

Iri Matintalo  
Riikka Palmberg

# Flexicult® Vet -viljelymaljan vertailututkimus koirien ja kissojen virtsatieinfektioiden diagnostiikassa

Metropolia Ammattikorkeakoulu

Bioanalytiikka

Bioanalytiikan koulutusohjelma

Opinnäytetyö

20.4.2017

Tekijät Otsikko	Iri Matintalo ja Riikka Palmberg Flexicult® Vet -viljelymaljan vertailututkimus koirien ja kissojen virtsatieinfektioiden diagnostiikassa
Sivumäärä Aika	45 sivua + 1 liite 20.4.2017
Tutkinto	Bioanalyttikko (AMK)
Koulutusohjelma	Bioanalytiikan koulutusohjelma
Suuntautumisvaihtoehto	Bioanalytiikka
Ohjaajat	Marjatta Luukkanen, Lehtori, Metropolia AMK Päivi Rauvo, Tuotepäällikkö, Triolab
<p>Virtsatieinfektiot ovat yleinen syy mikrobilääkkeiden määräämiseen koirilla ja kissoilla. Virtsaviljelyllä pyritään löytämään virtsatieinfektioita aiheuttava bakteeri, jolle tehdään oikean lääkkeen löytämiseksi myös antibioottiliikkyysmääritys. Kansainvälisten suositusten mukaan lemmikkieläinten epäiltyjen virtsatietulehdusten antibioottilähdön tulisi perustua viljely- ja herkkyystesteihin. Yleisimmillä määritysmenetelmillä kestää kuitenkin kaksi päivää ennen kuin herkkyysmäärityksen tuloksiin perustuva hoito voidaan aloittaa.</p> <p>Toimeksiantajana tutkimuksessa toimi Triolab Oy. Tutkimuksen tarkoituksena oli verrata silmämääräisesti Triolabin valikoimaan tulleen koirille ja kissoille tarkoitetun Flexicult® Vet -virtsaviljelymaljan tuloksia perinteiseen virtsan bakteeriviljelyyn ja herkkyysmääritykseen. Vertailumaljaksi valittiin yleisesti eläinklinikoilla käytössä oleva Uriselect 4. Tavoitteena oli, että jos vertailtavien menetelmien tulokset ovat yhtenevät, Triolab voisi suositella Flexicult Vet -maljaa eläinklinikoille korvaamaan nykyisin käytössä olevan menetelmän. Flexicult Vet -maljalla voidaan määrittää bakteerien määrä, alustava tunnistus ja ennuste antibioottiliikkydestä yhdellä viljelykerralla, jolloin tulokset ovat käytettävissä vuorokauden kuluessa. Kummatkin vertailtavat maljat ovat kromogeenisia, joten bakteeripesäkkeet värjäytyvät eri väreihin, mikä helpottaa bakteerien silmämääräistä tunnistusta.</p> <p>Näytteitä viljeltiin yhteensä 43, joista 13 oli koirien ja kissojen virtsanäytteitä ja 30 koululta saatuja ATCC -bakteerikantoja ja niiden laimennoksia. Molemmille maljoille tehtiin bakteeriviljelyt ja Uriselect 4 -maljan bakteereille tehtiin lisäksi antibioottiliikkyysmääritykset yleisesti käytössä olevalla kiekkomenetelmällä Mueller-Hinton -maljalle.</p> <p>Tutkimuksen perusteella pesäkemorfologiassa ja kasvun määrässä ei ollut havaittavissa suurempia eroja maljojen välillä. Värireaktiot olivat selkeitä ja toimivat suurimmaksi osaksi valmistajan lupaamalla tavalla. Antibioottiliikkyysien tulokset vastasivat toisiaan, lukuun ottamatta yhtä poikkeamaa <i>E. colin</i> herkkyudessa amoksisilliini/klavulaanilaholle. Flexicult Vet -malja on helppokäyttöinen käsittelyaika säästävä ratkaisu, joka voisi nopeuttaa herkkyysmäärityksiin perustuvaa antibioottiliikkyysmääritystä ja näin ollen korvata perinteisen virtsaviljelymenetelmän eläinklinikoilla rutiinidiagnostiikassa. Luotettavamman tutkimustuloksen saaminen edellyttäisi kuitenkin suurempaa näytemäärää, joka koostuisi kokonaan koirien ja kissojen virtsanäytteistä.</p>	
Avainsanat	virtsatieinfektio, virtsan bakteeriviljely, kromogeeniset maljat, antibioottiliikkyysmääritykset

Authors Title Number of Pages Date	Iri Matintalo and Riikka Palmberg Comparative study of Flexicult® Vet -culture test in canine and feline urinary tract infections 45 pages + 1 appendices 20 April 2017
Degree	Bachelor of Health Care
Degree Programme	Biomedical Laboratory Science
Specialisation option	Biomedical Laboratory Science
Instructors	Marjatta Luukkanen, Senior Lecturer, Metropolia UAS Päivi Rauvo, Product Manager, Triolab
<p>Urinary tract infection is a common cause to prescribe antimicrobial medicine for dogs and cats. Urine culturing is used to diagnose urine tract infection, identify the bacterium and to test antimicrobial susceptibility to find the right antibiotics. According to international guidelines the antibiotic treatment for pets suspected urinary tract infections should be based on culturing and susceptibility testing. However, the most common diagnostic culture requires at least two days before the treatment can be started based on susceptibility results.</p> <p>The subject of this study was assigned by Triolab Oy. The purpose of the study was to compare the functioning of the new Flexicult® Vet canine and feline urinary culture tests with traditional culturing and susceptibility tests. The reference plate was Uriselect 4, which is commonly used in veterinary practice. The purpose was to visually compare the results between Flexicult Vet and Uriselect 4 and find out if both have the same results. If the results were congruent, Flexicult Vet can be recommended to replace the existing culture in veterinary practice. Flexicult Vet allows enumeration of bacteria in urine, presumptive identification and prediction of antimicrobial susceptibility with one culturing, so the results are obtainable within 24 hours. Both plates are chromogenic which means that bacteria colonies will appear in different colours, which helps visually identify the bacteria.</p> <p>There was a total of 43 samples of which 13 were canine and feline urine samples and 30 were bacterial ATCC strains and dilutions of them. Bacterial culture was done on both plates. In addition, antimicrobial susceptibility test was made from Uriselect to Mueller-Hinton agar using a disc diffusion.</p> <p>According to the results, there were no significant differences between the plates when comparing colony morphology and bacterial growth. The colour reactions were clear and mostly appeared as promised by the manufacturer. The antimicrobial susceptibility results were same with both plates, except for one false <i>E. coli</i> susceptibility for amoxicillin/clavulanate. Flexicult Vet is easy to use, it could reduce processing time of samples and expedite the starting of susceptibility based antibiotic treatment. Hence Flexicult Vet could replace Uriselect 4 in veterinary practices in routine diagnostics. However, obtaining more reliable results would require a larger amount of samples that would consist entirely of canine and feline urine samples.</p>	
Keywords	urinary tract infection, urinary culture, chromogenic agar, antimicrobial susceptibility tests

## Sisällys

1	Johdanto	1
2	Opinnäytetyön tarkoitus ja tavoite	2
3	Tutkimuksen taustaa	2
4	Virtsatieinfektioiden aiheuttajia koirilla ja kissoilla	3
4.1	Yleistä bakteereista	4
4.2	Gramnegatiiviset bakteerit	5
4.2.1	<i>Escherichia coli</i>	5
4.2.2	<i>Klebsiella</i>	6
4.2.3	<i>Proteus</i>	7
4.2.4	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	7
4.3	Grampositiiviset bakteerit	8
4.3.1	Enterokokit	8
4.3.2	<i>Streptococcus canis</i>	9
4.3.3	<i>Staphylococcus pseudintermedius</i>	9
5	Viljelymenetelmät	9
5.1	Virtsan bakteeriviljely	9
5.2	Puhdasviljely	11
5.3	Bakteerien tunnistus	12
5.4	Mikrobiologisten menetelmien epävarmuus	12
5.5	Elatusaineet	13
6	Kromogeeniset maljat	13
6.1	UriSelect™4	14
6.2	Flexicult® Vet -malja	15
7	Herkkyysmäärytykset	17
7.1	Kiekkoherkkyysmenetelmä	18
7.2	Antibiootit	19
7.2.1	Ampisilliini ja amoksisilliini/klavulaanihappo	21
7.2.2	Oksasilliini	21
7.2.3	Enrofloksasiini	21
7.2.4	Trimetopriimi/ Sulfametoksatsoli	22

7.3	Mikroilääkeresistenssi	22
8	Työn toteutus	24
8.1	Aikataulu	24
8.2	Näytteiden keräys	25
8.3	Vertailun suoritus	26
9	Tulokset	29
10	Pohdinta	37
10.1	Luotettavuus ja eettisyys	37
10.2	Tulosten pohdinta	39
10.3	Ammatillinen kehittyminen	42
	Lähteet	43
	Liitteet	
	Liite 1. Työn tulokset	

## 1 Johdanto

Bakteriologiset laboratoriotutkimukset ovat tärkeässä osassa infektiotautien diagnostiikassa. Perustan tutkimuksille muodostaa bakteeriviljely, jolla eristetyt bakteerit tunnistetaan suku- ja lajitasolle. Koska bakteeritauteja hoidetaan mikrobilääkkeillä, infektiokannalta merkityksellisille bakteereille tehdään mikrobilääkeherkkyysmääritys. Viime vuosina resistenssi mikrobilääkkeille on lisääntynyt ja monipuolistunut nopeasti ja siitä on tullut lääketieteen ja eläinlääketieteen suurimpia uhkia. Mikrobilääkkeiden hallittua käyttöä pidetään tärkeimpänä resistenssin hallinnan kannalta. Tämän takia on tärkeää, että antibioottihoitoon päädyttäessä oikea lääke valitaan laboratoriotulosten perusteella. Bakteriologisten tulosten käyttöarvo riippuu siitä, kuinka nopeasti tulokset saadaan ja miten niitä voidaan käyttää tilastollisesti hyväksi empiirisiä lääkevalintoja tehtäessä. (Carlson – Koskela 2011: 37; Evira 2016.)

Tämän opinnäytetyön aiheena on koirille ja kissoille tarkoitetun Flexicult® Vet -virtsaviljelymaljan tulosten vertaaminen perinteiseen virtsan bakteeriviljelymenetelmään ja herkkyysmääritykseen. Vertailumaljana käytettiin eläinklinikoilla yleisesti käytössä olevaa Bio-Radin Uriselect 4 -viljelymaljaa. Toimeksiantajana toimii Triolab Oy, joka on vuonna 1986 perustettu laboratoriodiagnostiikkatuotteita maahantuova, markkinoiva ja myyvä asiantuntijayritys (Triolab 2016.) Yhteyshenkilönä toimii Triolabin tuotepäällikkö Päivi Rauvo. Triolab on ottanut lähiaikoina tuotevalikoimaansa Flexicult Vet -maljan ja tavoitteena oli, että jos verrattavien menetelmien tulokset vastaavat toisiaan, Triolab voisi suositella eläinklinikoita korvaamaan käytössä olevat maljansa Flexicult Vet -maljoilla. Maljan etuna on se, että tulokset ja antibioottiherkkyys saadaan yhdessä vuorokaudessa, kun perinteisellä menetelmällä herkkyys saadaan vasta toisen viljelyvuorokauden jälkeen. Tällöin oikea antibioottihoito voidaan aloittaa aikaisemmin sekä mahdollisesti väärät ja turhat antibioottimääräykset vähenevät.

Opinnäytetyön tuloksista on hyötyä Flexicult Vet -maljan käyttöönotossa, mikäli opinnäytetyössä todennetaan, että maljan tunnistus on yhtä luotettava kuin nykyinenkin menetelmä. Tällöin mahdollisesti useampi eläinklinikka ottaa maljan käyttöönsä. Tästä voi olla apua kissojen ja koirien virtsatieinfektioiden diagnostiikassa, se voi lisätä antibioottimääräysten luotettavuutta ja siten vähentää antibioottiresistenssin syntymistä.

## 2 Opinnäytetyön tarkoitus ja tavoite

Flexicult Vet -maljojen käytöllä pyritään vähentämään koirien ja kissojen turhia ja vääriä antibioottilääkityksiä ja nopeuttamaan diagnoosiprosessia. Opinnäytetyön tarkoituksena oli vertailla Flexicult Vet -viljelymaljan toimivuutta perinteiseen virtsan bakteeriviljelyyn ja herkkyysmäärittämiseen. Työn tavoitteena oli, että jos Flexicult Vet -maljan tulokset ovat yhtenevät perinteisten menetelmien kanssa, Triolab voisi suositella Flexicult Vet -maljaa eläinklinikoille korvaamaan nykyisin käytössä olevan virtsaviiljelymaljan nopeampana vaihtoehtona koirien ja kissojen virtsatieinfektioiden diagnostiikassa.

Eläinklinikoilla bakteerien tunnistus tapahtuu useasti vain kromogeenisten maljojen värin sekä ulkonäön perusteella ja vain epäselvissä tapauksissa maljat lähetetään jatkotutkimuksiin. Toimeksiantajan toiveena oli, että työskentely tässä vertailututkimuksessa on mahdollisimman samankaltaista eläinlääkäriasemien kanssa, jolloin työssäkään ei tehty tarkempia tunnistustestejä virtsanäytteiden bakteereille.

## 3 Tutkimuksen taustaa

Kansainvälisten suositusten mukaan lemmikkieläinten epäiltyjen virtsatietulehdusten antibioottilääkitysten tulisi perustua viljely- ja herkkyystesteihin. Monet tekijät vaikuttavat kuitenkin negatiivisesti suositusten toteutumiseen eläinklinikoilla. Näitä tekijöitä ovat pitkät laboratorioden käsittelyajat, erikoisvaatimukset huonosti säilyviin kuljetuksiin ja taloudelliset kustannukset lemmikkien omistajille. Paikan päällä viljely on vaihtoehto näytteiden lähettämiseksi laboratorioon, mutta kaikilla klinikoilla ei ole varustusta suorittaa bakteerien eristämistä ja herkkyysmäärittämiä kansainvälisten laatuvaatimusten ja turvallisuusstandardien mukaan. Vaikka tutkimukset suoritettaisiin optimaalisesti, vaatii viljely vähintään kaksi vuorokautta ennen kuin herkkyysmäärittämisen tuloksiin perustuva hoito voidaan aloittaa. (Guardabassi – Hedberg – Rem Jessen – Damborg 2015: 2.)

Laboratorion ulkopuolella suoritettavat testit voisivat olla mahdollisesti tapa, millä säästetään käsittelyaikaa sekä kustannuksia. Tanskalaisen SSI Diagnostican kehittämää Flexicult™ -maljaa käytetään Tanskassa laajasti ihmisten virtsatieinfektion nopeampaan diagnoosiin ja herkkyysmäärittämiseen perusterveydenhuollossa. Testillä voidaan määrittää semikvantitatiivinen bakteerien määrä, virtsapatogeenien alustava tunnistus ja ennuste antibiootin herkkydestä. Maljan koostumusta muutettiin myös eläimille sopivaan

muotoon, jotta saataisiin eläimillä esiintyvät patogeenit *Staphylococcus pseudintermedius* ja *Streptococcus canis* kasvamaan paremmin. Tämän eläimille vastaavan tuotteen, Flexicult Vet -maljan, toimivuutta pieneläinklinikoilla testattiin kenttätutkimuksessa seitsemällä pienellä eläinklinikalla Tanskassa vuonna 2013. Testissä eläinklinikat viljelivät 72 virtsanäytettä Flexicult Vet -maljalle ja loput näytteestä lähetettiin Kööpenhaminan yliopiston mikrobiologian laboratorioon tutkittavaksi. Testien tuloksia verrattiin ja niiden perusteella arvioitiin Flexicult Vet -maljan sensitiivisyys ja spesifisyys. Myöhemmin mikrobilääkelokeroita muutettiin metisilliiniresistentin *Staphylococcus pseudintermediuksen* (MRSP) tunnistamiseksi lisäämällä oksasilliinia sisältävä lokero. MRSP on moniantibiottiresistentti bakteeri ja suuri huolenaihe pieneläinklinikoilla. Kehitettyä Flexicult Vet -maljaa arvioitiin 110 yleisellä koirien ja kissojen virtsatietutkimuksia aiheuttavalla eristetyllä bakteerikannalla. (Guardabassi ym. 2015: 2.)

Kenttätutkimuksen perusteella Flexicult Vet -maljan sensitiivisyys (83 %) ja spesifisyys (100 %) kliinisesti merkittävän bakteerikasvun tunnistukseen olivat samat, riippumatta siitä tekikö tulkinnan klinikan henkilökunta vai tutkijat. Bakteerien tunnistamisessa oli kuitenkin eroa klinikan henkilökunnan ja tutkijoiden välillä. Klinikan henkilökunta tunnisti oikein 53 % näytteistä, kun taas tutkijoiden tunnistus onnistui 100 %. Virheitä klinikan henkilökunnan tunnistuksessa oli enterokokkeja lukuun ottamatta kaikissa bakteerilajeissa. Tunnistuksessa esiintyvien virheiden takia valmistaja paransi ohjeistusta bakteerien tunnistukseen. Kenttätutkimuksessa herkkyysmäärytyksien suurimmat virheet olivat beeta-laktaamien (ampisilliini, amoksisilliini-klavulaanihappo) väärä resistenssi *E. colilla*, ja myöhemmässä tutkimuksessa väärä amoksisilliini/klavulaanihapporesistenssi *E. colilla*, sekä väärä ampisilliiniherkkyys *Staphylococcus pseudintermediuksella*. Tutkimuksessa kävi myös ilmi, että *Staphylococcus aureusta* ja *Staphylococcus pseudintermediusta* oli mahdoton erottaa 24 tunnin inkubaation jälkeen, mutta 48 tunnin inkubaation jälkeen pesäkkeet tulivat näkyville. (Guardabassi ym. 2015: 5.)

#### **4 Virtsatieinfektioiden aiheuttajia koirilla ja kissoilla**

Virtsatieinfektiot ovat yleinen syy mikrobilääkkeiden määräämiseen eläinlääkäriasemilla, ja koirilla infektioita todetaan enemmän kuin kissoilla. Diagnoosi tehdään virtsasta löytyvien bakteerien perusteella. Yleisin aiheuttaja on *Escherichia coli*, joka aiheuttaa ainakin 50 % kissojen ja koirien virtsatietulehduksista. Loppujen infektioiden aiheuttajina on grampositiivisista kokeista stafylokokit, enterokokit sekä streptokokit ja gramnegatiivisista sauvoista proteukset, klebsiellat ja pseudomonakset. (Guardabassi ym. 2015: 2.)



#### 4.1 Yleistä bakteereista

Bakteerit ovat yksisoluisia, kooltaan mikroskooppisia organismeja. Kun bakteereja kasvatetaan elatusalustalla oikeissa olosuhteissa, ne muodostavat pesäkkeitä jotka ovat silmin havaittavissa. Bakteeripesäke voi koostua jopa sadoista miljoonista erillisistä bakteerisolusta. Bakteerien toiminnan, sekä esimerkiksi antibakteeristen lääkkeiden vaikutusmekanismien ymmärtämisen kannalta on tärkeää tuntea bakteerien rakenteita. Taudinaiheuttajabakteerit omaavat sairauksien aiheuttamista edistäviä ominaisuuksia, kuten tarttumiskyvyn kohteeseen mm. tarttumista helpottavien karvojen, fimbrioiden, avulla ja ympäristössä liikkumisen liukumisen tai flagellojen eli värekarvojen avulla. Bakteerit voivat siirtää DNA:ta solusta toiseen mm. konjugaation eli pariutumisen avulla. Jotta bakteerit selviytyisivät epäedullisista olosuhteista, jotkut lajit ovat kehittäneet lepomuodon, itiön, jonka avulla bakteeri selviää huonojen aikojen ohi. (Vaara – Skurnik – Sarvas 2010: 14.)

Mikrobisto on elimistössä monimuotoinen elin, jonka merkityksestä hyvinvoinnille tiedetään vielä melko vähän. Normaali mikrobisto eli normaalifloora kehittyy terveelle organismille luonnollisessa ympäristössä. Se ylläpitää elimistön tasapainoista toimintaa, suojaa ympäristön patogeeneilta ja muokkaa ruoan sisältämiä ravintoaineita hyödylliseen muotoon. Mikrobiston koostumukseen ja toimintaan vaikuttaa isännän ominaisuuksien lisäksi myös ympäristötekijät. Normaalialueelta löytyy iholta, ruoansulatuskanavasta ja genitaalialueelta. (Jalava 2010: 76–81.) Myös normaaliflooran mikrobit voivat aiheuttaa taudin joutuessaan elimistön muille alueille. Esimerkiksi suoliston normaaliflooran bakteeri voi virtsateihin päästessään aiheuttaa virtsatieinfektion. Jos mikrobilääkettä käytetään pitkään tai toistuvasti, voi normaaliflooraa tuhoutua taudinaiheuttajan kanssa. Tällöin hiiva tai antibioottiresistentiksi muuttunut normaaliflooraan kuuluva bakteeri voi aiheuttaa infektion. (Karhumäki – Jonsson – Saros 2005: 30.)

Useilla bakteereilla on solun ulkopuolinen kapseli. Sen avulla bakteerikasvustolla on mahdollisuus kiinnittyä ympäristöönsä ja muodostaa biofilmiä. Biofilmiksi kutsutaan bakteerien muodostamaa ulkoista polysakkaridiverkostoa, joka sulkee ja eristää bakteereita sisäänsä ja tämä hankaloittaa mikrobilääkkeen pääsyä vaikutuskohteeseensa. (Vuopio-Varkila – Kuusela – Kotilainen 2010: 85.) Kapselin tarkoituksena on suojata bakteeria mahdolliselta fagosytoosilta, lysosyymliltä, komplementilta sekä ympäristön muilta haittavaikutuksilta. Monilla taudinaiheuttajabakteereilla esiintyy sekä kapselillisiä että kapselittomia muotoja. Kapselittomat muodot ovat yleensä kuitenkin ihon ja limakalvojen

normaalifloorassa ja voivat aiheuttaa vain pinnallisia infektoita. Samojen bakteerien kapselilliset muodot taas voivat aiheuttaa yleisinfektioita. Kapseli on yleensä erittäin hapanta polysakkaridia, mutta harvemmin se voi olla myös proteiinia tai polypeptidiä. Myös bakteerin kapselimateriaali voi kiinnittää sen ympäristöönsä, jolloin polysakkaridi toimii liimana eikä täten valikoi tarttumiskohdettaan. (Vaara ym. 2010: 30.)

Toisin kuin eläinsoluilla, useimmilla bakteereilla on soluseinä plasmamembraanin ulkopuolella. Soluseinä antaa bakteereille niille ominaisen muodon ja ne voivat olla joko pallomaisia, nauhamaisia, sauvamaisia tai korkkiruuvimaisia. Bakteerit voidaan jaotella ryhmiin muotojensa perusteella, esimerkiksi pallomaisen muotoisiksi kokeiksi tai pitkulaisen muotoisiksi sauvoiksi. Soluseinän rakenne toimii perustana monille antibioottien toimintamekanismeille. Bakteerit jaetaan gramnegatiivisiin ja grampositiivisiin bakteereihin niiden soluseinän rakenteen mukaan. Nimitys tulee tanskalaisen lääkärin Hans Christian Gramin keksimästä gramvärjäyksestä. (Vaara ym. 2010: 21.)

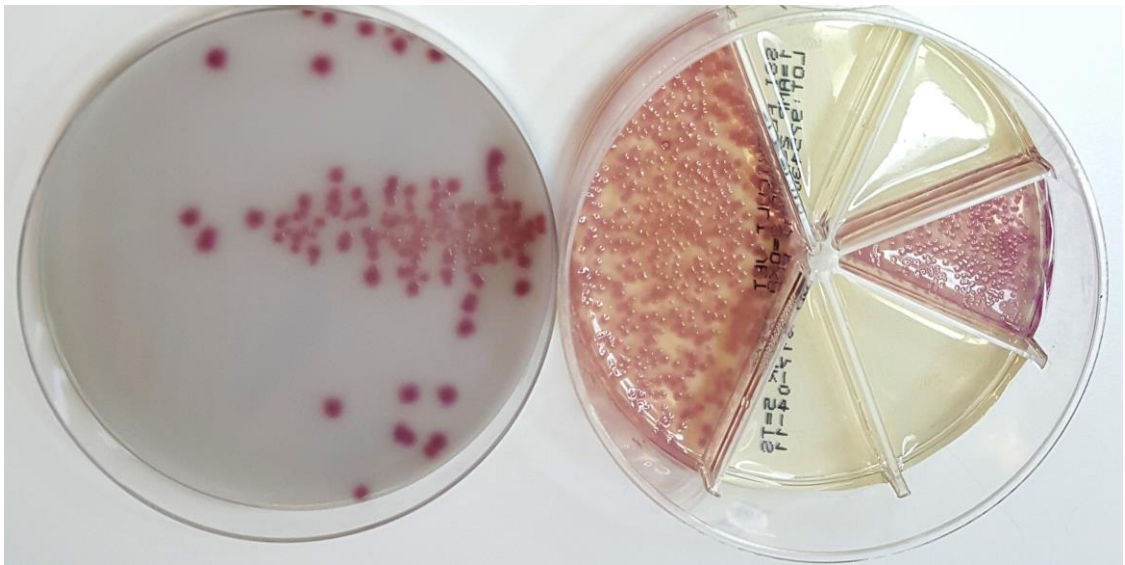
## 4.2 Gramnegatiiviset bakteerit

Sekä gramnegatiivisten että grampositiivisten bakteerien soluseinä koostuu pääosin peptidoglykaanista, mutta gramnegatiivisten bakteerien soluseinä on monimutkaisempi. Niiden soluseinässä on plasmamembraanin ja ohuen peptidoglykaanikerroksen ulkopuolella ylimääräinen biologinen kalvo, ulkomembraani, joka on ominaisin rakenteellinen piirre gramnegatiivisilla bakteereilla. Gramvärjäyksessä gramnegatiiviset bakteerit värjäytyvät vaaleanpunaisiksi. (Vaara ym. 2010: 21–26.)

### 4.2.1 *Escherichia coli*

*Escherichia coli* -bakteerit kuuluvat ihmisten ja tasalämpöisten eläinten normaaliin suolistomikrobistoon. Niiden tehtävänä on estää tautia aiheuttavien mikrobien tarttuminen ja lisääntyminen isännän suolistossa, sekä K-vitamiinin tuottaminen. (Evira 2016.) *E. coli* on suoliston aerobisen flooran valtabakteeri ja se voi aiheuttaa opportunistisia infektoita (aiheuttaa infektoita vain, jos elimistön puolustuskyky on joko yleisesti tai paikallisesti heikentynyt), tavallisimmin virtsatieinfektioita. *E. coli* -kantoja on monia erilaisia, aineenvaihdunnaltaan samankaltaisia, mutta virulenssiltaan eli taudinaiheuttamiskyvyltään erilaisia aerobisia bakteereja. Rakenteeltaan *E. coli* on tyypillinen gramnegatiivinen enterobakteeri. Useimmat liikkuvat flagellojen avulla ja kiinnittyvät pintoihin ja kudoksiin

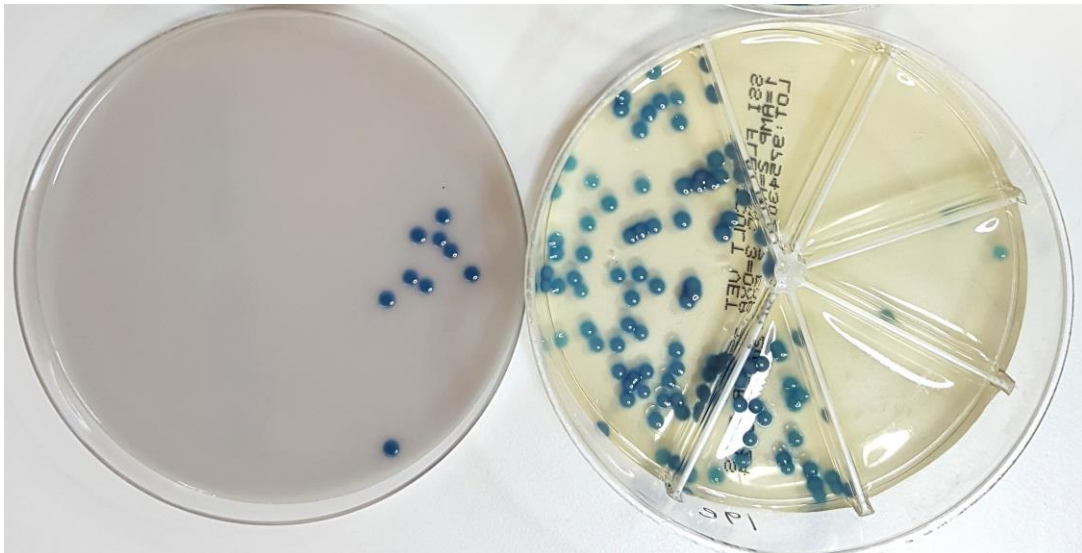
fimbrioiden avulla. Enterobakteerit ovat luonnollisesti resistenttejä monille antibiooteille tehokkaan ulkomembraaninsa takia, mutta myös niiden hankittu resistenssi on yleistä. *E. coli* on kuitenkin herkkä gramnegatiivisiin bakteereihin tehoaville antibiooteille. *E. coli* on ollut 1940-luvulta lähtien biokemiallisen tutkimuksen, sekä myöhemmin myös geneettisten ja molekyylibiologisten tutkimusten tärkein kohde ja se onkin maailman parhaiten tunnettu solu. Se on ihanteellinen mallisolun helpon käsiteltävyyden, kasvatuksen ja manipuloinnin takia. (Siitonen – Vaara 2010: 17, 177–178.) Kromogeenisellä virtsaviljelymaljalla *E. coli* saadaan kasvamaan punaisena (Kuvio 1).



Kuvio 1. *Escherichia coli* -kasvustoa UriSelect™4 ja Flexicult® Vet -maljoilla.

#### 4.2.2 Klebsiella

*Klebsiella*-lajit kuuluvat gramnegatiivisiin sauvoihin ja niiden limaiset pesäkkeet elatusainemaljalla kertovat niiden erinomaisesta kyvystä muodostaa polysakkaridikapselia (Kuvio 2). Ne ovat ampisilliinille luonnostaan resistenttejä, mutta yleensä esimerkiksi amoksisilliinin ja klavulaanihapon yhdistelmälle herkkiä. Virtsatieinfektioissa melko tavallisia löydöksiä ovat *K. pneumoniae* sekä *K. oxytoca*. (Tissari – Anttila 2010: 196.)



Kuvio 2. *Klebsiella pneumoniae* -kasvustoa UriSelect™4 ja Flexicult® Vet -maljoilla.

#### 4.2.3 *Proteus*

*Proteus*-lajeille ominaista on yleensä leviävä pesäke, vahva positiivinen ureaasireaktio sekä kyky tuottaa rikkivetyä. Proteuksen kyky hajottaa ureaa kertoo osittain sen taipumuksesta aiheuttaa virtsatieinfektioita. *Proteus*-lajit esiintyvät suolistossa ja ne ovat opportunisteja. Proteuksen aiheuttama virtsatieinfektio voi muuttua krooniseksi ja tuhota munuaisen parenkymia. *Proteus mirabilis* on gramnegatiivisten bakteerien hoitoon tarkoitetuille antibiooteille yleensä herkkä, toisin kuin *Proteus vulgaris*, joka on näille enemmän resistentti. (Tissari – Anttila 2010: 198.)

#### 4.2.4 *Pseudomonas aeruginosa*

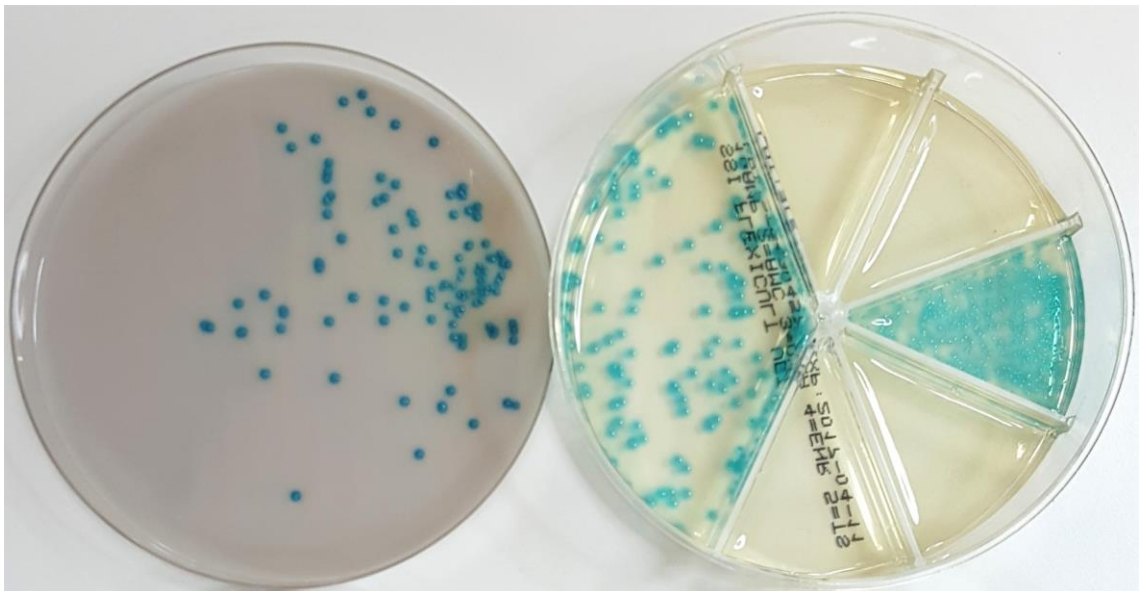
*Pseudomonas aeruginosa* on ohut, gramnegatiivinen sauvabakteeri, joka viihtyy maaperässä sekä vesissä. Se on melko vaatimaton kasvuvaatimuksiltaan. Se on opportunistinen bakteeri. *P. aeruginosa* pystyy hyödyntämään monia orgaanisia yhdisteitä kasvaakseen ja sen kasvua suosivia olosuhteita ovat erityisesti kosteat olosuhteet. *P. aeruginosa* on monille mikrobilääkkeille luonnostaan resistentti, mikä johtuu sen ulkomembraanin rakenteesta, joka toimii tehokkaasti läpäisyesteenä. Lisäksi sen soluseinämässä on eräänlaisia pumppuja, jotka kuljettavat antibiootteja ulos solusta. (Tissari – Anttila 2010: 200–201.)

### 4.3 Grampositiiviset bakteerit

Grampositiiviset bakteerit värjäytyvät gramvärjäyksessä sinivioleteiksi ja niiden soluseinä on paksu, sillä siinä on useampia peptidoglykaanikerroksia päällekkäin, kun taas gramnegatiivisilla bakteereilla kerroksia on vain 1-3. Paksun peptidoglykaanikerroksen johdosta ne ovat herkkiä lysotsyymille, sekä penisilliinille ja sen johdannaisille. (Vaara ym. 2010: 22–25.)

#### 4.3.1 Enterokokit

Enterokokit ovat kasvuvaatimuksiltaan joustavia bakteereja. Ne voivat kasvaa hyvin monessa eri lämpötilassa, korkeassa pH:ssa, sekä hyvin suolaisessa ympäristössä. Enterokokit ovat tärkeä osa eläinten ja ihmisten normaalia suolistomikrobistoa. *Enterococcus*-sukuun kuuluu useita eri lajeja, joista yleisimmät laboratoriolöydökset ovat *E. faecalis* ja *E. faecium*. Enterokokit ovat taudinaiheuttajina opportunisteja bakteereja. Yleensä enterokokin aiheuttama infektio on peräisin isännän omasta mikrobistosta. Yleisimmin enterokokin aiheuttama infektio on virtsatietulehdus. (Rantakokko-Jalava – Anttila 2010: 126.) Enterokokit kasvavat kromogeenisilla maljoilla usein sinisinä (Kuvio 3).



Kuvio 3. *Enterococcus faecalis* -kasvustoa UriSelect™4 ja Flexicult® Vet -maljoilla.

#### 4.3.2 *Streptococcus canis*

Streptokokit ovat tyypillisiä grampositiivisia bakteereja, joiden soluseinä koostuu proteiineista ja polysakkarideista. *Streptococcus canis* kuuluu beetahemolyyttiseen streptokokki G -ryhmään ja aiheuttaa infektoita lähinnä koirilla. *Str. canis* on zoonoottinen patogeeni, eli se voi aiheuttaa infektoita, sekä tarttua eläinten ja ihmisten välillä. (Rantakokko-Jalava – Anttila 2010: 122.)

#### 4.3.3 *Staphylococcus pseudintermedius*

*Staphylococcus pseudintermedius* on grampositiivinen bakteeri ja se kuuluu *Staphylococcus intermedius* -ryhmään. Se on opportunistinen patogeeni, joka kuuluu kissojen ja koirien normaaliflooraan. Metisilliinille resistentit *S. pseudintermedius* -kannat ovat viime aikoina olleet suuri haaste eläinlääketieteelle niiden laajan monilääkeaineresistenssin ja sairaalainfektioiden taudinaiheuttamiskyvyn takia. Biofilmin muodostuksen arvioidaan olevan yksi tärkeimmistä virulenssitekijöistä stafylokoikeilla. (Grönthal ym. 2017.)

## 5 Viljelymenetelmät

Bakteeriviljely on bakteriologisen diagnostiikan perusmenetelmä, jonka avulla eristetyt bakteerit voidaan tunnistaa suku- tai lajitasolle. Viljeltyjen bakteerikantojen ominaisuudet ovat helposti tutkittavissa tarkemmin erilaisten tunnistustestien avulla. Viljely mahdollistaa myös mikrobilääkeherkkyyden määrittämisen infektion kannalta merkityksellisiltä bakteereilta. Viljelmien käsittelyyn ja tulkintaan vaaditaan kokeneita, koulutettuja tekijöitä. (Anttila – Hellstén 2010: 58; Carlson – Koskela 2011: 37, 40–41.)

### 5.1 Virtsan bakteeriviljely

Virtsaviljely kuuluu yleisimmin käytettyihin bakteeriviljelyihin ja sillä etsitään virtsatieinfektioita aiheuttavia bakteereita. Tutkimusta varten virtsan tulisi olla rakossa tarpeeksi kauan, vähintään neljä tuntia, jotta bakteerien määrän voi luotettavasti määrittää. Bakteerit lisääntyvät huoneenlämmössä nopeasti, joten jos näytettä ei viljellä puolen tunnin sisällä, se säilyy analyysikelpoisena joko jääkaappilämpötilassa 24 tuntia tai säilöntäaineellisessa kuljetusputkessa huoneenlämmössä 24 tuntia ja jääkaappilämpötilassa 2 vuorokautta. (Eskelinen 2016; Huslab 2016.)

Ihanteellinen tapa saada näyte eläimeltä virtsaviljelyyn on ottaa se suoraan virtsarakosta kystosenteesillä, eli punktoimalla. Toiseksi paras tapa on saada näyte katetroimalla virtsa suoraan rakosta. Koska muutamia bakteereja esiintyy normaalisti virtsaputken suulla, on mahdollista, että virtsa kontaminoituu tällä näytteenottotavalla. Virtsanäyte joka otetaan, kun eläin virtsaa itse, voi sisältää myös elimistön normaaleja bakteereita, jotka saattavat tehdä virtsaviljelyn tulkinnaasta haastavaa. Vapaasti laskettua virtsanäytettä ottaessa tulee huomioida, että se otetaan keskivirtsasta, eikä virtsan tulisi koskettaa eläimen turkkia. (Langston 2011: 197.)

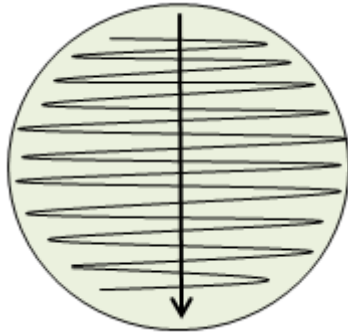
Näytteet viljellään (Kuvio 4) kasvuvaatimusten mukaiselle elatusainemaljalle ja laitetaan inkuboitumaan lämpökaappiin. Patogeeniset bakteerit kasvavat useimmiten parhaiten +35 C:n lämpötilassa. Bakteerit lisääntyvät 18–24 tunnin aikana niin paljon, että ne näkyvät pesäkkeinä maljalla. Tulos ilmoitetaan bakteerien määränä millilitrassa virtsaa. Kliinisesti merkittävät bakteerimäärän rajat vaihtelevat koiralla näytteenottotavan mukaan, mutta kissoilla se on näytteenottotavasta riippumatta  $10^3$  CFU/ml (Taulukko 1). (Eskelinen 2016; Huslab 2016; Rasmussen ym. 2015)

Taulukko 1. Merkitsevän bakteerikasvun rajat koirilla ja kissoilla.

Näytteen keräystapa	Koira	Kissa
Punktio	$\geq 10^3$ CFU/mL	$\geq 10^3$ CFU/mL
Katetri	$\geq 10^4$ CFU/mL	$\geq 10^3$ CFU/mL
Keskivirtsa	$\geq 10^5$ CFU/mL	$\geq 10^3$ CFU/mL

Eri bakteerit muodostavat elatusaineelle eri pesäketyyppejä, jotka pyritään erottamaan toisistaan mm. koon, muodon, hemolyysin, värin ja hajun perusteella. Jos viljelyssä näkyy useita erilaisia pesäkkeitä, niin sanottua sekaflooraa, bakteerit ovat todennäköisesti tulleet virtsaan iholta näytteenoton yhteydessä. Tämän takia näytteenotossa on tärkeää kiinnittää huomiota huolelliseen pesuun, puhtaisiin näytteenottovälineisiin ja siihen, että ensivirtsa lasketaan hukkaan. Jos kaikki pesäkkeet ovat samanlaisia, merkitsee se hyvin otettua näytettä ja hyvin todennäköisesti tulehdusta, jonka aiheuttaa lähes aina yksi bakteeri. Maljan tarkastelun perusteella voi kokenut tulkitsija päätellä jo paljon, ja tärkeistä näytteistä alustavat tulokset lähetetään jo tässä vaiheessa. Alustavan arvion jälkeen

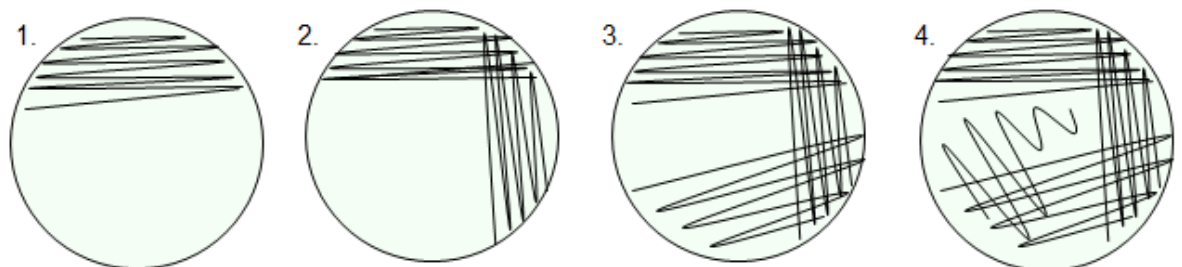
maljoilta poimitaan pesäkkeitä jatkotutkimuksia varten. (Eskelinen 2016; Carlson – Koskela 2011: 42.)



Kuvio 4. Virtsaviljelytekniikka.

## 5.2 Puhdasviljely

Puhdasviljelytekniikkaa käytetään eri bakteerilajien ja -kantojen erottelemiseksi toisistaan. Tarkoituksena on laimentaa lähtömateriaali niin, että elatusaineen pinnalle saadaan kasvamaan yksittäisiä pesäkkeitä erilleen toisistaan. Laimentaminen tapahtuu käytännössä niin, että alkuperäistä näytettä levitetään osalle maljaa, ja näyte levitetään hajotustekniikalla (Kuvio 5) koko maljalle, jolloin viimeiselle hajotusalueelle jää vain pieni osa bakteereista. Hajotuksen joka vaihe tehdään puhtaalla viljelysilmukalla. Kasvatuksen jälkeen alueelle muodostuneita erillispesäkkeitä voidaan siirtää uudelle puhtaalle maljalle, jolloin syntyy puhdasviljelmä. Jos kaikki pesäkkeet uudella maljalla ovat saman näköisiä, on puhdasviljelmä onnistunut. (Carlson – Koskela 2011: 41.)



Kuvio 5. Hajotusviljelytekniikka.



### 5.3 Bakteerien tunnistus

Bakteerien tunnistus on viime aikoihin saakka perustunut niiden muotoon, värjäytyvyyteen ja biokemiallisiin ominaisuuksiin. Nukleiinihappomenetelmät ovat kuitenkin alkaneen vallata alaa molekyyli-genetiikan ja geeniperusteisen bakteeritaksonomian myötä. Vaikka bakteereiden luokittelu ja lajijako perustuvat bakteerin DNA-rakenteeseen, käytännön diagnostiikassa ne tyypitetään edelleen valtaosin käyttäen fenotyypisiä ominaisuuksia. Biokemialliset testit, jotka perustuvat erilaisiin entsyymireaktioihin ovat yhä tärkeimpiä. Niissä tutkitaan joko bakteerin kykyä hajottaa orgaanisia yhdisteitä tai yksittäistä entsyymireaktiota. Kaupallisia testisarjoja käytetään paljon rutiinidiagnostiikassa. Tunnistuksessa voidaan käyttää apuna myös bakteerien lajikohtaista herkkyyttä ja resistenssiä erilaisille kemiallisille yhdisteille. (Carlson – Koskela 2011: 42–43; Lindholm – Eerola 2010: 64.)

Menetelmä valitaan yksinkertaisuuden, nopeuden ja toistettavuuden perusteella. Se, että menetelmät toimivat käytännön infektiodiagnostiikassa perustuu myös siihen, että valtaosa kliinisistä näytteistä eristetyistä patogeeneista kuuluu suppeaan piiriin. Nämä kliinisten näytteiden yleisimmät bakteerit ovat kuitenkin vain pieni osa kaikista tunnetuista bakteereista, joten rutiinimenetelmät eivät sovi sellaisenaan harvinaisempien bakteerien tunnistukseen. (Lindholm – Eerola 2010: 64.)

### 5.4 Mikrobiologisten menetelmien epävarmuus

Mikrobiologisen analyysin periaate poikkeaa paljon kemiallisista analyyseistä. Kemiallisissa analyyseissä analyytti erotetaan matriisista kemiallisin erotusmenetelmin, minkä takia hiukkaspitoisuus on yleensä suuri laimennetussakin analyytissä. Tämän takia satunnainen hajonta ei juuri vaikuta kemiallisissa analyyseissä tuloksiin. Mikrobiologiassa taas näyte analysoidaan mikrobeineen sekä häiritsevine taustoineen ja analyytti erotellaan vasta kasvatusalustalla. (Evira 1997: 2.)

Menetelmän spesifisyys määräytyy alustan koostumuksen ja kasvuolosuhteiden sekä tutkittavien kantojen ominaisuuksien vaihtelun perusteella. Jotta yksittäiset pesäkkeet voidaan laskea, näyte joudutaan usein laimentamaan sellaiseen pitoisuuteen, että pesäkkeet erottuvat erillisinä. Tämän takia rinnakkaismääritysten pesäkemäärät voivat vaihdella ilman, että kyseessä olisi virhe. (Evira 1997: 2.)

Koska mikrobit ovat elävää materiaalia, tulosten oikeellisuuden määrittäminen on hankalaa, sillä valmisteen todellista pitoisuutta ei voida määrittää eikä se pysy muuttumattomana. Mikrobiologiassa pidetään oikeana tuloksena usean toiston keskiarvotuloksen ja referenssimateriaaleilla saadun hyväksytyn arvon lähekkäisyyttä. Tulosten hajontaa lisää työntekijäkohtaiset työskentely- sekä tulkintaerot, jotka liittyvät näytteen ja mikrobin ominaisuuksiin. (Evira 1997: 3.)

## 5.5 Elatusaineet

Näytteet viljellään joko nestemäiseen elatusaineeseen tai kiinteille elatusainemaljoille. Kiinteä elatusaine valmistetaan petrimaljalta hydyttämällä nestemäinen elatusaine agarilla. Eri patogeenien kasvuvaatimukset vaihtelevat paljon. Esimerkiksi stafylokokit ja enterokokit tyytyvät varsin vaatimattomiin olosuhteisiin, kun taas streptokokit ja jotkin anaerobit bakteerit vaativat paljon erilaisia kasvutekijöitä. Elatusaineen koostumus on suunniteltu optimaaliseksi bakteerin kasvulle, jolloin ne lisääntyvät jakautumalla. Elatusaineissa käytetään ravinteina osittain hydrolysoituja proteiineja sekä erilaisia liha- ja hiivauutteita. Kiinteisiin elatusaineisiin lisätään usein myös defibrinoitua verta rikasteeksi. Elatusaineita, joilla useimmat aerobiset patogeenit kasvavat, kutsutaan yleiselatusaineiksi. Näitä ovat esimerkiksi verimalja ja suklaamalja. Yleiselatusaineiden lisäksi on käytettävissä erilaisia erottelevia ja selektiivisiä elatusaineita. Virtsaviljelyissä yleisesti käytettävä Cled -malja sisältää laktoosia, jota esimerkiksi *E. coli* hajottaa happamiksi aineenvaihduntatuotteiksi muuttaen samalla värin keltaiseksi pesäkkeen ympäriltä. Eri bakteerilajeja voidaan erottaa toisistaan liittämällä värillisiä komponentteja elatusaineeseen, jotka kerääntyvät bakteeripesäkkeeseen. *E. coli* saadaan kasvamaan tällaisella kromogeenisellä virtsaviljelymaljalla punaisena ja enterokokki sinisenä. Selektiiviselle maljalle taas voidaan lisätä antibiootteja ja muita bakteerimyrkkyjä, jolloin saadaan häiritsevien bakteerien kasvu estettyä. (Carlson – Koskela 2011: 41–42.)

## 6 Kromogeeniset maljat

Kromogeeniset agarit ovat elatusaineita, jotka sisältävät väriä muodostavia yhdisteitä, kromogeeniä. Kromogeeni on liitetty substraattiin ja bakteerin kasvaessa maljalla se tuottaa entsyymiä, jolloin spesifisessä entsyymi-substraattireaktiossa kromogeeni vapautuu ja bakteeripesäke näkyy värillisenä. Koska substraattia hajottava entsyymi on

lajispesifinen, ainoastaan tietyn lajin bakteerit värjäytyvät. Jos värin muutos perustuu johonkin muuhun, esimerkiksi pH:n muutokseen, malja ei ole kromogeeninen. Kromogeeniset maljat ovat monesti selektiivisiä, esimerkiksi antibioottisäysten takia. Kaupallisten kromogeenisten maljojen koostumusta ei liikesalaisuuteen vedoten yleensä kerrota. Monesti koostumuksesta voidaan kertoa kuitenkin selektiivinen tekijä ja entsyymi, johon bakteerin tunnistus perustuu. Kromogeenisia maljoja voidaan käyttää primaariviljelyyn, jolloin siitä voidaan tehdä jo alustava tai lopullinen mikrobien tunnistus, tai siitä voidaan tehdä jatkotunnistustestejä. (Kärpänoja 2007: 39–40.)

Suomessa kromogeenisten maljojen käyttö kliinisessä diagnostiikassa on ollut vielä vähäistä pääosin korkean hinnan takia, mutta kiinnostus on selvästi lisääntynyt. Eniten niitä käytetään virtsaviiljelyissä helpottamassa työprosessia, koska virtsaviiljely on useimmissa laboratorioissa määrältään suurin mikrobiologinen tutkimus. Suurella osalla markkinoilla olevista elatusaineista on mahdollisuus tehdä suora *E. coli* lajitason ja enterokokkien sukutason tunnistus primaariviljelymaljalta. Muitakin virtsapatogeenia on kromogeenisilta maljoilta helpompi tunnistaa alustavasti kuin tavallisilta maljoilta ja tutkimuksissa on osoitettu, että kasvattavuus on tavallisilla ja kromogeenisilla maljoilla samaa luokkaa. Kromogeenisilta maljoilta on myös useissa tapauksissa helpompi havaita sekakasvusto eri lajien värjäytyessä eri värein. Eri valmistajilla on eri ohjeistukset tunnistuksen luotavuudesta ilman erillisiä tunnistustestejä. Kromogeenisilla maljoilla voidaan mahdollisesti nopeuttaa diagnostiikkaa ja tehostaa työskentelyä laboratoriossa. (Kärpänoja 2007: 39–40; Meurman 2007: 41.)

## 6.1 UriSelect™4

UriSelect™4 on Bio-Radin valmistama ei-selektiivinen kromogeeninen agarpohjainen viljelymalja, jolla yleisimmät virtsatieinfektioiden aiheuttajat voidaan eristää ja tunnistaa suoraan tai alustavasti (Taulukko 2). Maljalla on ravintorikas elatusaine joka sisältää peptoneja, tryptofaania ja kromogeenisen sekoituksen, jolla voidaan tunnistaa tiettyjen entsyymien toimintaa. Näin voidaan erottaa tietyt lajit ja organismiryhmät mahdollisimman vähillä tunnistustesteillä. UriSelectilla voidaan tunnistaa suoraan *E. coli*, enterokokki ja *Proteus* ja alustava tunnistus voidaan tehdä erityisesti KESC-ryhmälle (*Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Citrobacter*). (Bio-Rad Laboratories 2013.)

Virtsan bakteeriviljely Uriselect-maljalle tehdään virtsaviljelytekniikalla käyttämällä standardin mukaista 10 µl:n viljelysilmukkaa. Viljelysilmukka pidetään pystyasennossa virtsaan upotettaessa. Sen jälkeen silmukka viedään agarin päälle ja vedetään se kerran maljan läpi halkaisijan mukaisesti. Lopuksi hajotetaan siirros vetämällä silmukkaa tiiviisti, tasaisin välein ylhäältä alaspäin maljan sivulta toiselle koko agarin pinnalle. (Bio-Rad Laboratories 2013.)

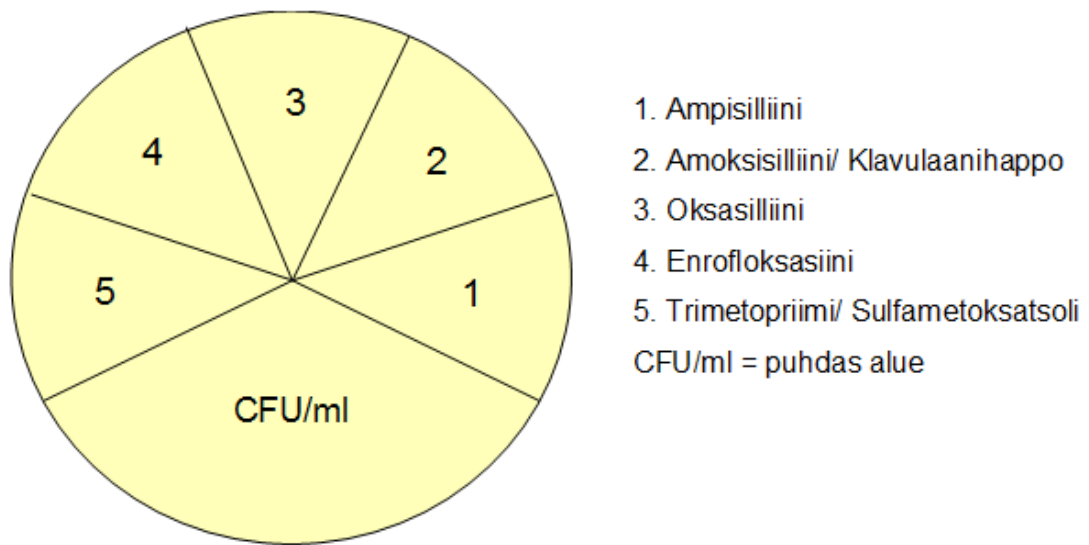
Taulukko 2. Pesäkkeiden värit Uriselect-maljalla.

Bakteerilaji	Pesäkkeen väri / Uriselect™4
<i>Escherichia coli</i>	vaaleanpunainen/ punainen
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	sininen/ violetti
<i>Klebsiella oxytoca</i>	sininen/ violetti
<i>Enterobacter</i> lajit	harmaansininen
<i>Enterococcus faecalis</i>	turkoosinsininen
<i>Enterococcus faecium</i>	turkoosinsininen
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	kermanvärinen/ valkoinen
<i>Proteus vulgaris</i>	oranssinruskea
<i>Proteus</i> lajit	oranssinruskea
<i>Staphylococcus pseudintermedius</i>	väri ei tiedossa
<i>Streptococcus canis</i>	väri ei tiedossa

## 6.2 Flexicult® Vet -malja

Flexicult Vet on kromogeeninen agaripohjainen virtsaviljelymalja, joka on suunniteltu kissojen ja koirien virtsatieinfektioiden diagnosointiin. Maljan avulla arvioidaan bakteerien määrä virtsassa, tunnistetaan virtsapatogeenit alustavasti (Taulukko 3), ja saadaan enuste antibiootin herkkydestä viidelle eri antibiootille, jotka ovat valmiina maljan loke-roissa (Kuvio 6). Antibioottiherkkyys määritetään joko resistenttinä R (lokerossa on kasvua) tai herkkänä S (lokerossa ei ole kasvua) kyseistä antibioottia kohtaan. Antibiootti saattaa vaikuttaa bakteerin värjäytymiseen maljalla, jonka takia tunnistus tehdään aina puhtaalta alueelta. Boorihappo voi vaikuttaa joidenkin bakteerien kasvuun ja antibioottiherkkyysiin, joten näyteputken tulee olla boorihapoton. Koska Flexicult Vet -maljalta saadaan määritettyä viljelyn yhteydessä myös antibioottiherkkyys, oikean lääkehoidon

aloitus nopeutuu. Maljan käyttöönoton tarkoituksena on vähentää eläinten turhia antibioottilääkityksiä ja nopeuttaa diagnoosiprosessia. (Rasmussen ym. 2015.)



Kuvio 6. Flexicult Vet -malja. (Rasmussen ym. 2015.)

Virtsan bakteeriviljely Flexicult Vet -maljalle suoritetaan siten, että maljalle pipetoidaan esimerkiksi pasteur-pipetillä virtsaa noin 1 ml miniminäytemäärän ollessa 0,8 ml. Näytettä pipetoidaan puhtaalle alueelle 6-8 tippaa ja jokaiseen antibioottilokeroon 2-3 tippaa. Tämän jälkeen maljaa kallistellaan varovasti noin 3-5 sekunnin ajan, jotta näyte levittyy tasaisesti agarille. Näytteen kulkeutumista lokerosta toiseen tulee välttää kontaminaattioriskin vuoksi. Lopuksi valutetaan ylimääräinen virtsa pois maljan antibioottilokeroiden puolelta, jolla estetään antibioottien levittyminen puhtaalle kasvualustalle. Sen jälkeen asetetaan kansi paikoilleen ja siirretään malja +35–37 C:n asteeseen inkuboitumaan pohja ylöspäin 18–24 tunniksi. (Rasmussen ym. 2015.)

Taulukko 3. Pesäkkeiden värit Flexicult Vet -maljalla.

Bakteerilaji	Pesäkkeen väri / Flexicult® Vet
<i>Escherichia coli</i>	punainen/punaruskea
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	tummansininen/violetti
<i>Klebsiella oxytoca</i>	tummansininen/violetti
<i>Enterobacter</i> lajit	tummansininen/violetti
<i>Enterococcus faecalis</i>	vihreä/vihreän sininen
<i>Enterococcus faecium</i>	vihreä/harmaa
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	vihertävän valkoinen/vihertävä
<i>Proteus vulgaris</i>	vihreä/ruskea
<i>Proteus</i> lajit	vaalean ruskea
<i>Staphylococcus pseudintermedius</i>	valkoinen/vaaleanpunainen
<i>Streptococcus canis</i>	luonnonvalkoinen

## 7 Herkkyysmääritykset

Viljelyssä kasvaville todennäköisesti kliinisesti merkittävälle bakteereille määritetään mikrobilääkeherkkyys. Määrityksen tarkoituksena on selvittää, onko bakteerin herkkyys normaali, vai onko sen sietokyky merkittävästi korkeampi hoidossa kyseeseen tulevia antibiootteja kohtaan. Määrityksellä siis tutkitaan, onko bakteeri herkkä (S) lääkkeelle, joka soveltuu käytettäväksi infektion hoitoon vai resistentti (R), jolloin lääkkeellä ei ole tehoa kyseiseen bakteeriin. Joissain tapauksessa bakteerin herkkyys on alentunut, jolloin herkkyysluokka on intermediate (I). Mikrobilääkkeen tehoa mitataan MIC-arvolla (minimal inhibitory concentration), joka kertoo pienimmän lääkepitoisuuden, jolla bakteerin kasvu pystytään estämään. Bakteeri voi myös olla luonnostaan resistentti jonkin ryhmän mikrobilääkkeille, jolloin herkkyysmääritystään ei tällä lääkkeellä tehdä. (Carlson – Koskela 2011: 43–44.)

## 7.1 Kiekkoherkkyysmenetelmä

Agardiffuusioon perustuva kiekkomenetelmä on yleisimmin herkkyysmääryksissä käytetty menetelmä. Kiekkomenetelmässä bakteerisuspensio valmistetaan poimimalla viljelysauhalla muutama erillinen bakteeripesäke tuoreelta viljelymaljalta, jonka jälkeen pesäkkeet sekoitetaan steriiliin 0,9 % natriumkloridiin (NaCl). Herkkyysmääryksessä käytetään yleisesti 0.5 McFarlandin (McF) vahvuista suspensiota. Suspension vahvuus tarkistetaan vertaamalla sitä McF 0.5 standardiin tai tarkistamalla vahvuus densitometrillä. Kun vahvuus on oikea, suspensiota imetään steriiliin vanutikkuun ja poistetaan ylimäärä painamalla tikkua putken seinämää vasten. Lopuksi siirrostetaan vanutikkuun imeytetty suspensio tasaisesti huoneenlämpöiselle elatusainemaljalle esimerkiksi dreijaamalla, jonka jälkeen maljalle asetellaan antibioottikiekkoka painamalla ne kevyesti agarin pinnalle. Näin varmistetaan antibiootin ja bakteerin hyvä kontakti. Bakteerisuspensiosta tehdään aina laadunvarmistuksena myös häntämalja, jolla varmistetaan suspension puhtaus. Yleisesti herkkyysmääryksissä käytössä oleva elatusaine on Mueller-Hinton agar, jota tässäkin työssä käytetään. Viljelyn jälkeen herkkyysmalja tulee asettaa välittömästi lämpökaappiin niin, että maljan kansi on alaspäin, jotta muodostuva kosteus ei häiritse määrytystä. Lääke diffundoituu elatusaineeseen ja bakteeri alkaa kasvaa. Antibioottiekkon ympärille muodostuu estorengas, jonka halkaisija on suoraan verrannollinen bakteerin herkkyteen antibiootille (Kuvio 7). Näkyvän kasvun raja muodostuu sille etäisyydelle kiekosta, jossa antibioottipitoisuus on laskenut pienimmän bakteerin kasvua estävän rajan alle. Herkkyyttä tai resistenssiä tietyille antibiooteille voidaan käyttää apuna myös bakteerien tunnistuksessa. (Carlson – Koskela 2011: 43–44; FiRe 2009: 9.)

Kiekkomenetelmän virhelähteitä ovat esimerkiksi liian suuri bakteerisuspension tiheys joka voi aiheuttaa epäselvän reunan estovyöhykkeelle, antibioottiekkojen kosteus, jos niiden ei ole annettu lämmitä huoneenlämpöisiksi, sekä antibioottiekkojen huono kontakti agarin pinnalle. (Evira 2014). Kiekkomenetelmä ei aina toimi samalla luotettavuudella kaikkien bakteerien ja niiden lääkkeiden suhteen. Joidenkin bakteerien kasvuvälineet voivat edellyttää sellaista elatusainetta, josta on lääkkeen vaikutukselle haittaa. Esimerkiksi stafylokokkien beetalaktamaasivälitteinen resistenssi ei aina ilmene estorengaan selkeänä pienenemisenä, vaan saattaa ilmetä ainoastaan epätyypillisenä estorengaan reunana. (FiRe 2009: 5.)



Kuvio 7. Kiekkoherkkyysmenetelmä Mueller-Hinton -maljalla.

## 7.2 Antibiootit

Antibiooteilla tarkoitetaan sellaisia yhdisteitä, jotka hidastavat mikrobien kasvua tai tappavat niitä. Antibioottien käyttö tulee olla harkittua ja herkkyysmäärittäisiin perustuvaa. (Evara 2016.) Nykyään antibiooteista puhutaan mieluummin mikrobilääkkeinä joihin kuuluvat sekä synteettisesti valmistetut lääkeaineet että luonnosta saatavat yhdisteet. Antibiootit kuuluvat mikrobilääkkeisiin ja ne tehoavat vain bakteereja vastaan. Ne voidaan luokitella esimerkiksi niiden vaikutustavan ja -kohteen perusteella bakterisidisiin ja bakteriostaattisiin lääkkeisiin. Bakterisidiset lääkkeet tappavat niille herkkiä bakteereja ja bakteriostaattiset valmisteet estävät bakteerien kasvua ja lisääntymistä kuitenkin tappamatta niitä. Bakteriostaattiset valmisteet voivat muuttua bakteriosidisiksi lääkkeen pitoisuuden suurentuessa. (Huupponen 2014: 916.)

Bakteerilääkkeet voidaan myös luokitella neljään ryhmään niiden vaikutusmekanismien perusteella. Näitä ovat bakteerin soluseinän peptidoglykaanisynteesiin, proteiinisynteesiin, nukleiinihappojen synteesiin ja sytoplasmiseen kalvoon vaikuttavat aineet. Peptidoglykaanisynteesiin vaikuttavat bakteerilääkkeet voivat esimerkiksi estää erilaisten entsyymien toimintaa. Proteiinisynteesiin vaikuttavat lääkkeet ovat normaalisti bakteriostaattisia ja useimpien näiden vaikutus on tilapäinen. Kun bakteeri pääsee taas lääkkeettömään ympäristöön, käynnistyy proteiinisynteesi uudestaan. Nukleiinihappojen



synteisiin vaikuttavat bakteerilääkkeet sitoutuvat joko bakteerin RNA:han tai DNA:han. Sytoplasmiseen kalvoon vaikuttavat lääkkeet vaurioittavat bakteerin lisäksi terveitä soluja, minkä takia niiden käyttö antibakteerisina lääkkeinä on vähäistä. Ne vaurioittavat ensin solun ulkokalvoa, jonka jälkeen ne pääsevät sytoplasmiseen membraaniin ja hajottavat sen. (Järvinen – Vaara – Huovinen – Liippo – Vasankari 2011: 114–117.)

Penisilliini oli ensimmäisiä antibiootteja, jotka esiintyvät luonnossa mikrobien tuotteina. Nykyään suurin osa antibiooteista on synteettisiä ja ne rakennetaan laboratoriossa, sillä 1960-luvulla luonnossa esiintyvien antibioottien määrä väheni. Synteettiset antibiootit ovat käytännössä kemiallisia muunnelmia luonnosta löytyvistä aineista. Nykyään ongelmana on mikrobien nopeasti kehittämä vastustuskyky eli resistenssi käytössä oleville antibiooteille sekä uusien antibioottien kehittämisen hidastuminen. Antibiootin tehoon vaikuttavat sekä antibiootin että mikrobin rakenne. Antibiootin vaikutus alkaa, kun se löytää bakteerin pinnalla olevan reseptorin ja sitoutuu siihen. Sellaisia antibiootteja, jotka vaikuttavat suureen joukkoon bakteereita, kutsutaan laajakirjoisiksi antibiooteiksi. Tällaiset antibiootit ovat etuna silloin, kun ei pystytä luotettavasti päättelemään infektion mahdollisia aiheuttajia. (Lumio 2016.)

Suurin yleisesti käytössä oleva mikrobilääkeryhmä on beetalaktaamiantibiootit. Niihin kuuluvat penisilliinit, kefalosporiinit ja joitain muita antibiootteja. Beetalaktaamilääkkeiden rakenteessa on beetalaktaamirengas. Beetalaktaamit eivät tehoa bakteereihin, jotka tuottavat beetalaktamaasi- tai penisillinaasi-entsyymiä koska ne pilkkovat beetalaktaamirenkaan. Ne vaikuttavat suurimmaksi osin kasvaviin soluihin, ja ne ovat bakterisidisia. Ryhmän kaikilla antibiooteilla on samanlainen vaikutusmekanismi, joka kohdistuu bakteeriseinämän rakenteeseen. Niin kutsutussa bakteriolyysissä bakteerit hajoavat beetalaktaamivaikutuksen seurauksena siihen sopivissa olosuhteissa. (Huupponen 2014: 925.)

Antibiootin valinta on suureksi osaksi empiiristä ja lääke joudutaan valitsemaan vain kliinisten oireiden perusteella ilman edeltävää mikrobiologista tutkimusta. Lääkevalinnan ratkaisee kliiniseen tutkimukseen perustuva tieto tai epäily infektion sijainnista ja tieto infektion yleisimmistä aiheuttajista. Olennaista tehokkaan lääkkeen valinnassa on tieto bakteerien paikallisesta lääkeherkkyydestä. Vaikka empiirinen hoito aloitetaankin, se ei saa estää spesifiä mikrobiologista tutkimusta. Tämä on tärkeää, jos empiirinen hoito ei tehoakaan ja koska kokemuksen kerääminen infektion etiologiasta ja bakteerien herk-

kydestä antibiooteille tulevaisuutta varten on välttämätöntä empiirisen hoidon toteuttamiseksi. Mikrobiologinen diagnoosi on myös tärkeää bakteerien antibioottiresistenssien seurannassa. (Järvinen ym. 2011: 118.)

### 7.2.1 Ampisilliini ja amoksisilliini/klavulaanihappo

Ampisilliini ja amoksisilliini (aminopenisilliinit) kuuluvat laajakirjoiisiin penisilliineihin. Ne tehoavat periaatteessa samoihin bakteereihin kuin penisilliinitkin, mutta ne läpäisevät gramnegatiivisten sauvabakteerien ulkokalvon paremmin kuin peruspenisilliinit. Toisin kuin peruspenisilliinit, aminopenisilliinit tehoavat myös enterokokkeihin, mutta *Enterococcus faecium* on jo suuressa osassa tapauksista resistentti. Kaikki paitsi beetalaktamaasia tuottavat aerobiset gramnegatiiviset sauvabakteerit ovat aminopenisilliineille herkkiä. Noin 25 % *E. coli*ista on amoksisilliinille resistenttejä. Klavulaanihappoa käytetään yleensä yhdistettynä johonkin muuhun antibioottiin, koska sen kliininen antimikrobinen vaikutus on itsestään riittämätön. Amoksisilliinin yhdistäminen klavulaanihappoon tekee siitä tehokkaan myös beetalaktamaasia tuottaville bakteereille. Tämä yhdistelmä tehoaa esimerkiksi joihinkin ampisilliiniresistentteihin *E. coli*- ja *Klebsiella* -kantoihin. (Huupponen 2014: 925–930; Järvinen - Huovinen - Vaara 2011: 141–142.)

### 7.2.2 Oksasilliini

Oksasilliini kuuluu beetalaktaameihin, ja sen resistenssi on yleistä gramnegatiivisille sauvoille. Stafylokokit ovat herkkiä oksasilliinille, mutta koska MRSP on kuitenkin resistentti, käytetään sitä yhtenä MRSP:n tunnistuskeinona. Oksasilliinia sisältävä lokero luetaan Flexicult Vet -maljalta vain, jos siinä kasvaa pieniä (1-2 mm) kokoisia valkoisia/vaaleanpunaisia pesäkkeitä, jotka saattavat olla MRSP:ta. Tässä tapauksessa malja tulisi lähettää jatkoanalyysiin mikrobiologian laboratorioon. (Rasmussen ym. 2016.)

### 7.2.3 Enrofloksasiini

Enrofloksasiini kuuluu fluorokinoloneihin, joiden vaikutusmekanismi liittyy bakteerin DNA:n toiminnan estämiseen. Fluorokinoloneilla on laaja antibakteerinen kirjo ja ne vaikuttavat gramnegatiivisiin bakteereihin. Fluorokinolonit ovat aiheuttaneet rustovaurioita

kasvaville eläimille, joten niitä ei tulisi käyttää kasvuiässä oleville potilaille. Enrofloxasiinin päämetaboliitti eli aineenvaihdunnassa syntynyt tuote on siprofloksasiini. (Huupponen 2014: 941–943.)

#### 7.2.4 Trimetopriimi/ Sulfametoksatsoli

Sulfonamidit eli sulfat ovat bakteeristaattisia lääkkeitä ja ne estävät bakteerin foolihapposynteesiä. Sulfonamideille resistenttejä gramnegatiivisia enterobakteerikantoja on paljon liikkeellä, esimerkiksi *E. colin* resistenssi niille on yleisempää kuin millekään muulle virtsatieinfektioiden antibiootille. Pelkkiä sulfavalmisteita ei ole enää markkinoilla Suomessa, mutta sulfametoksatsoli (keskipitkävaikutteinen sulfonamidi) on käytössä yhdistelmänä trimetopriimin kanssa. Trimetopriimin ja sulfametoksatsolin yhdistelmä on synergistinen, eli tehostavat toistensa vaikutusta. Tämän yhdistelmän teho on kapeakirjoinen ja ne tehoavat sekä grampositiivisiin että gramnegatiivisiin bakteereihin. Sulfametoksatsoli ja trimetopriimi sopivat mikrobilääkkeiksi hyvin, koska elimistö ei syntetisoi foolihappoa vaan saa sen ravinnosta. Mikrobit taas syntetisoivat sen, eivätkä pysty käyttämään ulkopuolista foolihappoa. Tästä poikkeuksen tekevät enterokokit, jotka ovatkin usein resistenttejä sulfalle sekä trimetopriimille. (Orion Pharma 2000: 85–87; Järvinen ym. 2011: 170–171.)

### 7.3 Mikrobilääkeresistenssi

Merkitsevästi normaalia korkeamman sietokyvyn antibioottia kohtaan omaavaa bakteerikantaa kutsutaan resistentiksi. Jos bakteeri sietää korkeampaa bakteerilääkepitoisuutta kuin on turvallista kehossa saavuttaa, on se resistentti. Koska on osoitettu, että tällaisen rajan vetäminen on viitteellistä, on WHO (World Health Organization) tarkentanut resistenssin määritelmää niin, että bakteeria voidaan kutsua resistentiksi myös silloin, kun bakteeri sietää huomattavasti korkeampia lääkeainepitoisuuksia kuin suurin osa lajinsa edustajista. (FiRe 2009: 1.)

Luonnollinen resistenssi on bakteereille tyypillistä ja se vaihtelee paljon eri mikrobilääkkeitä kohtaan. Jo lääkkeiden käyttöalueita määritettäessä otetaan huomioon bakteerien luonnollinen resistenssi tiettyjen mikrobilääkkeiden vaikutukselle. Monet bakteerikannat, jotka ovat olleet aluksi herkkiä tietyille mikrobilääkkeelle, ovat tulleet sille ajan kuluessa resistenteiksi. Tätä kutsutaan hankituksi resistenssiksi. Antibiootin vaikutuskohdan tulee

olla muuttumaton ja vapaa, jotta se voisi häiritä bakteerin toimintoja. Bakteerit pystyvät kuitenkin muuntelemaan antibiootin vaikutuskohtia, jolloin ne eivät enää pysty sitoutumaan muuttuneisiin kohteisiinsa. Hankitun resistenssin syntymekanismit perustuvat esimerkiksi mikrobilääkkeitä hajottavien entsyymien tuottoon, bakteerilääkkeen vaikutus- tai sitoutumiskohdan muuttumiseen, metabolisen kiertotien käyttöön tai siihen, että lääkevaikutuksen kohteena olevan entsyymin tuotanto kiihtyy rajusti. Bakteerien seinämän rakenne voi myös estää lääkkeen läpäisyn tai bakteeri voi pumpata lääkeaineen solun sisältä. Hankittu resistenssi voi johtua bakteerin kromosomin pistemutaatiosta tai plasmidien resistenssiä välittävistä perintömateriaalista. Plasmidin sisältämä geneettinen informaatio voi siirtyä grampositiivisesta bakteerista toiseen lähisukulaiseen bakteriofagin välityksellä. Gramnegatiivisilla bakteereilla voi koko plasmidi siirtyä konjugaatiossa toiseen bakteeriin. Moniresistentit bakteerit ovat resistenttejä samaan aikaan monen eri ryhmän mikrobilääkkeille. (Evira 2016; Huupponen 2014: 919–920.)

Antibioottiresistenssi on lisääntynyt nopeasti viime vuosien aikana, eivätkä tavalliset antibiootit useissa tapauksissa tehoa enää. Resistenssi lisää ihmisten ja eläinten sairastuvuutta, kuolleisuutta ja kustannuksia terveydenhuollossa. Antibioottien käyttö on yhteydessä bakteerien lisääntyneeseen vastustuskykyyn, jonka takia tarpeettoman mikrobilääkehoidon välttäminen on paras keino lääkeresistenssin rajoittamiseksi. Mikrobilääkeresistenssi on tällä hetkellä yksi vakavimpia uhkia lääketieteessä ja eläinlääketieteessä. Jos antibioottihoitoon päädytään, oikea antibiootti tulee aina valita laboratoriotutkimusten perusteella. (Evira 2016; Helsingin yliopisto 2015.) Eläinklinikoilla osa lääkäreistä saattaa määrätä antibiootin ilman herkkyysmäärittämiä pelkän bakteerikasvun perusteella, mikä pahentaa antibioottiresistenssiä (Yle Fem 2017). Tästä syystä Flexicult Vet -maljan käytöllä voisi olla positiivisia vaikutuksia resistenssitilanteeseen.

Alla (Taulukko 4) näkyy virtsapatogeenien luonnolliset ja hankitut resistenssit Flexicult Vet -maljan antibiooteille. Viimeisen noin viiden vuoden sisällä ilmestynyt *Staphylococcus pseudintermediuksen* moniresistentti muoto MRSP (metisilliiniresistentti *Staphylococcus pseudintermedius*), on muodostunut merkittäväksi ongelmaksi eläinlääketieteessä. Se on resistentti kaikille beetalaktaameille ja ryhmälle muita antibiootteja. Ok-sasilliinia käytetään Flexicult Vet -maljalla MRSP:n havaitsemiseksi. MRSP on tyypillisesti resistentti myös muille maljan antibiooteille. (Rasmussen ym. 2016.)

Taulukko 4. Luonnolliset ja hankitut resistenssit Flexicult Vet -maljan antibiooteille. (Rasmus-  
sen ym. 2016.)

	Ampisilliini	Amoksisilliini	Oksasilliini	Enrofloxasiini	Trimetropiini
<i>E. coli</i>	S	S		S	S
<i>Klebsiella</i> sp	R	S		S	S
<i>Enterobacter</i> sp.	R	R		S	R
<i>Proteus</i> sp.	S	S		S	S
<i>Proteus vulgaris</i>	R	S		S	S
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	R	R		S	R
<i>Enterococcus faecalis</i>	S	S		S	R
<i>Enterococcus faecium</i>	R	S		R	R
<i>Staphylococcus pseudintermedius</i>	R	S	S (R jos MRSP)	S	S
<i>Streptococcus canis</i>	S	S		S	S

R= Luonnollisesti resistentti

R= Usein resistentti

S= Usein herkkä

## 8 Työn toteutus

### 8.1 Aikataulu

Projektin aihe saatiin 21.9.2016, jonka jälkeen työn teoriaosuutta alettiin luonnostella. Opinnäytetyön työstämiseen valittiin OneDrive -pilvipalvelu, joka helpotti yhdessä työskentelyä. Jäsennysvaiheessa sovittiin tapaaminen Päivi Rauvon kanssa, jossa mietittiin työn tavoitetta ja tarkoitusta, sekä toteutusta tarkemmin. Aiheen jäsennysseminaari oli 4.10.2016, jonka jälkeen aloitettiin suunnitelmavaiheen teko. Suunnitelmavaiheessa mietittiin aineiston keräämistä ja alustavaa aikataulua työn toteutukselle sekä perehdyttiin opinnäytetyön aihealueen teoriaan, jonka pohjalta työn toteutusta lähdettiin suunnittelemaan. Suunnitelma esiteltiin muille opiskelijoille ja ohjaajalle suunnitelmaseminaarissa 18.11.2016. Työhön tarvittavat materiaalit listattiin ja toimitettiin koululle tammikuussa 2017. Alustavan suunnitelman mukaan näytteiden keräys ja viljely olisi toteutettu tammikuun 2017 aikana, mutta koska näytteiden kerääminen ei sujunut suunnitelmien mukaan, osa viljelystä toteutettiin eläinten virtsanäytteillä helmikuussa ja toinen osa koulun bakteerikannoilla maaliskuussa 2017. Työn toteutuksen kannalta aikataulujen muuttaminen oli osaksi hyväkin asia, koska helmikuussa bakteriologian harjoittelut oli suoritettu, jolloin bakteriologisten tutkimusten tietotaito oli meillä molemmilla parantunut. Työn

aikataulun suunnittelua vaikeutti muutosten lisäksi eri aikoihin olevat työharjoittelut, joten yhteistä aikaa työn toteutukselle oli rajoitetusti. Tiedonhaku jatkui koko opinnäytetyöprosessin ajan. Tietoa haettiin monipuolisesti suomeksi ja englanniksi oppikirjoista, ammatillisista lehdistä, internetlähteistä sekä tietokannoista, kuten PubMed, ScienceDirect, Terveystietä ja CINAHL.

Opinnäytetyö esitettiin koulun opinnäytetyöseminaarissa 11.4.–12.4.2017. Lopullisen työn palautuspäivämäärä oli 20.4.2017. Opinnäytetyö julkaistaan myös Theseuksessa. Projektin tuloksena syntyvät opinnäytetyöt ovat julkisia asiakirjoja ja ne toimitetaan Metropolian kirjastoon.

## 8.2 Näytteiden keräys

Triolabin yhteyshenkilön kanssa päädyttiin siihen, että tutkimukseen käytettävä näytemäärä olisi vähintään 40 kappaletta. Tämän jälkeen alettiin selvittää mistä näytteet saadaan. Alkuperäinen suunnitelma oli kerätä kahden viikon ajan virtsanäytteitä eri eläinklinikoilta ja toteuttaa vertailututkimus pelkästään niillä, mutta koska näytteiden saaminen oli hidasta ja toteutuksen aika rajallinen, päädyttiin käyttämään lisäksi koulun ATCC-bakteerikantoja. Aluksi mahdollisia infektiovirtsanäytteitä pyydettiin kahdelta suuremmalta eläinklinikalta, joissa myös näytemäärät ovat suuret, mutta molemmat klinikat kieltäytyivät yhteistyöstä. Lopulta saatiin lupa kerätä virtsanäytteitä kolmelta pienemmältä eläinklinikalta, Evidensia Munkkivuoresta ja Kampista sekä kissaklinikka Catvetista.

Koirien ja kissojen virtsanäytteitä haettiin maanantaista keskiviikkoon, jotta loppuviikoksi jäi aikaa herkkyysmääritysten tekoon ja tulosten tulkintaan. Näytteiden haku ajoitettiin iltapäivään, jolloin eläinlääkäriasemalla oli saatu kerättyä näytteitä päivän aikana ja koulun mikrobiologian luokka oli vapaasti käytettävissä näytteiden viljelyä varten. Ennen näytteiden keräämistä klinikoille vietiin virtsojen säilytysputket ja ohje, josta selvisi mitä näytteen tietoja tutkimusta varten tarvitaan. Näytteitä kerättiin eläinklinikoilta neljän viikon ajan, jonka aikana saatiin vain yhteensä 13 virtsanäytettä. Näytteiden määrä jäi vähäiseksi joko siksi, että näytemäärä oli niin pieni, ettei siitä riittänyt enää tarvittavaa määrää tutkimukseen, tai koska eläinklinikoille ei tullut enempää näytteitä.

### 8.3 Vertailun suoritus

Viljelymaljojen vertailu suoritettiin koulun mikrobiologian luokan tiloissa. Saadut virtsanäytteet viljeltiin valmistajien ohjeiden mukaisesti sekä Flexicult Vet- että Uriselect -maljoille. Viljelyn jälkeen maljat laitettiin lämpökaappiin 36 C:n asteeseen 18–24 tunnin ajaksi. Näytteiden tiedot kirjattiin ylös ja näyteputket sekä maljat numeroitiin juoksevilla näytenumeroilla, jotta tietoja oli helpompi käsitellä ja maljat eivät menneet sekaisin. Maljassa olevan näytenumeron tiedot esitetään tuloksissa tarkemmin (liite 2). Seuraavana päivänä tulokset tulkittiin maljoilta, maljat kuvattiin ja Flexicult Vet -maljan herkkyyksien tulokset kirjattiin ylös. Kummaltakin maljalta tarkasteltiin bakteeripesäkkeiden määrää, ulkonäköä sekä väriä.

Uriselect-maljalta tehtiin valtakasvusta herkkyysmäärittäminen samoilla antibiooteilla, mitä Flexicult Vet -maljassakin on käytetty. Herkkyysmäärittäykset tehtiin Mueller-Hinton -maljoille 0,5 McF vahvuisesta bakteerisuspensiosta, jonka valmistuksessa käytettiin apuna densitometriä (Kuvio 8). Työskentely tapahtui laminaarikaapissa, jolla pyrittiin välttämään kontaminaatio. Lopuksi herkkyysmaljat laitettiin inkuboitumaan lämpökaappiin vuorokaudeksi ja seuraavana päivänä niistä tarkistettiin antibioottilherkkyydet ja niitä vertailtiin Flexicult Vet -maljan antibioottilherkkyksien tuloksiin. Virtsaviljelyiden Flexicult Vet- ja Uriselect-maljoja inkuboitiin vielä ylimääräinen vuorokausi, jotta mahdolliset hitaammin kasvavat kannatkin huomattaisiin. Herkkyysmäärittäyksiä tulkittaessa Mueller-Hinton -maljalta estorenkkaan halkaisija mitattiin tarkasti viivoitinta apuna käyttäen. Halkaisijan koon avulla saatiin tiedot antibiootin tehosta. Antibioottilherkkyksien tuloksille tehtiin oma taulukko. Flexicult Vet -maljalla herkkyysluokkien arviointiin on vain herkkyysluokat S ja R, kun taas kiekkoherkkyysmäärittäyksessä mukana on myös herkkyysluokka I.



Kuvio 8. BioMérieux Densicheck -densitometri.

Koululta saatiin käyttöön seitsemän eri bakteerikantaa jotka aiheuttavat virtsatieinfektioita. Näitä olivat *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium* sekä *Proteus vulgaris*. Kantoja säilytettiin eppendorf-putkissa pakasteessa -20C:n asteessa. Bakteerimassaa otettiin putkista viljelysauvalla puhtasviljelyä varten. Kannoista tehtiin ensin puhtasviljelmät hajotustekniikalla kasvun varmistamiseksi. Puhtasviljelmät tehtiin bakteerien kasvuvaatimusten mukaisesti joko Cled- tai verimaljalle. Niitä kasvatettiin yön yli lämpökaapissa +36 C:n asteessa. Seuraavana päivänä tarkistettiin ensin, että bakteerit kasvavat maljoilla puhtaina. Sen jälkeen niistä tehtiin laimennossarjoja, jotka havainnollistavat saman kannan laimennosten eri bakteerimääriä ja niiden ulkonäköä molemmilla maljoilla.

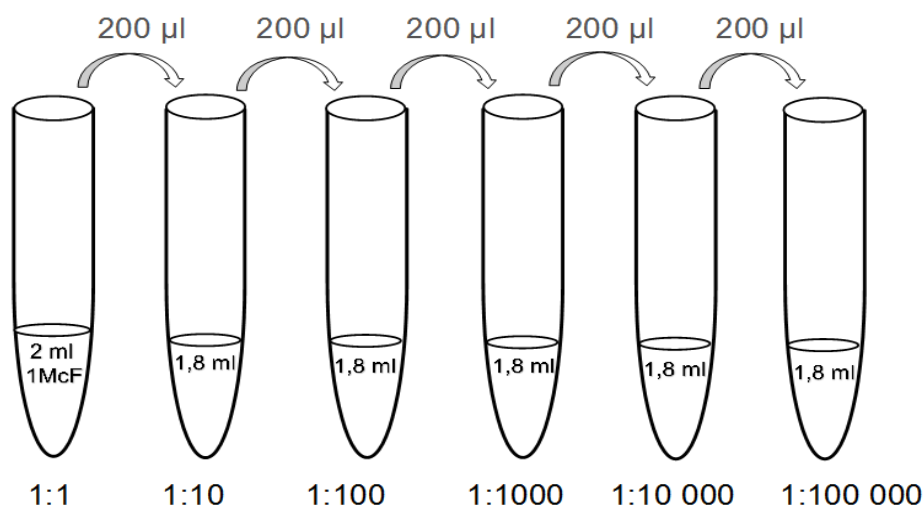




Kuvio 9. Laimennossarjat bakteerikannoista.

Bakteerilaimennosta tehdessä (Kuvio 9) bakteerimassaa sekoitettiin kahteen millilitraan 0,9 % NaCl:ia, kunnes saatiin aikaan suspensio, jonka vahvuus oli 1,0 McF. Näin pyrittiin vakioimaan bakteerien määrä suspensiossa. Vahvuus tarkastettiin densitometrin avulla. Suspensiosta tehtiin laimennokset kaikille bakteerikannoille 1:10, 1:100 ja 1:1000, jonka lisäksi *E. faecalis* ja *K. pneumoniae* -bakteereista tehtiin laimennokset 1:10 000 ja 1:100 000, jotta maljoilla saataisiin näkymään vielä pienempi bakteerikasvu (Kuvio 10). Kaikista kannoista ei saatu näitä viimeisiä laimennoksia tehtyä, koska maljoja oli rajoitetusti. Maljojen vähäisyyden takia Proteuksesta ei saatu tehtyä laimennossarjaa, mutta siitä päädyttiin tekemään 0,2 McF vahvuinen suspensio joka viljeltiin, että kummallakin maljalla nähtäisiin myös Proteuksen kasvustoa. *E. coli*, *E. faecium* ja *P. aeruginosa* -sekoituksesta tehtiin myös 1:100 000 laimennos, jotta saatiin näkymään sekakasvustoa maljoilla. Kaikista laimennoksista tehtiin bakteeriviljely sekä Uriselect- että Flexicult Vet -maljoille, jotka laitettiin yöksi lämpökaappiin +36 C:n asteeseen inkuboitumaan 18–24 tunnin ajaksi.

Seuraavana päivänä tulokset tulkittiin samalla tavoin kuin virtsanäytteet ja bakteerikannoista tehtiin herkkyysmääritykset Uriselectiltä Mueller-Hinton -maljalle. Työvaiheista tehtiin muistiinpanoja, jotka koottiin päivän päätteeksi tietokoneelle laadittuun taulukkoon.

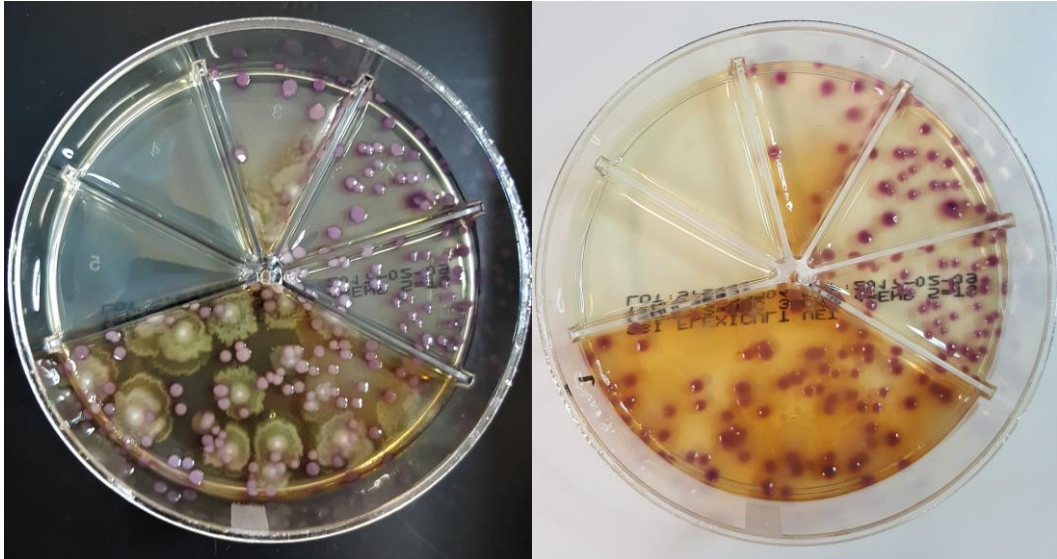


Kuvio 10. Laimennossarjan valmistus.

Kaikista maljojen tuloksista otettiin kuvat, jotka koottiin Google Drive -pilvipalveluun ja järjestettiin oikeaan järjestykseen näytteenumeron mukaan, jotta tulosten vertailu helpotuisi. Tulosten käsittelyyn käytettiin Excel-taulukkolaskentaohjelmaa. Näytteiden tiedot taulukoitiin Exceliin numerojärjestykseen. Taulukosta selviää eläinlaji ja näytteenotto-tapa/bakteerikanta, arvio pesäkkeiden määrästä sekä kuvaus pesäkkeiden ulkonäöstä ja väristä. Tulosten vertailun helpottamiseksi Uriselect- ja Flexicult Vet -maljan kaikki tulokset koottiin taulukkoon vierekkäin.

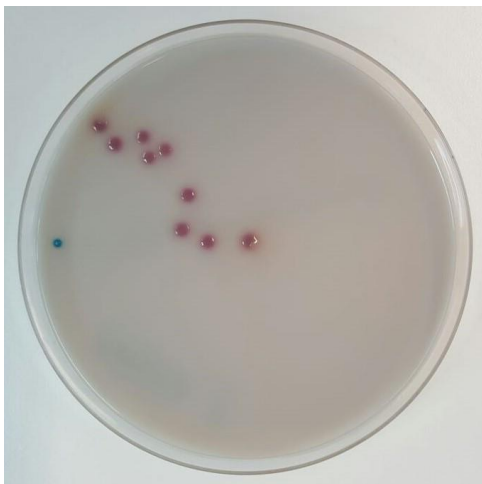
## 9 Tulokset

Bakteerien määrän ja morfologian arvioinnissa käytettiin apuna valmistajien ohjeita. Virtsanäytteitä saatiin kaikkiaan 13 kappaletta, joista neljässä oli bakteerikasvua. Suurin osa eläinnäytteissä kasvavista pesäkkeistä oli *E. colia*. Kaikkien viljelyjen tuloksia tarkasteltiin Flexicult Vet -maljalla aluksi valoa vasten ja sen lisäksi valkoista sekä mustaa alustaa vasten. Näin huomattiin, että joissakin näytteissä pesäkkeet erottuivat huomattavasti paremmin mustalla alustalla. Pesäkemorfologiaa tarkasteltaessa riittävä valaistus oli tärkeä, jolloin pesäkkeiden muoto ja levinneisyys olivat maljalla selkeämmin havaittavissa. Uriselectilla pesäkemorfologiaa oli helpompi tarkastella ja pesäkkeet erottuivat suurimmaksi osaksi paremmin kuin Flexicult Vet -maljalla, jos kasvu oli yhtään runsaampaa. Värireaktiot olivat molemmilla maljoilla selkeitä ja toimivat suurimmaksi osaksi valmistajan lupaamalla tavalla.



Kuvio 11. Pesäkkeiden erottuvuus Flexicult Vet -maljalla mustalla ja valkoisella alustalla.

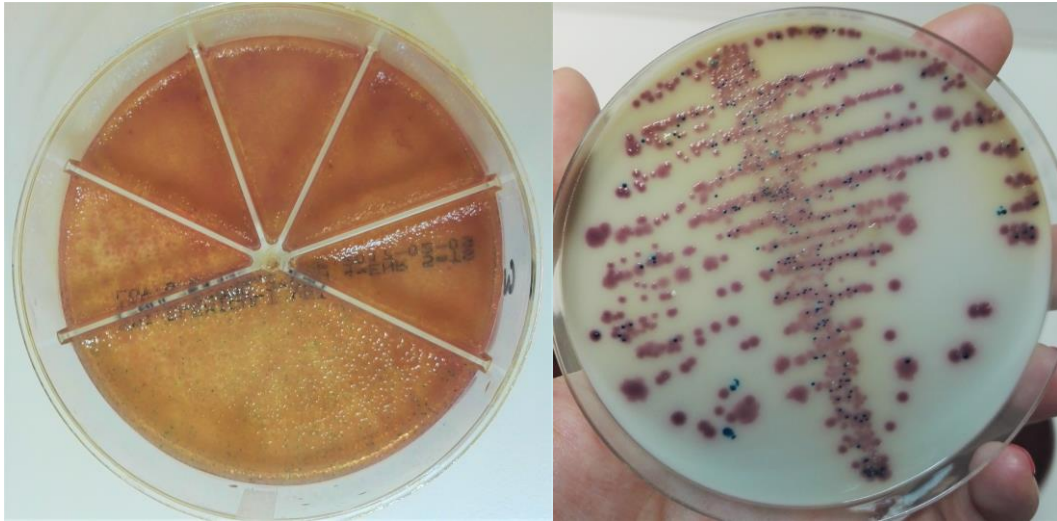
Flexicult Vet -maljalle viljellyssä koiran vapaasti lasketussa virtsanäytteessä nähdään pesäkkeiden ulkonäkö sekä mustalla että valkoisella alustalla (kuvio 11). Samassa näytteessä Uriselectille viljeltynä keskellä kasvavan *E. coli* -pesäkkeen päällä erottuu yksi heikosti kellertävä, limaisen näköinen pesäke, joka näkyi kunnolla vasta toisen kasvatusvuorokauden jälkeen (kuvio 12).



Kuvio 12. Pesäkkeet Uriselectillä.

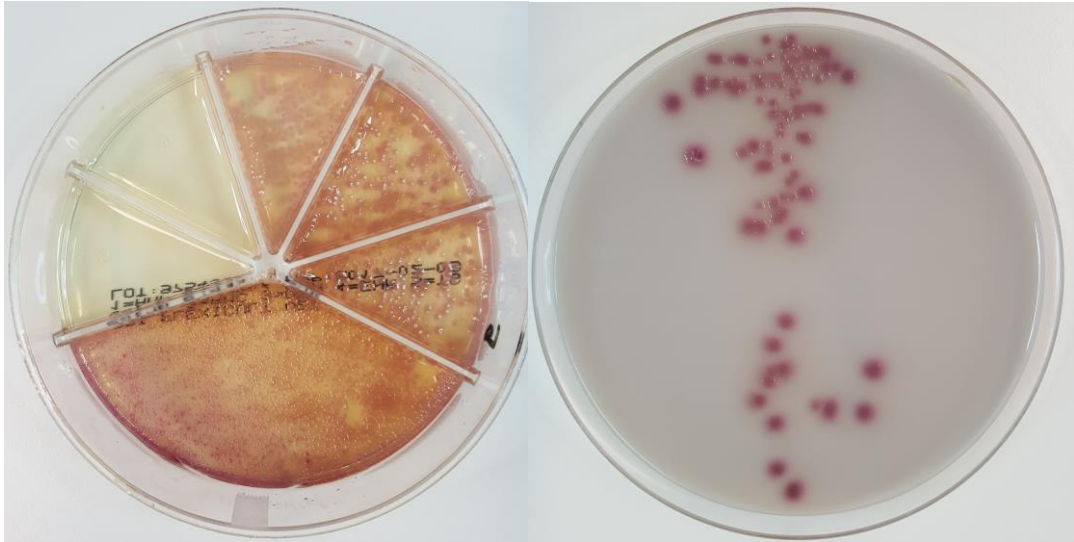
Koiran vapaasti lasketun virtsan viljelyssä nähdään kahta eri bakteeria sekä Flexicult Vet -maljalla että Uriselectilla (Kuvio 13). Koska maljoilla kasvavan *E. coli* pesäkkeet ovat suurempikokoisia kuin pienemmät, tummat kokkipesäkkeet, on vaikea erottaa kumpi kasvaa valtakasvuna. Flexicult Vet -maljalla kokkipesäkkeitä on vaikeampi erottaa, sillä

*E. coli* peittää ne osittain alleen. Tämän takia myös antibioottiherkkyys kokkikasvusta on hankala lukea maljalta. Herkkyysmääritys Uriselectin kokkikasvusta oli hieman haastavaa, sillä irtonaisia kokkipesäkkeitä oli vaikea eristää koska ne kasvoivat niin kiinni *E. coli* -pesäkkeissä. Jos erillispesäkkeitä ei saada poimittua, täytyisi pesäkkeistä tehdä puhtasviljelmät, jotta saataisiin irtonaisia pesäkkeitä maljalle. Maljalta saatiin kuitenkin eristettyä puhtaasti pari pesäkettä, joten puhtasviljelmää ei tarvittu.



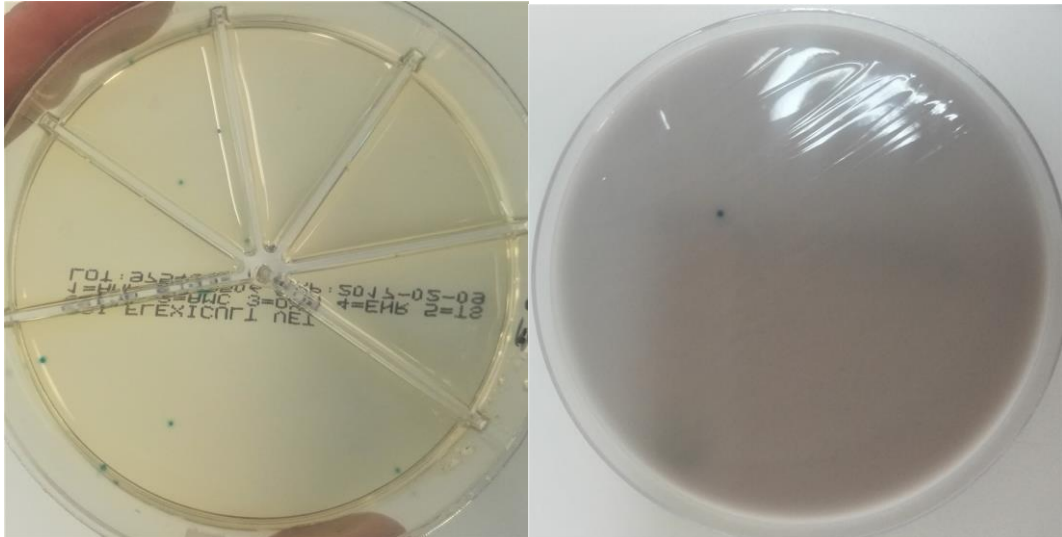
Kuvio 13. Tummaa kokkikasvustoa *E. coli*n seassa.

Seuraavassa kuvassa nähdään selkeä ja puhtaana kasvava *E. coli* -kasvusto molemmilla maljoilla (Kuvio 14). Pesäkkeet olivat Uriselectilla *E. colille* tyypillisiä suurehkoja ja punertavia. Flexicult Vet -maljalla kasvu oli niin tiheää, että pesäkkeet eivät mahtuneet kasvamaan suurempina, mutta väri oli maljalla tyypillinen *E. colille*. Tämä kissan virtsanäyte oli ainoa kystosenteesillä otettu, bakteerikasvua sisältävä näyte. Muissa merkittävissä kasvuissa oli näytteenä vapaasti laskettua virtsaa ja niissä kasvoi useampaa kuin yhtä bakteeria.



Kuvio 14. Selkeä *E. coli* -kasvusto molemmilla maljoilla.

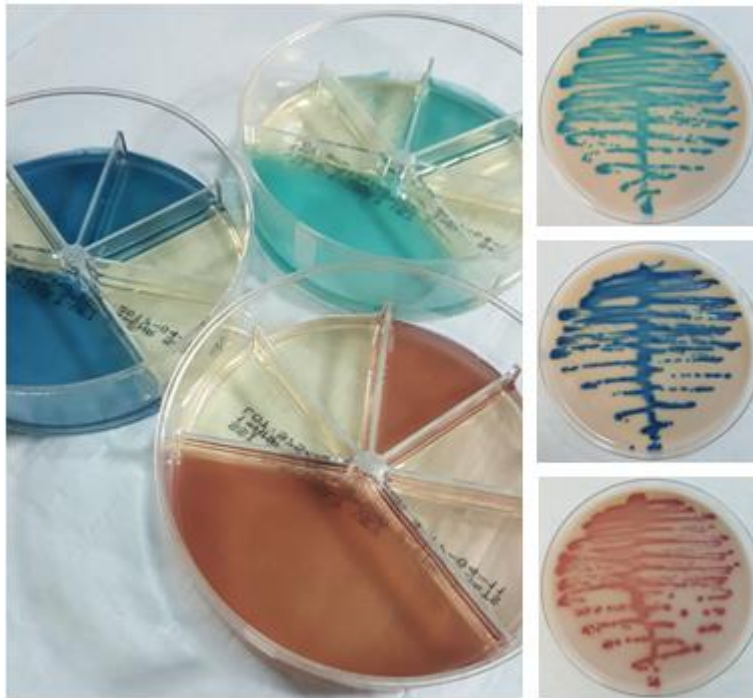
Kissalta kystosenteesillä otetussa virtsanäytteessä Flexicult Vet -maljalla kasvoi muutama kokkipesäke ja Uriselectilla vain yksi (Kuvio 15). Bakteerien määrä on reilusti alle  $10^3$ , joten määrä ei ole merkittävä virtsatieinfektiota epäiltäessä, eikä aiheuta jatkotoimenpiteitä.



Kuvio 15. Pieniä kokkipesäkkeitä.

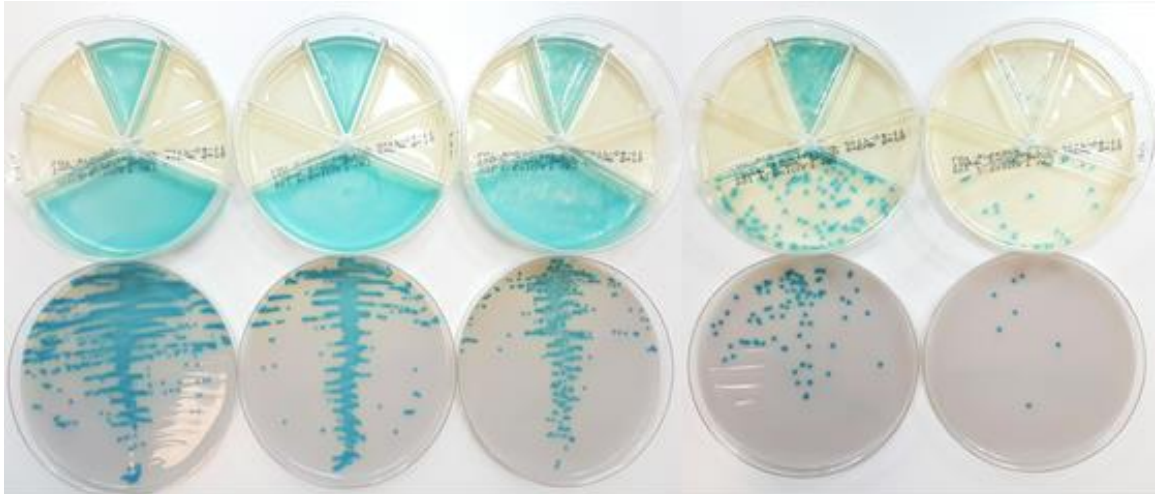
Kaikki viljellyt bakteerikannat kasvoivat hyvin kummallakin maljalla ja kasvun määrässä ei ollut havaittavissa suuria eroja maljojen välillä. Flexicult Vet -maljalta suuren kasvun määrää oli vaikeampi arvioida, koska jos kasvua on yli  $10^5$ , pesäkkeet kasvavat tasaisena mattona (Kuvio 16). Tämä ei kuitenkaan haittaa diagnoosin kannalta, koska yli  $10^5$

bakteerimäärä on merkitsevää kasvua ja vaatii antibioottihoidon. Bakteerien morfologiseen tunnistamiseen se kuitenkin vaikuttaa, koska pesäkkeitä ei voi arvioida koon ja muodon perusteella. Tutkimuksessa käytettyjen bakteerien värireaktiot olivat kuitenkin selkeästi valmistajan ohjeen mukaiset kaikilla bakteerikannoilla, paitsi *Enterococcus faeciumilla* ja *Pseudomonas aeruginosalla* joten arvion bakteerista pystyi tekemään suurimmaksi osaksi pelkän värinkin perusteella. Kummallakin maljalla enterokokkien värireaktio levisi hieman pesäkkeen ulkopuolelle.



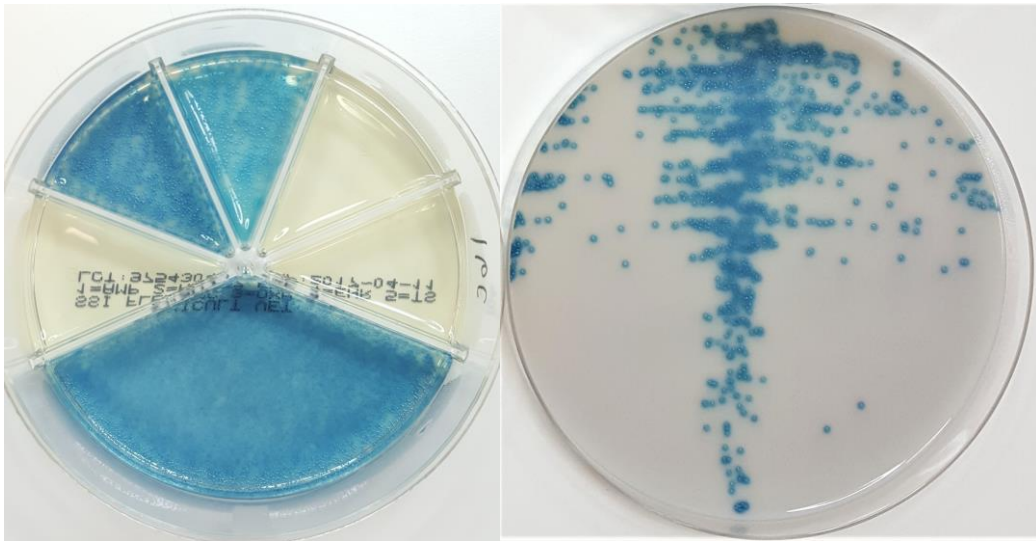
Kuvio 16. Tiheää *E. coli*- ja enterokokkikasvua Flexicult Vet- ja Uriselect -maljoilla.

Ensimmäiset 1 McF suspension viljelyt kasvoivat tasaisena mattona Flexicult Vet -maljoilla, joten niistä päätettiin tehdä laimennossarjat. Laimennossarjojen avulla oli helpompi vertailla bakteerien kasvun määrää ja maljojen herkkyttä (Kuvio 17).



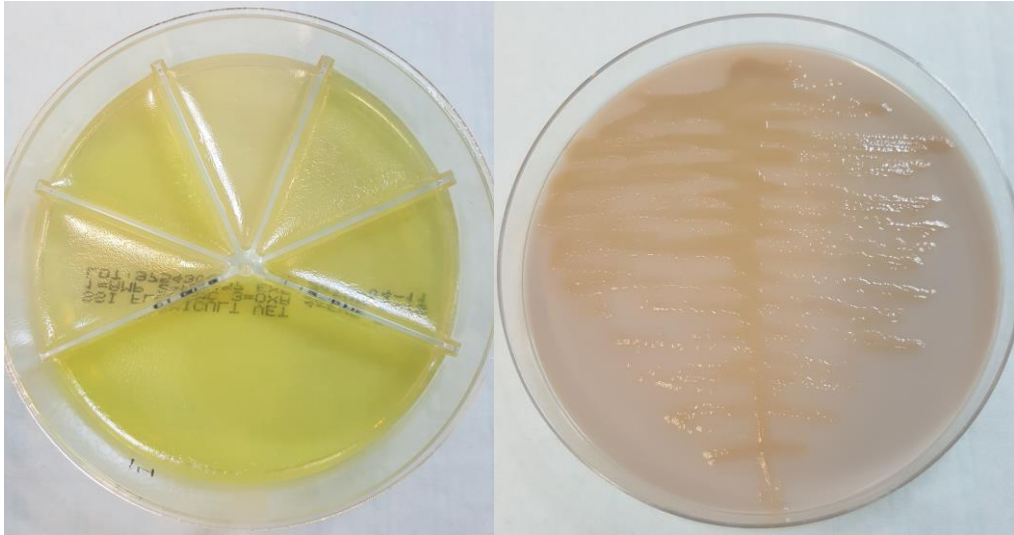
Kuvio 17. Laimennossarja *Enterococcus faecalis* -kannasta molemmilla maljoilla.

*Enterococcus faecium* kasvoi Flexicult Vet -maljalla tummansinisenä, vaikka valmistajan ohjeen mukaan sen kuuluisi kasvaa siinä vihreänä tai harmaana (Kuvio 18).



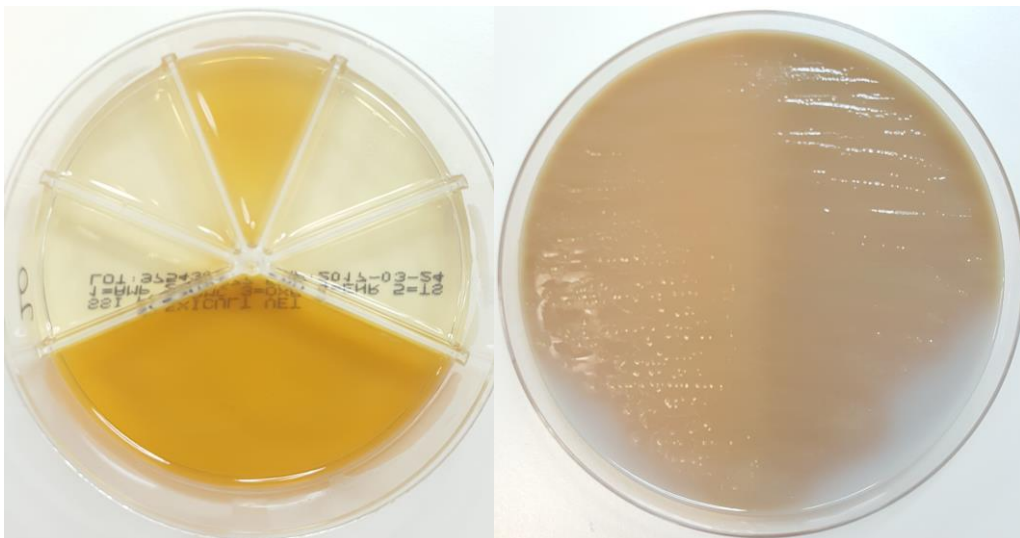
Kuvio 18. *Enterococcus faecium* molemmilla maljoilla.

*Pseudomonas aeruginosa* kasvoi Flexicult Vet -maljalla vaalean keltaisena, vaikka ohjeen kuvauksessa sen kuuluisi kasvaa vihertävänä. Kasvu kuitenkin näyttää kuvassa vihertävämmältä kuin paikan päällä tarkasteltaessa (Kuvio 19). Uriselectilla *P. aeruginosa* kasvoi sille tyypillisen näköisenä. *Pseudomonas aeruginosalle* on ominaista voimakas tuomenkukan tuoksu, joka on myös sen yksi tunnistuskeino.



Kuvio 19. *Pseudomonas aeruginosa* molemmilla maljoilla.

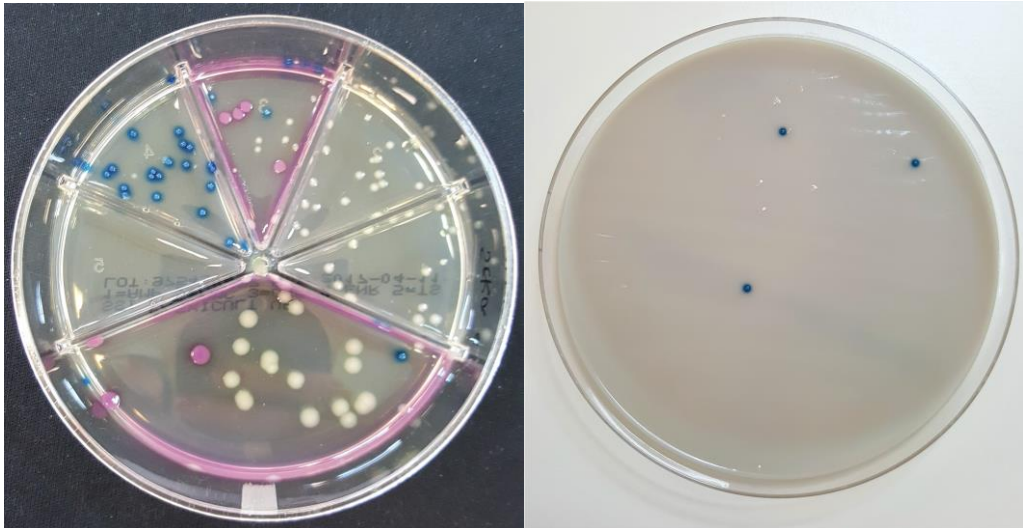
*Proteus vulgaris* -bakteerista päätettiin tehdä ainoastaan yksi viljely 0,2 McF vahvuisesta suspensiosta molemmille maljoille, sillä maljoja ei ollut enää tarpeeksi laimennossarjan tekoon. Uriselectilla näkyy Proteukselle tyypillinen leviävä kasvu ja Flexicult Vet -maljalla ohjeessa kuvatun värinen, mutta tasaisena mattona näkyvä kasvu (Kuvio 20). Uriselectilla *Pseudomonas aeruginosa* ja Proteukset värjäytyivät lähes samanvärisiksi, mutta Proteuksen voi tunnistaa sen maljalle leviävästä kasvustaan.



Kuvio 20. *Proteus vulgaris* -kasvua molemmilla maljoilla.

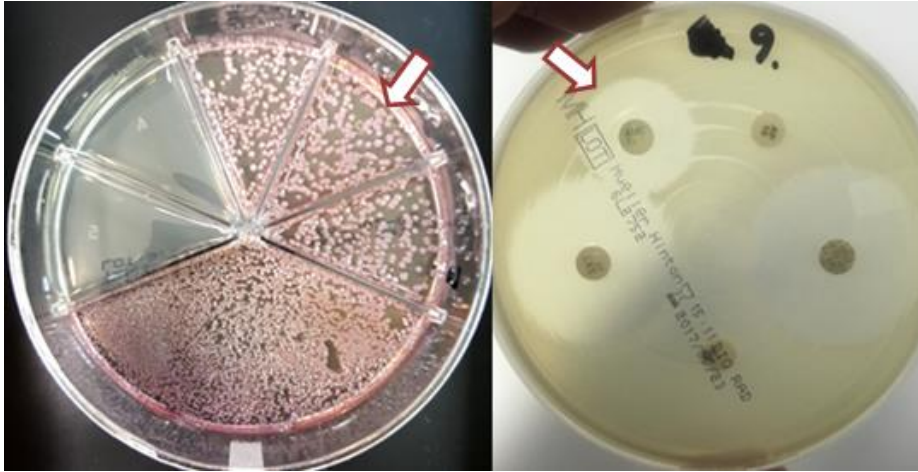


Yhdelle maljalle viljeltiin sekoitus *E. coli*-, *E. faecium*- sekä *P. aeruginosa* -bakteereita. Viljely tehtiin 1,0 McF vahvuisen suspension 1:100 000 laimennoksesta. Flexicult Vet -maljalla kaikki nämä bakteerit kasvoivat hyvin, mutta Uriselectilla ei kasvanut *E. coli* ollenkaan (Kuvio 21). Flexicult Vet -maljalla *E. coli* oli osittain levinnyt reunoille tasaisesti, joten pesäkkeiden määrää siitä ei voinut tarkasti arvioida.



Kuvio 21. *E. coli*, *E. faecium* ja *P. aeruginosa* sekakasvusto viljeltynä molemmilla maljoilla.

Herkkyysmäärityksen tulokset olivat suurimmaksi osaksi yhtenevät maljojen välillä, lukuun ottamatta joitakin amoksisilliini/klavulaanihapon ja enrofloksasiinin tuloksia. Amoksisilliini/klavulaanihapon yhdistelmäantibiotti näytti maljoilla eriäviä tuloksia kolmen virtsanäytteen *E. colin* herkkyysmäärityksissä. Flexicult Vet -maljalla *E. coli* oli resistentti amoksisilliini/klavulaanihapolle, kun taas Mueller-Hintonilla tulos oli joko herkkä (Kuvio 22), tai herkkyys oli alentunut. Aikaisemmassa tutkimuksessa Flexicult Vet -maljan suurimpia virheitä oli *E. colin* väärä resistenssi amoksisilliini-klavulaanihapolle, mikä tässäkin tutkimuksessa kävi ilmi yhden näytteen kohdalla. Enrofloksasiinin kohdalla *P. aeruginosa* ja *E. faecalis* olivat resistenttejä Flexicult Vet -maljalla, kun taas kiekkomenetelmän tuloksissa herkkyys oli alentunut.



Kuvio 22. *E. coli* näkyy Amoksisilliini/klavulaanihapolle resistenttinä Flexicult Vet -maljalla ja herkkänä Mueller-Hintonilla.

Maljojen tulosten perusteella päädyttiin yhtenevään tulokseen bakteerien kasvun määrässä ja alustavassa tunnistuksessa. Bakteeripesäkkeet kasvoivat kummallakin maljalla tyypillisen värisinä kahta poikkeusta lukuun ottamatta Flexicult Vet -maljalla. Bakteerien määrän arviot olivat yhtenevät maljojen välillä  $10^5$  määrään asti. Flexicult Vet -maljalla kasvu näkyi tiheämpänä johtuen suuremmasta näytemäärästä, jolloin sillä oli vaikea määrittää tarkemmin suurempaa kuin  $10^5$  kasvua, koska suuremmat bakteerimäärät kasvoivat tasaisena mattona, eikä erillispesäkkeitä erottanut. Antibioottiherkkyysmääritysten tulokset olivat aiemmin mainittuja poikkeuksia lukuun ottamatta samat Flexicult Vet -maljalla ja Mueller-Hintonilla.

## 10 Pohdinta

Opinnäytetyön tarkoituksena oli vertailla, saadaanko Flexicult Vet -maljalla yhteneviä tuloksia perinteisen virtsan bakteeriviljelymenetelmän sekä herkkyysmäärityksen kanssa. Vertailussa kiinnitettiin huomiota bakteerien kasvun määrään, bakteerien ulkonäköön, väriin ja siihen, saadaanko Flexicult Vet -maljan antibioottiherkkyysistä ja kiekkomenetelmällä tehdyistä herkkyysmäärityksistä samat tulokset.

### 10.1 Luotettavuus ja eettisyys

Bakteerien tunnistaminen suoraan kromogeenisilta maljoilta ei ole täysin luotettavaa ilman erillisiä jatkotunnistustestejä. Työssä ei kuitenkaan ollut tarkoitus tehdä jatkotunnis-

tustestejä, vaan tunnistuksen tuli perustua silmämääräiseen bakteeripesäkkeiden tarkasteluun ja maljojen väliseen vertailuun. Maljan lukijan pitää tuntea pesäkemorfologiaa, sekä myös kyseenalaistaa tulosten luotettavuutta. Flexicult Vet -maljaa, kuten muitakin kromogeenisia maljoja käytettäessä tulisi henkilökunnan saada hyvä perehdytys maljojen käyttöön ja lukemiseen, jotta vältyttäisiin mahdollisilta vääriltä tulkinnoilta. Työntekijäkohtaiset työskentely-, sekä tulkintaerot voivat myös lisätä tulosten hajontaa, mutta nämä pyrittiin työssä minimoimaan huolellisella suunnittelulla ja pohtimalla tuloksia yhdessä. Tuloksia tarkastellessa täytyy ottaa myös huomioon mikrobiologisten menetelmien epävarmuustekijät, kuten se, että hyvästä sekoituksesta huolimatta tietyssä määrässä näytettä ei aina ole samaa määrää bakteereita. Tästä johtuen bakteerikasvujen määrissä esiintyy aina pieniä eroja maljojen välillä.

Luotettavuutta pyrittiin parantamaan hyvän suunnittelun lisäksi huolehtimalla työssä käytettyjen materiaalien oikeanlaisesta säilytyksestä ja käsittelystä sekä tarkistamalla että materiaalit ovat käyttökelpoisia. Kahdessa käyttämättömässä Uriselect-maljassa näkyi vihertävä reuna agarilla, joten ne heitettiin pois eikä niitä käytetty tutkimuksessa. Näytteet sekoitettiin huolellisesti vortexilla ennen viljelyä ja herkkyysmäärittämisen tekoa. Ennen näytteen viljelyä Uriselectille tarkastettiin, että nestepinta oli näkyvässä viljelysilmuksen molemmilla puolilla. Näin varmistettiin, että näytettä oli riittävästi todennukaisen tuloksen saamiseksi. Bakteerikantojen viljelyn alussa kuitenkin huomattiin, ettei laimennos irronnut Uriselectille viljeltäessä silmukasta samoin kuin virtsanäyte ja sen määrä näytti pienemmältä. Näyte päätettiin pipetoida varmuuden vuoksi 10 µl:n pipetillä lopuille maljoille. Luotettavuutta lisäsi myös ohjeistus näytteiden keräämisestä, mikä jaettiin näytteitä antaville eläinlääkäriasemille.

Bakteerikantoja viljeltäessä luotettavuutta paransi puhtasviljely, jolla varmistettiin bakteerien kasvu ja puhtaus. Viljelyvaiheessa tärkeänä osana oli suunnitelmallisuus ja aseptinen työskentely, jolla vältettiin maljojen mahdollinen kontaminoituminen ja täten kasvatusten epäonnistuminen. Laimennossarjoja tehtäessä kiinnitettiin erityistä huomiota järjestelmällisyyteen, huolelliseen sekoitukseen ja pipetinkärjen vaihtamiseen jokaisessa laimennoksessa. Bakteerisuspensioiden teossa käytettiin vahvuuden varmistamiseksi densitometriä, joka kontrolloitiin siihen tarkoitetuilla kontrollisuspensioilla ennen käyttöä. Kontrollien tulokset olivat hyväksytyjen rajojen sisällä. Näytteet numeroitiin maljojen pohjiin, jotta näytteen alkuperä tiedettiin ja näin tiedot eivät päässeet vaihtumaan kansien mukana vahingossa toiseen maljaan.

Eläinten näytteenotossa voi aiheuttaa ongelmia se, että vapaasti lasketun näytteen kerääminen täysin puhtaasti on haastavaa, jolloin sekakasvusto voi haitata tutkimuksia ja vaikuttaa tulosten luotettavuuteen. Virtsanäytteiden keräämisessä luotettavuutta saattoi heikentää se, että virtsaa ei useissa tapauksissa saatu näyteputken täyttöviivaan asti, jolloin suhde säilöntäaineen kanssa ei ollut oikea. Kun tarpeeksi eläinten virtsanäytteitä ei saatu suunnitelman mukaan ajallaan, käyttämättä olevat Flexicult Vet -maljat ehtivät vanheta. Tästä syystä vanhentuneet maljat jouduttiin heittämään pois ja tilaamaan lisää uusia niiden tilalle.

Koska virtsan määrää ei ole vakioitu Flexicult Vet -maljalla, voi bakteerikasvu sillä hieman vaihdella. Uriselectillä virtsan määrä on tasan 10 µl, mutta Flexicult Vet -maljalla riittää joko virtsan tiputtaminen pipetillä tai sen kaataminen suoraan maljalle. Ylimääräinen virtsa valutetaan maljalta pois, jolloin näytettä voi jäädä tekijästä riippuen hieman eri määrä maljalle.

Näytteiden määrän ja eri bakteerikantojen vähyyys vaikutti tulosten luotettavuuteen negatiivisesti. Työn tarkoituksen kannalta paras vaihtoehto olisi ollut, että näytemateriaali olisi koostunut kokonaan virtsanäytteistä, koska Flexicult Vet -malja on suunniteltu koirien ja kissojen virtsanäytteiden diagnosointiin. Näin oltaisi nähty, miten bakteerit kasvavat oikeassa näytemateriaalissa ja jotta suoritus sekä tulkinta olisivat olleet mahdollisimman samankaltaiset eläinklinikoiden kanssa. Koska näytteitä ei kuitenkaan ollut mahdollisuutta kerätä useampaa kuukautta, niin oli hyvä, että tutkimukseen saatiin koulun bakteerikantoja, joita esiintyy eläinten virtsatieinfektioissa. Bakteerikantoja ja maljoja olisi kuitenkin pitänyt olla enemmän, jotta olisi saatu tehtyä lisää laimennoksia havainnollistamaan kasvua ja tulos olisi ollut vertailukelpoisempi sekä luotettavampi.

Tutkimukseen ei tarvittu eläinpotilaiden tietoja, joten lupia näytteiden käyttämiseen tutkimusaineistona ei myöskään tarvinnut pyytää. Työskentely tapahtui huolellisesti hyviä laboratoriakäytäntöjä noudattaen ja syntyneet jätteet hävitettiin asianmukaisesti. Näytteiden käsittelyssä huolehdittiin aseptiikasta ja hyvästä käsihygieniasta.

## 10.2 Tulosten pohdinta

Flexicult Vet -maljan tulokset olivat suurimmaksi osin yhtenevät nykyisen menetelmän tulosten kanssa. Jatkossa vertailussa voisi käyttää suurempaa määrää näytteitä ja työn

tarkoituksen kannalta olisi oleellista, että näytteet olisivat koirien ja kissojen virtsanäytteitä. Virtsanäytteiden määrän tulisi olla suurempi senkin takia, että saaduista 13 virtsatieinfektioepäilyistä näytteistä vain neljässä kasvoi bakteereita. Vaikka negatiiviset tuloksetkin ovat tuloksia, näytteitä olisi tarvittu paljon enemmän, jotta olisi saatu vertailuun riittävä määrä positiivisia näytteitä. Alun perin suunnitelmaan kuului näytteiden kemiallinen seulonta ennen viljelyä. Leukosyyttien ja/tai nitriittien ollessa positiivisia, on tulehdus todennäköisempi. Tällöin maljoja olisi säästynyt, kun vain positiiviset virtsanäytteet olisi viljelty. Käytännössä kuitenkin havaittiin, että vaikka näytteen leukosyytit ja nitriitit olivat testiliuskalla positiivisia, ei viljelyssä kuitenkaan näkynyt bakteerikasvua. Kasvua kuitenkin näkyi näytteen viljelyssä, minkä leukosyytit ja nitriitit olivat negatiivisia. Tämän takia emme kokeneet tarpeelliseksi jatkaa seulontojen tekoa.

Laimennossarjoja suunnitellessa oli vaikea löytää tietoa siitä, mistä vahvuudesta sarja kannattaisi aloittaa, jotta saataisiin kasvua mahdollisimman hyvin havainnollistavat laimennokset. Ensimmäiseksi testit viljeltiin 1 McF vahvuudesta suspensioista kaikille bakteerikannoille. Kasvu näkyi tiheänä, ja Flexicult Vet -maljalla tasaisena mattona, josta pesäkkeet eivät erottuneet. Uskoimme, että 1:10–1:1000 laimennoksissa pesäkkeet kuitenkin erottuisivat. Huomasimme, että vielä 1:1000 laimennoksessakin kasvu oli Flexicult Vet -maljalla tiheää, vaikka pesäkkeet hieman erottuivatkin. Halusimme kuitenkin kasvua, joka havainnollistaisi myös  $10^4$  ja  $10^3$  bakteerimääriä. Maljoja ei kuitenkaan ollut enää tarpeeksi, että olisimme voineet tehdä 1:10 000 ja 1:100 000 laimennokset kaikista kannoista, joten valitsimme *Enterococcus faecalis*en ja *Klebsiella pneumoniae*n, koska yleisimmästä taudinaiheuttajasta *E. colista* oli jo virtsanäytteistä tullut havainnollistavaa kasvua. Laimennossarjoja tehdessä olisi pitänyt ottaa huomioon näytteen suurempi määrä Flexicult Vet -maljalla, jolloin bakteereita tulee maljalle enemmän ja kasvukin on tiheämpää. Jatkossa laimennossarjat olisi kannattavampi aloittaa esimerkiksi 0,5 McF vahvuudesta, jotta määrää edustavat kasvut saadaan vähemmällä määrällä laimennoksia.

Flexicult Vet -maljalla suurempi bakteerimäärä kuin  $10^5$  kasvoi tasaisena mattona, mutta koska näin suuri määrä bakteereita tarkoittaa kuitenkin lähes aina infektiota, virtsatieinfektio voidaan todeta ja lääke määrätä, koska herkkyysmääritysten tulokset voidaan lukea tiheästä kasvusta huolimatta. Jos tunnistustestejä ei tehdä, bakteerien tunnistamisen arvioon ei tässä tapauksessa ole muuta keinoa kuin värireaktion luottaminen, koska erillisiä pesäkkeitä ei erotu, jolloin tunnistamisen apuna ei voida käyttää muodon ja koon arviointia.

Koska tässä työssä käytetyistä bakteerilajeista oli saatavilla vain yhdenlaista kantaa, täytyy ottaa huomioon, että saman bakteerilajin eri kantojen pesäkkeiden ulkonäöllä voi olla eroavaisuuksia kromogeenisilla maljoilla. Vertailun voisi jatkossa tehdä myös bakteerikannoilla, mutta tässä tapauksessa saman lajin vertailtavia kantoja tulisi olla paljon enemmän, jotta nähtäisiin, miten eri kannat kasvavat maljoilla.

Herkkyysmäärittämissä huomattiin maljojen välillä eroa amoksisilliini/klavulaanihapon ja enrofloxasiinin tuloksissa. Flexicult Vet -maljan tuloksena oli kaikissa näissä tapauksissa resistentti, ja kiekkoherkkyysmenetelmällä tulos oli joko herkkä tai herkkyys oli alentunut. Herkkyysmäärittämissä väärä resistenssi antibiootille vähentää vaihtoehtoja lääkehoitoon ja voi johtaa laajakirjoisten antibioottien turhaan käyttöön, jolla saattaisi olla negatiivisia vaikutuksia resistenssin kannalta. Suurempi virhe olisi kuitenkin, jos määrittämissä tulos näyttäisi herkkää antibiootille, jolle bakteeri on oikeasti resistentti. Tässä tapauksessa voitaisiin valita väärä lääke, joka ei tehoa infektiin. Herkkyysmäärittämissä poikkeamissa, missä Flexicult Vet -maljan tulos oli resistentti ja Mueller-Hintonilla herkkyys oli alentunut, ei ole kuitenkaan vaikutusta lääkehoitoon koska kummassakaan tapauksessa kyseistä lääkettä ei määrätä.

Flexicult Vet on saanut positiivista palautetta käyttäjiltään liittyen sen nopeuteen ja helppokäyttöisyyteen. Eläinklinikoiden työntekijät eivät aina ole kunnolla perehtyneitä laboratoriomenetelmiin, joten on tärkeää, että käytettävä menetelmä on selkeä ja helppo käyttää. Flexicult Vet -maljan etuna klinikoille on myös se, että tilattavien tarvikkeiden määrä on vähäisempi.

Tämän vertailututkimuksen tulosten perusteella Flexicult Vet voisi toimia bakteerien alustavaan tunnistukseen yhtä hyvin kuin perinteinen virtsaviljely ja parhaimmillaan se nopeuttaisi diagnoosiprosessia ja oikean antibiootin valintaa. Flexicult Vet voisi rutiinidiagnostiikassa korvata nykyisin käytössä olevat maljat, kunhan henkilökunta saa kunnan perehdytyksen bakteerien tunnistukseen ja maljan käyttöön. Luotettavampi tutkimustulos edellyttäisi kuitenkin suurempaa näytemäärää, joka koostuisi kokonaan koirien ja kissojen virtsanäytteistä. Tästä syystä tulosten luotettavuuden vahvistamiseksi olisi laajempi tutkimus vielä tarpeen.

### 10.3 Ammatillinen kehittyminen

Kehityimme opinnäytetyön prosessin aikana paljon sekä kirjoittajina että mikrobiologisen vertailututkimuksen tekijöinä. Opimme etsimään tietoa ja pääsimme hyödyntämään aiemmin opittuja tietotekniikan ja mikrobiologian kurssin taitoja. Pääsimme myös hyödyntämään bakteriologian harjoittelussa oppimiamme asioita. Koska opintomme ovat keskittyneet vain ihmisnäytteiden mikrobiologisiin tutkimuksiin, opimme työssämme myös eläinten näytteenotosta ja taudinaiheuttajista. Kehityimme paljon kromogeenisilla maljoilla kasvavien virtsatieinfektioita aiheuttavien bakteerien silmämääräisessä tunnistamisessa ja pesäkemorfologian tarkastelussa. Työssä käytettiin monipuolisesti kirjallisuutta ja mahdollisimman tuoreita lähteitä sekä itse otettua kuvamateriaalia. Työn kirjoitukseen käytettiin siihen tarkoitettua opinnäytetyön pohjaa ja lähteet sekä lähdeviitteet on kirjoitettu Metropolian ohjeita noudattaen. Lähteisiin perehtyminen ja tiedonhaku lisäsivät laajasti tietämystämme monesta eri aihealueesta. Huomasimme myös käytännön työssä, etteivät asiat etene aina suunnitellusti, eikä ennalta päätetyt menetelmät välttämättä toimi. Nämä asiat kehittivät ongelmanratkaisukykyämme ja opimme enemmän kuin mitä olisimme oppineet ilman vastoinkäymisiä.

Yhteistyö Triolabin kanssa oli sujuvaa ja saimme tarpeen tullen neuvoja työn toteutusta varten. Saimme apua myös opinnäytetyötä ohjaavilta opettajiltamme sekä mikrobiologian opettajiltamme.

## Lähteet

Antibioottikoiran elämää. 18.4.2017. Yle Fem.

Anttila, Veli-Jukka – Hellstén, Soile – Rantala, Arto – Routamaa, Marianne - Syrjälä, Hannu – Vuento, Risto (toim.) 2010. Hoitoon liittyvien infektioiden torjunta. Porvoo: WS Bookwell Oy.

Biorad laboratories 2013. UriSelect™ 4. Verkkodokumentti. <[http://www.biorad.com/webroot/web/pdf/inserts/CDG/fi/63726\\_2013\\_11\\_FI.pdf](http://www.biorad.com/webroot/web/pdf/inserts/CDG/fi/63726_2013_11_FI.pdf)> Luettu 19.1.2017.

Carlson, Petteri – Koskela, Markku 2011. Bakteriologiset tutkimukset. Teoksessa Hedman, Klaus – Heikkinen, Terho – Huovinen, Pentti – Järvinen, Asko – Meri, Seppo – Vaara, Matti (toim.) Infektiosairaudet. Helsinki: Duodecim.

Ehder, Tapio 2005. Kemian metrologian opas. Metrologian neuvottelukunta. Verkkodokumentti. <<http://www.vtt.fi/inf/pdf/MIKES/2005-J6.pdf>> Luettu 29.9.2016.

Eskelinen, Seija 2016. Virtsan bakteeriviljely. Duodecim terveyskirjasto. Verkkodokumentti. <[http://www.terveyskirjasto.fi/terveyskirjasto/tk.koti?p\\_artikkeli=snk03153](http://www.terveyskirjasto.fi/terveyskirjasto/tk.koti?p_artikkeli=snk03153)> Luettu 9.11.2016.

Evira 2014. Bakteerien antibioottiliikkyvän tutkiminen kiekkoherkkyysmenetelmällä. Menetelmäohje. Verkkodokumentti. <[https://www.evira.fi/files/attachments/fi/evira/lo-makkeet\\_ja\\_ohjeet/elintarvikkeet/elintarvike\\_ja\\_rehututkimus/mibi/evira\\_3484\\_v9\\_bakteerien\\_antibi\\_internet.pdf](https://www.evira.fi/files/attachments/fi/evira/lo-makkeet_ja_ohjeet/elintarvikkeet/elintarvike_ja_rehututkimus/mibi/evira_3484_v9_bakteerien_antibi_internet.pdf)> Luettu 22.3.2017.

Evira 2016. Katse koirien ja kissojen antibioottihoitoihin. Verkkodokumentti. <<https://www.evira.fi/elaimet/elainten-terveys-ja-elintaudit/laakitseminen/euroopan-antibioottipaiva/katse-koirien-ja-kissojen-antibioottihoitoihin/>> Luettu 19.1.2017.

Evira 2016. Mikrobilääkeresistenssi. <Verkkodokumentti. <https://www.evira.fi/elaimet/zoonosikeskus/mikrobilaaakeresistenssi/>> Luettu 13.11.2017.

Evira 1997. Mikrobiologisten menetelmien validointiohje. Valvonta 13/1997. Helsinki: Elintarvikevirasto.

FiRe 2009. Bakteerin lääkeherkkyyden määrittäminen kiekkomenetelmällä. Versio 6. Verkkodokumentti. <<http://www.thl.fi/attachments/Fire/kiekkomenetelma.pdf>> Luettu 28.2.2017

Grönthal, Thomas – Eklun, Marjut – Thomson Katariina – Piiparinen, Heli – Sironen, Tarja – Rantala, Merja 2017. Antimicrobial resistance in *Staphylococcus pseudintermedius* and the molecular epidemiology of methicillin-resistant *S. pseudintermedius* in small animals in Finland. Journal of antimicrobial chemotherapy. Verkkodokumentti. <<https://academic.oup.com/jac/article-lookup/doi/10.1093/jac/dkw559>> Luettu 10.4.2017

Guardabassi, Luca – Hedberg, Sandra – Rem Jessen, Lisbeth – Damborg, Peter 2015. Optimization and evaluation of Flexicult® Vet for detection, identification and antimicrobial susceptibility testing of bacterial uropathogens in small animal veterinary practice. Verkkodokumentti. <<https://actavetscand.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13028-015-0165-4>> Luettu 28.9.2016.



Helsingin yliopisto 2015. Seuraeläinten bakteerien vastustuskyky antibiooteille huolestuttavan korkea. Eläinlääketieteellinen tiedekunta. Verkkodokumentti. <[http://www.vet-med.helsinki.fi/tiedekunta/uutiset/2015/151118\\_antibioottiresistenssi.html](http://www.vet-med.helsinki.fi/tiedekunta/uutiset/2015/151118_antibioottiresistenssi.html)> Luettu 17.1.2016.

Huslab 2016. Bakteeriviljely virtsasta. Verkkodokumentti. <<https://huslab.fi/ohjekirja/1155.html>>. Luettu 28.2.2017.

Huupponen, Risto 2014. Bakteerilääkkeet. Teoksessa Pelkonen, Olavi - Ruskoaho, Heikki - Hakkola, Jukka - Huupponen, Risto - MacDonald, Ewen - Moilanen, Eeva - Pasanen, Markku - Scheinin, Mika - Vähäkangas, Kirsi (toim.) Lääketieteellinen farmakologia ja toksikologia. Helsinki: Duodecim.

Jalava, Jari 2010. Ihmisen normaali mikrobisto ja sen merkitys. Teoksessa Hedman, Klaus – Heikkinen, Terho – Huovinen, Pentti – Järvinen, Asko – Meri, Seppo – Vaara, Matti (toim.) Mikrobiologia. Helsinki: Duodecim.

Järvinen, Asko – Vaara, Martti – Huovinen, Pentti – Liippo, Kari – Vasankari, Tuula 2011. Bakteerilääkkeet. Teoksessa Hedman, Klaus – Heikkinen, Terho – Huovinen, Pentti – Järvinen, Asko – Meri, Seppo – Vaara, Matti (toim.) Infektiosairaudet. Helsinki: Duodecim.

Karhumäki, Eliisa - Jonsson, Anne - Saros, Marita 2005. Mikrobit hoitotyön haasteena. Helsinki: EditaPrima Oy.

Kärpänoja, Pauliina 2007. Kromogeenset maljat periaate ja tausta. Moodi (1).

Langston, Cathy E 2011. Cystitis in dogs. Teoksessa Morgan, Rhea – Small animal practice client handouts. USA: Saunders.

Lumio, Jukka 2016. Antibiootit. Duodecim terveyskirjasto. Verkkodokumentti. <[http://www.terveyskirjasto.fi/terveyskirjasto/tk.koti?p\\_artikkeli=dlk01177](http://www.terveyskirjasto.fi/terveyskirjasto/tk.koti?p_artikkeli=dlk01177)> Luettu 13.3.2017.

Lyytikäinen, Outi – Vuopio-Varkila, Jaana – Kotilainen, Pirkko 2010. Koagulaasinegatiiviset stafylokokit. Teoksessa Hedman, Klaus – Heikkinen, Terho – Huovinen, Pentti – Järvinen, Asko – Meri, Seppo – Vaara, Matti (toim.) Mikrobiologia. Helsinki: Duodecim.

Meurman, Olli 2007. Kokemuksia kromogeenisten maljojen käytöstä virtsaviljelyssä. Moodi (1).

Orion pharma 2000. Antibioottiryhmät. Teoksessa Mikrobiolääkkeet 2000-luvun eläinlääkinnässä. Turku: Kirjapaino Koteva.

Rasmussen, Tanja – Kern, Mette – Meyer, Aase 2015. Flexicult® Vet urinary test. Statens serum institut. Verkkodokumentti <[http://www.ssidiagnostica.com/-/media/Admin/Diagnostica-Downloads/Downloads-UK/Packaging-inserts/Insert-Flexicult-Vet\\_EN.ashx?la=da](http://www.ssidiagnostica.com/-/media/Admin/Diagnostica-Downloads/Downloads-UK/Packaging-inserts/Insert-Flexicult-Vet_EN.ashx?la=da)> Luettu 28.9.2016.

Siitonen, Anja – Vaara, Martti 2010. Escherichia, Salmonella, Shigella ja Yersinia. Teoksessa Hedman, Klaus – Heikkinen, Terho – Huovinen, Pentti – Järvinen, Asko – Meri, Seppo – Vaara, Matti (toim.) Mikrobiologia. Helsinki: Duodecim.

Tissari, Päivi - Anttila, Veli-Jukka 2010. Muu Enterobacteriaceae-heimo. Teoksessa Hedman, Klaus – Heikkinen, Terho – Huovinen, Pentti – Järvinen, Asko – Meri, Seppo – Vaara, Matti (toim.) Mikrobiologia. Helsinki: Duodecim.

Tissari, Päivi - Anttila, Veli-Jukka 2010. Proteukset. Teoksessa Hedman, Klaus – Heikkinen, Terho – Huovinen, Pentti – Järvinen, Asko – Meri, Seppo – Vaara, Matti (toim.) Mikrobiologia. Helsinki: Duodecim.

Tissari, Päivi - Anttila, Veli-Jukka 2010. Pseudomonakset, pseudomonaksen kaltaiset sauvat ja akinetobakteerit. Teoksessa Hedman, Klaus – Heikkinen, Terho – Huovinen, Pentti – Järvinen, Asko – Meri, Seppo – Vaara, Matti (toim.) Mikrobiologia. Helsinki: Duodecim.

Triolab 2016. Verkkodokumentti. <<http://www.triolab.fi/>> Luettu 28.9.2016.

Vaara – Skurnik – Sarvas 2010. Bakteerisolun rakenne ja toiminta. Teoksessa Hedman, Klaus – Heikkinen, Terho – Huovinen, Pentti – Järvinen, Asko – Meri, Seppo – Vaara, Matti (toim.) Mikrobiologia. Helsinki: Duodecim.

Vuopio-Varkila, Jaana – Kuusela, Pentti – Kotilainen, Pirkko 2010. Staphylococcus aureus. Teoksessa Hedman, Klaus – Heikkinen, Terho – Huovinen, Pentti – Järvinen, Asko – Meri, Seppo – Vaara, Matti (toim.) Mikrobiologia. Helsinki: Duodecim.

## Työn tulokset

	Eläinlaji ja näytteenottotapa	Pesäkkeiden määrä		Pesäkkeiden ulkonäkö	
		Flexicult	Uriselect	Flexicult	Uriselect
1	koira, laskettu virtsa	a) 10 <sup>3</sup> - 10 <sup>4</sup> b) 10 <sup>3</sup> c) ei kasvua	a) 10 <sup>3</sup> b) ei kasvua c) yksi pesäke	a) punertavat, isohkot pesäkkeet b) levinneet oranssit isot pesäkkeet, agar värjäytynyt oranssiksi	a) punertavat, isot pesäkkeet c) pieni sininen kokkimainen pesäke
2	kissa, punktio	ei kasvua	ei kasvua	ei kasvua	ei kasvua
3	koira, laskettu virtsa	a) 10 <sup>5</sup> b) 10 <sup>4</sup>	a) 10 <sup>6</sup> b) 10 <sup>6</sup>	a) punertavia pieniä pesäkkeitä kasvaa lähes mattona b) pieniä tummia vihertäviä pisteitä, erottuu heikommin muun kasvuston alta	a) punertavia isohkoja pesäkkeitä b) tummansinisiä, kokkimaisia pieniä pesäkkeitä
4	kissa, punktio	ei kasvua	ei kasvua	ei kasvua	ei kasvua
5	kissa, punktio	ei kasvua	ei kasvua	ei kasvua	ei kasvua
6	kissa, punktio	ei kasvua	ei kasvua	ei kasvua	ei kasvua
7	kissa, punktio	ei kasvua	ei kasvua	ei kasvua	ei kasvua
8	koira, punktio	ei kasvua	ei kasvua	ei kasvua	ei kasvua
9	kissa, punktio	10 <sup>5</sup>	10 <sup>4</sup> - 10 <sup>5</sup>	punertavia pieniä pesäkkeitä kasvaa lähes mattona	punertavat, isot pesäkkeet
10	koira, laskettu virtsa	ei kasvua	ei kasvua	ei kasvua	ei kasvua
11	koira punktio	ei kasvua	ei kasvua	ei kasvua	ei kasvua
12	koira, laskettu virtsa	ei kasvua	ei kasvua	ei kasvua	ei kasvua
13	koira, laskettu virtsa	viisi pesäkettä	yksi pesäke	pieni sinivihreä kokkimainen pesäke	pieni sinivihreä kokkimainen pesäke

	Bakteerikanta	Pesäkkeiden määrä		Pesäkkeiden ulkonäkö	
		Flexicult	Uriselect	Flexicult	Uriselect
	(McFarland 1+laimennokset)				
14	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC27853	>10 <sup>5</sup>	10 <sup>7</sup>	kasvaa keltaisena sileänä mattona, pesäkkeitä ei erota ollenkaan	vaalean beigen väriset pienehköt pesäkkeet kasvavat hieman limaisen näköisenä lähes yhdessä
14A	laimennos 1:10	>10 <sup>5</sup>	10 <sup>6</sup>	kasvaa keltaisena sileänä mattona, pesäkkeitä ei erota ollenkaan	vaalean beigen väriset pienehköt pesäkkeet kasvavat hieman limaisen näköisenä lähes yhdessä
14B	laimennos 1:100	>10 <sup>5</sup>	10 <sup>5</sup>	kasvaa keltaisena sileänä mattona, pesäkkeitä ei erota ollenkaan	vaaleanbeigeä kasvustoa, irrallisia pienehköjä pesäkkeitä vähän
14C	laimennos 1:1000	>10 <sup>5</sup>	10 <sup>4</sup>	kasvaa keltaisena sileänä mattona, pesäkkeitä ei erotu ollenkaan	vaaleanbeigeä kasvustoa, irrallisia pienehköjä pesäkkeitä vähän

15	<i>Escherichia coli</i> <b>ATCC8939</b>	>10 <sup>5</sup>	10 <sup>7</sup>	kasvaa punertavana sileänä mattona, pesäkkeitä ei erotu ollenkaan	punertavia isoja pesäkkeitä kasvaa suurimmaksi osaksi kiinni toisissaan
15A	laimennos 1:10	>10 <sup>5</sup>	10 <sup>6</sup>	kasvaa punertavana sileänä mattona, pesäkkeitä ei erotu ollenkaan	punertavat, suurehkot pesäkkeet, osaksi kasvaa kiinni toisissaan
15B	laimennos 1:100	10 <sup>5</sup>	10 <sup>5</sup>	punertavia pieniä pesäkkeitä kasvaa melkein mattona	punertavat, suurehkot pesäkkeet, osaksi kasvaa kiinni toisissaan
15C	laimennos 1:1000	10 <sup>4</sup>	10 <sup>4</sup>	punertavia, pienehköjä pesäkkeitä	punertavat, suurehkot pesäkkeet kasvavat irrallaan
16	<i>Enterococcus faecium</i> <b>ATCC19439</b>	>10 <sup>5</sup>	>10 <sup>7</sup>	kasvaa sinisenä tasaisena mattona, pesäkkeet ei erotu	sinistä kasvustoa, pieniä sinisiä kokkipesäkkeitä irrallaan vähän
16A	laimennos 1:10	>10 <sup>5</sup>	10 <sup>7</sup>	kasvaa sinisenä tasaisena mattona, pesäkkeet ei erotu	sinistä kasvustoa, pieniä sinisiä kokkipesäkkeitä irrallaan vähän
16B	laimennos 1:100	>10 <sup>5</sup>	10 <sup>6</sup>	kasvaa sinisenä tasaisena mattona, pesäkkeet ei erotu	sinistä kasvustoa, pieniä sinisiä kokkipesäkkeitä irrallaan jonkin verran
16C	laimennos 1:1000	10 <sup>5</sup>	10 <sup>5</sup>	siniset pienet kokkipesäkkeet kasvaa melkein kiinni toisissaan	sinisiä pieniä kokkipesäkkeitä, keskeltä vaaleampia, väri levinnyt hiukan agariin
17	<i>Enterococcus faecalis</i> <b>potilaskanta</b>	>10 <sup>5</sup>	10 <sup>7</sup>	kasvaa kirkkaan turkoosina mattona, pesäkkeet ei erotu	pienet, turkoosit pesäkkeet kasvavat suurimmaksi osaksi kiinni toisissaan
17A	laimennos 1:10	>10 <sup>5</sup>	10 <sup>7</sup>	kasvaa kirkkaan turkoosina mattona, pesäkkeet ei erotu	pienet, turkoosit pesäkkeet kasvavat suurimmaksi osaksi kiinni toisissaan
17B	laimennos 1:100	>10 <sup>5</sup>	10 <sup>6</sup>	kasvaa kirkkaan turkoosina mattona, pesäkkeet erottuvat hieman	pienet, turkoosit pesäkkeet kasvavat suurimmaksi osaksi kiinni toisissaan
17C	laimennos 1:1000	10 <sup>5</sup>	10 <sup>5</sup>	kirkkaan turkoosit pienet kokkipesäkkeet kasvavat melkein yhdessä	turkooseja kokkipesäkkeitä, pesäke keskeltä vaaleampi, väri leviää hieman agariin
17D	laimennos 1:10 000	10 <sup>4</sup>	10 <sup>4</sup>	kokkimaiset pienet kirkkaanturkoosit pesäkkeet, pesäke keskeltä vaaleampi, väri levinnyt hieman agariin	turkooseja kokkipesäkkeitä, pesäke keskeltä vaaleampi, väri leviää hieman agariin
17E	laimennos 1:100 000	10 <sup>3</sup>	10 <sup>3</sup>	kokkimaiset pienet kirkkaanturkoosit pesäkkeet, pesäke keskeltä vaaleampi, väri levinnyt hieman agariin	turkooseja kokkipesäkkeitä, pesäke keskeltä vaaleampi, väri leviää hieman agariin
18	<i>Klebsiella oxytoca</i> <b>ATCC700329</b>	>10 <sup>5</sup>	>10 <sup>7</sup>	kasvaa ruskeanharmaana, reunoilta sinertävänä mattona, pesäkkeitä ei erotu	kasvaa tummansinisenä ja limaisena, irrallisia pesäkkeitä ei juuri erotu
18A	laimennos 1:10	>10 <sup>5</sup>	10 <sup>7</sup>	kasvaa ruskeanharmaana, reunoilta sinertävänä mattona, pesäkkeitä ei erotu	kasvaa tummansinisenä ja limaisena, irrallisia suurehkoja pesäkkeitä ei juuri erotu
18B	laimennos 1:100	>10 <sup>5</sup>	10 <sup>6</sup>	keskeältä ruskeanharmaa, reunoilta sininen mattomainen kasvusto, pesäkkeet erottuvat heikosti	kasvaa tummansinisenä ja limaisena, irrallisia suurehkoja pesäkkeitä ei juuri erotu
18C	laimennos 1:1000	10 <sup>5</sup>	10 <sup>5</sup>	pienet tummansiniset pesäkkeet kasvavat lähes yhdessä	tummansinisiä limaisen näköisiä suurehkoja pesäkkeitä

19	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC13883	>10 <sup>5</sup>	10 <sup>7</sup>	kasvaa ruskeanharmaana, reunoilta sinertävänä mattona, pesäkkeitä ei erotu	kasvaa tummansinisenä ja limaisena, irrallisia pesäkkeitä ei juuri erotu
19A	laimennos 1:10	>10 <sup>5</sup>	10 <sup>7</sup>	kasvaa ruskeanharmaana, reunoilta sinertävänä mattona, pesäkkeitä ei erotu	kasvaa tummansinisenä ja limaisena, irrallisia pesäkkeitä erottuu jonkin verran
19B	laimennos 1:100	>10 <sup>5</sup>	10 <sup>6</sup>	reunoilta ja keskeltävä sinertävää, muualta harmaanruskeaa mattoa josta pesäkkeet erottuvat heikosti	suurehkoja tummansinisiä limaisen näköisiä pesäkkeitä
19C	laimennos 1:1000	10 <sup>5</sup>	10 <sup>5</sup>	hieman sinisempi kuin edellinen laimennos mutta harmaata vielä hieman, pesäkkeet erottuvat heikosti	suurehkoja tummansinisiä limaisen näköisiä pesäkkeitä
19D	laimennos 1:10 000	10 <sup>4</sup>	10 <sup>4</sup>	tummansinisiä, hieman limaisen näköisiä suurehkoja pesäkkeitä	tummansinisiä, hieman limaisen näköisiä suurehkoja pesäkkeitä
19E	laimennos 1:100 000	10 <sup>3</sup>	10 <sup>3</sup>	tummansinisiä, hieman limaisen näköisiä suurehkoja pesäkkeitä	tummansinisiä, hieman limaisen näköisiä suurehkoja pesäkkeitä
20	<i>Proteus vulgaris</i> ATCC6380 (McFarland 0,2)	>10 <sup>5</sup>	>10 <sup>7</sup>	Kasvaa rusehtavan oranssina mattona, pesäkkeitä ei erotu	kasvaa vaalean beigenä ja leviää lähes mattomaiseksi, erilliset pesäkkeet erottuvat heikosti
21	<i>E.coli</i> + <i>Pseudomonas aeruginosa</i> + <i>Enterococcus faecium</i> 1:100 000	a) kaksi pesäkettä b) 10 <sup>3</sup> c) kaksi pesäkettä	a) ei kasvaa b) 10 <sup>3</sup> c) kolme pesäkettä	a) pesäke punertava, iso b) pesäke vaaleankellertävä, iso c) pieniä sinisiä kokkipesäkkeitä, keskeltä vaaleampia, leviää reunoilta hieman agariin	b) pesäke läpikuultava, pienehkö c) pieniä sinisiä kokkipesäkkeitä, keskeltä vaaleampia, leviää hieman reunoilta agariin

## Herkkyyshmääritykset

	Ampisilliini		Amoksisilliini/ klavulaanihappo		Oksasilliini		Enrofloxasiini		Trimetopriimi/sulfa	
	Flexicult	MH	Flexicult	MH	Flexicult	MH	Flexicult	MH	Flexicult	MH
1	R	R	R	I	-	-	S	S	S	S
3A	R	R	R	I	-	-	R	R	R	R
3B	S	S	S	S	-	-	S	S	S	S
9	R	R	R	S	-	-	S	S	S	S
14	R	R	R	R	-	-	R	I	R	R
15	S	S	S	S	-	-	S	S	S	S
16	S	S	S	S	-	-	R	R	S	S
17	S	S	S	S	-	-	R	I	S	S
18	R	R	R	R	-	-	S	S	S	S
19	R	R	S	S	-	-	S	S	S	S
20	S	S	S	S	-	-	S	S	S	S