-alaltaan, joko dreijaamalla tai tiheillä edestakaisliikkeillä. Bakteerin siirroksen tulee tapahtua 15 minuutin kuluessa suspension valmistuksesta. Tavoitteena on jatkuva ja tasainen kasvusto, jossa estorenkaiden reunat ovat mahdollisimman selkeitä. (Nissinen 2009.)

3.4.1 Kiekkoherkkyysmääritys

Kiekkoherkkyysmääritykset ovat yleisimmin käytettyjä bakteerien herkkyysmäärityksiä, sillä ne ovat oikein suoritettuna luotettavia ja teknisesti helppoja. Maljalle viljellään standardoitua bakteerisuspensiota, jonka jälkeen maljalle asetetaan antibioottilääkkeellä kyl-

lästettyjä pahvikiekkkoja tai tabletteja (kuva 3). (Brown, Andrews, Winstanley & Mac-Gowan 2005, 215.) Bakterit alkavat kasvaa, ja samalla lääke alkaa diffundoitua kiekosta elatusaineeseen. Malja sijoitetaan lämpökaappiin +35 °C:n inkuboitumaan ja tulos luetaan yleensä seuraavana päivänä 18-24 tunnin kuluttua. Kiekkojen mikrobilääke estää mikrobilääkkeille herkkien bakteerien kasvun kiekkojen lähellä. Kasvun estyminen näkyy kirkkaana estorenkana kiekon ympärillä, ja tämän estorenkkaan halkaisija mitataan. Mitä suurempi estorenkkaan halkaisija on, sitä herkempi bakteeri on kyseiselle mikrobilääkkeelle. Resistentit bakteerit kasvavat lähes tai kokonaan kiinni kiekkossa. (Saros 2005, 175; Carlson & Koskela 2011.)



KUVA 3. Kiekkojen asettaminen maljalle (Kuva: Heidi Ikäläinen & Jonna Sääskö 2016)

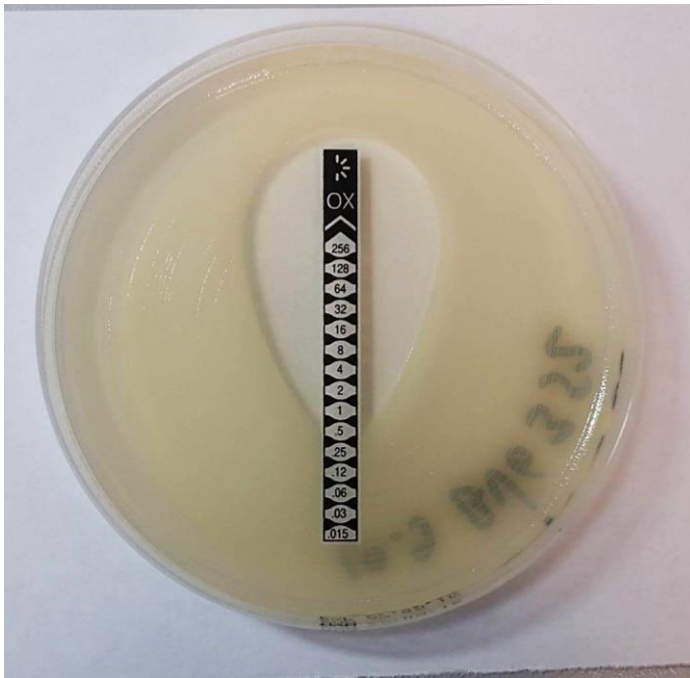
Mikrobilääkkeet voidaan jakaa estorenkkaan halkaisijan mukaan kolmeen eri SIR-järjestelmän luokkaan: S (sensitive, herkkä), kun bakteerin herkkyys ei poikkea normaalista, I (intermediate, alentunut herkkyys) ja R (resistant, vastustuskykyinen), kun bakteerin sietokyky lääkkeelle on muuttunut normaalia oleellisesti korkeammaksi. (Saros 2005, 175; Carlson & Koskela 2011.) I-alue on S- ja R-alueen välillä, ja sen tärkein tehtävä on ehkäistä menetelmän epätarkkuudesta johtuvien väärin R- tai S-tulkintojen syntymistä (Nissinen 2009).

Aikaisemmin Suomessa käytettiin FiRe:n standardia. Kaikki Suomen FiRe-laboratoriot ovat siirtyneet käyttämään EUCAST-standardia vuodesta 2011 lähtien. Ennen vuotta 2011 olevia resistenssitasoja ei voi suoraan verrata nykyisiin resistensseihin standardin vaihtumisen myötä. (Jalava 2014, 8.) EUCAST suosittelee kefoksitiinia *S.aureuksen* kiekko-testaukseen, koska se on erittäin herkkä ja spesifinen *mecA*- ja *mecC*-geenin merkiaineelle. Oksasilliinikiekkojen käyttöä ei enää suositella. EUCAST:n uusimmassa Breakpoint-taulukossa oksasilliinin tulkintarajat on poistettu. (Lindhölm 2013.)

3.4.2 E-testi

MIC-arvo (minimal inhibitory concentration) ilmoittaa pienimmän bakteerin kasvun estävän lääkeainepitoisuuden (Rintala, E. & Saxén, H. 2011, 44). Käytännössä pyritään kudoksen lääkepitoisuuksiin, jotka ovat 2-4 kertaa suurempia kuin MIC-arvo. Harvemmin voidaan määrittää lisäksi MBC (minimal bactericidal concentration) eli pienin tappava pitoisuus. (Saros 2005, 175; Carlson & Koskela 2011.)

MIC-arvo määritetään E-testillä (Epsilon-testi). E-testi on kaupallinen ohut muovinen liuska, jossa on valmiiksi imeytettynä tiettyä lääkettä gradienttina (pitoisuus muuttuu asteikon mukaan). Määrä ilmaistaan mikrogrammoina antibioottia millilitrassa elatusainemaljalle, jossa on valmiina tutkittavasta bakteerikannasta valmistettua suspensiota. Inkuboinnin jälkeen liuskan ympärillä nähdään päärynänmuotoinen bakteerikasvun estovyöhyke (kuva 4). MIC-arvo luetaan suoraan mitta-asteikolta estovyöhykkeen ja liuskan leikkauspisteestä. (Carlson & Koskela 2011; Fimlab Laboratoriot Oy 2016a.) Kun lääkkeen MIC-arvo infektion aiheuttajaa kohtaan tunnetaan, voidaan vakavissa infektoissa säätää lääkkeen annostusta tarkemmin sopivaksi, kuin pelkän SIR-tulkinnan perusteella. Lääkkeen farmakokineettiset ominaisuudet tulee ottaa tällöin huomioon. (FiRe 2009.)



KUVA 4. E-testin estovyöhyke (Kuva: Heidi Ikäläinen & Jonna Sääsö 2016)

4 β -LAKTAAMIT

β -laktaamien bakteerilääkeryhmä muodostuu penisilliineistä, kefalosporiineista sekä eräistä muista β -laktaamirakenteisista bakteerilääkkeistä kuten karbapaneemeista. β -laktaamin rakenne muistuttaa bakteerin soluseinän peptidoglykaanin ristositomisessa toimivaa D-alanyyli-D-alaniinirakennetta. Tämän vuoksi β -laktaamit sitoutuvat bakteerin peptidoglykaanisynteesin loppuvaiheen entsyymeihin, penisilliiniä sitoviin proteiineihin (penicillin binding protein, PBP). Bakteerien resistenssi voi johtua poikkeavista PBP-entsyymeistä, joihin β -laktaamit eivät kykene sitoutumaan tai bakteerien muodostamista β -laktaamientsyymeistä, jotka hajottavat β -laktaamirenkaan. Bakteerien ulkokalvolla voi myös olla kyky estää lääkkeen pääsy bakteerisolun sisään. Stafylokokkien tuottama β -laktamaasi hajottaa vain penisilliinejä, jonka vuoksi sitä kutsutaankin penisillinaasiksi. (Järvinen, Huovinen & Vaara 2011.) MRSA:n resistenttiys β -laktaameja kohtaan syntyy PBP2a:n läsnäolosta (Levinson 2014, 89).

4.1 Kefalosporiinit ja kefoksitiini

Kefalosporiinit ovat *Cephalosporium*-homeen erittämän antibiootin puolisynteettisiä johdannaisia (Järvinen, Huovinen & Vaara 2011). Nämä β -laktaamit toimivat samalla tavalla kuin penisilliinit: ne inhiboivat peptidoglykaanin ristosidontaa. Ero penisilliineihin tulee rakenteesta. Kefalosporiinit voidaan jakaa viiteen eri sukuun. Ensimmäisen sukupolven kefalosporiinit toimivat lähinnä grampositiivisia kokkeja vastaan, kun taas uudempien sukupolvien kefalosporiinit syntetisoitiin niin, että ne toimisivat myös gramnegatiivisia sauvoja vastaan. Nämä uudet kefalosporiinit on jaoteltu toiseen, kolmanteen ja neljanteen sukupolveen, joissa jokaisella sukupolvella on laajempi vaikutus tiettyjä gramnegatiivisia sauvoja kohtaan. (Levinson 2014, 72-73.) Samalla useiden teho grampositiivisiin bakteereihin on heikentynyt verrattuna ensimmäiseen polveen (Järvinen, Huovinen & Vaara 2011). Neljännen ja viidennen sukupolven kefalosporiinit toimivat myös monia grampositiivisia kokkeja vastaan. Kefalosporiinit ovat tehokkaita monia organismeja vastaan. Niitä siedetään yleisesti hyvin ja ne tuottavat vähemmän yliherkkyysoireita kuin penisilliinit. (Levinson 2014, 72-73.)

Kefoksiitini ($C_{16}H_{17}N_3O_7S_2$) on semisynteettinen, antibakteerisen vaikutuksen omaava toisen sukupolven kefalosporiini. Rakenteensa ansiosta se on tehokas gramnegatiivisten bakteerien lisäksi myös β -laktamaasia erittäviä bakteereja vastaan. Kefoksiitini toimii inaktivoimalla bakteerin PBP:n toimintaa soluseinämällä. Tämän toiminnan vaikutuksesta bakteerin soluseinä heikentyy ja aiheutuu solun tuhoutuminen. (PubChem 2016.) Kefoksiini on todettu paremmaksi *mecA*-geenin tunnistajaksi kuin penisilliinit (Swenson & Tenover 2005).

4.2 Stafylokokkipenisilliinit

Toisin kuin muut penisilliinit, stafylokokkipenisilliinit eivät hajoa stafylokokkien tuottaman penisillinaasin vaikutuksesta. Niitä käytetään ainoastaan stafylokokkien aiheuttamien infektioiden hoitoon, erityisesti vaikeissa infektioissa, kuten sepsiksessä. Stafylokokkipenisilliinit eivät ole yhtä tehokkaita esimerkiksi streptokokkien hoidossa. Stafylokokit voivat kuitenkin kehittää resistenssin stafylokokkipenisilliineille, jolloin kantoja kutsutaan metisilliinille tai oksasilliinille resistenteiksi stafylokokkeiksi. Ne ovat resistenttejä myös lähes kaikille muille β -laktaameille, mukaan lukien kefalosporiinit. Resistenssi johtuu kromosomiin integroituneesta *mecA*- tai *mecC*-geenistä, joka koodaa penisilliiniä sitovaa uutta proteiinia PBP2a:ta. (Järvinen, Huovinen & Vaara 2011.)

Oksasilliini, joka kuuluu stafylokokkipenisilliineihin, on β -laktamaasia kestävä valmiste. Muita samankaltaisia valmisteita ovat esimerkiksi kloksasilliini ja dikloksasilliini. Valmisteiden 6-aminopenisillaanihappoon on liitetty sivuketjun rakenne, joka suojaa molekyyliä β -laktamaasientsyymiltä. Näitä penisillinaaseja käytetään pelkästään β -laktamaasia tuottavia stafylokokkeja vastaan. (Huupponen 2014.)

5 VERIFIOINTI

Standardin SFS-EN ISO 15189 mukaan laboratorion tulee käyttää vain validoituja menetelmiä. Validoinnin tarkoituksena on varmistaa, että menetelmä täyttää sille asetetut vaatimukset ja menetelmä sopii käyttötarkoitukseensa. (Izquierdo Álvarez & Bernabeu Andreu 2011.) Verifiointi eli todentaminen tarkoittaa, että laboratorio osoittaa tutkimusten ja dokumenttien kautta hallitsevansa käyttöönotettavan menetelmän, ja osoittaa menetelmän soveltuvan tarkoitukseensa. Verifiointi on kevyempi menettely kuin varsinainen validointi, jossa tarkoituksena on todistaa menetelmän toimivuus ja sen antamien tulosten oikeellisuus laboratoriossa. Verifiointissa osoitetaan, että jo validoitu menetelmä toimii omassa laboratoriossa omaa näyttemateriaalia käytettäessä odotetusti. (Haapala 2015; Hallanvuo 2010.) Menetelmien verifiointi kuuluu jokaisen laboratorion toimintaan (Ikäheimo 2002, 13-14).

Mittausmenetelmät ja niihin liittyvät tuotteet valmistetaan usein suurissa kansainvälisissä yrityksissä, jotka ovat vastuussa validoinnista. Menetelmien ja tarvikkeiden ostajat ja käyttäjät taas ovat vastuussa verifiointista, jolloin osoitetaan, että validoinnissa esille tulleet piirteet pystytään tuottamaan samalla tavalla omassa laboratorioympäristössä. Verifiointikäytäntöihin vaikuttaa akkreditointi ja sertifiointi. Käytännössä verifiointi on rajoitettu kahden menetelmän vertailuun ja tutkimusten toistamiseen, jotta saadaan selville epätarkkuudet. Joskus voidaan kerätä vertailuarvoja viitearvojen varmistamiseksi. Yleisesti kliiniset laboratoriot tutkivat 20-200 potilasnäytettä, joissa on mahdollisimman laaja konsentraatioalue, käyttäen sekä nykyistä korvattavaa menetelmää, että uutta verifioitavaa menetelmää. (Theodorsson 2012, 316-317.)

On olemassa muutamia mitattavia muuttujia, jotka tulisi ottaa huomioon validoinnissa ja verifiointissa. Arvioitu tarkkuus on yksi avainmuuttujista. Kvantitatiivisessa menetelmässä tarkkuus koostuu täsmällisyydestä ja oikeellisuudesta. Täsmällisyys tarkoittaa tulosten yhteenpitävyyttä toistetuissa mittauksissa, ja oikeellisuus tulosten yhteenpitävyyttä viitearvojen kanssa. Laadullisissa menetelmissä tarkkuuden osatekijät ovat herkkyys ja spesifisyys. Herkkyydellä mitataan sitä, kuinka hyvin menetelmä huomaa positiiviset tulokset, kun taas spesifisyys kuvaa sitä, kuinka hyvin negatiiviset tulokset huomataan. (Izquierdo Álvarez & Bernabeu Andreu 2011.)

Edes yksinkertaiselta vaikuttavaa menetelmää ei pitäisi vaihtaa laboratoriossa ilman, että toimivuus on jollain tavalla varmistettu. Menetelmää ei pidä koskaan vaihtaa ainoastaan hinnan vuoksi, sillä laatu on tärkein kriteeri. Perusteelliseenkaan validointi tai verifiointi ei tee tarpeettomaksi laadunvarmistusta jatkossa, joten menetelmän toimivuutta tulee seurata sisäisin kontrollein ja ulkoisten laadunarvointien avulla. (Liimatainen 2002, 12-13.)

6 TYÖN TARKOITUS JA TAVOITTEET

Opinnäytetyön tarkoituksena on määrittää rinnakkain bakteerikantojen herkkyyttä kefoksitiini- ja oksasilliinikiekolla sekä oksasilliini-E-testillä ja kefoksitiinimaljalla. Kefoksitiinikiekkoherkkyys on työssä verifioitava menetelmä, jonka toimivuutta verrataan käytössä olevaan menetelmään. Työn alussa Fimlab Laboratoriot Oy hyödynsi *Staphylococcus aureuksen* ja MRSA:n toteamisessa kolmen eri menetelmän yhdistelmää: oksasilliinikiekkokko, oksasilliini-E-testi sekä kefoksitiinimalja. Työn tarkoitus voidaan tiivistää seuraavaan kahteen tutkimuskysymykseen:

1. Ovatko *Staphylococcus aureuksen* herkkyysmäärittämisen tulokset yhteneviä E-testillä, kefoksitiinimaljalla sekä oksasilliini- ja kefoksitiinikiekolla?
2. Onko kefoksitiinikiekkoherkkyysmenetelmä yksistään riittävä *Staphylococcus aureuksen* metisilliiniresistenssin havaitsemiseen?

Opinnäytetyön tavoitteena on selvittää, voisiko Fimlab Laboratoriot Oy siirtyä käyttämään *Staphylococcus aureuksen* diagnostiikassa pelkästään kefoksitiinikiekkokko. Tavoitteen täytyessä MRSA:n diagnosointi Fimlab Laboratoriot Oy:llä olisi nykyisten EUCAS-Tin sekä FiRen standardien mukaista ja myös nopeampaa sekä yksinkertaisempaa kuin aiemmin.

Oma tavoitteemme opinnäytetyöprosessin aikana on syventää omaa osaamistamme ja tietämystämme mikrobiologian osalta. Tavoitteenamme on myös kehittyä ongelmanratkaisussa ja lähdekriittisyydessä. Toivomme oppivamme mahdollisimman paljon tutkimuksen tekemisestä ja sen tulosten arvioinnista. Opinnäytetyön kokeellisen osuuden suorittaminen luo hyvää pohjaa mikrobiologian laboratoriossa työskentelemiselle.

7 MENETELMÄLLISET LÄHTÖKOHDAT

Tutkimusmenetelmät jaetaan karkeasti kahteen eri ryhmään: kvantitatiivinen ja kvalitatiivinen tutkimus. Kvalitatiivinen eli laadullinen tutkimus pyrkii selittämään tutkimuskohteen käyttäytymistä ja päätösten syitä. Tutkimusmenetelmänä käytimme kvantitatiivista eli määrällistä tutkimusta. Kyseistä tutkimusta käytetään, kun etsitään vastausta kysymyksiin: ”Mikä? Missä? Paljonko?”. Kvantitatiivisessa tutkimuksessa asioita käsitellään numeeristen arvojen kautta ja asioita havainnollistetaan taulukoinnin tai asioiden välisten riippuvuuksien välityksellä. Taulukoinnin edellytyksenä on, että jokaiselle tutkittavalle yksikölle annetaan arvoja eri muuttujilla. Aineiston tulee olla riittävän suuri ja edustava luotettavien tulosten saamiseksi. (Alasuutari 2011; Heikkilä 2014, 15.) Kvantitatiivinen analyysi pohjautuu siihen, että etsitään eri muuttuja-arvojen tilastollisia yhdistäviä tekijöitä. Kuitenkaan kvantitatiivinen tutkimus ei anna selityksiä yhdistäville tekijöille. (Alasuutari 2011.)

Työmme on kokeellinen eli eksperimentaalinen tutkimus. Kyseessä on selittävän tutkimuksen muoto, jonka kautta tarkastellaan tiettyjen tekijöiden vaikutusta kontrolloiduissa olosuhteissa. Keskeistä kokeelliselle tutkimukselle on pyrkiä vakioimaan kaikki muut tekijät paitsi tutkittava muuttuja. Tämä menetelmä on yleinen luonnontieteiden lisäksi myös lääketieteen puolella. Kokeellinen tutkimus vaatii ammattitaitoa, sillä luotettavien tulosten saamiseksi tulee osata arvioida tuloksia kriittisesti. (Heikkilä 2014, 14, 19.) Työssämme muuttujina toimivat erilaiset mikrobiherkkyystestit.

Tutkimuksen otoksena oli yhteensä viisikymmentä (50) näytettä. Näytteet olivat toimeksiantajan keräämiä ja valikoimisia. Tutkimuksessa käytettävät näytteet oli varmistettu *S.aureus*-kannoiksi. Kokeellisen osuuden alussa yksi kannoista oli todettu *mecA*-positiiviseksi. Tarkastelimme eroavaisuuksia kahden antibiootin, kefoksitiinin ja oksasilliinin, välillä. Tutkimuksemme vaati huolellisuutta työtavoissa, koska emme analysoineet näytteistä rinnakkaistuloksia. Kaikki näytteet käsiteltiin samoilla työtavoilla.

Hyvän tutkimusraportin edellytyksenä on koko tutkimuksen luotettavuuden arviointi (Heikkilä 2014, 178). Luotettavuutta on mahdollista kuvata kahdella eri termillä: reliabiliteetti ja validiteetti (Metsämuuronen 2002, 10). Luotettavuus ei saisi olla yksioikoisesti tavoiteltu ominaisuus, vaan luotettavuuden tärkeys riippuu tutkimuskysymyksestä.

Reliabiliteetti määrittelee tutkimustuloksen toistettavuutta. Tutkimuksen mittaustulos voidaan olettaa koostuvan mitattavasta suureesta ja mittausvirheestä. (Ketokivi 2015.) Mittausvirhe tässä työssä voisi esimerkiksi olla herkkyysrajojen mittaamisessa: yksi lukee herkkyudeksi I:n ja toinen R:n. Tämänlaista reliabiliteettia kutsutaan toistomittausreliabiliteetiksi. Mittaus katsotaan reliaabeliksi, kun uudelleen suorittamalla saadaan sama tulos (Ketokivi 2015).

Validiteetti kuvaa sitä, miten on onnistuttu mittaamaan juuri sitä, mitä pitikin mitata. Yleistettynä tutkimuksen validius tarkoittaa systemaattisen virheen puuttumista. Systemaattiseen virheeseen ei auta suurempi otoskoko ja sen laajuutta voi olla vaikea arvioida. Systemaattisen virheen aiheuttaa jokin aineiston keräämiseen liittyvä tekijä. Mikäli mitauksessa ilmenee kyseinen virhe, alenevat sen seurauksena yleensä sekä reliabiliteetti että validiteetti. Systemaattinen virhe on paljon pahempi kuin satunnaisvirhe. Mitattavat käsitteet ja muuttujat tulee olla tarkoin määriteltäviä ja tutkimuksen tavoitteet täsmällisiä. Etukäteen tehdyllä huolellisella suunnittelulla ja tiedonkeruulla varmistetaan validiutta. Validius on hankala käsitellä jälkikäteen. (Heikkilä 2014, 27, 177.)

8 KOKEELLINEN OSUUS

Suoritimme opinnäytteen kokeellisen osuuden Fimlab Laboratoriot Oy:n mikrobiologian laboratoriossa 7.-11.9.2015. Saimme ohjausta osuuden suorittamiseen työelämän yhteyshenkilöltä, sairaalamikrobiologi Jari Hirvoselta. Olimme alustavasti miettineet päivien kulun ennen kokeellisen osuuden alkamista (taulukko 1). Näin päivien aikataulut ja ohjelma olivat ensimmäisestä päivästä lähtien suhteellisen selkeitä.

TAULUKKO 1. Kokeellisen osion aikataulu

PVM	
7.9.	<ul style="list-style-type: none"> • Tutustuminen mikrobiologian laboratorion tiloihin • Tarvikkeiden valikointi osuuden suorittamista varten • Puhdasviljelmät verimaljalle 35 valikoiduista potilasnäytteestä, joissa vallitseva bakteerikanta oli <i>S.aureus</i>
8.9.	<ul style="list-style-type: none"> • 0,5 McFarlandin bakteerisuspensioiden tekeminen puhdasviljelmistä • Bakteerisuspensioiden viljely maljoille • Maljojen kiekottaminen
9.9.	<ul style="list-style-type: none"> • Herkkyystuloksien lukeminen ja tulkinta edellispäivän maljoista • 15 uutta puhdasviljelmää valikoiduista potilasnäytteistä
10.9.	<ul style="list-style-type: none"> • 0,5 McFarlandin bakteerisuspensioiden tekeminen puhdasviljelmistä • Bakteerisuspensioiden viljely maljoille • Maljojen kiekottaminen
11.9.	<ul style="list-style-type: none"> • Herkkyystuloksien lukeminen ja tulkinta edellispäivän maljoista • Alustavaa kokeellisen osuuden tulosten tulkintaa Jari Hirvosen kanssa

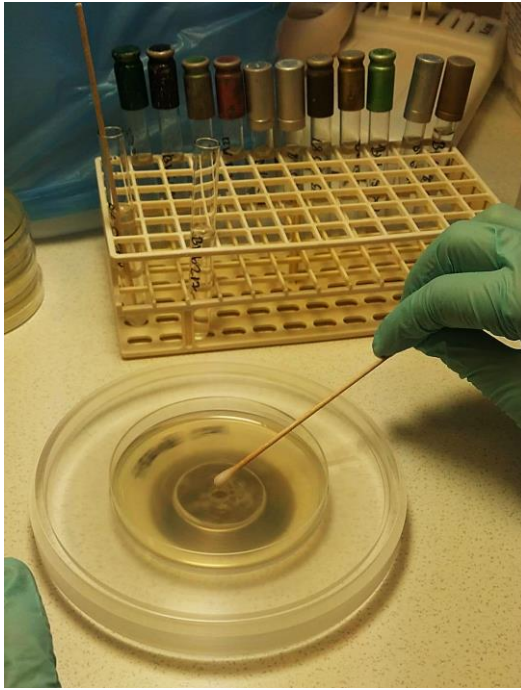
Kokeellisen viikon ensimmäisenä päivänä tutustuimme mikrobiologian laboratorion tiloihin ja työskentelytapoihin. Sairalamikrobiologi opasti meille työtavat puhdasviljel-

mien tekemiseen sekä maljojen viljelyyn. Meille varatut näytteet oli säilytetty jääkaappilämpötilassa. Näytemääränä 50 kliinistä näytettä oli sopivan kokoinen otos kahdelle tehtäväksi viikon aikana. Näytteistä ei ollut muuta tietoa kuin näytenumero, joten emme hyödyntäneet potilastietoja työn aikana. Yhdestä näytteestä tuli tehdä neljä viljelmää: kolme Müller-Hinton-maljalle kefoksitiini- ja oksasilliinikiekkkoja sekä oksasilliini-E-testiä varten, ja yksi kefoksitiinia sisältävälle selektiiviselle MRSA-maljalle. Jaoimme antibioottikiekoille tarkoitettut Müller-Hinton-maljat kahteen osaan ja MRSA-maljan neljään osaan vähentääksemme käytettävien maljojen määrää. Käytössä olleet antibioottikiekot ja E-testi-liuska on kerrottu taulukossa 2.

TAULUKKO 2. Kokeellisessa osiossa käytetyt antibioottikiekot ja E-testiliuska

Kefoksitiinikiekko	Mast Diagnostics: MASTDISCS (5x50) CEFOXITIN 30ug FOX30C
Oksasilliinikiekko	Mast Diagnostics: MASTDISCS (5x50) OXACILLIN 1ug OX1C
Oksasilliini-E-testi	Thermo Scientific Oxoid: M.I.C.Evaluator OXACILLIN 256-0,015 ug/ml

Viljelimme *S.aureusta* sisältävistä näytteistä ensin puhtasviljelmät. Levitimme viljelysauvalla pesäkkeen alkuperäiseltä maljalta verimaljalle. Maljoja inkuboitin +35 °C:n lämpökaapissa noin 24 tuntia. Puhtasviljelmistä teimme standardin mukaisen 0,5 MacFarlandin bakteerisuspension. Valmistimme suspension lisäämällä yhden tai useamman bakteeripesäkkeen viljelysauvalla 0,9% natriumkloridiliuokseen. Tämän jälkeen vertasimme suspension vahvuutta MacFarland 0,5 standardisuspensioon, ja tarvittaessa sekoitimme joukkoon lisää bakteeripesäkkeitä. Viljelimme suspensiosta pumpulitikulla pohjakasvuston kolmelle Müller-Hinton-maljalle ja yhdelle MRSA-maljalle. E-testiä varten oleville Müller-Hinton-maljoille levitimme suspension dreijaamalla (kuva 5) ja muille maljoille liikuttaen pumpulitikku edestakaisin. Müller-Hinton-maljoista kiekoitimme kaksi kefoksitiini- ja oksasilliini-antibioottikiekoilla ja dreijatulle maljalle laitoimme oksasilliini-E-testin. Käytimme antibioottikiekkkojen ja E-testiliuskan asettamiseen maljoille automaattisia kiekottajia sekä pinsettejä. Siirsimme maljat kasvamaan lämpökaappiin +35 °C:n yön yli.



KUVA 5. Bakteerisuspension dreijaus (Kuva: Heidi Ikäläinen & Jonna Sääsö 2016)

Herkkyysien lukemisesta meillä ei ollut vielä paljon kokemusta, joten luimme tuloksia aluksi sairaalamikrobiologin opastuksella. Tulosten rajoja tulkitimme EUCAST:n herkkyysrajojen mukaan. Kefoksitiinikiekkujen ympärille muodostuneissa renkaissa alle 22 mm halkaisija tarkoittaa resistenttiä ja yli 22 mm halkaisija herkkää. Oksasilliini ei ole enää EUCAST:n taulukoissa, joten käytimme Fimlab Laboratoriot Oy:n ohjetta. Sen mukaan alle 11 mm halkaisija tarkoittaa resistenttiä, 11-12 mm alentunutta herkkyyttä ja yli 13 mm herkkää. Mittasimme muodostuneet kiekkoherkkyysrenkaat työntömitalla ja katsoimme E-testiliuskan asteikon ympärille muodostuneen kuvion rajan arvon. Mikäli arvo oli kahden luvun välissä, merkitsimme sen niistä kahdesta pienemmäksi luvuksi. Välillä vastaan tuli näytemalja, jota oli hankala lukea. Keräsimme nämä maljat omaan pinoonsa ja varmistimme niiden tulokset lopuksi sairaalamikrobiologilta. Kokeellisen osuuden viimeisenä päivänä taulukoimme herkkyystulokset väliaikaisesti paperille ja kävimme alustavasti saamiamme tuloksia läpi yhdessä sairaalamikrobiologin kanssa.

Kokeellisen osuuden tulokset käsiteltiin tilastotieteellisin menetelmin Microsoft Excel- taulukkolaskentaohjelmalla. Maljoilta mitatut kiekkoherkkyudet, MIC-arvot sekä MRSA-maljan tulokset kirjattiin ylös Microsoft Excel-taulukkoon (ks. liite 1). Taulukkoon merkittiin ylös myös bakteerin herkkyys mikrobilääkkeelle SIR-järjestelmällä. Taulukkoa apuna käyttäen teimme tuloksista Excelillä kaaviot, joista tulosten tulkinta onnistuu nopeasti. Alun perin tarkoituksena oli ottaa tilastolliseen vertailuun kolme muuttujaa,

kiekkomenetelmät ja e-testi, mutta yritysten jälkeen totesimme sen olevan huono ratkaisu. Kiekkomenetelmän SIR-vastaukset ja e-testin MIC-arvot osoittautuivat hankaliksi vertailla keskenään, sillä niissä on eri mitta-asteikot. Saadut MIC-arvot taulukoitiin muiden tulosten kanssa yhteiseen tulostaulukkaan. Taulukosta on nopeasti nähtävissä mikrobilääkkeen MIC-arvo kullekin analysoidulle näytteelle. Laskimme myös MIC-arvoista keskiarvon sekä vaihteluvälin pienimmällä ja suurimmalla lukemalla.

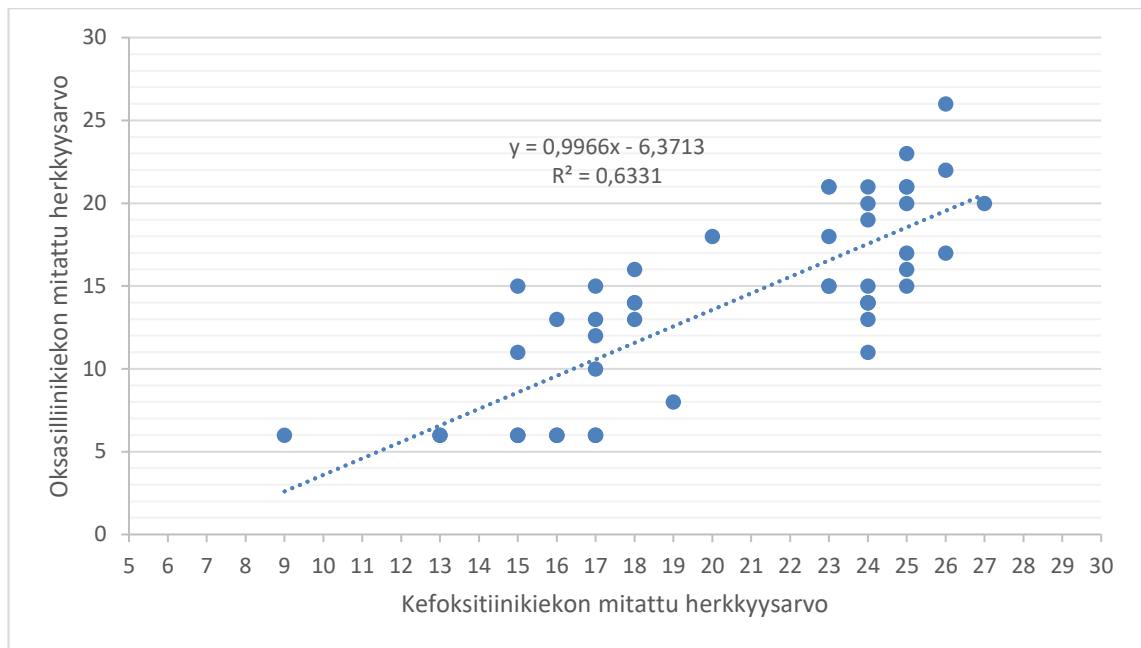
Päädyimme analysoimaan kiekkoherkkyysmenetelmien eroa verraten niitä MRSA-maljan tuloksiin. Vertasimme MRSA-maljan positiivisen/negatiivisen tuloksen suhdetta oksasilliini- ja kefoksitiinikiekkoherkkyydellä saatuun SIR-arvoon. Tämän lisäksi kiekkoherkkyysmenetelmien herkkyysarvoista tehtiin hajontakaavio ja laskettiin kahden tuloksen välinen korrelaatio sekä muutosprosentit kefoksitiini- ja oksasilliinikiekkoherkkyysrajojen välillä (ks. liite 2). Lisäksi taulukoitiin SIR-tulosten määrä molemmilla kiekkomenetelmillä, MRSA-maljojen tulos sekä kiekkomenetelmän poikkeavat SIR-tulokset. Kefoksitiini- ja oksasilliinikiekkoherkkyysrajojen eroista tehtiin selkeä pylväsdiagrammi (ks. liite 3).

9 TUTKIMUSTULOKSET

Vertailimme 50 *S.aureus*-bakteerikantaa neljällä eri herkkyysmenetelmällä. Näistä kannoista 26 kappaletta oli MRSA-positiivisia ja 23 kappaletta MRSA-negatiivisia. Yhden näytteen MRSA-maljan tulos oli epävarma. MRSA-maljan kasvua verrattiin kiekko menetelmän SIR-vastauksiin.

9.1 Kiekkoherkkyysmenetelmien vertailu

Kahden muuttujan välisen yhteyden tutkiminen aloitetaan tarkastelemalla, onko muuttujilla mahdollisuutta olla yhteydessä toisiinsa. Todettaessa, että muuttujilla voisi olla yhteys toisiinsa, voidaan tilastollista tutkimusta jatkaa. Kahden muuttujan välistä yhteyttä voidaan tarkastella hajontakuviolla (kuvio 1) eli korrelaatiodiagrammilla (scatter diagram). Muuttujien arvot merkitään koordinaatistoon ja tarkastellaan, muodostuuko pisteistä säännöllistä joukkoa. Hajontakuviosta voidaan tutkia yhteyden voimakkuutta, muotoa ja suuntaa. Säännönmukaisesta kuviosta voidaan jatkaa muuttujien välisen yhteyden matemaattista tarkastelua korrelaatiokertoimen avulla. Pearsonin korrelaatiokertoimen avulla voidaan osoittaa lineaarisen riippuvuuden suuruutta kertoimien -1 ja +1 välillä. Kertoimen etumerkki osoittaa riippuvuuden suunnan, positiivinen luku osoittaa nousevaa suoraa ja negatiivinen laskevaa suoraa. Jollei muuttujilla ole havaittavaa lineaarista riippuvuutta, on kertoimen arvo 0. (Holopainen & Pulkkinen 2008, 228-229, 233-234; Heikkilä 2014, 192-193.)



KUVIO 1. Kefoksitiini- ja oksasilliinikiekon välinen hajontakuvio ja regressiosuora

Regressiosuoran avulla voidaan havaita lineaarista riippuvuutta muuttujien välillä, sillä pisteet muodostuvat suoran lähetyville. Taulukosta löytyvä arvo R^2 on selityskerroin, joka kertoo kuinka suuren osan selittävä muuttuja (x) ja selitettävä muuttuja (y) vaihtelevat. Selityskerroin on saatu nostamalla korrelaatiokerroin toiseen potenssiin. Selityskerroin 0,64 tarkoittaa, että y :n vaihteluista 64 % voidaan selittää x :n vaihteluiden avulla. (Heikkilä 2014, 193.) Korrelaatiokerroin laskettiin kefoksitiini- ja oksasilliinikiekon herkkyystulosten välille. Korrelaatiokertoimeksi saatiin 0,80. Nouseva suora hajontakuviassa tukee tulosten välistä positiivista riippuvuutta. Tulosten välillä on näin ollen havaittavissa samanlaista suuntautumista. Kertoimen arvo tukee lineaarisen riippuvuuden olemassaoloa.

9.2 Tulosten yhteneväisyys menetelmien välillä

Havaintoarvo, joka poikkeaa huomattavasti muista, tai joka ei noudata samaa mallia, kutsutaan poikkeavaksi arvoksi (outlier). Poikkeus voi tulla esimerkiksi mittausvirheestä, mutta kyseessä voi olla oikeasti muista poikkeava arvo. Tällaiset tapaukset tulisi aina tutkia erikseen ja etsiä mahdollista syytä. (Holopainen & Pulkkinen 2008, 287.) Herkkyysmäärittysten tuloksia verrattiin taulukoiden avulla keskenään. Taulukoinnissa tulee

huomata, ettei kefoksitiinin kiekkoherkkyysmenetelmälle ole annettu erillistä I-arvoa, kuten oksasilliinille on. Tulokseen eriävät SIR-vastaukset on esitetty taulukossa 3 vertailun helpottamiseksi.

TAULUKKO 3. SIR-tulosten jakautuminen kiekkomenetelmissä

	Kefoksitiiniekko	Oksasilliiniekko
S	25	33
I	-	3
R	25	14

Taulukosta 3 nähdään, kuinka yhteneväisiä kiekkoherkkyysmenetelmien SIR-tulokset ovat toistensa kanssa. Taulukko osoittaa näiden kahden mikrobilääkkeen eroavaisuuden herkkyuden ja resistentin välillä *S.aureus*-kannalle. Eri tulkintarajojen (kts. kappale 8) vuoksi menetelmien välisissä tuloksissa on eroa toisiinsa nähden. Kefoksitiiniekolle ei ole määritelty I-herkkyysrajaa EUCASTin tulkintataulukoissa. Poikkeavia tuloksia katsellaan tarkemmin taulukossa 4.

TAULUKKO 4. Poikkeavat tulokset kiekkoherkkyysmenetelmässä

	Kefoksitiini	Oksasilliini	MRSA-malja
Näyte 7	S	I	Negatiivinen
Näyte 8	R	S	Positiivinen
Näyte 9	R	S	Positiivinen
Näyte 10	R	S	Positiivinen
Näyte 12	R	I	Positiivinen
Näyte 13	R	S	Positiivinen
Näyte 21	R	S	Positiivinen
Näyte 23	R	S	Positiivinen
Näyte 25	R	S	Positiivinen
Näyte 30	R	I	Positiivinen
Näyte 31	R	S	Positiivinen

Verrattaessa oksasilliini- ja kefoksitiiniekkoherkkyysmenetelmän SIR-tuloksia MRSA-maljan vastauksiin, suurin osa herkkyksistä oli yhteneväisiä. Yhteneväisyys tarkoittaa,

että molemmilla kiekkoherkkyysmenetelmällä saatiin sama SIR-tulos. Joukosta löytyi yksitoista (11) poikkeavaa tulosta (taulukko 4), jotka tarkoittavat toisistaan poikkeavia tuloksia kiekkoherkkyysmenetelmällä. Yhtä lukuun ottamatta kaikki poikkeavat tulokset ovat tulleet MRSA-positiivisista maljoista. Kefoksitiinikiekkomenetelmällä tulos R oli lähes poikkeuksetta MRSA-maljalla positiivinen. Poikkeuksiin tuli kaksi näytekantaa. Poikkeavissa tuloksissa MRSA-maljan tulokseksi saatiin positiivinen, mutta kefoksitiinikiekkoherkkyysmenetelmän mitatuksi herkkyudeksi tuli S. Oksasilliinikiekkoherkkyysmenetelmällä SIR-tulos vaihteli herkästä resistenttiin positiivisten MRSA-maljojen kohdalla. Positiivisista MRSA-maljoista S-herkkyysä oli 10, I-herkkyysä 2 ja R-herkkyysä 14 oksasiillinikiekkoherkkyysmenetelmällä.

10 TULOSTEN YHTEENVETO

Kiekkoherkkyysmenetelmän mitatut arvot olivat osittain toisistaan erilaisia menetelmien välillä. Tähän vaikuttaa menetelmien tulkinta-arvot. Kefoksitiinikiekkoherkkyysmenetelmän arvot vaihtelivat 9-27 mm välillä, oksasilliinikiekkoherkkyysmenetelmän arvot 6-26 mm välillä. Suurempi ero arvoissa tulee keskiarvolukemissa: kefoksitiinin keskiarvon ollessa 20 mm ja oksasilliinin 14 mm. Taulukoinnissa ei vertailtu oksasilliini-E-testiä kiekkomenetelmien takia menetelmäeron vuoksi. E-testin arvot vaihtelivat välillä 0,12-256,00 mg/l, keskiarvon ollessa 8,33 mg/l. E-testi vastataan MIC-arvona, joten vertailu kiekkoherkkyysmenetelmän SIR-arvoihin on hankalaa. Arvoja vertailemalla on kuitenkin mahdollista nähdä kiekkoherkkyysmenetelmän SIR-arvolla mikrobilääkkeen teho ja e-testin MIC-arvolla tarvittava antibiootin määrä bakteerikantaa kohtaan.

Kefoksitiinikiekkon ja MRSA-maljan tulokset olivat yhteneväiset keskenään kahta poikkeusta lukuun ottamatta. Poikkeukset muodostivat näytteet 1 ja 2. Näytteen 1 kohdalla MRSA-maljan tulkinta oli epävarmaa muista poikkeavan kasvuston perusteella. Näyte 2:en poikkeavuuden syy jäi tuntemattomaksi. Muutoin kaikki S-tuloksen saaneet kefoksitiinikiekkoherkkyysmenetelmän näytteet olivat negatiivisia MRSA-maljalla. R-tuloksen saaneet näytteet saivat aikaan kasvuston MRSA-maljalle, eli olivat positiivisia. Oksasilliinikiekkon ei muodostanut samanlaista selkeää yhteyttä MRSA-maljan kanssa kuin kefoksitiini. Tuloksista aikaisemmin mainitut samat 11 näytettä poikkesivat SIR-tulosten lisäksi myös yhtenäisissä MRSA-tuloksissa. Näiden 11 näytteen lisäksi virheisiin lasketaan samat näyte 1 ja näyte 2 kuin kefoksitiinin kohdalla. Kefoksitiinikiekkoherkkyysmenetelmän tuloksista 96 % oli yhteneväisiä MRSA-maljan kanssa, oksasilliinikiekkoherkkyysmenetelmän tuloksista vain 74 % muodostivat saman tuloksen MRSA-maljan kanssa.

Muutosprosenttitaulukosta (liite 2) ilmenee kefoksitiinikiekkon suurempi tulos verrattuna vanhaan oksasilliinikiekkoherkkyysmenetelmään. Muutosprosenttien keskiarvo on 65,9 %. Koska kyseessä on kaksi erilaista mikrobilääkettä, joiden tulkinta-arvot eroavat suuresti, ei muutosprosentin merkittävyyttä arvioida. Tuloksista voi kuitenkin nähdä kuinka paljon eroa menetelmien välillä on erilaisten tulkinta-arvojen kohdalla. Oksasilliinille resistentit kannat, joiden mitattu herkkyys on ollut 6 mm, eroavat eniten kefoksitiinin tuloksista. Näillä arvoilla muutosprosentti on jopa 183,3 %. Muutosprosentti kertoo, kuinka

suuri numerollinen eroavaisuus tuloksilla on keskenään. Kefoksitiinikiekkoa käytettäessä saadut numeraaliset tulokset ovat suurempia kuin oksasilliinikiekkolla. Muutosprosentti ei vaikuta tulosten tulkintaan, mutta sen avulla on nopea nähdä, millaiset herkkyysrajojen erot menetelmien välillä ovat.

Otoksessa oli joukossa muutamia toisistaan poikkeavia tuloksia (ks. 9.2.). Näytteissä eron MRSA-maljan vertailuun tekee lähes jokaisen kohdalla oksasilliinikiekkko. Näiden 11 näytteen lisäksi poikkeaviin tuloksiin kuuluvat näyte 1 epäselvän MRSA-kasvunsa takia ja näyte 36 oksasilliini-E-testi-tuloksen myötä. Näytteen 36 E-testin MIC-arvo oli 256 mg/l, mikä eroaa huomattavasti keskiarvosta 8,33 mg/l. Taustatiedoista emme tiedetä kuin bakteerikannan, *S.aureus*, joten emme osaa sanoa löytyykö taustalta selittävää tekijää poikkeuksille.

Tulosten perusteella tehtävät päätelmät viittaavat kefoksitiinikiekkomenetelmän toimivuuteen *S.aureuksen* ja MRSA:n diagnostiikassa. Tätä tulosta tukevat myös kirjallisuus sekä nykyiset mikrobiologian laboratoriossa käytössä olevat standardit. Kefoksitiinikiekkokerkkyysmenetelmä olisi tulostemme perusteella yksistään riittävä *S.aureuksen* metisilliiniresistentin havaitsemiseen.

Oksasilliinia ja kefoksitiinia on vertailtu viime vuosina useampaan kertaan. Tutkimuksessa ”*Comparison of Cefoxitin and Oxacillin Disk Diffusion Methods for Detection of mecA-Mediated Resistance in Staphylococcus aureus in a Large-Scale Study*” (2009) todettiin loppupäätelminä kefoksitiinin olevan luotettavampi menetelmä *S.aureuksen* ja MRSA:n resistenttiyden selvittämiseen. Kefoksitiinikiekkokerkkyuden tulokset olivat helpommin tulkittavissa ja herkempiä *mecA*-tunnistukseen kuin oksasilliinikiekkokerkkyys. Oksasilliinin estorenkaut muodostivat utuiset ääriarvot, kefoksitiinin vastaavat olivat useimmin selkeärajaiset. (Broekema, Van, Monson, Marshall & Warshauer 2009.)

11 POHDINTA

Opinnäytetyössä vertailimme keskenään kefoksitiini- ja oksasilliinikiekkoherkkyysmenetelmää, oksasilliini E-testiä ja kefoksitiinimaljaa. Työllä oli kaksi tarkoitusta: ovatko herkkyysmääritysten tulokset yhteneväisiä ja onko kefoksitiinikiekkoherkkyysmenetelmän käyttö yksinään riittävä MRSA:n havaitsemiseen. Tavoitteena oli saada selville voiko Fimlab Laboratoriot Oy siirtyä käyttämään kefoksitiinikiekkoa *S.aureuksen* diagnostiikassa ja siirtyä täten EUCASTin standardin mukaiseen menetelmään.

Taulukoimme kefoksitiini- ja oksasilliinikiekkoherkkyysmenetelmän, oksasilliini E-testin ja kefoksitiinimaljan tulokset Excel-tilaukseen ja vertailimme arvoja tilastotieteellisin menetelmin. Kefoksitiinikiekkon ja MRSA-maljan tulokset olivat yhteneväiset keskenään kahta poikkeusta lukuun ottamatta. Oksasilliinikiekkolla ei ollut samanlaista yhteyttä MRSA-maljan tuloksiin. Kefoksitiinikiekkoherkkyysmenetelmään siirtymistä puoltaa myös se, että oksasilliinikiekkon estorenkaut muodostivat utuisemmat ääriarvot, kun taas kefoksitiinikiekkon estorenkaut olivat selkeärajaiset ja paremmin tulkittavissa. Kokeellisen osuuden tulosten perusteella kefoksitiinikiekkoherkkyysmenetelmä on yksinään riittävä MRSA:n havaitsemiseen. Sen käyttöön voitaisiin siirtyä Fimlab Laboratoriot Oy:ssä.

Valitsimme aiheen, koska se vaikutti tarpeelliselta tutkimukselta. Toivoimme, että työtämme olisi suoraan hyötyä Fimlab Laboratoriot Oy:lle. Aiheen mielenkiintoisuuteen vaikutti myös se, että emme löytäneet juuri tästä aiheesta suomenkielisiä tutkimuksia. Kiinnostusta työhön lisäsi kokeellisen osion toteutus. Työ on avannut mikrobiologian alaa ja bakteerien mikrobiresistenttiyttä todella paljon. Jatkuvasti eteenpäin menevä lääketieteellinen tuli hyvin esille työn lähteitä etsiessä.

Tutkimus on eettisesti hyväksyttävä, sillä potilastietoja ei käytetty, eikä näytteitä voi jäljittää alkuperäisiin potilasnäytteisiin. Käytimme alkuperäisiä näyttenumeroita kokeellisen osion ajan, mutta loimme niiden tilalle uudet tunnisteen tulosten tarkastelua varten. 50 näytteen otos oli riittävä tähän tutkimukseen. Tutkimus voitaisiin toistaa uusilla näytteillä, mikäli kaivattaisiin esimerkiksi suurempaa otoskokoja tai toistettavuuden toteutusta. Pidimme näytteet hyvässä järjestyksessä kokeellisen osuuden ajan, ja käytimme niiden alkuperäisiä näyttenumeroita, jotta näytteet eivät menneet missään vaiheessa sekaisin. Kä-

sittelimme vain yhtä näytettä kerrallaan minimoidaksemme virhetekijöiden mahdollisuuden ja lisätäksemme työskentelyn tarkkuutta. Vertasimme jokaista tekemäämme bakteerisuspensiota aina MacFarland 0,5 standardiin, joten kaikki bakteerisuspensiot olivat saman vahvuisia.

Otimme maljat, herkkyysmäärityskiekot ja E-testiliuskat ajoissa lämpenemään ohjeistuksen mukaan. Kiekot ja liuskat olivat samaa erää, mikä varmistaa tulosten luotettavuuden. Asetimme kiekot ja liuskat maljoille oikeaan aikaan, 15 minuuttia bakteerisuspension levittämisestä. Noudatimme aseptisia työtapoja ja käsittelimme kaikki näytteet mahdollisina tartuntavaarallisina näytteinä. Suoritimme tutkimuksen viikon sisällä, joten näytteiden ja laboratorion olosuhteet pysyivät samoina. Käsittelimme tulokset tarkasti ja rehellisesti, emmekä muuttaneet mitään arvoja. Koska vakioimme työskentelytapamme ja välineemme niin hyvin kuin mahdollista, pidämme tutkimustuloksia luotettavina.

Kokemuksen puute saattoi kuitenkin vaikuttaa työskentelyyn. Emme ole aikaisemmin käsitelleet itsenäisesti näin montaa näytettä. Vaikka saimme apua työtä tehdessämme, joutui monia työvaiheita, kuten dreijausta, muistelemaan. Saatuamme lisää tietoa aiheesta, jäämme pohtimaan, oliko maljalle viljelemämme bakteeripohja liian paksu tai bakteerisuspensio oikeanlainen, vaikka vertasimme sitä standardiin. Teimme herkkyysmääritykset ja tulosten tulkinnan Fimlabin tapojen mukaan. Emme voineet vaikuttaa itse näytteisiin, sillä *S. aureusta* sisältävät maljat annettiin meille valmiiksi. Jos näytteisiin liittyen on tapahtunut jokin virhe, emme tiedä siitä. Tämän vuoksi systemaattisen virheen mahdollisuus on olemassa.

Haimme lähteitä mahdollisimman laajasti ja pyrimme suhtautumaan niihin kriittisesti. Halusimme käyttöön mahdollisimman tuoreita lähdeviitteitä. Vanhempien julkaisujen kohdalla pohdimme asian paikkansapitävyyttä nykyhetkellä ennen kuin referoimme sitä. Työn aikana hylkäsimme monta lähdettä, koska emme olleet varmoja niiden oikeellisuudesta. Raporttiosan lähteet ovat luotettavia tieteellisiä kirjoja, internetsivustoja ja julkaisuja alan ammattilaisten kirjoittamina.

Kehitimme opinnäytetyön tekemisen aikana tiedonhakutaitojamme, ja opimme kyseenalaistamaan lähteiden luotettavuutta. Luotettavien ja tieteellisten tekstien löytäminen hioutui paremmaksi. Syvensimme teoriatietojamme mikrobiologian osa-alueella. Verifiointi oli työssämme tärkeä aihealue, mutta siitä löytyi huonosti tarpeeksi kattavia lähteitä.

Koemme kuitenkin, että perehdyimme verifiointiin niin hyvin kuin mahdollista, ja ymmärrämme sen merkityksen laboratorion kannalta.

Kokeellinen osio olisi ollut helpompi suorittaa pitkän harjoittelumme jälkeen. Saimme kuitenkin hyvät ohjeet, joiden mukaan toimimme. Kokeellisesta osuudesta hankalin osuus oli herkkyystulosten tulkinta. Mittasimme kaikki herkkyystulokset yhdessä, jotta olimme varmoja vastauksesta. Epäselvissä tapauksissa pyysimme tulkinta-apua mikrobiologilta. Käytimme samaa tulkintatapaa sekä häilyvässä että tarkoissa rajoissa. Kokeellisen osuuden aikana meille ei selvinnyt EUCAST:n määrittämät tulkintatavat häilyvästi kasvavista herkkyystuloksista. Nämä tulkintaohjeet liittyivät lähinnä kuitenkin raja-arvotapauksiin, jossa mitattu kiekkoherkkyysmenetelmän tulos oli joko R tai S riippuen tulkintatavasta. Raja-arvotapauksia meillä ei juuri ollut ja kaikki tämänlaiset tulokset tarkistimme yhdessä mikrobiologin kanssa.

Opinnäytetyön tekeminen parityönä mietitytti aluksi, sillä ajattelimme yhteisen ajan löytymisen olevan mahdollisesti hankalaa. Onneksi saimme aikataulutettua opinnäytetyön tekemisen molemmille sopivaksi, ja pääsimme tekemään kokeellisen osuuden tiiviisti yhdessä viikossa. Olimme molemmat yhtä motivoituneita opinnäytetyöaiheesta, ja molempien tiedot sekä taidot olivat samalla tasolla. Vaihtelimme kokeellisessa osuudessa muutamana kerran työnjakoa, jotta molemmat pääsisimme tekemään kaikkea. Etsimme lähteitä yhdessä kirjastosta ja internetistä helpottaaksemme lähteiden luotettavuuden arviointia. Kirjoitimme opinnäytetyön raporttiosuutta sekä yhdessä että erillään. Säännöllisin väliajoin kävimme tekstiä läpi yhdessä. Vaihdoimme lähdemateriaalia keskenämme, jotta kaikki hyvä tieto tuli varmasti kerättyä aiheesta. Kokeellisen opinnäytetyön tekeminen saman tasoisen parin kanssa oli kannattavaa, sillä se mahdollisti tehokkaamman kokeellisen osuuden suorittamisen. Raporttiosuudessa käsiteltävät asiat tuli avattua paljon syvällisemmin, kun kaksi henkilöä kävi läpi käytettävät lähteet.

Opinnäytetyö oli kokonaisuudessaan opettavainen prosessi. Kokeellisen osuuden tulosten perusteella Fimlab Laboratoriot Oy pääsi ottamaan kefoksitiinikiekon rutiinikäyttöön. Kefoksitiinikiekko on korvannut oksasilliinikiekon ja kefoksitiinimaljan. Käytäntö on yksinkertaisempi kuin aiemmin ja säästää rahan lisäksi myös herkkyysmäärittämiseen käytettävää aikaa. Tämän työn avulla Fimlabissa on otettu siis uusi askel kohti tehokkaampaa ja luotettavampaa *S.aureus* -kantojen herkkyysmäärittämistä.

LÄHTEET

- Alasuutari, P. 2012. Laadullinen tutkimus 2.0. Osuuskunta Vastapaino. Viitattu 20.5.2016. Saatavissa: <https://www.elliblibrary.com/book/978-951-768-385-2>
- Broekema, N., Van, T., Monson, T., Marshall, S. & Washauer D. 2009. Comparison of Cefoxitin and Oxacillin Disk Diffusion Methods for Detection of *mecA*-Mediated Resistance in *Staphylococcus aureus* in a Large-Scale Study. Viitattu 6.5.2016. Saatavissa: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2620872/#r8>
- Brown, D. F. J., Andrews, J., Winstanley, T. & MacGowan, A. P. 2005. 2. painos. Antimicrobial susceptibility testing. Teoksessa Hawkey, P. & Lewis, D. (toim.) Medical Bacteriology. New York: Oxford University Press Inc, 215-217.
- Carlson, P. & Koskela, M. 2011. Bakteriologian perustekniikat. Infektiosairaudet. Kustannus Oy Duodecim. Viitattu 2.5.2016. Saatavissa: <http://www.oppi-portti.fi.elib.tamk.fi/op/isa00302/do>
- Cosimo, F., Suvoros, M., Vakulenko, S. & Mobashery, S. 2004. The Basis for Resistance to β -Lactam Antibiotics by Penicillin-binding Protein 2a of Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Viitattu 5.5.2016. Saatavissa: <http://www.jbc.org/content/279/39/40802.full#fn-2>
- CHROMagar™. Tuoteluettelo. Viitattu 27.5.2016. Saatavissa: http://www.chromagar.com/images_spaw/LF_EXT_029_FIN_V3.pdf?PHPSSES-SID=f76c14ce09e1e44daf06b147fdaa6420
- Dobric, J. 2014. Antibiotikaresistens: Kampen mot det ansiktslösa hotet. Laboratoriet 4/2014.
- EUCAST - The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 6.0, 2016. Viitattu 22.5.2016. Saatavissa: <http://www.eucast.org>
- Fimlab Laboratoriot Oy. 2016a. MIC-määrittäminen gradienttiliuskalla. Työohje. Viitattu 20.7.2016.
- Fimlab Laboratoriot Oy. 2016b. *Staphylococcus aureus*, metisilliiniresistentti. Työohje. Viitattu 20.7.2016.
- Fimlab Laboratoriot Oy. 2016c. *Staphylococcus aureus*, metisilliiniresistentti (MRSA), viljely. Ohjekirja. Viitattu 22.5.2016. Saatavissa: http://www.fimlab.fi/ohjekirja/nayta.tmpl?sivu_id=194;setid=5959
- FiRe. 2009. Kiekkomenetelmää täydentävät menetelmät. Viitattu 6.5.2016. Saatavissa: http://www.thl.fi/attachments/Fire/liite_6_taydentavat_menetelmat.pdf
- Haapala, A-M. 2015. Laboratorion näkökulma muuttuvaan standardiin 15189: 2012 mikä muuttuu? Fimlab Laboratoriot Oy. Viitattu 3.5.2016. Saatavissa:

<http://www.labquality.fi/@Bin/2813446/Anna-Maija+Haapala+Laboration+n%C3%A4k%C3%B6kulma+muuttuvaan+standardiin+Labquality+Days+2015.pdf>

Hallanvuo, S. 2010. Validointi - Mikrobiologiset menetelmät. Viitattu 26.5.2015. Saatavissa: http://www.evira.fi/files/attachments/fi/evira/esittely_toiminta_valvonta/laboratoriotoiminta/koulutus/saija_hallanvuo_validointialustus_13102010.pdf.

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

Hirvonen J., & Kaukoranta, S. 2014. Usability and Performance of Copan EMRSA Broth for the Preliminary Detection of Methicillin-Resistant Staphylococcus Aureus in Clinical Specimens. Copan Diagnostics. Viitattu 30.7.2016. Saatavissa: <http://www.copanusa.com/education/scientific-studies/usability-and-performance-copan-emrsa-broth-preliminary-detection-methicillin-resistant-staphylococcus-aureus-clinical-specimens/>

Hirvonen, J. 2016. Rikastusviljely. Sähköpostiviesti. jari.hirvonen@fimlab.fi. Luettu 20.5.2016.

Holopainen, M. & Pulkkinen, P. 2008. Tilastolliset menetelmät. 5.-6.painos. Helsinki: WSOY Oppimateriaalit Oy

Huttunen, R. & Timonen, S. 2012. Pirkanmaan MRSA. Viitattu 13.10.2015. Saatavissa: http://www.finnanest.fi/files/simonen_mrsa.pdf.

Huupponen, R. 2014. Penisilliinien jaottelu. Teoksessa: Toim. Hakkola, J., Huupponen, R., MacDonald, E., Moilanen, E., Pasanen, M., Scheinin, M. & Vähäkangas, K. Lääketieteellinen farmakologia ja toksikologia. Kustannus Duodecim.

Izquierdo Álvarez, S. & Bernabeu Andreu, F.A. 2011. Procedures for Validation of Diagnostic Methods in Clinical Laboratory Accredited by ISO 15189. Luettu 21.5.2016. <http://cdn.intechopen.com/pdfs-wm/22135.pdf>

Ikäheimo, I. 2002. Käytännön esimerkkejä kliinisen mikrobiologian menetelmien validoinnista ja verifiointista. Moodi 1/2002.

Jalava, J. 2014. Bakteerien mikrobilääkeresistenssi Suomessa - Finres 2014. THL, 8. Viitattu 3.5.2016. Saatavissa: <http://www.julkari.fi/handle/10024/127187>

Jalava, J. 2016. Ohje moniresistenttien bakteerien diagnostiikasta - Toteaminen, resistenssimekanismit ja kantajuusseulonnat. THL. Viitattu 3.5.2016. Saatavissa: <http://www.julkari.fi/handle/10024/130258>

Jonsson, A. & Karhumäki, E. 2005. Sairaalainfektiot. Teoksessa Karhumäki, E., Jonsson, A. & Saros, M. Mikrobit hoitotyön haasteena. Helsinki: Edita Prima Oy, 143.

Järvinen, A., Huovinen, P. & Vaara, M. 2011. Beetalaktaamit. Infektiosairaudet. Kustannus Oy Duodecim. Viitattu 2.5.2016. Saatavissa: <http://www.oppiportti.fi.elib.tamk.fi/op/isa00802/do>

Katila, M-L. 2004. Teoksessa Penttilä, I. (toim.) Kliiniset Laboratoriotutkimukset. Helsinki: WSOY, 343-344, 354, 357-358.

- Ketokivi, M. 2015. Tilastollinen päättely ja tieteellinen argumentointi. Helsinki: Gaudamus. Viitattu 20.5.2016. Saatavilla: <https://www.elibslibrary.com/book/9789524958516>
- Kärpänoja, P. 2014. MALDI-TOF MS -menetelmän käyttö bakteereiden ja sienten tunnistuksessa. Moodi 4-5/2014.
- Levinson, W. 2014. 13. painos. Review of Medical Microbiology and Immunology. The United States of America: McGraw-Hill Education, 72-73, 111.
- Liimatainen, O. 2002. Menetelmien validointi ja verifiointi kliinisen mikrobiologian laboratoriossa: yleisiä periaatteita. Moodi 1/2002.
- Lindholm, L. 2013. Grampositiivisten bakteerien resistenssimekanismien toteaminen EUCAST-suositus. THL. Viitattu 5.5.2016. Saatavissa: http://www.thl.fi/attachments/Shp-SIRO-FiRe/25.%20Laura%20Lindholm_Grampositiivisten%20bakteerien%20resistenssimekanismien%20toteaminen1%2010%202013.pdf
- Metsämuuronen, J. 2002. Metodologia - sarja 2 - Tilastollisen kuvauksen perusteet. Helsinki: International Methelp Ky, 11.
- Nissinen, A. 2009. Bakteerin lääkeherkkyyden määrittäminen kiekkomenetelmällä. FiRe. Viitattu 6.5.2016. Saatavissa: <http://www.thl.fi/attachments/Fire/kiekkomenetelma.pdf>
- Peacock, S. 2006. Staphylococcus aureus. Teoksessa Gillespie, S. & Hawkey, P. (toim.) Principles and Practice of Clinical Bacteriology. Chichester: John Wiley & Sons, 77.
- Percy, MG. & Gründling, A. 2014. Artikkel. Lipoteichoic acid synthesis and function in gram-positive bacteria. Viitattu: 4.5.2016. Saatavissa: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24819367>
- Pirkanmaan sairaanhoitopiiri. 2015. Tartuntatautiraportti.
- PucChem. 2016. Cefoxitin. Viitattu 6.5.2016. Saatavissa: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/cefoxitin#section=Top>
- Rantakokko-Jalava, K. 2011. Moniresistentit mikrobit - mitä mikrobiologialla on tarjolla? Suomen Sairaalahygienialehti. 3/2011. Saatavilla: http://sshy.fi/data/documents/lehdet/11_3.pdf
- Rantakokko-Jalava, K. 2013. Moniresistenttien bakteerien seulontaan uusi laadunarviointiohjelma. Moodi 5/2013.
- Rintala, E. & Saxén, H. 2011. Infektiosairaudet. Mikrobiologia, immunologia ja infektiosairaudet. 1. painos. Porvoo: Bookwell Oy, 44.
- Saros, M. 2005. Laboratoriodiagnostiikka. Teoksessa Karhumäki, E., Jonsson, A. & Saros, M. Mikrobit hoitotyön haasteena. Helsinki: Edita Prima Oy, 173, 175, 177-178, 198, 202.

Swenson, J. & Tenover, F. 2005. Results of Disk Diffusion Testing with Cefoxitin Correlate with Presence of *mecA* in *Staphylococcus* spp. Viitattu 6.5.2016. Saatavissa: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1233887/>

Theodorsson, E. 2012. Validation and verification of measurement methods in clinical chemistry. *Bioanalysis* 2012, 4(3), 305- 320. Viitattu 3.5.2016. Saatavissa: <http://www.future-science.com/doi/pdf/10.4155/bio.11.311>

THL. Päivitetty 2016. Spa-tyypitys. Viitattu 3.5.2016. Saatavissa: <https://www.thl.fi/fi/web/infektiotaudit/laboratoriotoiminta/laboratoriotutkimukset/mrsa-laboratoriotutkimukset/mrsa-laboratoriotutkimukset-spa-tyypitys>

Tuokko, S., Rautajoki, A. & Lehto, L. 2008. Kliiniset laboratorionäytteet - opas näytteiden ottoa varten. Helsinki: Tammi, 97.

Tykslab. 2010. Mikrobiologisten näytteiden ottaminen. Ohjekirja. Viitattu 22.5.2016. Saatavissa: <http://ohjekirja.tykslab.fi/liitteet/MikrobiolNaytteet.pdf>

Vaara, M., Skurnik, M. & Sarvas, M. 2003. Bakterisolun rakenne ja toiminta. Teoksessa Huovinen, P., Meri, S., Peltola, H., Vaara, M., Vaehri, A. & Valtonen, V. (toim.) *Mikrobiologia ja infektiosairaudet*. Kirja 1. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim, 59, 61-62.

Vuopio-Varkila, J., Kuusela, P. & Kotilainen, P. 2003. *Staphylococcus aureus*. Teoksessa Huovinen, P., Meri, S., Peltola, H., Vaara, M., Vaehri, A. & Valtonen, V. (toim.) *Mikrobiologia ja infektiosairaudet*. Kirja 1. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim, 98-99.

Vuopio-Varkila, J., Kuusela, P. & Kotilainen, P. 2010. *Staphylococcus aureus*. *Mikrobiologia*. Kustannus Oy Duodecim. Viitattu 2.5.2016. Saatavissa: <http://www.oppi-portti.fi.elib.tamk.fi/op/mbg00601/do>

LIITTEET

Liite 1. Tulostaulukko

	Kefoksitiinikiekko (mm)	SIR	Oksasilliinikiekko (mm)	SIR	Oksasilliini-E-testi (mg/l)	MRSA-malja
Näyte 1	18	R	14	S	2,00	Epävarma (ei/kyllä)
Näyte 2	24	S	19	S	1,00	Positiivinen
Näyte 3	15	R	6	R	8,00	Positiivinen
Näyte 4	25	S	15	S	2,00	Negatiivinen
Näyte 5	16	R	6	R	16,00	Positiivinen
Näyte 6	15	R	6	R	16,00	Positiivinen
Näyte 7	24	S	11	I	2,00	Negatiivinen
Näyte 8	18	R	13	S	1,00	Positiivinen
Näyte 9	15	R	15	S	1,00	Positiivinen
Näyte 10	20	R	18	S	1,00	Positiivinen
Näyte 11	24	S	14	S	1,00	Negatiivinen
Näyte 12	17	R	12	I	4,00	Positiivinen
Näyte 13	18	R	14	S	1,00	Positiivinen
Näyte 14	23	S	21	S	0,12	Negatiivinen
Näyte 15	26	S	17	S	0,50	Positiivinen
Näyte 16	15	R	6	R	8,00	Positiivinen
Näyte 17	17	R	10	R	2,00	Positiivinen
Näyte 18	23	S	15	S	2,00	Negatiivinen
Näyte 19	16	R	6	R	8,00	Positiivinen
Näyte 20	13	R	6	R	16,00	Positiivinen
Näyte 21	16	R	13	S	2,00	Positiivinen
Näyte 22	16	R	6	R	8,00	Positiivinen
Näyte 23	18	R	16	S	1,00	Positiivinen
Näyte 24	17	R	6	R	1,00	Positiivinen
Näyte 25	17	R	13	S	8,00	Positiivinen
Näyte 26	17	R	6	R	8,00	Positiivinen
Näyte 27	23	S	15	S	1,00	Negatiivinen
Näyte 28	13	R	6	R	16,00	Positiivinen
Näyte 29	17	R	6	R	4,00	Positiivinen
Näyte 30	15	R	11	I	2,00	Positiivinen
Näyte 31	17	R	15	S	2,00	Positiivinen
Näyte 32	19	R	8	R	8,00	Positiivinen
Näyte 33	24	S	13	S	1,00	Negatiivinen
Näyte 34	24	S	15	S	1,00	Negatiivinen
Näyte 35	24	S	14	S	1,00	Negatiivinen
Näyte 36	9	R	6	R	256,00	Positiivinen
Näyte 37	24	S	20	S	0,25	Negatiivinen
Näyte 38	25	S	23	S	0,12	Negatiivinen
Näyte 39	23	S	21	S	0,25	Negatiivinen
Näyte 40	26	S	26	S	0,12	Negatiivinen
Näyte 41	25	S	21	S	0,12	Negatiivinen
Näyte 42	24	S	21	S	0,12	Negatiivinen
Näyte 43	23	S	18	S	0,25	Negatiivinen
Näyte 44	25	S	20	S	0,12	Negatiivinen
Näyte 45	25	S	17	S	0,50	Negatiivinen
Näyte 46	26	S	22	S	0,50	Negatiivinen
Näyte 47	25	S	16	S	0,50	Negatiivinen
Näyte 48	24	S	14	S	0,50	Negatiivinen
Näyte 49	27	S	20	S	0,12	Negatiivinen
Näyte 50	25	S	21	S	0,25	Negatiivinen

Liite 2. Muutosprosentit

	Kefoksitiinikiekko (mm)	Oksasilliinikiekko (mm)	Tulosten välinen muutosprosentti (%)
Näyte 1	18	14	28,6
Näyte 2	24	19	26,3
Näyte 3	15	6	150,0
Näyte 4	25	15	66,7
Näyte 5	16	6	166,7
Näyte 6	15	6	150,0
Näyte 7	24	11	118,2
Näyte 8	18	13	38,5
Näyte 9	15	15	0,0
Näyte 10	20	18	11,1
Näyte 11	24	14	71,4
Näyte 12	17	12	41,7
Näyte 13	18	14	28,6
Näyte 14	23	21	9,5
Näyte 15	26	17	52,9
Näyte 16	15	6	150,0
Näyte 17	17	10	70,0
Näyte 18	23	15	53,3
Näyte 19	16	6	166,7
Näyte 20	13	6	116,7
Näyte 21	16	13	23,1
Näyte 22	16	6	166,7
Näyte 23	18	16	12,5
Näyte 24	17	6	183,3
Näyte 25	17	13	30,8
Näyte 26	17	6	183,3
Näyte 27	23	15	53,3
Näyte 28	13	6	116,7
Näyte 29	17	6	183,3
Näyte 30	15	11	36,4
Näyte 31	17	15	13,3
Näyte 32	19	8	137,5
Näyte 33	24	13	84,6
Näyte 34	24	15	60,0
Näyte 35	24	14	71,4
Näyte 36	9	6	50,0
Näyte 37	24	20	20,0
Näyte 38	25	23	8,7
Näyte 39	23	21	9,5
Näyte 40	26	26	0,0
Näyte 41	25	21	19,0
Näyte 42	24	21	14,3
Näyte 43	23	18	27,8
Näyte 44	25	20	25,0
Näyte 45	25	17	47,1
Näyte 46	26	22	18,2
Näyte 47	25	16	56,3
Näyte 48	24	14	71,4
Näyte 49	27	20	35,0
Näyte 50	25	21	19,0

Liite 3. Kefoksitiinin ja oksasilliinin herkkyysarvojen erot kiekkomittauksella

