



Mira Nevalainen

Selektiivisten MRSA-agarmaljojen
soveltuvuus koirien metisilliiniresistentin
Staphylococcus pseudintermedius
-bakteerin seulontaan

Validointitutkimus

Metropolia Ammattikorkeakoulu

Bioanalyttikko (AMK)

Bioanalytiikan tutkinto-ohjelma

Opinnäytetyö

12.11.2021

Tekijä	Mira Nevalainen
Otsikko	Selektiivisten MRSA-agarmaljojen soveltuvuus koirien metisilliiniresistentin <i>Staphylococcus pseudintermedius</i> -bakteerin seulontaan – Validointitutkimus
Sivumäärä	64 sivua + 4 liitettä
Aika	12.11.2021
Tutkinto	Terveysalan ammattikorkeakoulututkinto
Tutkinto-ohjelma	Bioanalyttikko (AMK)
Ohjaajat	Kliininen opettaja Thomas Grönthal Lehtori Merja Ojala
<p>Tämä opinnäytetyö toteutettiin yhteistyössä Helsingin yliopiston eläinlääketieteellisen tiedekunnan kliinisen hevos- ja pieneläinlääketieteen osaston kliinisen mikrobiologian laboratorio YESLAB:n kanssa. Opinnäytetyön tarkoitus oli vertailla neljän eri valmistajan selektiivisiä MRSA-agarmaljoja ja niiden soveltuvuutta koirien MRSP-seulontatutkimuksiin. Vertailututkimuksen tavoite oli löytää YESLAB:n käyttöön uusi selektiivinen MRSA-malja, joka soveltuisi käytössä ollutta maljaa paremmin MRSP:n tunnistukseen seulontanäytteistä. YESLAB:n käyttämän kromogeenisen Bio-Rad MRSA Select™ II -maljan rinnalla tutkittiin Oxoid Brilliance™ MRSA 2 Agar-, Tammer BioLab Chrom Agar MRSA- ja BD BBL™ CHROMagar™ MRSA II -maljojen soveltuvuutta MRSP:n tunnistukseen. Käyttöön valittava MRSA-malja oli myös validoitava koirien MRSP:n tunnistukseen.</p> <p>Vertailututkimus koostui osioista A ja B, joista B piti sisällään alaosiot B1, B2 ja B3. A-osassa käytettiin mikrobikoostumukseltaan tuntemattomia koirien MRSA-MRSP-seulontanäytteitä ja B-osioissa tunnettuja bakteerilajeja ja -kantoja. Maljoille laskettiin herkkyys (sensitivity), spesifisyys (specificity) ja havaitsemisrajat (limit of detection). Kussakin vaiheessa arvioitiin myös maljojen yleisiä ominaisuuksia ja MRSP:n sekä ei-merkitsevien bakteerilajien kasvua maljoilla. MRSP:n tuli erottua valittavalta maljalta aiempaa selkeämmin ja nopeammin sekä vähentää seulontanäytteiden jatkotutkimusten tarvetta ja näin nopeuttaa tulosten valmistumista.</p> <p>Vertailun tuloksena Oxoid Brilliance™ MRSA 2 Agar -malja todettiin parhaaksi maljaksi koirien MRSP-seulontaan. Oxoid Brilliance™ MRSA 2 Agar -malja todettiin herkimmäksi, spesifisimmäksi, nopeimmaksi ja selkeimmäksi kaikista neljästä maljasta. Toiseksi parhaiten MRSP-seulontatutkimukseen soveltui Bio-Rad MRSA Select™ II. Tammer BioLab Chrom Agar MRSA- ja BD BBL™ CHROMagar™ MRSA II -maljojen ei katsottu soveltuvan MRSP-tutkimuksiin. Tutkimukseen sisältyi useita epävarmuustekijöitä, jotka pyrittiin huomioimaan maljan valinnassa. Maljan valintaan vaikuttivat numeeristen tulosten lisäksi myös käyttäjäkokemukset. YESLAB otti Oxoid Brilliance™ MRSA 2 Agar -maljan käyttöön syksyllä 2021.</p>	
Avainsanat	MRSP, <i>Staphylococcus pseudintermedius</i> , seulonta, validointi, MRSA, vertailututkimus, selektiivinen, kromogeeninen, mikrobilääkeresistenssi

Author	Mira Nevalainen
Title	The Suitability of Selective MRSA Media for Screening Canine Methicillin Resistant <i>Staphylococcus pseudintermedius</i> – a Validation Study
Number of Pages	64 pages + 4 appendices
Date	12.11.2021
Degree	Bachelor of Health Care
Degree Programme	Biomedical Laboratory Science
Instructors	Thomas Grönthal, Clinical Teacher Merja Ojala, Senior Lecturer
<p>This thesis was conducted in collaboration with University of Helsinki's Faculty of Veterinary Medicine's laboratory of clinical microbiology (YESLAB). The purpose of this study was to compare four selective MRSA media from different manufacturers and evaluate their suitability for screening canine MRSP. The aim of this study was to find a new selective MRSA medium for YESLAB to use for detection and isolation of MRSP from canine samples. YESLAB used chromogenic MRSA medium (Bio-Rad MRSA Select™ II) for screening MRSP. Alongside of Bio-Rad MRSA Select™ II, three other media (Oxoid Brilliance™ MRSA 2 Agar, Tammer BioLab Chrom Agar MRSA and BD BBL™ CHROMagar™ MRSA II) and their abilities to detect MRSP were evaluated. Also, the selected medium had to be validated for screening canine MRSP.</p> <p>As for methods, the study consisted of two parts, A and B, of which B consisted of subsections B1, B2 and B3. For part A MRSP samples that had an unknown microbial composition were used and known bacterial species and strains for part B. Sensitivity, specificity and limit of detection were determined for each medium. Overall features of the media and growth properties of MRSP and the non-significant species were evaluated throughout parts A and B. MRSP should grow faster and more distinguishable on the medium selected compared to Bio-Rad MRSA Select™ II. Use of the new MRSA medium should also minimize overall analysis time and additional procedures of the diagnostic process.</p> <p>As a result of the comparison, Oxoid Brilliance™ MRSA 2 Agar is recommended for YESLAB for screening canine MRSP. Of all four media, Oxoid Brilliance™ MRSA 2 Agar was found to be the most sensitive and specific, but also the fastest and most explicit. Bio-Rad MRSA Select™ II was the second best suitable for screening MRSP. Tammer BioLab Chrom Agar MRSA and BD BBL™ CHROMagar™ MRSA II were seen unfit for screening MRSP. The study contained numerous factors of uncertainty which have been considered as possible. It was not only the numeric results that were considered in the selection of the medium, but also user experience. Since Autumn 2021 YESLAB has used Oxoid Brilliance™ MRSA 2 Agar for screening canine MRSP.</p>	
Keywords	MRSP, <i>Staphylococcus pseudintermedius</i> , screening, validation, MRSA, comparative study, selective, chromogenic, antimicrobial susceptibility

Sisällys

1	Johdanto	1
2	Stafylokokit ja stafylokokkien mikrobilääkeresistenssi	2
2.1	<i>Staphylococcus aureus</i>	2
2.2	<i>Staphylococcus pseudintermedius</i>	3
2.3	Mikrobilääkeresistenssi	4
2.3.1	Metisilliiniresistentti <i>Staphylococcus aureus</i>	5
2.3.2	Metisilliiniresistentti <i>Staphylococcus pseudintermedius</i>	6
3	Bakteerin lajin ja antibioottiresistenssin tunnistus	7
3.1	Bakteeriviljely	7
3.2	Lajintunnistus	9
3.2.1	Morfologia	9
3.2.2	MALDI-TOF	11
3.3	Herkkyysmääritys ja herkkyysmääritystulosten tulkinta	11
3.4	Koirien MRSA- ja MRSP-seulonnat	13
3.4.1	Normaali mikrobisto MRSP-näytteissä	14
3.4.2	Koirien MRSP-seulontatutkimukset YESLAB:ssa	14
4	Validointitutkimus	16
4.1	Validointiparametrit mikrobiologian alalla	16
4.2	Validointiprosessi	18
5	Opinnäytetyön tarkoitus ja tavoite	19
6	Opinnäytetyön menetelmät	19
6.1	Tutkimuksessa käytetyt MRSA-maljat	21
6.2	Maljojen vertailu seulontanäytteillä	24
6.2.1	Näytteet	25
6.2.2	Toteutus	25
6.2.3	Tulosten analysointi ja maljan valinnan kriteerit	27
6.3	Maljojen vertailu tunnetuilla bakteerikannoilla	28
6.3.1	Näytteet	29
6.3.2	Toteutus	31
6.3.3	Tulosten analysointi ja maljan valinnan kriteerit	35
7	Tulokset	36

7.1	Seulontanäytevertailu	36
7.1.1	Seulontanäytteet BRMS-malja	37
7.1.2	Seulontanäytteet OXMA-maljalla	39
7.1.3	Seulontanäytteet TACM-maljalla	40
7.1.4	Seulontanäytteet BDCM-maljalla	41
7.2	Vertailu tunnetuilla bakteerikannoilla	42
7.2.1	Tunnettujen kantojen kasvuominaisuudet	42
7.2.2	Pienten MRSA- ja MRSP-bakteerimäärien kasvuominaisuudet	44
7.2.3	Simuloidut seulontanäytteet	48
8	Pohdinta	51
8.1	Tulosten tarkastelu	51
8.1.1	Vertailu seulontanäytteillä	51
8.1.2	Vertailu tunnetuilla bakteerikannoilla	53
8.2	Luotettavuus	55
8.3	Eettisyys	58
8.4	Johtopäätökset	59
8.5	Kehittämisehdotukset	62
8.6	Ammatillinen kasvu	64
	Lähteet	65
	Liitteet	
	Liite 1 Taulukko tunnettujen bakteerikantojen kasvuominaisuuksista	
	Liite 2 Taulukko rikastamattomien laimennosten kasvuominaisuuksista	
	Liite 3 Taulukko rikastettujen laimennosten kasvuominaisuuksista	
	Liite 4 Taulukko MRSA- ja MRSP-laimennosten kasvumääristä	

Sanasto

Agarmalja – agarilla kiinteytetty petrimal-
jassa oleva elatusaine, kts. viljelymalja

Antibiootti – bakteeri-infektioihin spesifi-
nen mikrobilääke

Bakteeri-isolaatti – näytteestä eristetty
bakteerilaji tai -kanta

Bakteerikanta – bakteerilajin alatyyppejä tai
geneettinen variantti

Bakteeriplasmidi – bakteerin solulimassa
sijaitseva rengasmaisen DNA-molekyylin

DNA – kaksijuosteinen deoksiribonukleiini-
happomolekyylin (deoksyribo nucleid acid),
joka sisältää eliön geneettisen materiaalin

Hemolyysi – punasolujen hajoaminen

Herkkyysemääritys – kliinisen mikrobiolo-
gian menetelmä, jossa tutkitaan bakteeri-
isolaatin herkkyyttä valituille mikrobilääkeai-
neille

Heterogeeninen – koostumukseltaan epä-
yhtenäinen

Infektio – tartunta tai patogeenisen mikro-
bin aiheuttama sairaus

Inkubaatio (mikrobiol.) – kasvatuksen tai
reaktion tapahtumista hallituissa olosuh-
teissa

Kromogeeninen – väriä muodostava

Kvalitatiivinen – laadullinen

Kvantitatiivinen – määrällinen

McFarland-standardi – bakteerisuspension
määritetty turbiditeetti

Mikrobilääke – mikrobien aiheuttamiin in-
fektioihin spesifinen lääke

MRSA – metisilliiniresistentti *Staphylococ-
cus aureus*

MRSP – metisilliiniresistentti *Staphylococ-
cus pseudintermedius*

MSSA – metisilliinille herkkä *Staphylococ-
cus aureus*

MSSP – metisilliinille herkkä *Staphylococ-
cus pseudintermedius*

Opportunistinen bakteeri – Bakteeri, joka
ei ole terveessä isännässä taudinaiheuttaja,
mutta tietyissä olosuhteissa pystyy aiheut-
tamaan infektioita

Patogeeni – taudinaiheuttajamikrobi

PCR – polymeerasiketjureaktio (Polyme-
rase Chain Reaction), jolla voidaan monis-
taa eksponentiaalisesti yksittäinen geeni tai
haluttu DNA-alue

Penisilliinijohdannainen – lääkeaine, joka
on johdettu penisilliinistä, esim. oksasilliini,
metisilliini ja amoksisilliini

Pintaproteiini (bakteerin) – bakteerin ulko-
pinnan proteiini, jolla bakteeri kiinnittyy
isäntäsoluun

PMY – pesäkkeen muodostava yksikkö, li-
sääntymiskykyinen bakteerisolun

Selektiivinen – valikoiva, erottelukykyinen

Spesifinen – tiettyyn asiaan toimiva tai eri-
koistunut

Turbiditeetti – sameus, tiheys

Validointi – menetelmän soveltuvuuden
varmistaminen käyttötarkoitukseensa

Viljelymalja – bakteeriviljelyastia, jossa on
bakteerin kasvatukseen optimaalista elatus-
ainetta

Virulenssi – mikrobin taudinaiheuttamis-
kyky

Väärä negatiivinen tulos – testitulos,
jonka mukaan tutkittavalla yksilöllä ei ole
tutkittua sairautta, jota yksilö todellisuus-
sessa sairastaa. Väärä negatiivinen testitu-
los voi johtaa väärään negatiiviseen diag-
noosiin

Zoonoosi – tartuntatauti, joka voi tarttua
eläimistä ihmisiin ja toisin päin

1 Johdanto

Bakteereja on kaikkialla ympärillämme ja jotkin bakteerit voivat aiheuttaa infektioita ihmisille ja eläimille. Infektioita hoidetaan usein mikrobilääkkeillä, jotka haittaavat elimistön normaalia mikrobistoa ja voivat kehittää resistenttejä bakteerikantoja. Stafylokokkien metisiilliniresistentti *Staphylococcus aureus* eli MRSA on merkittävimpiä vastustuskykyisiä bakteereita. (Lumio 2020b.) Koirien *Staphylococcus pseudintermedius* on monin tavoin *S. aureuksen* kaltainen (Maali ym. 2018, Van Duijkeren ym. 2011). *S. aureus* ja *S. pseudintermedius* sekä niiden resistentit muodot MRSA ja MRSP ovat zoonooseja, eli mikrobeja, jotka voivat tarttua eläimestä ihmiseen ja toisin päin (Ballantine 2021: 50–55; Bünsow ym. 2021).

Koira voi olla MRSA- tai MRSP-bakteerin oireeton kantaja, joka saattaa levittää moniresistenttejä bakteereita. Samoin kuin MRSA voi aiheuttaa sairaalaepidemioita, on MRSP eläinsairaaloiden ja -klinikoiden epidemiariski. (Ruiz-Ripa ym. 2021.) Koirien MRSP-seulonnoissa etsitään moniresistenttejä bakteereita niitä kantavista koirista. Seulonnat keskitetään yleensä riskiryhmiin, kuten kroonisia iho- ja korvainfektioita sairastaviin tai vastikään ulkomailta tuotuihin koiriin (Ballantine 2021: 50–55; Thomson & Aaltonen 2019). Seulonnoilla pyritään leviämisen ennakointiin ja ehkäisyyn sekä torjuntatoimien arviointiin (Thomson & Aaltonen 2019). Mikrobilääkeresistenssin lisääntyminen korostaa tarvetta leviämisen ennakoinnille (French 2009). Seura- ja lemmikkieläinten antibioottiresistenssin valvonnasta ja raportoinnista Suomessa vastaa YESLAB (Helsingin yliopisto b).

Tämä opinnäytetyö toteutettiin yhteistyössä Helsingin yliopiston eläinlääketieteellisen tiedekunnan kliinisen hevos- ja pieneläinlääketieteen osaston kliinisen mikrobiologian laboratorio YESLAB:n kanssa. MRSP:n seulontaan ei ole kaupallisia elatusaineita, ja MRSA-maljojen käyttö MRSP:n tunnistukseen voi synnyttää vääriä negatiivisia tuloksia. Opinnäytetyö on validointitutkimus, jossa vertaillaan kolmen eri valmistajan selektiivisiä MRSA-agarmaljoja ja verrataan niitä YESLAB:ssa käytettyyn selektiiviseen MRSA-agarmaljaan. Opinnäytetyöprosessin alkaessa YESLAB käytti kromogeenista Bio-Rad MRSA Select™ II (BRMS) -maljaa, jolta MRSP erottuu huonosti. MRSA kasvaa BRMS-maljalla tyypillisesti voimakkaan vaaleanpunaisena ja MRSP haalean vaaleanpunaisena. Tämän maljan rinnalla tutkittiin Oxoid Brilliance™ MRSA 2 Agar- (OXMA), Tamer BioLab Chrom Agar MRSA- (TACM) ja BD BBL™ CHROMagar™ MRSA II (BDCM) -maljojen soveltuvuutta MRSP:n tunnistukseen. Maljoja vertailtiin koirien

MRSA-MRSP-seulontanäytteillä ja tunnetuilla bakteerikannoilla. Vertailututkimuksen tavoitteena oli löytää YESLAB:n käyttöön uusi selektiivinen MRSA-malja. Valittava malja oli myös validoitava koirien MRSP-bakteerin tunnistukseen. Validoinnilla varmistettiin, että valittava malja sopii käyttötarkoitukseensa, ja validointi sisältyi vertailututkimusprosessiin. MRSP:n tuli erottua valittavalta maljalta selkeämmin ja nopeammin sekä vähentää seulontanäytteiden jatkotutkimusten tarvetta ja näin nopeuttaa tulosten valmistamista.

2 Stafylokokit ja stafylokokkien mikrobilääkeresistenssi

Stafylokokit ovat *Staphylococcus* -suvun kokkibakteereja, jotka muodostavat viiniryppälemäisiä ryhmiä (Madigan & Bender & Buckley & Sattley & Stahl 2018). Valtaosa stafylokokki-infektioista on lieviä ja paranevat ilman antibioottihoitoa. Näitä lieviä infektioita ovat mm. märkänäppylät, paiseet ja muut ihon infektiot. Vakavammin oireilevia stafylokokki-infektioita hoidetaan useimmiten penisilliinin sukuisilla antibiooteilla eli beetalaktaameilla, mutta tietyt stafylokokit, kuten MRSA, ovat kehittäneet vastustuskyvyn näille lääkkeille. (Terveystieteiden tutkimuskeskus.) Stafylokokkien aiheuttamiin tauteihin ei ole löytynyt toimivaa rokotetta, eikä taudeista muodostuvien vasta-aineiden nähdä suojaavan infektioilta (Vuopio & Kuusela & Järvinen 2020). Stafylokokit tuottavat biofilmiä isäntänsä kudoksissa, mutta myös elottomille pinnoille. Biofilmi suojaa bakteereja fyysisiltä ja kemiallisilta torjuntakeinoilta ja edesauttaa niiden selviytymistä. (Garbacz & Żarnowska & Piechowicz & Haras 2013.)

S. aureuksen ja *S. pseudintermediuksen* ohella stafylokokkeihin kuuluu koagulaasinegatiivisia stafylokokkeja (KNS), joista yleisin on *Staphylococcus epidermidis*. KNS-ryhmän bakteerit ovat pääosin opportunisteja, ja infektio vaatii usein syntyäkseen altistavan tekijän, kuten limakalvovaurion tai vierasesineen. Koagulaasinegatiivisista sairaalainfektioita aiheuttavista stafylokokkilajeista yli puolet on nykyään resistenttejä metisilliinille, mutta myös monille muille antibiooteille. Niiden resistenssi perustuu *S. aureuksen* tavoin muuntuneeseen PBP2-pintaproteiiniin, joka on penisilliiniä sitova proteiini (penicillin-binding protein). (Lyytikäinen & Vuopio & Järvinen 2020.)

2.1 *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus on bakteerin suku ja *aureus* sen laji (Lumio 2020b). *Staphylococcus aureus* esiintyy ihmisten ja joidenkin eläinlajien iholla ja ulosteissa sekä nenän ja suun limakalvoilla. *S. aureus* voi elää hapellisissa ja hapettomissa olosuhteissa ja se

kestää poikkeuksellisen kuivaa ympäristöä sekä laaja-alaisesti erilaisia pH-olosuhteita ja lämpötiloja. (Ruokavirasto b.) *S. aureus* on yksi merkittävimmistä ihmisten hoitopöytäinfektioita aiheuttavista patogeeneista. Monet sairaalaympäristön *S. aureus*-kannat ovat erityisen virulentteja, eli niiden taudinaiheuttamiskyky on korkea, ja resistenttejä tavallisimmille antibiooteille. Useiden yksilöiden mikrobiomiin kuuluvia bakteereita on kuitenkin hankalaa poistaa sairaanhoitoympäristöstä täysin. (Madigan ym. 2018.)

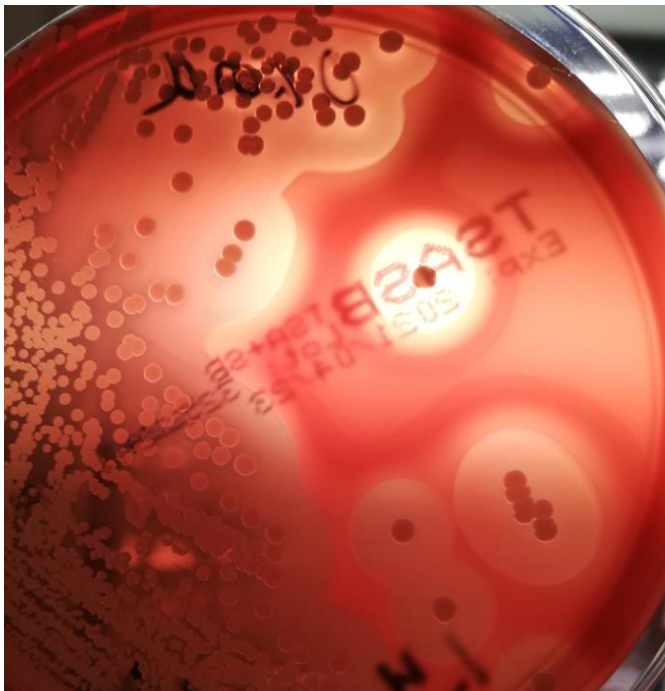
S. aureus leviää kosketus- tai pisaratartuntana. Bakterin soluseinässä on peptidoglykaania ja teikkohappoa ja se tuottaa punasoluja hajottavia hemolysiinejä. *S. aureuksen* proteiini A (spa, staphylococcal protein A) sitoo immunoglobuliineja Fc-osasta eli väärin päin, jolloin spesifiset vasta-ainemolekyylit eivät pääse tarttumaan kohteeseensa. Proteiini A:ta voidaan hyödyntää *S. aureus*-kantojen epidemiologisessa tunnistamisessa, ns. spa-tyypityksessä, jossa sekvensoidaan proteiinia koodaava geeni. (Vuopio ym. 2020.) *S. aureuksen* pinnalla on useita adhesiineja, joilla bakteeri voi kiinnittyä isäntänsä kudostuhoon. *S. aureus* myös tuottaa kudostuhoa aiheuttavia entsyymejä, ja välttää isäntänsä puolustusmekanismeja mm. pintaproteiini A:n ja leukosyyttejä tappavien toksien avulla. (Rhen & Kuusela 2020.)

2.2 *Staphylococcus pseudintermedius*

Staphylococcus pseudintermedius on opportunistipatogeeni, joka aiheuttaa koirille infektioita mm. iholla ja korvissa sekä virtsa- ja hengitysteissä (Lynch & Helbig 2021; Bünsow ym. 2021). *S. pseudintermedius* voi aiheuttaa myös bakteremiaa ja endokardiittia. Bakteeria esiintyy myös terveissä koirissa ja se voi tarttua ihmiseen sairaasta tai terveestä koirasta. (Bünsow ym. 2021.) *S. pseudintermediusta* voi myös esiintyä ihmisillä arvioitua enemmän, koska sitä saatetaan virheellisesti identifioida *S. aureukseksi* (Skov ym. 2019). *S. pseudintermedius* on koirien normaalia mikrobistoa, ja sitä esiintyy eniten perineumissa, eli peräaukon ja sukuelinten välillä sijaitsevassa ihossa, ja toiseksi eniten sierainten ja suun limakalvoilla (Lynch & Helbig 2021). *S. pseudintermediuksen* aiheuttamien infektioiden hoitoa vaikeuttaa bakteerin resistentin muodon esiintyminen (Maali ym. 2018).

S. intermedius löytyi vuonna 1976 koagulaasipositiivisten stafylokokkien eläinbiotyypeistä E ja F (Hajek 1976). *S. intermediusta* pidettiin pääasiallisena koirien infektioiden aiheuttajana, kunnes vuonna 2005 tunnistettiin uusi laji *S. pseudintermedius*. Nykyisin molemmat lajit kuuluvat *Staphylococcus delphinin* ohella niin sanottuun *S. intermedius*-ryhmään. (Garbacz ym. 2013.) Tämä kolmen stafylokokkilajin ryhmä tunnetaan SIG-ryhmänä (*S. intermedius* group) (Van Duijkeren ym. 2011).

S. aureus ja SIG-ryhmän bakteerilajit ovat molemmat koagulaasipositiivisia, gram-positiivisia ryhmäkokkeja (Lainhart & Yarbrough & Burnham 2018). Koagulaasipositiiviset lajit tuottavat koagulaasia, joka on verta hyydyttävä entsyymi (Becker & Heilmann & Peters 2014). *S. aureuksen* tavoin myös *S. pseudintermedius* on hemolyyttinen, ja kasvaa usein kaksoishemolyyttisinä pesäkkeinä, joiden sisempi kehä on β -hemolyyttinen ja ulompi α -hemolyyttinen (Savini ym. 2013) (kuva 1). *S. pseudintermedius* muistuttaa monin ominaisuuksin *S. aureusta* erityisesti erilaisten virulenssitekijöidensä suhteen. Molemmat tuottavat entsyymejä kuten koagulaasia ja proteaasia. *S. pseudintermediuksella* on samalla tavalla käyttäytyviä pintaproteiineja kuin *S. aureuksen* proteiini A. Molemmat lajit voivat myös tuottaa toksiineja (Maali ym. 2018; Van Duijkeren ym. 2011.) *S. pseudintermedius* voi tuottaa Luk-I –leukotoksiinia, joka muistuttaa *S. aureuksen* tuottamaa Panton-Valentine-leukosidiiniä (PVL) (Van Duijkeren ym. 2011).

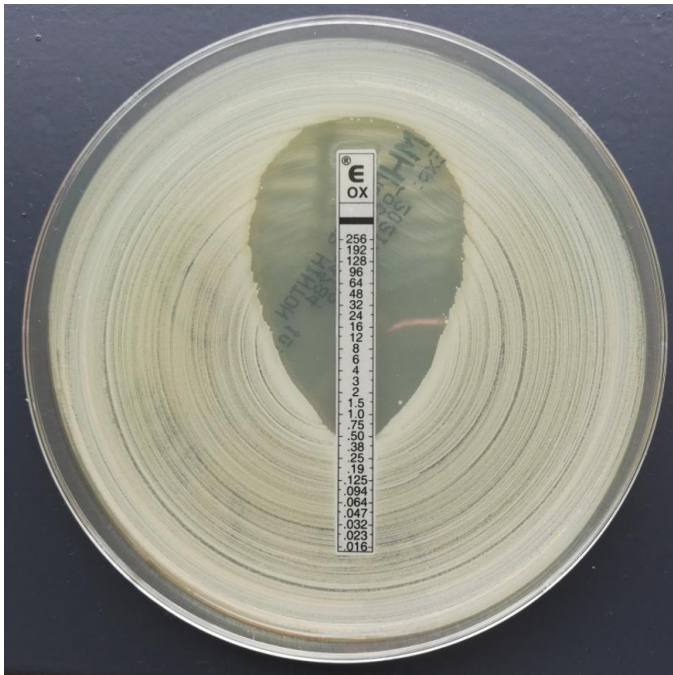


Kuva 1. Kaksoishemolyyttinen MRSP puhdasviljelmässä veriagarmaljalla.

2.3 Mikrobilääkeresistenssi

Antibiootit ovat mikrobilääkkeiden alaluokka. Mikrobilääkkeillä hoidetaan bakteerien lisäksi virusten, sienien ja alkueläinten aiheuttamia infektioita, kun taas antibiootit toimivat lähes poikkeuksetta pelkästään bakteeri-infektioihin. Bakteerin tappavat antibiootit ovat bakterisideja, kuten soluseinän hajottavat penisilliinit ja kefalosporiinit. Bakterios-taattit, kuten doksisyklini, estävät bakteerien lisääntymisen esimerkiksi vaikuttamalla

bakteerin aineenvaihduntaan. (Lumio 2020a.) Penisilliinit, kefalosporiinit, monobaktaatit ja karbapeneemit sekä aminopenisilliinit, kuten amoksisilliini, ovat beetalaktaamirakenteisia bakteerilääkkeitä. (CLSI 2019.) Jotkin bakteerilajit ovat luonnostaan resistenttejä erilaisille antibiooteille (Lumio 2020b). Resistentit bakteerit omaavat mutaation, joka vähentää niiden herkkyttä tietyille lääkeaineille, eli nostaa niiden MIC-arvoa. MIC-arvolla (minimum inhibitory concentration) tarkoitetaan antibiootin sellaista minimipitoisuutta, joka estää bakteerin kasvun 90 %:ssa tapauksista (kuva 2). (CLSI 2019.)



Kuva 2. MRSP-bakteerin oksasilliini-MIC-määrittäminen Mueller-Hinton-maljalla. MIC-arvo on 0,50 mg/L.

Bakteerikantojen lisääntynyt antibioottiresistenssi on maailmanlaajuinen uhka. Antibioottihoidot häiritsevät elimistön mikrobiomia ja hyödyllisten bakteerien tasapaino palautuu hitaasti vasta hoitoa seuraavien kuukausien aikana. (Lumio 2020b.) Mikrobilääkkeiden käyttö lisää näin bakteerien resistenssiä (Thomson & Aaltonen 2019; Zhou & Wang & Lin 2012). Resistentit bakteerit eivät kuitenkaan aiheuta terveille eläimille infektioita herkkiä bakteerikantoja helpommin. (Thomson & Aaltonen 2019.)

2.3.1 Metisilliiniresistentti *Staphylococcus aureus*

Metisilliiniresistenteillä *S. aureus* -kannoilla on genominsa patogeenisuussaarekkeissa geenikasetti SCCmec (staphylococcal cassette chromosome mec). *MecA*- ja *mecC*-geenit koodaavat penisilliiniä sitovaa proteiinia bakteerin soluseinään, tehden bakteerin resistentiksi. (Vuopio ym. 2020.) Metisilliinille herkältä MSSA:ita (methicillin susceptible

Staphylococcus aureus) puuttuu *mecA* -geeni (Quach & Sakoulas & Nizet & Pogliano & Pogliano 2016). BORSA-kannoilta (borderline oxacillin-resistant *S. aureus*) puuttuu *mec*-geenin koodaama PBP2-proteiini ja niiden herkkyys beetalaktaamiantibioteille vaihtelee, minkä vuoksi BORSA-kantoja ei aina eroteta MRSA-kannoista herkkyysmäärittelyn perusteella (Hryniewicz & Garbacz 2017).

Antibioottien liiallinen ja kritiikitön käyttö ovat aiheuttaneet vastustuskykyisten bakteerien yleistymisen sekä ihmisillä että eläimillä (Zhou ym. 2012). MRSA aiheuttaa monenlaisia infektioita ihmisille, mutta sitä todetaan seuraeläimillä suhteellisen vähän (Penna ym. 2021). Seuraeläimillä todetaan pääosin ihmisillä esiintyviä MRSA-tyyppejä. MRSA:ta esiintyy enemmän hevosilla, sioilla ja naudoilla, kuin koirilla tai kissoilla. (Ruokavirasto a.) Koirista eristettyjen *S. aureus* -kantojen resistenssi on kuitenkin kasvavaa, ja MRSA:ta todetaan nykyään koirilla yhä useammin (Penna ym. 2021).

MRSA-bakteerit ovat resistenttejä stafylokokkipenisilliineille eli metisilliinille, kloksasilliinille ja dikloksasilliinille, mutta myös kefalosporiineille ja karbapeneemeille. MRSA-infektioita voidaan hoitaa mm. keftaroliinilla. (Vuopio ym. 2020.) Suomessa eläinten lääkintää on kuitenkin rajoitettu, eikä useitakaan mikrobilääkeaineita saa käyttää eläimille. Karbapeneemien, moksifloksasiinin ja useiden kefalosporiinien, muiden muassa, tulee olla nimenomaan eläinlääkintään hyväksytyjä. Kyseisten lääkevalmisteiden käyttö eläimillä on kielletty, jos valmiste on tarkoitettu ainoastaan ihmisten käyttöön. (Valtioneuvoston asetus eräiden lääkeaineiden käytön kieltämisestä eläimille 1054/2014 § 11.)

2.3.2 Metisilliiniresistentti *Staphylococcus pseudintermedius*

Metisilliinille resistentti *Staphylococcus pseudintermedius* on muuntunut, vastustuskykyinen *S. pseudintermedius* (Van Duijkeren ym. 2011). *S. pseudintermedius* -kantojen resistenssi on kasvavaa (Bemis & Jones & Frank & Kania 2009; Lynch & Helbig 2021). Jopa 4,5 % terveistä koirista voi kantaa MRSP:tä osana normaalia mikrobistoaan. Sairaista koirista eristetyistä *S. pseudintermedius* -kannoista jopa 63 prosentin on todettu olevan metisilliiniresistenttejä. (Lynch & Helbig 2021.) MRSP on resistentti beetalaktaamiryhmän antibioteille, mutta usein myös muille mikrobilääkeaineryhmille. MRSP-infektioiden hoitoa rajoittaa myös tiettyjen lääkeaineiden käyttökielto eläimillä. Mikrobilääkkeillä ei ole todettua hyötyä MRSP-kolonisaatioon, ja mikrobilääkkeiden käyttö oireettomilla kantajilla kasvattaa resistenssin lisääntymisen mahdollisuutta (Van Duijkeren ym. 2011).

MRSP:lle altistavia tekijöitä ovat mm. toistuvat iho-, korva- tai virtsatieinfektiot, hoitoon liittyvät infektiot ja runsas mikrobilääkkeiden kulutus (Ballantine 2021: 50–55; Thomson & Aaltonen 2019). MRSP voi tarttua koirien välillä suorassa kontaktissa tai epäsuorasti ympäristön välityksellä (Lynch & Helbig 2021). Kotieläimen MRSP-kantajuus ei pääsääntöisesti vaadi erityistoimia kotiloissa, mutta eläinlääkäriasemilla asioitaessa kantajuudesta tulee ilmoittaa jo ennen klinikakäyntiä. Ilmoituskäytännöllä suojataan muita eläinpotilaita, varsinkin perussairauksia omaavia ja infektiolle alttiita. (Evidensia.) MRSA-bakteerit voivat säilyä sisätiloissa kuivilla pinnoilla useita viikkoja ja MRSP useita päiviä. Resistenssistä tiedettäessä eläimen hoitoa voidaan myös suunnitella etukäteen esimerkiksi eristystiloissa toteutettavaksi. (Thomson & Aaltonen 2019.)

Helsingin yliopisto on 2010-luvulla tutkinut *S. pseudintermediuksen* mikrobilääkeresistenssiä ja sen resistenttien kantojen esiintyvyyttä Suomessa. Vuonna 2017 julkaistussa tutkimuksessa eläimestä eristetyn *S. pseudintermediuksen* huomattiin olevan todennäköisemmin MRSP, jos eläin oli näytteenottohetkellä antibioottikuurilla tai jos eläin oli uros. Seulonnoissa MRSP:n löytymisen todennäköisyyttä lisäsi eläimen näytteenottoajankohtana käyttämät useat mikrobilääkkeet. (Grönthal & Eklund & Thomson & Piiparinen & Rantala 2017.)

3 Bakterin lajin ja antibioottiresistenssin tunnistus

Eläimen näytteestä voidaan tunnistaa patogeeneja erilaisin mikrobiologisin, immunologisin ja molekyylibiologisin menetelmin (Madigan ym. 2018). Seulonnalla ei kuitenkaan etsitä infektion aiheuttajia, vaan pyritään tunnistamaan eläimiä, joiden kautta patogeenit pääsevät leviämään (Ballantine 2021: 50–55).

3.1 Bakteeriviljely

Viljely on tyypillinen mikrobiologian laboratorioissa tehtävä mikrobinkasvatusmenetelmä (Madigan ym. 2018). Bakteerit muodostavat kiinteällä elatusaineella kasvaessaan pesäkkeitä, joista jokainen koostuu useista miljoonista bakteeriyksilöistä (Skurnik & Vuopio 2020). Elatusaineiden kiinteytykseen käytetään yleensä agarია, punalevästä eristettävää hyytelöimisainetta. Kiinteällä elatusaineella kasvavien bakteerien klooneja pystytään eristämään jatkotutkimuksia varten. (Bonnet & Lagier & Raoult & Khelaifia 2020.)

Hajotusviljelyssä näytettä hajotetaan viljelymaljalla aina pienemmiksi pitoisuuksiksi, kunnes näytteen mikrobeille jää riittävän väljästi tilaa kasvaa. Agarilla kasvavista pesäkkeistä voi tehdä jatkotutkimuksia, jos yksittäispesäkkeet kasvavat riittävän erillään toisistaan. Tarvittaessa yksittäinen pesäke voidaan viljellä uudelleen toiselle maljalle puhtasviljelmänä. (Carlson & Koskela 2011.) Puhtasviljelmässä on näin vain yhtä bakteerilajia. Useimmat jatkotutkimukset vaativat puhtasviljelmän, koska sekakasvuisilla maljoilla voi kasvaa eri bakteerilajeja päällekkäin. (Sandle 2015.)

Elatusaineessa on oltava bakteerin kasvuun vaadittuja ravinteita. Yleiselatusaineissa käytetään yleensä lampaan tai hevosen verta tarjoamaan ravintoa ja suojaamaan bakteereita happiradikaaleilta. (Bonnet & Lagier & Raoult & Khelaifia 2020.) Selektiivisen eli valikoivan elatusaineen sisältämät yhdisteet hillitsevät tiettyjen mikrobien kasvua, ja tukevat toisten mikrobien kasvua. Erottelevilla elatusaineilla pystytään tekemään alustavaa tunnistusta visuaalisesti. Elatusaine voi olla sekä selektiivinen että erotteleva. MRSA:n tunnistukseen, esimerkiksi, käytetään usein kromogeenista elatusainetta, jonka sisältämä kromogeeninen substraatti saa MRSA-pesäkkeet näkymään tunnistettavan värisinä. (Madigan ym. 2018.) MRSP:n tunnistukseen tarkoitettuja kaupallisia menetelmiä ei toistaiseksi ole saatavilla (Van Duijkeren ym. 2011). Elatusaineelle viljeltävä näyte voi olla esimerkiksi ulostetta, virtsaa, kudosta tai märkää (Madigan ym. 2018). Näyte viljellään, ja jos viljelmässä todetaan mahdollisesti merkitsevä patogeeni, tehdään yleensä jatkotutkimuksena herkkyysmääritys. Patogeenin merkitsevyyteen vaikuttavat mm. eläimen terveyshistoria, laji, ikä ja näytteenottokohta sekä löydetyn bakteerin laji ja määrä. (CLSI 2019.)

Selektiivisten MRSA-maljojen soveltuvuutta MRSP:n toteamiseen on jo aiemmin tutkittu. Vuonna 2011 julkaistussa saksalaistutkimuksessa vertailtiin viittä selektiivistä maljaa, mukaan lukien BD BBL™ CHROMagar™ MRSA (BD Diagnostics) ja Brilliance MRSA agar (Oxoid). Tutkimuksen MRSP-kannat oli eristetty koirista ja kantojen MIC-arvot määritettiin. Lisäksi tutkittiin seitsemää stafylokokkilajia ja kuutta ei-stafylokokkilajia, joita usein esiintyy samoissa näytteissä *S. pseudintermediuksen* kanssa. Muiden bakteerilajien vaikutusta *S. pseudintermediuksen* ilmenemiseen maljoilla testattiin bakteerilajisekoituksilla, joiden sekoitussuhteet vaihtelivat välillä 1 : 1 ja 1 : 9. Tutkimuksessa todettiin, että MRSA kasvoi hyvin kaikilla maljoilla, ja MRSP hyvin kolmella maljalla. MRSP kasvoi huonosti tai kohtalaisesti BD BBL™ CHROMagar™ MRSA (BD Diagnostics)- ja ChromID™ MRSA agar (bioMérieux) -maljoilla. Viidestä maljasta parhaiten soveltuvaksi MRSP:n tunnistamiseen ja eristämiseen todettiin Oxoidin Oxacillin Resistance Screening Agar Base- ja Brilliance MRSA agar -maljat. (Horstmann & Mueller & Straubinger & Werckenthin 2011.)

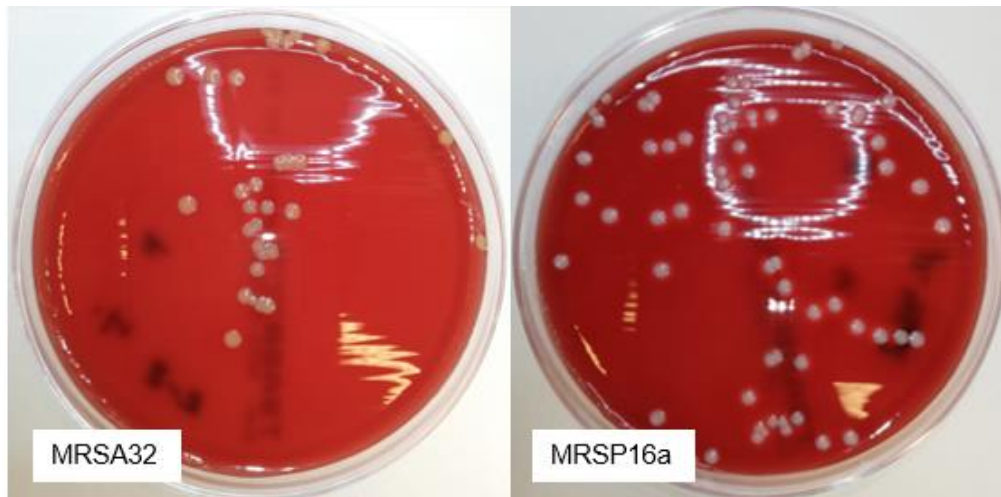
3.2 Lajintunnistus

3.2.1 Morfologia

Morfologialla tarkoitetaan muotoa. Tavallisimmat bakteerisolun morfologiset luokat ovat kokit, sauvat ja spirillit. Bakteerien morfologia on vaihtelevaa, eikä se juurikaan kerro solun muista ominaisuuksista, kuten fysiologiasta tai taudinaiheuttamiskyvystä. Morfologialla on kuitenkin tärkeä osuus bakteerilajien tunnusomaisia piirteitä kuvailtaessa. (Madigan ym. 2018.)

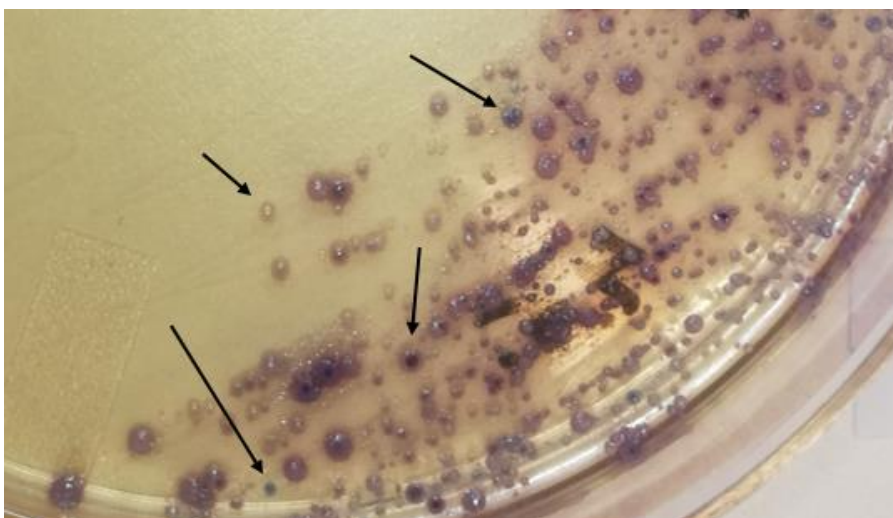
Pesäkemorfologia kattaa bakteerin muodostamien pesäkkeiden koon, muodon, rakenteen, värin ja tuoksun. Pesäkkeet voivat olla esimerkiksi pyöreitä, epäsäännöllisiä tai säikeisiä. Pesäkkeen pintarakenne voi olla mm. tasainen, kiiltävä, matta, leviävä, limainen, karkea tai rypyyinen. Pesäkkeissä voi olla väriä tai ne voivat olla kirkkaita tai läpikuultavia. Pesäkkeet voivat myös tehdä pigmenttiä kasvualustaansa, tai niissä voi olla metallinen sävy. Koot vaihtelevat suurista (> 5 mm) keskikokoisiin (4–5 mm) ja pieniin (2–3 mm). Pienimmät pesäkkeet ovat pistemäisiä (≤ 1 mm). Pesäkkeet voivat olla litteitä tai kohota kasvualustastaan joko tasaisesti tai vain pesäkkeen keskeltä tai reunoilta. Pesäkkeillä on myös bakteerin suvusta riippuvia ominaisuuksia. (Kandi 2015.)

Bakteerien tunnistus alkaa yleensä niiden morfologian arvioinnilla. Myös hemolyysiä arvioidaan, jos bakteeria on kasvatettu veripohjaisella elatusaineella. Morfologisten ominaisuuksien arvioinnilla saadaan alustava luokitus bakteerin suvusta tai lajista, mikä helpottaa vahvistavien jatkotutkimusten valitsemista. (Perry 2014: 12.) *S. aureus*, esimerkiksi, on tunnistettavissa veriagarilla kellertävistä pesäkkeistä (kuva 3) ja voimakkaasta β -hemolyysistä, kun taas mm. *S. epidermidis* -pesäkkeet ovat valkoisia (Misiakas & Schneewind 2013).



Kuva 3. *S. aureus* (vas.) on veriagarmaljalla *S. pseudintermediusta* (oik.) kellertävämpi. Molemmat kuvien kannat ovat hemolyyttisiä ja metisilliiniresistentejä.

Bakteeriviljelyssä kasvaneet pesäkkeet voivat näyttää erilaisilta, vaikka olisivatkin keskenään samaa lajia. Bakteerin hemolyttiset ominaisuudet voivat vaihdella, kuten myös pesäkkeiden koko, väri ja rakenne (kuva 4). Morfologian heterogeenisyyttä ilmenee monilla bakteeriryhmillä, mutta se on yleisintä streptokokeilla, stafylokokeilla ja mykobakteereilla sekä *Pseudomonas aeruginosalla* ja enterobakteereilla. (CLSI 2019.) *S. aureuksella* ja *S. pseudintermediuksella* on pienipesäkkeisiä varianteja (SCV, small colony variant), joiden pesäkkeet ovat nimensä mukaisesti huomattavasti lajityypillistä pienempiä (Savini ym. 2014). Jos morfologialtaan erilaisista pesäkkeistä tehdään herkkyysmääritykset, niiden tulokset ovat yleensä identtiset, mutta jos viljelmässä on saman lajin eri kantoja, voi tuloksissa olla suuria eroja (CLSI 2019.)



Kuva 4. Tyypillinen puhdas MRSP-viljelmä BDCM-maljalla toisen inkubaation jälkeen. Kanta on eristetty koiran näytteestä. Nuolet osoittavat muutamia morfologisesti heterogeenisia pesäkkeitä.

3.2.2 MALDI-TOF

Kliinisissä laboratorioissa usein käytetään biokemiallisten tutkimusmenetelmien sijaan matriisiavusteiseen massaspektrometriaan perustuvaa mikrobintunnistusautomaattia (Harju & Grönroos 2020: 1660–1667). MALDI-TOF (Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-Of-Flight, matriisiavusteinen laserdesorptio-ionisaatiolentoaika) perustuu molekyyliormenjälkeä muistuttavaan, kullekin bakteerilajille tyypilliseen proteiinispektriin. Laite vertaa tätä näytteestä mitattua, niin sanottua molekyyliormenjälkeä järjestelmänsä tietokannan arvoiltaan vastaaviin spektreihin. (Perry 2014: 29; Harju & Grönroos 2020: 1660–1667.) MALDI-TOF-analyysillä pystytään erottamaan perinteisiä tutkimusmenetelmiä tarkemmin patogeeneja normaalimikrobistosta. Aiemmin, esimerkiksi, *S. pseudintermedius* on helpommin sekoitettu *S. aureukseksi*, tai jouduttu vastaamaan koagulaasinegatiivisena stafylokokkina. Tunnistuksen lisäksi ohjelmisto antaa tulokselle numeroarvon välillä 0–3 sekä toiseksi eniten näytteen spektriä muistuttavan tuloksen. (Harju & Grönroos 2020: 1660–1667.) MALDI-TOF -järjestelmä pisteyttää antamansa tulokset siten, että tuloksella 1.70-2.0 voidaan tunnistaa bakteeri suvun tasolle ja tuloksella ≥ 2.0 lajin tasolle. Alle 1.70 jääviä tuloksia ei voida pitää luotettavina. (Wang ym. 2020.)

3.3 Herkkyysmääritys ja herkkyysmääritystulosten tulkinta

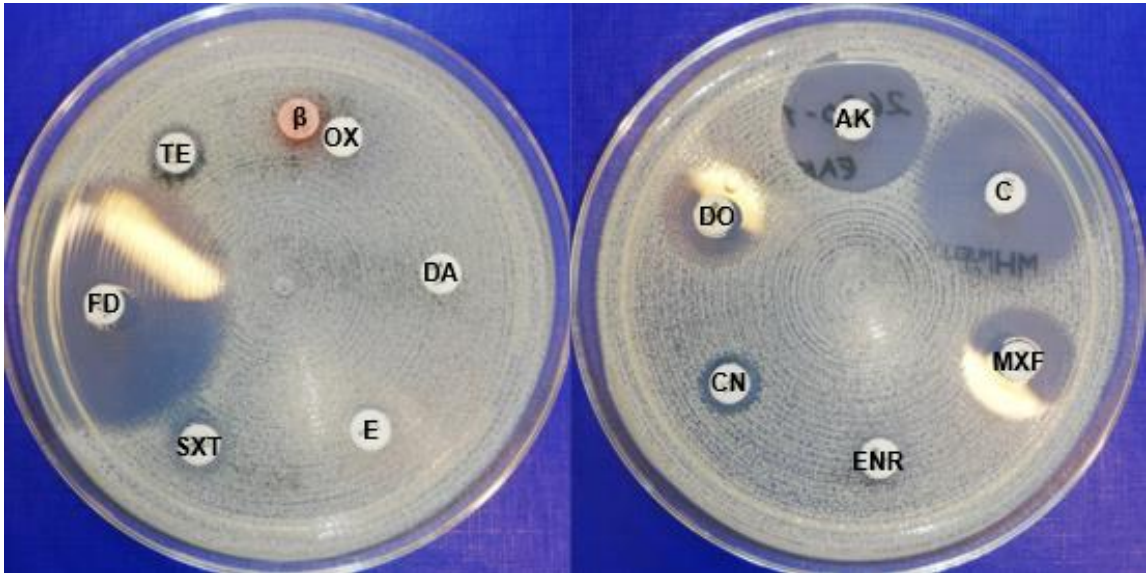
Bakteeri-infektioiden hoito perustuu oikein valittuun ja ajoitettuun antibioottihoitokuuriin (Quach ym. 2016). Antibioottiherkkyysmäärityksellä paitsi haetaan infektion hoitoon toimivaa lääkettä, myös tunnistetaan bakteerien antibioottiresistenssiä.

Herkkyysmääritysten menettelyjä ja tulosten tulkintaa normittavat mm. CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute), ISO (International Organization for Standardization) ja EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing). (Schumacher & Vranken & Malhotra & Arts & Habibovic 2018.)

Gram-positiivisten bakteerien mikrobilääkeherkkyyksissä on suuria eroja. Yleisimmät eläimistä eristetyt gram-positiiviset ryhmät ovat streptokokit, stafylokokit ja enterokokit sekä gram-positiiviset sauvat, kuten korynebakteerit ja mykobakteerit. Stafylokokeilla on jonkin verran luontaista resistenssiä, mutta niillä on korkea riski hankitulle resistenssille, ja siksi herkkyysmääritys on tärkeä tehdä stafylokokkilajeille. (CLSI 2019.)

Bakteerin mikrobilääkeherkkyys voidaan määrittää esimerkiksi agardiffuusioon perustuvalla menetelmällä (Schumacher ym. 2018). Kiekkodiffuusiossa bakteerit viljellään agar-elatusalustalle ja kasvatetaan 18–24 tuntia. Kasvaneista pesäkkeistä tehdään

määrätyn konsentraation omaava suspensio, jota sivellään pumpulitikulla agarmaljalle. Maljalle lisätään tarkoituksenmukaisesti valittuja, antibioottia sisältäviä kiekkoja. Inkubaation aikana muodostuu estovyöhykkeitä sellaisten kiekkojen ympärille, joiden antibiootti estää bakteerin kasvun (kuva 5). Tulos määräytyy estovyöhykkeen halkaisijan koon perusteella ja on kvalitatiivinen. (Schumacher ym. 2018.)



Kuva 5. Koiran MRSA-MRSP-seulontanäytteestä eristetyn *S. pseudintermedius* -löydöksen herkkyysmääritys Mueller-Hinton-maljoilla. Bakteeri on poikkeuksellisen resistentti MRSP.

Herkkyysmääritykset suositellaan tehtäväksi McFarland-standardin mukaisilla bakteerimäärillä. Standardilla määritetään valmistettavan bakteerisuspension turbiditeetti eli suspension sameus, joka vastaa tiheydeltään tiettyä arvioitua bakteerimäärää liuoksessa (taulukko 1). (Pro-Lab Diagnostics 2012.)

Taulukko 1. Muutamia McFarland-standardeja vastaavat bakteerimäärät liuoksessa (Pro-Lab Diagnostics 2012).

McFarland	Bakteerimäärä arviolta (lisääntymiskykyistä bakteerisolua)
0,5	$1,5 \times 10^8$
1,0	$3,0 \times 10^8$
2,0	$6,0 \times 10^8$

Herkkyysmääritysten estovyöhykkeet voidaan mitata viivoittimella tai mittaamiseen erikoistuneella laitteella. BIOMIC® V3, esimerkiksi, on automaattinen herkkyysmääritysmaljojen lukija ja tulkitsija. Laite tunnistaa siihen syötettävältä maljalta lääkekiekon ja mittaa sen halkaisijan. Lääkekiekkojen sijaintia ja estovyöhykkeen kokoa pystyy myös

muuttamaan manuaalisesti. Järjestelmä tulkitsee lääkaineiden estovyöhykkeet CLSI- tai EUCAST-raja-arvoilla. (Giles Scientific Inc.) Tutkittavan bakteerin herkkyys antibiootille ilmoitetaan S/I/R-asteikolla, jossa S on herkkä (susceptible), I alentunut (intermediate) ja R resistentti (resistant). (Schumacher ym. 2018.)

Testattavien antibioottien valinta perustuu lajintunnistukseen ja osittain myös siihen, mistä bakteeri on eristetty. Koirilla käytetään *S. pseudintermediuksen* metisilliiniresistenssin testaamiseen oksasilliinia, koska muut testatut beetalaktaamilääkkeet eivät paljasta luotettavasti kyseistä resistenssimekanismia. Koirilla on *S. pseudintermediukselle* ja *S. aureukselle* keskenään erilaiset oksasilliinin raja-arvot. (CLSI 2019.) CLSI:n raja-arvojen mukaan *S. pseudintermedius* -isolaatti on herkkä, jos estovyöhykkeen halkaisija on ≥ 18 mm ja resistentti, jos halkaisija on ≤ 17 mm. EUCAST ja CLSI suosittavat kefoksitiinia MRSA:n erottamiseen metisilliiniresistenteistä KNS-stafylokokkeista. Kefoksitiinin käyttöä myös *S. pseudintermediuksen* metisilliiniresistenssin tunnistukseen on tutkittu, mutta oksasilliinin on toistaiseksi todettu indikoivan paremmin *mecA*-välitteistä beetalaktaamiresistenssiä. (Skov ym. 2019.) *S. pseudintermedius* on MRSP, jos sen oksasilliini-MIC-arvo on $\geq 0,5$ $\mu\text{g/ml}$ (Bemis ym. 2009).

3.4 Koirien MRSA- ja MRSP-seulonnat

Moniresistentejä bakteereja etsitään niitä kantavista eläimistä seulonnoilla. Moniresistentit bakteerit MRSA ja MRSP leviävät herkästi ja voivat aiheuttaa epidemioita eläinlääkäriasemilla ja -sairaaloissa. Selonnoilla pyritään paitsi ennakoimaan ja ehkäisemään leviämistä, myös arvioimaan torjuntatoimien onnistumista ja mahdollisesti niiden lisäämistä. (YESLAB a.) Seulonnat ovat vain osa resistenttien bakteerien hillitsemistä, ja kaikki seulontamenetelmät voivat myös antaa vääriä negatiivisia tuloksia (French 2009).

Koirien MRSA-MRSP-seulonnat keskitetään riskiryhmiin. Eläimellä voi olla useita samanaikaisia riskitekijöitä, mutta suurella osalla ei myöskään ole minkäänlaisia viitteitä tarttuvasta taudista. MRSA-MRSP-riskiä nostaa mm. runsas mikrobilääkkeiden kulutus. Eläin tulisi seuloa myös silloin, jos sillä on hoitoon liittyvä infektio, toistuvia virtsatieinfektioita, kroonisia iho- tai korvainfektioita, tai jos eläin ei vastaa mikrobilääkitykseen. Rescue-toiminnan kautta ulkomailta tuodut koirat seulotaan MRSP:n varalta kolmen kuukauden sisällä tuonnista. Jos eläin tiedetään ongelmamikrobin kantajaksi tai eläimen perheessä on ongelmamikrobia kantava eläin tai ihminen, tulisi MRSA-MRSP-seulontoja tehdä kuukauden välein. (Ballantine 2021: 50–55.)

3.4.1 Normaali mikrobisto MRSP-näytteissä

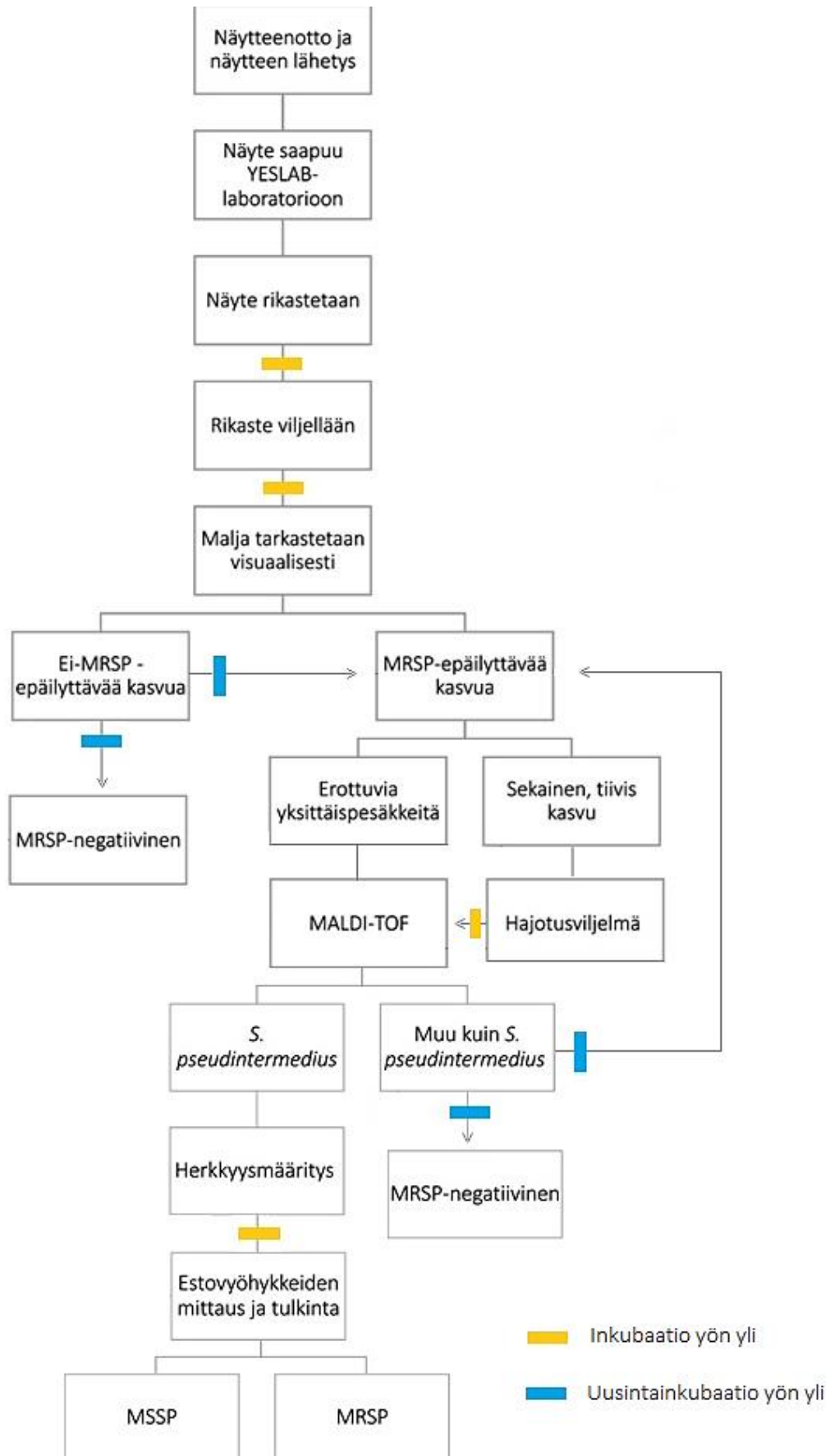
Iholla ja limakalvolla elävät bakteerit ovat elimistön mikrobiomia eli normaalia mikrobistoa. Sikiöt ovat bakteerittomia eli steriilejä syntymäänsä asti, mutta saavat synnytyksessä emon mikrobistoa. (Lumio 2020b.) Suoliston normaalia mikrobistoa ovat mm. enterokokit, jotka ovat ihmisten ja eläinten kommensaalisia opportunistipatogeeneja, joilla esiintyy paljon mikrobilääkeresistenssiä. *Enterococcus* -suvun yleisimmin esiintyvät lajit ovat *Enterococcus faecium* ja *Enterococcus faecalis*. (Castillo-Rojas ym. 2013.) Pinnallisista bakteeriviljelynäytteistä etenkin peräaukon seutu on herkästi kontaminoiva (YESLAB b).

Staphylococcus epidermidis tunnetaan kliinisten bakteeriviljelyiden yleisenä kontaminanttina. *S. epidermidis*, muiden koagulaasinegatiivisten stafylokokkien tavoin, on synnynnäinen osa ihon ja limakalvojen mikrobistoa, jota siirtyy helposti eläimen omaan näytteeseen. Mikrobiologian kliinisissä tutkimuksissa *S. epidermidis* voi olla haaste, koska bakteerin kasvaessa elatusaineessa voi olla kyse kolonisaatiosta, kontaminaatiosta tai todellisesta infektiosta aiheuttajasta. (Widerström 2016.)

3.4.2 Koirien MRSP-seulontatutkimukset YESLAB:ssa

Seulontaviljelyyn otetaan suu-sierainnäyte pyörittämällä näytteenottotikkua koiran sieraimen etuosassa. Samalla tikulla pyyhitään näytettä ikeniltä. Lisäksi otetaan toisella tikulla näyte perineumista ihon ja limakalvon liittymäkohdasta. Mahdollisesta haavasta otetaan näyte omalla tikullaan, ilman pintaeritteiden pyyhkimistä ennen näytteenottoa. Näytteeksi tulee yhdestä neljään tikkua, jotka siirretään heti näytteenoton jälkeen omiin geelikuljetusputkiin tai M40™ Transystem -putkiin. Jokainen putki merkitään omistajan tai eläimen nimellä, päivämäärällä sekä näytteenottokohdalla. Näyte ei saa olla kolmea vuorokautta vanhempi saapuessaan tutkittavaksi. (YESLAB b.)

MRSA- ja MRSP-seulontaviljelmiin hyödynnetään rikastusmenetelmää. Näytteestä tehdään vuorokauden kestävä esirikastus selektiivisessä rikastusliemessä, jota viljellään selektiiviselle maljalle. Kasvatus kestää yhdestä kahteen vuorokautta, minkä jälkeen epäilyttävät pesäkkeet tunnistetaan. Bakteerin resistenssiä metisilliinille tutkitaan oksasilliinilla. Tutkimuksen alustava vastaus saadaan kaksi vuorokautta viljelyn aloituksen jälkeen (kuvio 1). Seulontarajan tuntumaan jäävät kannat voidaan vahvistaa PCR-menetelmällä tutkimalla, onko niissä *mecA*- tai *mecC*-geeniä. (YESLAB a.)



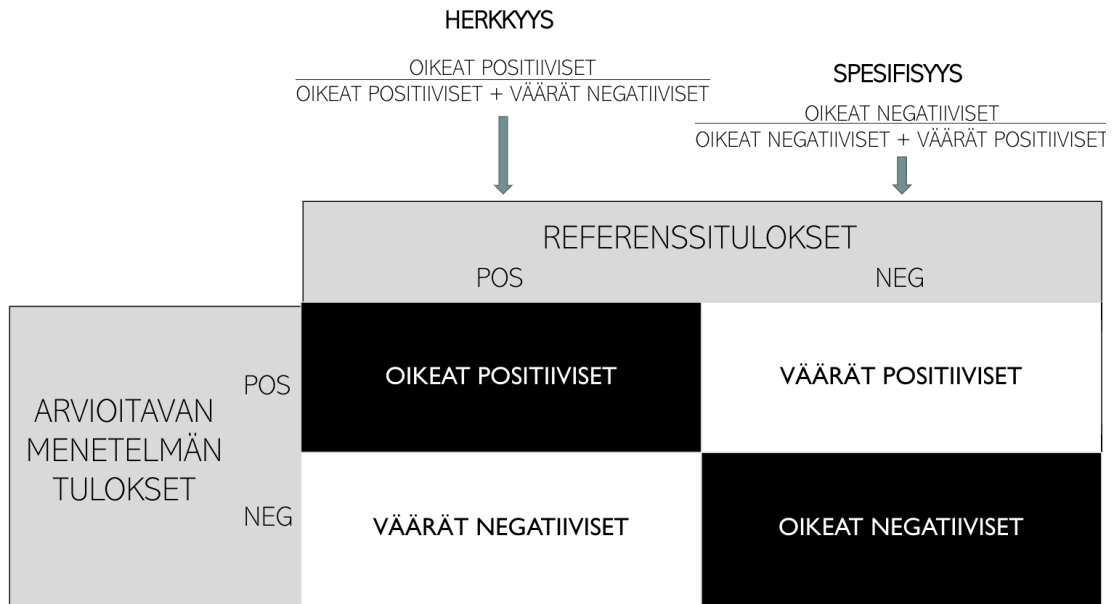
Kuvio 1. Prosessikuvio MRSP-seulontanäytteen tutkimusprosessista YESLAB:ssa. Selektiivisiä MRSA-maljoja ei inkuboida yhteensä yli kahta vuorokautta.

4 Validointitutkimus

Validointi (validation, varmentaminen) on laitteen tai menetelmän soveltuvuutta ja suorituskykyä tietyntyylisessä käytössä arvioiva menettely. Validointi mahdollistaa menetelmän tai laitteen käyttöönoton, jolle hyväksyty validointi on edellytys. Validoinnin tulee kattaa kaikki tutkimuskohteensa testauksen osa-alueet näytteiden ottamisesta tulosten tulkintaan ja raportointiin. Validointiparametrit ja niiden arvot valitaan tapauskohtaisesti riippuen validoinnin kohteesta. Parametreja valittaessa voidaan painottaa tulosten luotettavuuden kannalta oleellisimpia menetelmän osia. Validointi on pätevä ainoastaan validoitavalle menetelmälle, testatuilla käyttöalueilla ja parametreilla sekä tarkoituksenmukaisesti valituilla, testatuilla näytematriiseilla, yhdisteillä, pitoisuuksilla ja laitteilla. Validoidun menetelmän toimivuutta seurataan käyttöönoton jälkeen ja varmistetaan jatkuvasti erilaisin laadunvarmistusmenetelmin. Laadunvarmistustoimenpiteet voivat olla sisäistä laadunohjausta tai ulkoista laadunarviointia, ja ne voivat sisältää viranomaisten vahvistamia menettelyjä. Jos menetelmää muutetaan validoinnin jälkeen esimerkiksi laajentamalla sen näytematriiseja, tulee menetelmä validoida uudelleen tietyiltä osin. (Hägg 2016.)

4.1 Validointiparametrit mikrobiologian alalla

Menetelmän herkkyys (sensitivity) on sen kykyä todeta vähäiset vaihtelut määritettävien mikrobien pitoisuuksissa tietyssä materiaalissa, eli osoittaa positiiviset näytteet kaikkien näytteiden joukosta (Hägg 2016). Mikrobiologiassa herkkyysarvo saadaan jakamalla oikeiden positiivisten tulosten lukumäärä oikeiden positiivisten ja väärin negatiivisten tulosten lukumäärien summalla (kuviokuva 2) (Hägg 2016; Rutjes & Reitsma & Coomarasamy & Khan & Bossuyt 2007). Mikrobiologiassa käytetään usein virheellisesti herkkyuden termiä, kun tarkoitetaan toteamisrajaa tai havaitsemisrajaa (Hägg 2016; UNODC 2009). Toteamisraja tai havaitsemisraja (limit of detection) ovat osuvampia termejä esimerkiksi silloin, kun tarkoitetaan pienintä menetelmällä tunnistettavaa pesäkemäärää (Hägg 2016). Havaitsemisrajalla tarkoitetaan pienintä pitoisuutta, joka voidaan luotettavasti todeta, ja se eroaa nollanäytteen arvosta merkittävästi (MIKES 2011; UNODC 2009). Nollanäyte on näyte, joka ei sisällä tutkittavaa analyyttiä tai mikrobia (UNODC 2009). Toisin kuin laboratoriolääketieteen alalla yleensä, bakteriologiassa ei käytetä viitearvo-termiä (reference value) (Hägg 2016).



Kuvio 2. Tulosten ristiintaulukointi sekä herkkyiden ja spesifisyyden laskukaavat.

Mikrobiologiassa menetelmän spesifisyys kertoo sen kyvystä löytää tutkittava mikrobi näytteen häiriötekijöistä huolimatta (Hägg 2016; Sandle 2015; UNODC 2009). Menetelmän korkea spesifisyys vähentää väärin negatiivisten tulosten todennäköisyyttä (Maidigan ym. 2018; UNODC 2009). Menetelmän spesifisyyden testaamiseen olisi hyvä käyttää sekä kohdeorganismeja että ei-kohdeorganismeja, kuten tutkimuksen kohteena olevan mikrobin lähisukulaisia tai menetelmässä häiritseviä kantoja (Hägg 2016; UNODC 2009). Spesifisyysarvo saadaan jakamalla oikeiden negatiivisten tulosten lukumäärä oikeiden negatiivisten ja väärin positiivisten tulosten lukumäärien summalla (kuvio 2). Spesifisyys tarkoittaa menetelmän kykyä erotella negatiiviset näytteet kaikista näytteistä. Mikrobiologiset viljelymaljat kuitenkin eivät koskaan ole täysin spesifisiä, ja pesäkkeiden tulkinta on osin subjektiivista. (Hägg 2016.)

Herkkyiden ja spesifisyyden laskemiseksi arvioitavaa menetelmää voidaan verrata ns. kultaiseen standardiin (gold standard). Kultaisella standardilla tarkoitetaan menetelmää, joka parhaiten määrittää, onko näytteessä kohdemikrobia vai ei. Jos, kuitenkin, kultainen standardi on menetelmän puutteellinen, ja sitä käytetään validoinnissa referenssimenetelmänä, syntyy laskelmiin poikkeamia. (Rutjes ym. 2007.) Näitä mittausvirheitä syntyy silloin, kun kultainen standardi ei todellisuudessa ole kultainen standardi (Fox & Lash & Bodnar 2020). Herkkyyden ja spesifisyyden tavoitelukuja on käytännössä vaikea saavuttaa, jolloin validoinnissa on usein painotettava enemmän validoinnista vastaavan henkilön kokemusta ja ammattitaitoa. (Hägg 2016.)

Kvalitatiivisella menetelmällä todetaan, onko tutkittavassa näytteessä organismeja vai ei. Kvantitatiivisesta tutkimuksesta saadaan numeerisia tuloksia. Tulokset voidaan analysoida myös semikvantitatiivisesti, esimerkiksi havaitsemisrajaa määritettäessä, jaksamalla tulokset asteikoiksi, kuten < 10 tai < 100 . Havaitsemisrajojen määrittämiseen vaikuttaa myös mahdollisten laimennossarjojen satunnaispoikkeamat, joiden vuoksi havaitsemisrajaa joudutaan joskus pitämään vain teoreettisena. (Sandle 2015.) Laimennossarjan viljely voidaan toteuttaa niin, että bakteerisuspensiosta tehdään laimennokset esimerkiksi välillä $10^{-1} - 10^{-7}$. Yksi pesäke kasvaa yhdestä pesäkkeen muodostavasta yksiköstä (pmy). Luotettavaan laskemiseen tarvitaan yleensä 30–300 pesäkettä, jotka kasvavat riittävän erillään toisistaan. (Boukouvalas & Prates & Lima Leal & Araújo 2019.) Pienen bakteerikonsentraation omaavista laimennoksista ei myöskään välttämättä päädy viljelymaljalle yhtään pesäkettä muodostavaa yksikköä, koska bakteerimäärä liuoksessa on niin pieni (Sharp 2001).

Kliinisessä mikrobiologiassa validointi on laaja, jos laboratoriolle ei ole kokemusta käytönotettavasta menetelmästä. Validointiin valitaan erilaisia mahdollisesti tutkimukseen sopivia menetelmiä. Menetelmille suoritetaan rinnakkaistutkimuksia valituilla näytteillä. Laajaan validointiin tarvitaan suuri näytemäärä, vähintään 30–50 näytettä, jotka sisältävät positiivisia ja negatiivisia näytteitä. Testien vertailussa kiinnitetään erityisesti huomiota menetelmien kykyyn erotella negatiiviset tulokset matalista positiivisista tuloksista. (Hägg 2016.) Kun käytössä oleva menetelmä pyritään korvaamaan uudella menetelmällä, on menetelmiä vertailtava keskenään. Vaihtoehtoisen menetelmät eivät välttämättä muistuta tuloksiltaan käytössä olevaa menetelmää. Menetelmiä vertailtaessa on suoritettava rinnakkaistestauksia, joiden tuloksia analysoidaan tilastollisin menetelmin mahdollisuuksien mukaan. Aina kuitenkin menetelmien suora vertailu ei ole mahdollista. Menetelmän valitsemisessa tärkeintä on se, että valittavalla menetelmällä saadaan edelleen johdonmukaisia tuloksia tutkittavista näytteistä. (Sandle 2015.)

4.2 Validointiprosessi

Ennen validointiprosessin konkreettista testausvaihetta tulee tehdä suunnitelma, joka dokumentoidaan ja hyväksytään. Työn edetessä muutokset ovat mahdollisia, mutta ne on aina dokumentoitava. Validointisuunnitelmasta tulisi käydä ilmi validoinnin kohde ja soveltamisala, validoinnin tavoite, näyteaineisto, validointiin osallistuvat henkilöt ja heidän vastualueensa, tavoiteaikataulu, laitteet, tilat ja tilojen mahdolliset erityisvaatimukset sekä validoinnin laajuus ja parametrit. (Hägg 2016.)

Raportissa tulee ilmoittaa johtopäätökset sekä se, otetaanko menetelmä käyttöön vai ei. Raportointivaiheessa on vielä mahdollista muuttaa menetelmän soveltuvuutta tulosten perusteella. Validointiaineisto arkistoidaan lainsäädännössä tai laboratorion omassa arkistointisäännössä määritelty aika. Validoitujen menetelmien aineistoa säilytetään vähintään se aika, kun menetelmä on käytössä. (Hägg 2016.)

5 Opinnäytetyön tarkoitus ja tavoite

Helsingin yliopiston YESLAB:lla oli käytössä Bio-Rad MRSA Select™ II -malja (BRMS), jolta MRSP ei tunnistunut riittävän hyvin. Tämän opinnäytetyön tarkoitus oli tutkia, soveltuuko jokin toinen MRSA-maljaa paremmin MRSP:n seulontaan ja validoida valittava malja. Tämän opinnäytetyön tavoitteena oli selvittää, että mikä neljästä vertailtavasta maljasta sopii parhaiten MRSP:n seulontaan ja löytää uusi, YESLAB:lla käytössä ollut parempi MRSA-seulontamalja. MRSA kasvaa BRMS-maljalla tyypillisesti voimakkaan vaaleanpunaisena ja MRSP haalean vaaleanpunaisena. BRMS-maljan rinnalla tutkittiin Oxoid Brilliance™ MRSA 2 Agar- (OXMA), Tammer BioLab Chrom Agar MRSA- (TACM) ja BD BBL™ CHROMagar™ MRSA II (BDCM) -maljojen soveltuvuutta MRSP:n tunnistukseen.

6 Opinnäytetyön menetelmät

Tämä opinnäytetyö toteutettiin Helsingin yliopiston Viikin kampuksen Clincum-rakennuksen keskuslaboratoriossa YESLAB:n laitteilla. Yliopisto teki 14.1.2021 validoinnista validointisuunnitelman, jonka perusteella määräytyivät mm. validoinnin toteutustavat, menetelmät ja aikataulut sekä tutkittavat bakteerikannat. Tehtävä validointi oli laaja validointi, vaikkakin osittainen, koska menetelmän rikastusvaihe oli jo validoitu. Validointi koostui pääosista A ja B (kuviot 3 ja 4).

A Maljojen vertailu seulontanäytteillä

- 53 koirien MRSA-MRSP-seulontanäytettä, joiden mikrobikoostumus ei ollut etukäteen tiedossa
- Näytteiden tutkiminen tavanomaisen seulontanäyteprosessin mukaisesti
 - Herkkyys ja spesifisyys
 - Yleiset ominaisuudet, käyttäjäystävällisyys
 - Kultakin maljalta tehtyjen jatkotutkimusten ja MRSP-löydösten määrä sekä tulosten valmistumisnopeus

Kuvio 3. Maljavertailun A-osion keskeisimmät menetelmät.

B Maljojen vertailu tunnetuilla bakteereilla

- Pakastetut bakteerit, joiden lajit ja kannat olivat tiedossa
- Kannat viljeltiin veriagarmaljoille puhtasviljelminä, joita käytettiin inkubaation jälkeen B-alaosioihin

B1 Tunnettujen kantojen kasvuominaisuudet

- Puhtasviljelmien kannat viljeltiin MRSA-maljoille sektoreittain
- *S. aureus*- (MSSA, MRSA) ja *S. pseudintermedius* (MSSP, MRSP) -kantoja ja koirien normaalin mikrobiston bakteereita
- Kasvuominaisuuksien tarkastelu visuaalisesti, mm. pesäkemorfologia, väritys ja pigmentti sekä bakteerilajien ja -kantojen väliset samankaltaisuudet ja/tai eroavaisuudet

B2 Pienten MRSA- ja MRSP-bakteerimäärien kasvuominaisuudet

- Erilaisen MIC-arvon omaavia MRSA- ja MRSP-kantoja
- pesäkemäärien laskeminen laimennoksista ja rikastetuista laimennoksista havaitsemisrajan (limit of detection) määrittämiseksi

B2.1 Laimennokset

- Veriagarmaljojen puhtasviljelmistä tehtiin laimennossarjat ja laimennokset viljeltiin MRSA-maljoille ja kontrollimaljoille
- Pesäkemäärät

B2.2 Rikastetut laimennokset

- B1-vaiheen laimennokset rikastettiin ja viljeltiin MRSA-maljoille ja kontrollimaljoille
- Pesäkemäärät

B3 Simuloidut seulontanäytteet

- B2.1-vaiheen rikastamattomia laimennoksia lisättiin negatiivisiin koirien seulontanäytteisiin ja viljeltiin MRSA-maljoille
- Tarkasteltiin heikkojen MRSP-positiivisten näytteiden kasvua MRSA:n ja normaalin mikrobiston bakteerien seassa

Kuvio 4. Maljavertailun B-osion keskeisimmät menetelmät vaiheittain.

Maljojen ominaisuuksia ja suoriutumista arvioitiin koirien MRSA-MRSP-seulontanäytteillä (kuvio 3) ja tunnetuilla bakteerikannoilla (kuvio 4). A-osassa viljeltiin seulontanäytteitä rinnakkain eri maljoille ja vertailtiin maljojen herkkyyttä (sensitivity) ja spesifisyyttä

(specificity). B-osassa arvioitiin MRSA-maljojen ominaisuuksia ja mahdollisuuksien mukaan MRSP:n toteamisrajaa (limit of detection) maljoilla. Vertailussa käytettiin erilaisia oksasilliini-MIC-arvoja omaavia kantoja.

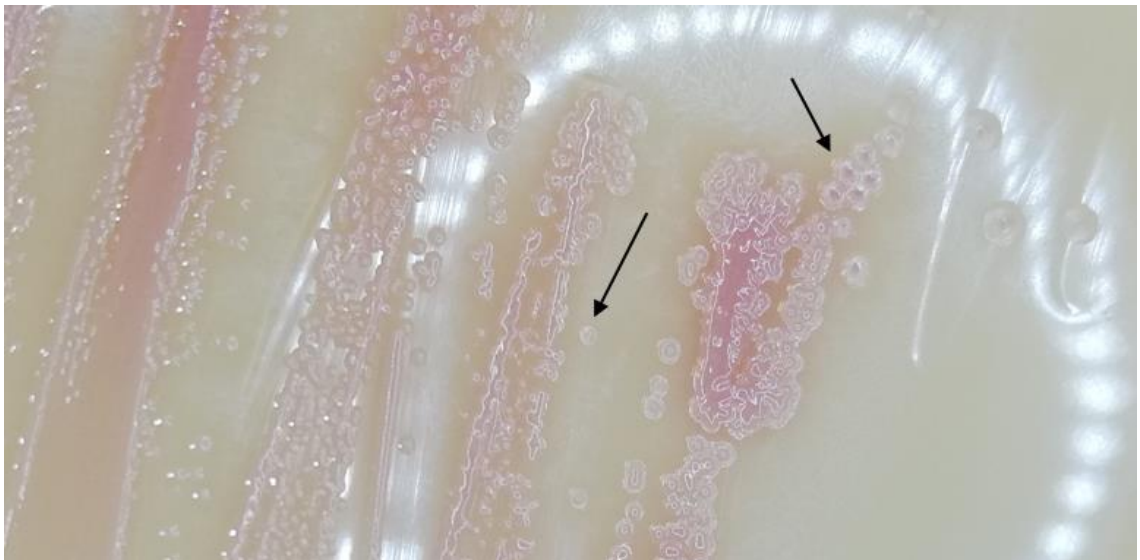
Validoitavaksi valittiin mahdollisesti MRSP:n tunnistukseen soveltuvia maljoja. MRSP:n tunnistukseen käytetään MRSA-maljoja ja vertailuun valittiin Suomessa myytäviä maljoja. Tunnetut testikannat saatiin pakastetuista kaupallisista ATCC-kannoista (American Type Culture Collection) sekä tunnetuista eläinten potilasnäytekannoista, jotka rikastettiin ja viljeltiin kullekin testattavalle maljalle. Rikastusliemi oli kaupallinen MRSA:n kasvatukseen tarkoitettu liemi (Tammer BioLab). Testattaviin kantoihin kuului MRSA-, MSSA-, MRSP- ja MSSP-kantoja, joiden lisäksi testattiin näytteiden normaalin mikrobiston ilmenemistä *Enterococcus faecalis*-, *Enterococcus faecium*-, *Staphylococcus epidermidis*- ja *Corynebacterium auriscanis* -kannoilla. Matalan MIC-arvon omaaville kannoille tehtiin laimennossarjat, joilla selvitettiin, kuinka pienet bakteerimäärät kasvavat maljoilla.

Valittavalta maljalta toivottiin jatkotutkimusten vähenemistä, tulosten nopeampaa vahvistumista ja parempaa herkkyttä MRSP:n suhteen. MRSP:n tulisi erottua maljalta tunnistettavana ja kasvaa riittävän runsaana muun mikrobiston seassa. Seulontatutkimuksen kustannusten ei tule nousta uuden maljan myötä, eikä seulomiseen käytettävän työmäärän lisääntyä.

6.1 Tutkimuksessa käytetyt MRSA-maljat

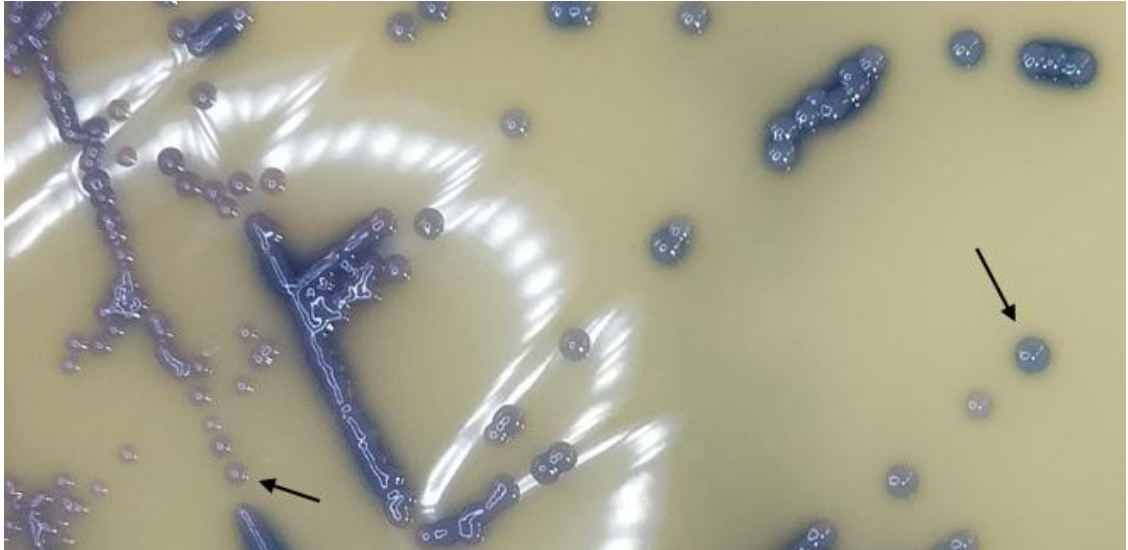
Tutkimuksessa vertailtiin Bio-Rad MRSA Select™ II-, Oxoid Brilliance™ MRSA 2 Agar-, Tammer BioLab Chrom Agar MRSA- ja BD BBL™ CHROMagar™ MRSA II -maljoja. MRSP:n seulomiseksi ei ole opinnäytetyön tekohetkellä ollut saatavilla kaupallisia elatusaineita. Kaupalliset MRSA-seulontamaljat saattavat sisältää kefoksiini-antibioottia, joka voi estää varsinkin matalan oksasilliini-MIC-arvon omaavien MRSP-kantojen kasvun ja johtaa väriin negatiivisiin tuloksiin. Maljojen valmistajat eivät tiettävästi ole testanneet niiden toimivuutta MRSP:lle, koska maljat on suunniteltu ensisijaisesti humanikäyttöön, eikä MRSP toistaiseksi ole ihmiselle riittävän merkittävä patogeeni. MRSP:n kasvamista testattavilla maljoilla verrattiin aiempaan menetelmään, koska testattavien maljojen soveltuvuudesta MRSP:lle ei ollut tietoa. Aiemmin julkaistuissa tutkimuksissa MRSA-maljojen soveltuvuudesta MRSP:n tunnistukseen on käytetty eri maljoja, kuin tässä opinnäytetyössä, tai samojen maljojen vanhempia versioita.

Bio-Rad MRSA Select™ II -malja (BRMS) on selektiivinen kromogeeninen malja, joka on tarkoitettu MRSA:n eristykseen ja suoraan tunnistukseen. Maljan elatusaine sopii MRSA:n seulptaan. Elatusaineen mikrobilääkkeet yhdessä optimaalisen suolakonsentraation kanssa estävät hiivojen ja valtaosaa muista bakteereista kasvamasta maljalla. MRSA muodostaa maljalla punertavia pesäkkeitä, kun sen tuottama entsyymi reagoi elatusaineen kromogeenisen substraatin kanssa (kuva 6). Koagulaasinegatiiviset metisilliiniresistentit stafylokokit eivät metabolisoi substraattia. Maljalla voi kasvaa MSSA-kantoja, joiden MIC-arvot ovat lähellä MRSA:n MIC-arvoja. (Bio-Rad 2016.)



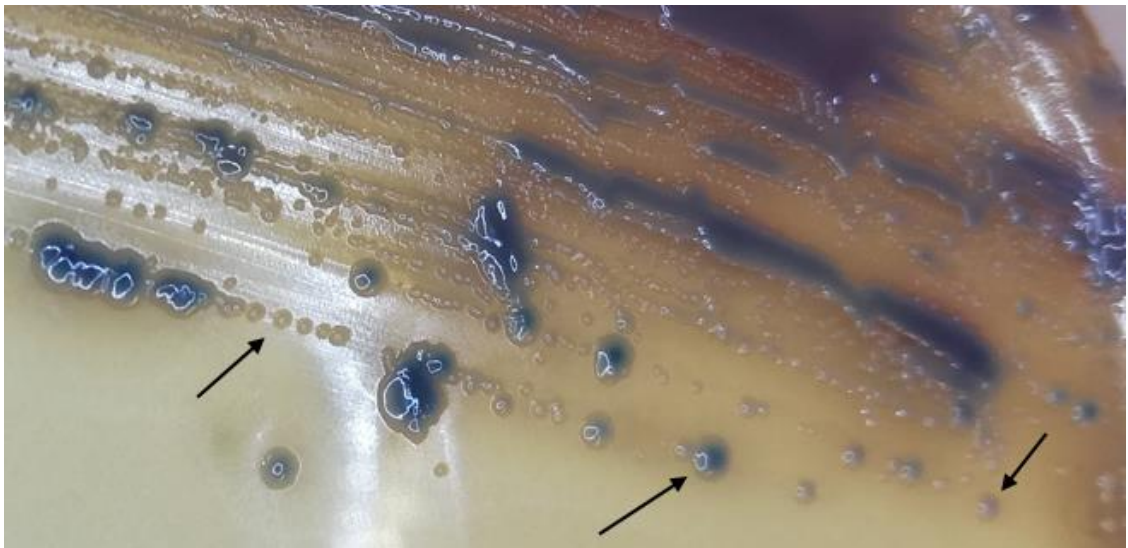
Kuva 6. MRSP-kontrollikanta BRMS-maljalla toisen inkubaation jälkeen. MRSP-pesäkkeet ovat BRMS:lla tyypillisesti pieniä ja haalean vaaleanpunaisia. Kasvu on tasaisen väristä, mutta se jää helposti muun kasvuston peittoon ja sekoittuu useisiin normaalin mikrobiston bakteereihin. Nuolilla on osoitettu tutkimuksen perusteella tyypillisiä MRSP-pesäkkeitä.

Oxoid Brilliance™ MRSA 2 Agar -malja (OXMA) on valmistajan mukaan suunniteltu vähentämään vääriä positiivisia tuloksia ja maljalta tehtävien jatkotutkimusten määrää. Siirrostus voidaan tehdä suoraan näytetikusta tai eristettävästä pesäkkeestä tai viljellä MRSA-rikasteesta. Maljaa inkuboidaan +37 °C -asteessa 18–24 tuntia, eikä MRSA-tutkimuksissa tarvita toista inkubaatiota. MRSA-pesäkkeet myös ovat muihin maljoihin nähden suurempia ja väritykseltään helpommin tunnistettavia. MRSA-pesäkkeet kasvavat maljalla sinisinä, ja negatiivinen tulos näkyy punertavina, liloina tai valkeina pesäkkeinä (kuva 7). Negatiivisesta tuloksesta syntyvä vaaleanpunainen värireaktio lisää tulosten lukemisen luotettavuutta. (Thermo Fisher Scientific 2010.)



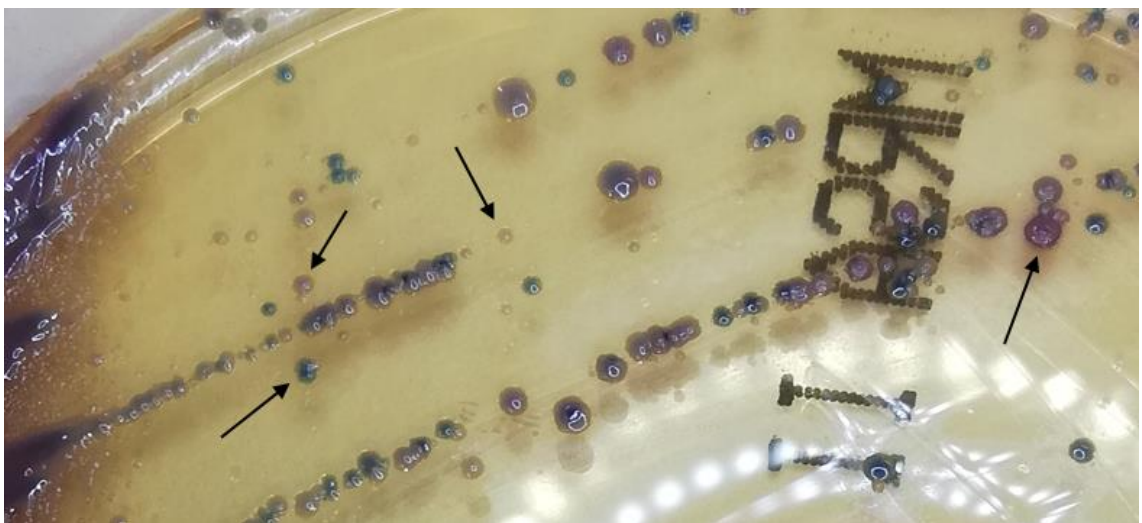
Kuva 7. MRSP-kontrollikanta OXMA-maljalla toisen inkubaation jälkeen. Tutkimuksen aikana todettu tyypillinen MRSP-kasvu on OXMA:lla vaaleansinistä tai lilaa. MRSP-pesäkkeiden värin todettiin vaihtelevan lilan ja sinisen välillä, mutta pesäkkeissä todettiin aina tunnistettava pastellinen sävy. Nuolilla on osoitettu tutkimuksen perusteella tyypillisiä MRSP-pesäkkeitä.

Tammer BioLabin Chrom Agar MRSA -malja (TACM) on selektiivinen MRSA-kantojen havaitsemiseen suunniteltu malja. Maljan elatusaine on kromogeeninen (kuva 8) ja sitä käytetään tyypillisesti kliinisessä lääketieteessä sekä eläinlääketieteen tutkimuksissa. (Tammer BioLab.)



Kuva 8. MRSP-kontrollikanta TACM-maljalla toisen inkubaation jälkeen. Tutkimuksen aikana todettu tyypillinen MRSP-kasvu on TACM:lla vaihtelevaa. Nuolilla on osoitettu kasvusta eri värisiä ja kokoisia pesäkkeitä, joiden vaihtelevalle morfologialle ei todettu näennäistä ulkopuolista syytä.

Becton, Dickinson and Companyn BBL™ CHROMagar™ MRSA II -agarmalja (BDCM) on erotteleva ja kromogeeninen (kuva 9). Malja on suunniteltu MRSA:n suoraan kvalitatiiviseen osoitukseen. Maljan sisältämä kefoksitiini edesauttaa MRSA:n kasvua ja MRSA:n tulisi kasvaa malvan värisenä. Elatusaineessa on myös selektiivisiä yhdisteitä, jotka estävät mm. muiden gram-positiivisten kokkibakteerien kasvua. Muut maljalla kasvavat bakteerilajit voivat vääristää niiden kanssa kasvavien MRSA-pesäkkeiden malvaa väriä. Malja voi antaa negatiivisen testituloksen, vaikka tutkittavan siiraimissa todellisuudessa olisikin MRSA-bakteereita. Valmistaja suosittelee MRSA-kontrollikannan viljelyä maljalla ennen sen käyttöönottoa MRSA-typillisen kasvun tunnistuksen harjoitteluksi. (Becton, Dickinson and Company 2015.)



Kuva 9. MRSP-kontrollikanta BDCM-maljalla toisen inkubaation jälkeen. Tutkimuksen aikana MRSP-kasvun todettiin olevan BDCM:lla kirjavaa. Nuolilla on osoitettu kasvusta eri värisiä ja kokoisia pesäkkeitä, joiden vaihtelevalle morfologialle ei todettu näennäistä ulkopuolista syytä.

MRSA-maljoja tarvittiin A-osioon yhteensä 53 kappaletta ja B-osioon yhteensä 49 kappaletta. A-osiossa käytettiin veriagarmaljoja puhdas- ja hajotusviljelmiin sekä herkkyysmääritysten kontrollimaljoiksi. B-osioon meni yhteensä 77 veriagarmaljaa. MRSA-maljat tilattiin 1–3 viikkoa ennen työn aloitusta ja jokaiselle erälle tehtiin kontrollit ennen käyttöönottoa. Myös ylimääräisiä maljoja tilattiin mm. kontrollien tekemiseen. Kaikkia maljoja säilytettiin jääkaappilämpötilassa, josta ne otettiin huoneenlämpöön tunti ennen viljelyä.

6.2 Maljojen vertailu seulontanäytteillä

Seulontanäytteiden tuloksia verrattiin nykyiseen menetelmään ja arvioitiin menetelmien herkkyyttä ja spesifisyyttä. Seulontanäytteistä etsittiin ensisijaisesti MRSP:tä, mutta

myös MRSA olisi ollut kliinisesti merkitsevä löydös. Seulontanäytteistä tehdyistä viljelmistä siis etsittiin *S. pseudintermediuksen* ja *S. aureuksen* näköistä kasvua. Muut löytyneet bakteerilajit eivät olleet kliinisesti merkitseviä, koska seulonnalla pyritään toteamaan näytteestä ainoastaan MRSP ja/tai MRSA. Näytteet, jotka eivät olleet MRSP- tai MRSA-positiivisia, olivat seulontatutkimuksen kannalta negatiivisia. Seulontatutkimustulokset ovat positiivisia tai negatiivisia, jolloin tulos ilmoitetaan kvalitatiivisesti. Tässä tutkimuksessa arvioitiin myös MRSP-löydösten määriä kullakin neljällä selektiivisellä MRSA-maljalla, jolloin tuloksia analysoitiin myös kvantitatiivisesti.

6.2.1 Näytteet

Seulontanäytteiden viljelyyn käytettiin YESLAB-laboratorioon lähetettyjä koirien MRSA-MRSP-näytteitä. Menetelmävertailuun tarvittiin vähintään viisikymmentä seulontanäytettä. Näytteet olivat MRSA- ja MRSP-seulontanäytteitä, jotka oli otettu koirista suu-sierain- ja perianaalialueelta sekä mahdollisista muista kehonosista pinnallisesti. Näytteet tulivat pääasiassa eläinsairaaloista ja eläinlääkäriasemilta. Näytteistä ei tiedetty niiden saapuessa, ovatko ne MRSP-positiivisia vai -negatiivisia. Tutkimusprosessi aloitettiin näytteiden saapumispäivänä siirtämällä näytetikut rikasteputkiin. Vertailuun saatiin yhteensä 53 seulontanäytettä 23:n työpäivän aikana. Laboratorioon saapui 1–6 koiran seulontanäytettä työpäivässä. Näytteitä säilytettiin tutkimisen jälkeen kahden viikon ajan laboratorion jääkaapissa.

6.2.2 Toteutus

Maljojen vertailu seulontanäytteillä toteutettiin tavallisen seulontaprosessin mukaisesti (kuvio 1, s. 15). Seulontanäytteet laitettiin rikastumaan niiden saapumispäivänä. Seulontanäytetikut upotettiin MRSA-rikasteliemeen (Tammer BioLab), jonne tikkujen päät katkaistiin steriileillä saksilla. Näyte rikastui +35 °C:ssa 16–24 tuntia, minkä jälkeen lientä imeytettiin pumpulitikkuun ja viljeltiin kaikille neljälle selektiiviselle MRSA-maljalle. Maljoille siirrostetut rikasteet hajotettiin viljelysauvalla (Sterilin®, Thermo Scientific). Seulontanäytteet viljeltiin samaan aikaan kaikille neljälle maljalle. Maljoja inkuboitiin +35 °C:ssa normaaliatmosfäärissä 16–24 tuntia.

Inkubaation jälkeen kaikilta maljoilta arvioitiin bakteerien kasvu ja tarkasteltiin MRSP-typillisten pesäkkeiden ilmaantumista. Kaikkia maljoilla kasvavia pesäkkeitä ei tutkittu. Seulontanäytevertailun alussa tutkittiin lähes kaikenlaisia pesäkkeitä, jotta saatiin yleiskuva maljojen ominaisuuksista, koska tutkimus aloitettiin seulontanäytteillä. Koska mal-

joja ei ole tietävästi testattu MRSP:llä, ei työn alkaessa ollut tietoa miltä *S. pseudintermedius* näyttää uusilla maljoilla. Myöhemmin maljoilta tutkittiin ainoastaan *S. pseudintermediukselta* tai *S. aureukselta* näyttäviä pesäkkeitä. Ennen työn aloitusta kaikille tutkittaville maljoille viljeltiin MRSA-, MRSP- ja MSSP-kontrollikantoja, jotka tarkasteltiin silmämääräisesti. Ei-epäilyttävistä viljelmistä, joiden kasvu ei ollut erityisen runsasta, ei pääsääntöisesti tehty hajotusviljelmiä. Tulosten analysoinnissa on huomioitu, että kaikki tutkitut pesäkkeet eivät ole olleet MRSP-epäilyttäviä.

BRMS-maljat tarkastettiin visuaalisesti eläinlääkärin tai mikrobiologin toimesta, koska BRMS oli neljästä maljasta ainoa MRSP:lle validoitu diagnostinen menetelmä ja rutiini-analytiikan ensisijainen MRSA-malja. OXMA:n, TACM:n ja BDCM:n kasvun luki opinäytetyön tekijä, joka luki aina myös BRMS-maljan kasvun samana päivänä. Kasvusta jatkettiin aina toinen vuorokausi, jonka jälkeen maljat tarkastettiin silmämääräisesti uudestaan. MRSP-epäilyistä pesäkkeistä tehtiin jatkotutkimukset, eli lajintunnistus MALDI-TOF-menetelmällä ja herkkyysmääritys kiekkomenetelmällä. Tarvittaessa maljoilta tehtiin hajotus- tai puhtasviljelmät trypsiinisoija-lampaanveriagarille (TSA-SB, Thermo Scientific). Puhtasviljelmät tehtiin esimerkiksi MRSP-epäilyttävästä kasvusta, jota kasvoi maljalla vain yhden pesäkkeen verran, jolloin siitä saatiin sinä päivänä ainoastaan MALDI-TOF-määritys ja puhtasviljelämä, ja seuraavana päivänä puhtasviljelmästä herkkyysmääritys. MRSA-maljoja inkuboitettiin normaaliolosuhteissa (+35 °C) lämpökaapissa (POL-EKO-APARATURA® ILW 240 STD). Hajotus- ja puhtasviljelyverimaljoja inkuboitettiin samassa lämpökaapissa MRSA-maljojen kanssa.

Inkubaation jälkeinen kasvu, joka ei näyttänyt mahdolliselta *S. pseudintermedius* -kasvulta, luettiin negatiiviseksi, eikä ei-epäilyttävästä kasvusta pääasiassa tehty jatkotutkimuksia. Jatkotutkimuksia vaatineet pesäkkeet tunnistettiin Microflex® LT MALDI-TOF-laitteella (Bruker Diagnostics). Tunnistuneiden bakteerien tulosten tulkinnessa on noudatettu laitevalmistajan ohjeistamaa luotettavuustasoa ≥ 1.70 . *S. aureus*- ja *S. pseudintermedius* -bakteereiksi osoittautuville tehtiin herkkyysmääritykset, joilla selvitettiin niiden mahdollista metisilliiniresistenssiä. Herkkyysmääritykset toteutettiin CLSI:n (Clinical and Laboratory Standards Institute) käytäntöjen mukaisesti, viljelemällä 0,5 McFarlandia vastaavaa bakteerisuspensiota tasaisesti koko Mueller-Hinton-maljan pinta-alalle. Viljellyille bakteerimatoille laitettiin kaksitoista antibiootikiekkoa automaattianostelijalla. Antibiootit olivat tavallisimpia stafylokokki-infektioiden hoitoon ja diagnosointiin käytettyjä lääkkeitä (kuva 5, s. 12). Antibioottipaneeliin kuului oksasilliini (OX), klindamysiini (DA), erytromysiini (E), trimetopriimi-sulfametoksatsoli (SXT), fusidiinihappo (FD), tetrasykliini (TE), amikasiini (AK), kloramfenikoli (C), moksifloksasiini

(MXF), enrofloxasiini (ENR), gentamysiini (CN) ja doksisykliini (DO). Herkkyysmäärittysten Mueller-Hinton-maljoja ja herkkyysmäärittysten kontrolliverimaljoja inkuboitii normaaliatmosfäärissä (+ 36 °C) lämpökaapissa (BINDER® KB 53) yön yli. Inkubaation jälkeen maljoille lisättiin beetalaktaamikiekko noin tunti ennen herkkyiden lukemista. Herkkyysmäärittysten estovyöhykkeet luettiin BIOMIC® V3-järjestelmällä. CLSI:n käytäntöjen mukaisesti *S. pseudintermedius* -isolaatti on MSSP, jos oksasilliinin estovyöhykkeen halkaisija on ≥ 18 mm ja MRSP, jos halkaisija on ≤ 17 mm. Herkkyysmäärittysten kontrollimaljoilta tehtiin myös MALDI-TOF-määritykset, joilla vahvistettiin edellisenä päivänä tehtyjen lajintunnistusten luotettavuutta. Seulontanäytteiden tutkimukset ja tulokset kirjattiin Excel-taulukkoon malja- ja näytenumerokohtaisesti. Kaikki MRSP-löydökset myös ilmoitettiin asianosaisille asiakkaille, riippumatta siitä, miltä tutkittavista maljoista löydös oli tehty.

Seulontanäytteiden viljelyjärjestys oli sattumanvarainen ja vaihteli näytteiden välillä. Viljelyjärjestyksestä ei pidetty kirjaa. Maljojen viljelyjärjestyksen vaikutusta kasvuun testattiin viljelemällä rikastettua MRSP-kontrollikantaa sektoreittain kaikille neljälle maljalle neljässä erilaisessa järjestyksessä (taulukko 2). Viljelmien kasvuominaisuudet kirjattiin Excel-taulukkoon ensimmäisen ja toisen inkubaation jälkeen. Viljelyjärjestyksellä ei todettu olevan merkitystä MRSP:n kasvuille millään maljalla. Bakteerikasvuston ominaisuudet pysyivät näennäisesti samanlaisina kaikilla maljoilla viljelyjärjestyksestä riippumatta.

Taulukko 2. Neljä erilaista viljelyjärjestystä (A-D), joilla varmistettiin viljelyjärjestyksen näennäisesti olematon vaikutus MRSP-kasvuun tutkituilla MRSA-maljoilla. Maljojen sarakkeissa on ilmoitettu kunkin maljan järjestys viljelysarjassa.

	BRMS	OXMA	TACM	BDCM
A	4.	1.	2.	3.
B	1.	4.	3.	2.
C	2.	3.	1.	4.
D	3.	2.	4.	1.

6.2.3 Tulosten analysointi ja maljan valinnan kriteerit

Jokaisen seulontanäytteen tulokset lajiteltiin maljakohtaisesti joko MRSP-epäilyttäväksi tai ei-MRSP-epäilyttäväksi. MRSP-epäilyttävää oli *S. pseudintermediuksen* näköinen kasvu, eli positiivisen näköinen kasvu. Ei-MRSP-epäilyttävä kasvu ei näyttänyt *S. pseudintermediukselta* ja oli siten negatiivisen näköinen. Seulontanäytteiden maljakohtaisia

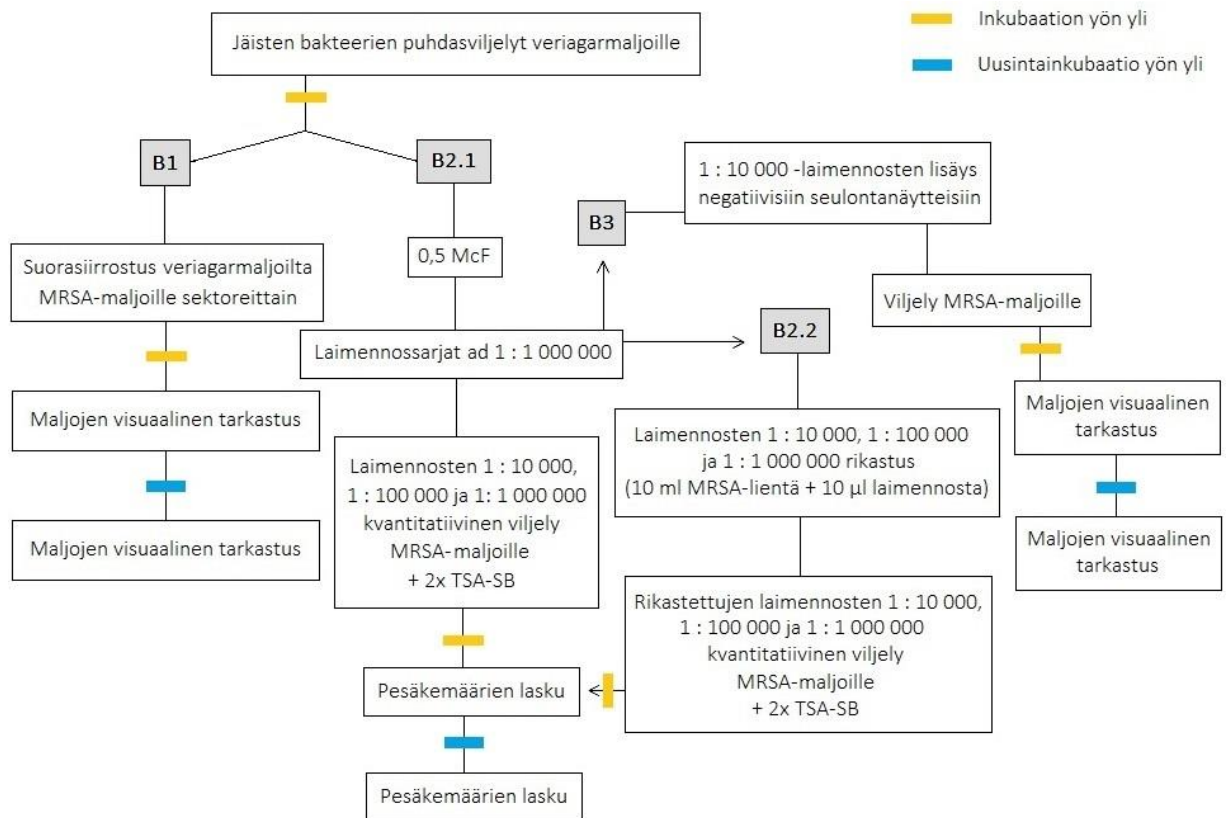
löydöksiä analysoitaessa ei huomioitu todellisia MALDI-TOF- tai herkkyysmääritystuloksia, vaan ainoastaan se, onko kasvu kyseisellä maljalla näyttänyt MRSP:ltä vai ei, eli onko viljelmästä jouduttu tekemään jatkotutkimuksia.

A-osion kriteereissä painotettiin herkkyyttä, spesifisyyttä, jatkotutkimusten määrää, bakteerilajien kasvuominaisuuksia ja käyttäjäkokemuksia. Väärät positiiviset tulokset ovat epätoivottuja, koska ne aiheuttavat tarpeettomia jatkotutkimuksia. Jatkotutkimukset hidastavat tulosten valmistumista jopa usealla työpäivällä. Jatkotutkimuksia ei pääasiassa tehty B-osiossa, minkä vuoksi niiden määrää painotettiin yhtenä valinnan kriteerinä A-osiossa. Jatkotutkimusten määrää kullakin maljalla vertailtiin herkkyydellä ja spesifisyydellä. Korkeimman herkkyysarvon omaava malja tunnistaa parhaiten positiiviset näytteet kaikista tutkittavista näytteistä, ja korkeimman spesifisyysarvon omaava malja tunnistaa parhaiten negatiiviset näytteet kaikista tutkittavista näytteistä. Korkean spesifisyyden omaavalla maljalla MRSP kasvaisi erilaisena muihin, ei-merkitseviin bakteereihin verrattuna, mikä vähentäisi jatkotutkimusten tarvetta.

Bakteerilajien kasvuominaisuuksien suhteen arvioitiin MRSP:n kasvuominaisuuksia sekä muiden, normaalin mikrobiston kasvuominaisuuksia kaikilla vertailluilla maljoilla. MRSP:n tuli kasvaa kooltaan, muodoltaan ja väritykseltään helposti tunnistettavana sekä muista bakteerilajeista selvästi erilaisena. MSSP:n kasvu valittavalla maljalla lisäisi turhia jatkotutkimuksia, koska MSSP ei ole metisilliiniresistentti, vaan oksasilliiniherkkä. Ei-merkitsevien bakteerilajien, kuten enterokokkien ja ei-merkitsevien stafylokokkien, tuli kasvaa valittavalla maljalla mahdollisimman niukasti tai vähintään MRSP:stä erilaisena. MRSP:n tuli kasvaa mieluusti jo ensimmäisen inkubaation jälkeen. MRSP:n runsas kasvu maljalla sekä muiden, ei-merkitsevien bakteerilajien niukka kasvu maljalla mahdollistavat kaikki jatkotutkimukset jo ensimmäisen inkubaation jälkeen. Tällöin pesäkkeistä saisi jo ensimmäisen tulosten luvun eli kasvun tulkinnan yhteydessä lajintunnistuksen MALDI-TOF:illa ja herkkyysmääritysviljelmän, eikä maljalta tarvitsisi tehdä hajotus- tai puhdasviljelmiä.

6.3 Maljojen vertailu tunnetuilla bakteerikannoilla

B-osiossa tunnettuja, pakastettuja bakteerikantoja käytettiin erilaisten bakteerilajien ja -kantojen kasvuominaisuuksien järjestelmällisempään arviointiin (kuvio 5). Tunnettuja kantoja viljelemällä pystyttiin tarkastelemaan syvällisemmin erilaisten normaalin mikrobiston bakteerien ilmenemistä, MIC-arvon vaikutusta MRSP:n kasvuun ja heikkojen positiivisten näytteiden kasvua eri maljoilla.



Kuvio 5. B-osion prosessikuvio.

Bakteeririkastettua maitoliuosta viljeltiin viljelysilmukalla pieni määrä puolitetuille veriagarmaljoille, joita inkuboitin yksi vuorokausi. Verimaljoille tehtyjä puhdasviljelyitä käytettiin kaikkiin tämän vaiheen osioihin. Tunnettuja pakastettuja kantoja viljeltiin maljoille suoraan puhdasviljelypesäkkeistä sekä laimennettuina että rikastettuina. Näiden lisäksi laimennoksia käytettiin simuloitujen seulontanäytteiden valmistukseen. Tunnettujen kantojen viljelmiä inkuboitin normaaliolosuhteissa (+35 °C) lämpöhuoneessa 19–24 tuntia. Kaikki B-osion maljat luki ainoastaan opinnäytetyön tekijä. Kantojen tutkimusprosessit tuloksineen kirjattiin Excel-taulukkuun.

6.3.1 Näytteet

Tunnettujen kantojen vertailuun käytettiin pakastettuja bakteerikantoja. Bakteerikantoja säilytettiin maitoon liuotettuina -80 °C -asteisessa pakastimessa. Putket otettiin pakastimesta vain viljelyn ajaksi, eikä niitä tarvinnut varsinaisesti sulattaa. Tutkimuksessa käytetyt kaupalliset kannat (ATCC) sekä YESLAB:n potilasnäytteistä (P) eristetyt kannat ja opetuskannat (O) oksasilliini-MIC-arvoineen (OX-MIC) on esitetty taulukoissa 3 ja 4. Osa MIC-arvoista on ilmoitettu lukuna > 16, koska 16 mg/L on suurin arvo, joka kysei-

sellä menetelmällä on pystytty määrittämään. *S. aureus*- ja *S. pseudintermedius*-kantojen tunnisteista ilmenee bakteerin laji, mahdollinen metisilliiniresistenssi ja kannan oksasilliini-MIC-arvo. Kaikkia B-osion näytteitä säilytettiin laboratorion jääkaapissa viimeiseen maljojen kasvun tulkinnan päivään asti, eli B-osion käytännön tutkimuksen valmistumiseen.

Taulukko 3. Tutkimuksessa käytetyt *S. aureus*- ja *S. pseudintermedius* -kannat ja niiden tunnistet sekä MIC-arvot. P; YESLAB:n potilaskanta, OX-MIC; oksasilliini-MIC-arvo.

Tunniste ja kantanumero	Bakteerilaji	OX-MIC (mg/L)
MRSA32 (ATCC 43300)	<i>S. aureus</i> (MRSA)	32
MRSA# (P-2070)	<i>S. aureus</i> (MRSA)	Ei tiedossa
MRSP16a (P-462)	<i>S. pseudintermedius</i> (MRSP)	> 16
MRSP16b (P-490)	<i>S. pseudintermedius</i> (MRSP)	> 16
MRSP4 (P-495)	<i>S. pseudintermedius</i> (MRSP)	4
MRSP1 (P-2500)	<i>S. pseudintermedius</i> (MRSP)	1
MRSP0,5 (P-2814)	<i>S. pseudintermedius</i> (MRSP)	0,5
MSSA0,25 (ATCC 25923)	<i>S. aureus</i> (MSSA)	0,25
MSSP0,12 (ATCC 49444)	<i>S. pseudintermedius</i> (MSSP)	0,12

Tutkimukseen haluttiin MRSP-kantojen lisäksi myös MRSA-kantoja, koska kaikki vertailtavat maljat ovat MRSA-maljoja. Lisäksi tutkittiin yleisimpiä koirien MRSA-MRSP-näytteiden kontaminantteja, jotka on esitetty taulukossa 4. Nämä kontaminantit ovat yleisimpiä koirien normaalin mikrobiston bakteereita, jotka kolonisoivat seulontanäytteiden näytteenottoalueita, kuten peräaukon seutua, ihoa ja limakalvoja.

Seulontanäytevertailussa maljoilta todettiin jonkin verran *Corynebacterium auriscanis*-bakteeria, joka kasvoi kaikilla muilla, paitsi OXMA:lla, josta sitä ei löytynyt kertaakaan. OXMA:lla on voinut olla tutkimusvaiheessa *C. auriscanis*-pesäkkeitä, mutta ne eivät ole näyttäneet MRSA- tai MRSP-epäilyttäviltä ja ovat siten helposti erotettavissa todellisista *S. aureus*- ja *S. pseudintermedius*-löydöksistä. Validoinnin toiseen vaiheeseen lisättiin *C. auriscanis*-kanta, koska bakteeri kuuluu koirien normaaliin mikrobistoon ja se saattoi olla sekoitettavissa MRSP-pesäkkeisiin vähintään kolmella neljästä maljasta. Maljoja todennäköisesti ei ole suunniteltu *C. auriscanis*in kasvun hillitsemiseen tai lajin erottumiseen, koska kaikki tutkittavat maljat on suunniteltu pääasiassa humaaninäytteiden tutkimiseen.

Taulukko 4. Tutkimuksessa käytetyt kannat, joilla tutkittiin normaalin mikrobiston bakteerien ilmenemistä.

Tunniste ja kantanumero	Bakteerilaji
STEP (ATCC 14990)	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
CORAU (2021-2848-8)	<i>Corynebacterium auriscanis</i>
Faecalis-A (ATCC 29212)	<i>Enterococcus faecalis</i>
Faecalis-B (O-66)	<i>Enterococcus faecalis</i>
Faecalis-C (O-67)	<i>Enterococcus faecalis</i>
Faecalis-D (O-68)	<i>Enterococcus faecalis</i>
FAECIUM-a (P-2570)	<i>Enterococcus faecium</i>
FAECIUM-b (P-1946)	<i>Enterococcus faecium</i>

Simuloituihin seulontanäytteisiin (osio B3) käytettiin taulukossa 3 esitettyjä MRSA- ja MRSP-kantoja sekä jo tutkittuja ja vastattuja koirien seulontanäytteitä. Seulontanäytteet olivat enintään kaksi viikkoa vanhoja rikasteita, joissa oli edelleen seulontanäytetikut mukana. Seulontanäytteet olivat MRSA:n ja MRSP:n suhteen negatiivisia. Kaikki rikasteet oli säilytetty jääkaapissa.

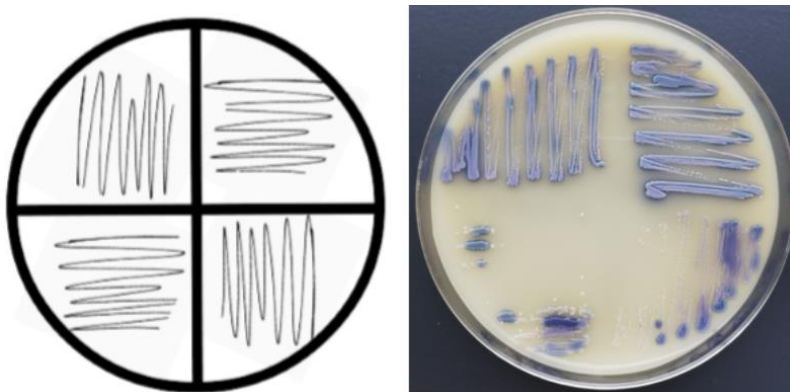
6.3.2 Toteutus

Näytteet viljeltiin järjestyksessä B1, B2.1, B2.2 ja B3. Näytteitä valmistettiin ja viljeltiin ja niiden tuloksia tarkasteltiin samoina päivinä inkubaatioaikojen mukaisesti (kuvio 6). Aina samana päivänä, kun tutkittiin ensimmäisen inkubaation jälkeiset maljat, tutkittiin päivää vanhemmat, toisen inkubaation jälkeiset maljat. B-osion viljelyt ja kasvun tulkinta toteutettiin viiden työpäivän aikana.

MA	pakastettujen kantojen puhdasviljelmät			
TI	B1: viljelyt	B2.1: laimennosten valmistus viljely	B2.2: laimennosten rikastus	B3: negatiivisten näytteiden kerääminen
KE	B1: 1. luku	B2.1: 1. luku	B2.2: viljely	B3: pmy-laskut näytteiden valmistus viljely
TO	B1: 2. luku	B2.1: 2. luku	B2.2: 1. luku	B3: 1. luku
PE			B2.2: 2. luku	B3: 2. luku

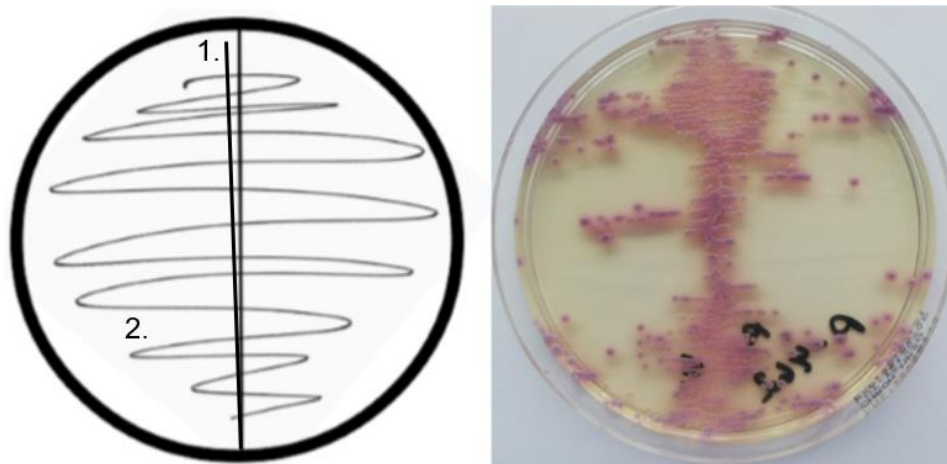
Kuvio 6. B-osion viikkoaikataulu. Luvulla tarkoitetaan bakteerikasvun visuaalista tarkastelua.

Tunnettujen kantojen kasvuominaisuuksia (osio B1) tutkittiin suoraviljelemällä bakteerimassaa MRSA-maljoille. Tunnettuja kantoja siirrostettiin veriagarmaljoilta suoraan tutkittaville maljoille sektoreittain (kuva 10). Suoraviljeltäviin bakteereihin kuului kaksi MRSA-, viisi MRSP-, neljä *E. faecalis*- ja kaksi *E. faecium* -kanta sekä yhden MSSA-, MSSP- ja *S. epidermidis* -kannat (taulukot 3 ja 4). Jokainen tutkittava MRSA-malja jaettiin neljään osaan ja sektorit nimettiin bakteeritunnisteilla. Veriagarmaljojen puhdasviljelmistä otettiin viljelysilmukalla pieni määrä haluttua bakteerimassaa ja viljeltiin se yksinkertaisella siksak-kuviolla bakteerilajia tai -kanta vastaavalle MRSA-maljan sektorille. Maljoja inkuboitettiin yhteensä kaksi vuorokautta ja kasvuominaisuudet kirjattiin kummankin inkubaation jälkeen.



Kuva 10. B1-osiossa yhdelle maljalle viljeltiin neljää eri näytettä (vas.). Erilaisia MRSP-kantoja OXMA:lla (oik.).

Pienten MRSA- ja MRSP-bakteerimäärien kasvuominaisuuksia (osio B2) tutkittiin tekemällä taulukon 3 (s. 30) MRSA- ja MRSP-kannoista laimennoksia (taulukko 5). Puhdasviljelmien bakteeripesäkkeistä tehtiin turbiditeetiltaan 0,5 McFarlandia vastaavat suspensiot. Puhdasviljelmistä siirrettiin viljelysautavalla pieni määrä bakteerikasvustoa natriumkloridiputkeen, joka sekoitettiin sekoittajalla (Vortex V-1 plus, Biosan) ja mitattiin nefelometrilla (DensiCHEK plus, Biomérieux). Laimennokset tehtiin sarjana, lisäämällä automaattipipetillä (m1000, BIOHIT) 200 µl bakteerisuspensiota 1,8 millilitraan 0,9-prosenttista natriumkloridia. 10^{-1} -laimennos tehtiin lisäämällä natriumkloridiputkeen 200 µl 0,5 McFarlandia vastaavaa suspensiota, ja muihin natriumkloridiputkiin aina edellistä valmistettua laimennosta 200 µl. Laimennokset viljeltiin rikastamattomina (osio B2.1) kvantitatiivisesti ja säilytettiin jääkaapissa. Kvantitatiivinen viljely toteutettiin kastamalla 10 µl:n viljelysilmukkaa laimennoksessa ja vetämällä silmukkaa maljan poikki kerran edestakaisin niin, että silmukan nestekupla rikkoutuu vedetyille viivoille. Tämän jälkeen viivat hajotettiin koko maljan pinta-alan peittävällä siksak-kuviolla, joka tehtiin samalla silmukalla (kuva 11). 10^{-1} -, 10^{-2} - ja 10^{-3} -laimennokset säilytettiin myös mahdollista jatkokäyttöä varten. Laimennokset viljeltiin MRSA-maljoille, minkä lisäksi laimennokset viljeltiin veriagarmaljoille duplikaatteina eli kaksoiskappaleina. Veriagarmaljat toimivat laimennosten kontrollimaljoina. Kaikkia maljoja inkuboitii yhteensä kaksi vuorokautta ja pesäkeluvut kirjattiin kummankin inkubaation jälkeen.



Kuva 11. B2-osiossa näytteet viljeltiin kvantitatiivisesti (vas.), mikä mahdollisti pesäkelaskun. Rikastettu MRSP-laimennos TACM:lla (oik.)

Laimennokset myös rikastettiin (B2.2) lisäämällä kutakin 10^{-4} -, 10^{-5} - ja 10^{-6} -laimennosta rikasteeseen 10 µl:n silmukalla. Myös rikastetut laimennokset viljeltiin kvantitatiivisesti MRSA-maljoille, joiden lisäksi ne viljeltiin veriagarmaljoille duplikaatteina (liite 3). Kaikkia maljoja inkuboitii yhteensä kaksi vuorokautta ja pesäkeluvut kirjattiin kummankin inkubaation jälkeen.

Taulukko 5. MRSA- ja MRSP-laimennosten laimennossuhteet ja laimennosliuoksen koostumus sekä kunkin laimennoksen arvioitu laskennallinen bakteerimäärä ja pesäkkeitä muodostavien yksiköiden määrä. NaCl; natriumkloridi, pmy; pesäkkeitä muodostava yksikkö.

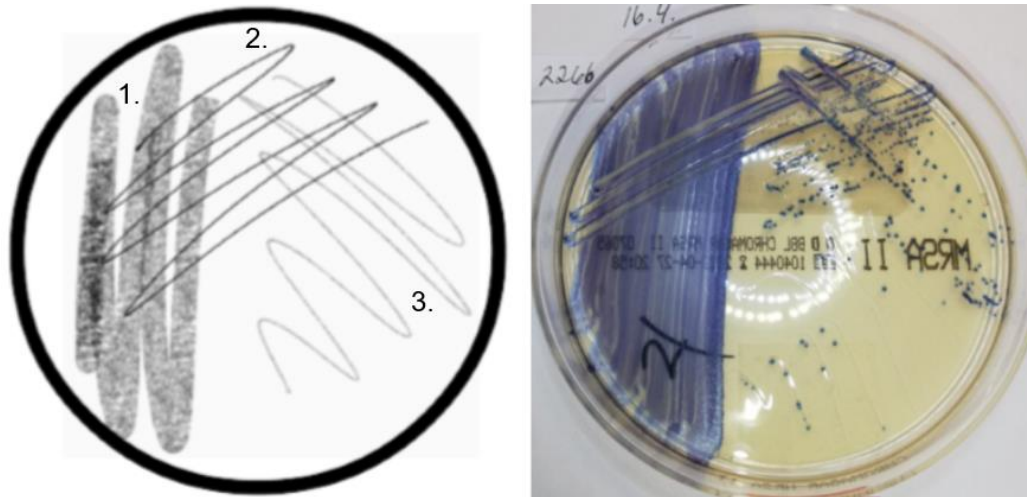
Näyte	Laimennossuhde	Laimennosliuoksen koostumus	Bakteerisoluja arviolta	pmy/ml
McF	0,5 McFarland	NaCl + bakteerimassaa	$1,5 \times 10^8$	75 M
10⁻¹	1 : 10	1,8 ml Nacl + 0,2 ml McF	$1,5 \times 10^7$	7,5 M
10⁻²	1 : 100	1,8 ml Nacl + 0,2 ml 10 ⁻¹	$1,5 \times 10^6$	750 000
10⁻³	1 : 1 000	1,8 ml Nacl + 0,2 ml 10 ⁻²	$1,5 \times 10^5$	75 000
10⁻⁴	1 : 10 000	1,8 ml Nacl + 0,2 ml 10 ⁻³	$1,5 \times 10^4$	7 500
10⁻⁵	1 : 100 000	1,8 ml Nacl + 0,2 ml 10 ⁻⁴	$1,5 \times 10^3$	750
10⁻⁶	1 : 1 000 000	1,8 ml Nacl + 0,2 ml 10 ⁻⁵	$1,5 \times 10^2$	75

Simuloidut seulontanäytteet (osio B3) tehtiin osiossa B2.1 valmistetuista laimennoksista ja negatiivisista seulontanäytteistä. Simulointiin käytettiin neljää MRSP-kantaa (MIC-arvot >16, 4, 1 ja 0,5) ja kahta MRSA-kantaa sekä kahta näiden yhdistelmää (taulukko 6). MRSA-MRSP-negatiivisiksi todettuja seulontanäytteitä sisältäviin rikasteputkiin lisättiin 1 ml kunkin bakteerin rikastamattomaa 10⁻⁴-laimennosta. Laskennalliset laimennosten PMY-määrät on laskettu kunkin rikastamattoman liuoksen kasvusta veriagarmaljalla (liite 2, TSA-SB). Näytteisiin lisättiin 10⁻⁴-laimennoksia, koska kaikissa simulointiin käytettyjen kantojen 10⁻⁴-laimennoksissa oli laskennallisesti 7 500 pmy/ml, joka on vaaditun bakteerimäärän 1 000 - 10 000 pmy/ml rajoissa (taulukko 5). MRSA-MRSP-yhdistelmänäytteisiin lisättiin 0,5 ml molempien bakteerien laimennoksista.

Taulukko 6. Simuloitujen seulontanäytteiden sisältämät MRSA- ja MRSP-kannat ja kantojen laimennossuhteet. Laimennoksia ei ole rikastettu. SIM; simuloitu seulontanäyte, P; potilasnäyte.

	Seulontanäyte + bakteerikanta	Kantaliuoksen laimennossuhde
SIM 1	P1 + MRSP16a + MRSA#	1 : 10 000 (10 ⁻⁴)
SIM 2	P2 + MRSP1 + MRSA32	1 : 10 000 (10 ⁻⁴)
SIM 3	P3 + MRSP16a	1 : 10 000 (10 ⁻⁴)
SIM 4	P4 + MRSP4	1 : 10 000 (10 ⁻⁴)
SIM 5	P5 + MRSP1	1 : 10 000 (10 ⁻⁴)
SIM 6	P5 + MRSP0,5	1 : 10 000 (10 ⁻⁴)
SIM 7	P7 + MRSA32	1 : 10 000 (10 ⁻⁴)
SIM 8	P8 + MRSA#	1 : 10 000 (10 ⁻⁴)

Yhdistelmänäytteisiin käytettiin MRSA-MRSP-pareja, joilla oli keskenään mahdollisimman lähekkäiset MIC-arvot. Simuloidut seulontanäytteet viljeltiin MRSA-maljoille inkuboitumattomina ja tavanomaisella hajotusviljelytyylillä (kuva 12). Maljoja inkuboitettiin yhteensä kaksi vuorokautta ja tulokset kirjattiin kummankin inkubaation jälkeen. Seulontanäytteiden sisältämistä muista bakteerilajeista ei ollut tietoa, kuten ei normaalistikaan seulontanäytteitä tutkittaessa.



Kuva 12. A- ja B3-osioissa näytteet viljeltiin tavanomaisella hajotustyyllillä (vas.). A-osion negatiivinen seulontanäyte BDCM:lla (oik.).

6.3.3 Tulosten analysointi ja maljan valinnan kriteerit

B1-osiossa tarkasteltiin bakteerien yleisiä kasvuominaisuuksia eri alustoilla. Tarkasteltavia kasvuominaisuuksia olivat kasvun runsaus, väritys ja pigmentin muodostuminen sekä mahdollisesti erottuvien yksittäispesäkkeiden morfologia. Runsaskasvuisista bakteerikanoista ei välttämättä muodostunut yksittäispesäkkeitä. B1-osiossa tarkasteltiin maljojen ominaisuuksia yleisimpien MRSP-seulontanäytteiden bakteerien suhteen. B1-osio oli tarkoitettu antamaan lisätietoa bakteerien kasvusta maljoilla sekä alustamaan ja tukemaan muita tutkimuksen osioita.

B2-osiossa tarkasteltiin heikkojen negatiivisten näytteiden kasvua viljelemällä maljoille pieniä pitoisuuksia MRSA:ta ja MRSP:tä. Viljelmistä kasvaneiden pesäkkeiden määrät laskettiin havaitsemisrajan määrittämiseksi. Havaitsemisraja kertoo, kuinka pieniä pitoisuuksia MRSP:tä maljoilta voidaan luotettavasti havaita. Laimennosten toivottiin kasvavan valittavalla maljalla pieninäkin pitoisuuksina viimeistään rikastettuina.

B3-osiossa simuloitujen seulontanäytteiden kasvua arvioitiin silmämääräisesti. Simuloidut potilasnäytteet valmistettiin pienillä MRSA- ja MRSP-bakteerimäärillä, koska osion tarkoitus oli tarkastella heikkojen positiivisten näytteiden kasvua maljoilla. B3-osiossa pienet bakteerimäärät yhdistyivät seulontanäytteille tyypilliseen sekamikrobistoon. B3-osio suunniteltiin täydentämään A- ja B2-osioita. Simulaatiolla haluttiin myös tarkastella MRSA:ta ja MRSP:tä sisältävien näytteiden kasvua yhteisellä maljalla. Seulontanäytteiden, joissa on sekä MRSA:ta että MRSP:tä, toivottiin erottelevan MRSA ja MRSP toisistaan selvästi ja molempien kasvavan tunnistettavana toisistaan huolimatta.

7 Tulokset

Maljoista otettujen valokuvien värisävyt ovat vain viitteellisiä eivätkä vastaa täsmällisesti paljaalla silmällä nähtäviä. Värisävyjen vaihteluun vaikuttavat mm. kuvauksessa käytetty valonlähde ja kuvien tarkasteluun käytettävä näyttö. Pesäkkeiden morfologian kuvailu on myöskin jokseenkin subjektiivista ja morfologia voi vaihdella myös bakteerilajin sisällä.

7.1 Seulontanäytevertailu

Vertailussa viljeltiin yhteensä 53 näytettä, joista MRSP:tä löytyi kuudesta, MSSP:tä neljästä ja MSSA:ta yhdestä näytteestä. MRSA:ta ei löytynyt. MSSA:ta löytyi vain OXMA:lta, jossa sitä oli yksi pesäke toisen inkubaation jälkeen. MSSP:tä löytyi yhdestä näytteestä kaikilta maljoilta, yhdestä näytteestä TACM:lta ja kahdesta näytteestä OXMA:lta. Kaikki MSSP-löydökset tehtiin toisen inkubaation jälkeen. MRSP-löydösten värit ja löytymispäivät inkubaation mukaan on esitetty taulukossa 7. Löydökset on merkitty SP-tunnisteella (*Staphylococcus pseudintermedius*) sekä numeroin yhdestä kuuteen, jotka vastaavat tiettyjä tutkimuksissa käytettyjä näytenumeroita. Osa löydöksistä on tehty verimaljalta (TSA-SB) hajotusviljelmistä, mutta ne eivät ole toisensa inkubaation jälkeen näkyneet sillä selektiivisellä maljalla, josta hajotusviljelmä on tehty. Jotkin ensimmäisen inkubaation jälkeen kasvaneet pesäkkeet saattoivat olla suurempia ja tummempia toisen inkubaation jälkeen, mutta ne eivät muuttuneet merkittävästi.

Taulukko 7. Vertailussa käytettyjen seulontanäytteiden MRSP-löydökset. VA; valkoinen, VS; vaaleansininen, L; lila, SL; sinilila, VP; vaaleanpunainen, x; ei MRSA/P-epäilyttävää kasvua, TSA-SB; verimaljalta tehty löydös.

	BRMS		OXMA		TACM		BDCM	
	1 vrk	2 vrk	1 vrk	2 vrk	1 vrk	2 vrk	1 vrk	2 vrk
SP 1	x	TSA-SB	VS	VS	x	TSA-SB	x	x
SP 2	VP	VP	L	L	L	L	L	L
SP 3	VP	VP	SL	SL	x	VA	x	VA
SP 4	x	x	VS	VS	x	x	x	x
SP 5	x	VP	VS	VS	x	L	L	L
SP 6	x	VP	VS	VS	x	TSA-SB	L	L

7.1.1 Seulontanäytteet BRMS-malja

Tutkittavien maljojen ominaisuuksia MRSP:n suhteen verrattiin BRMS-maljaan, koska BRMS-maljalle haettiin korvaavaa, parempaa maljaa. Taulukoissa 8, 9 ja 10 on esitetty kunkin kolmen maljan MRSP-epäilyttävä (*S. pseudintermediuksen* näköinen) kasvu (POS) ja ei-MRSP-epäilyttävä (ei *S. pseudintermediuksen* näköinen) kasvu (NEG).

Taulukko 8. Seulontanäytteiden todelliset löydökset ristiintaulukoituna BRMS:n MRSP-epäilyttävien (POS) ja ei-MRSP-epäilyttävien (NEG) löydösten kanssa.

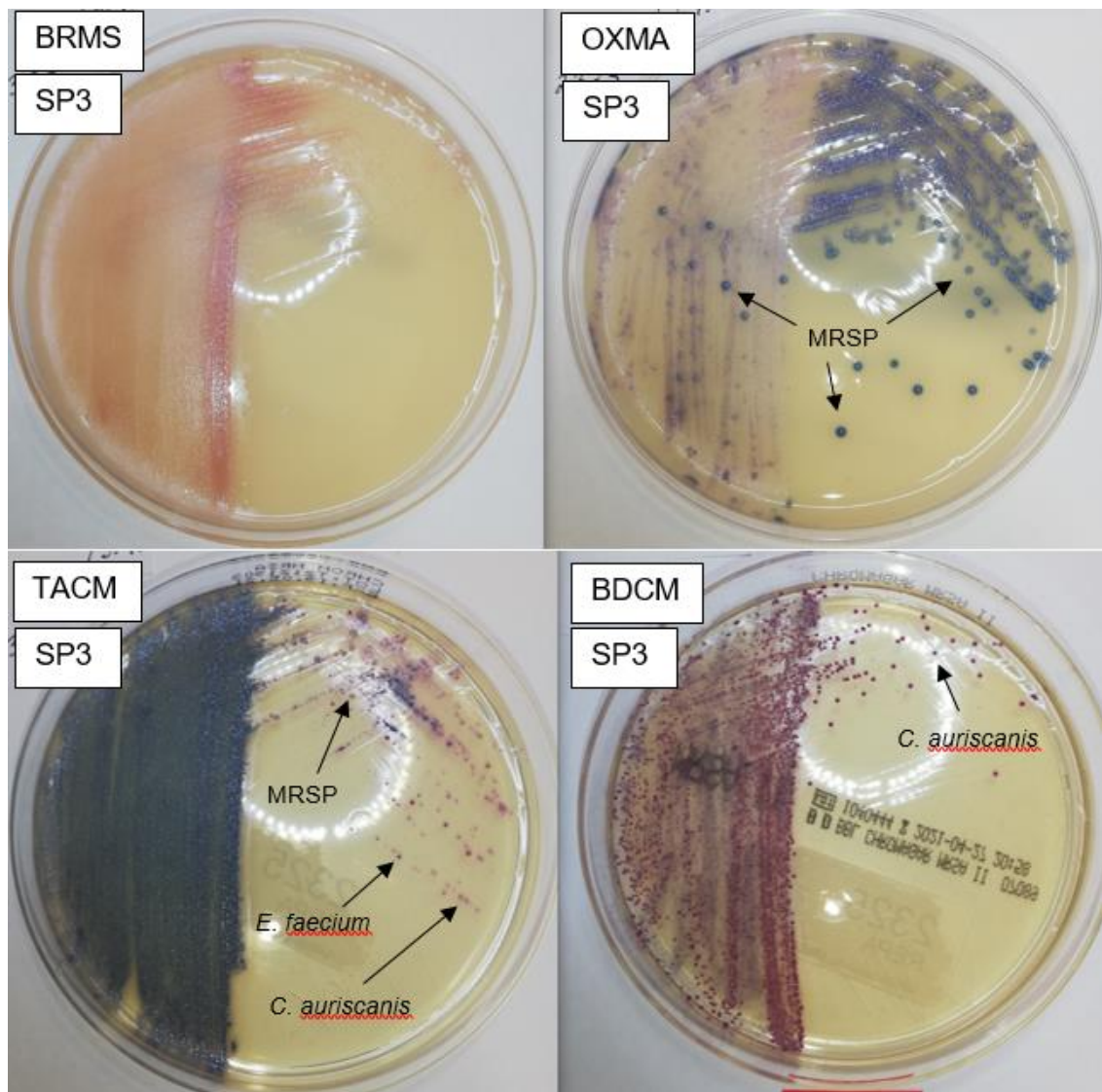
		Todelliset löydökset		
		POS	NEG	YHT.
BRMS	POS	4	19	23
	NEG	2	28	30
	YHT.	6	47	53

53:sta viljellystä seulontanäytteestä yhteensä 23 näytettä kasvoi BRMS:lla MRSP-epäilyttävän näköisenä. Näistä 20 näytettä vaati jatkotutkimuksia ensimmäisen inkubaation jälkeen ja kolme näytettä toisen inkubaation jälkeen. Negatiivisen näköisinä kasvoi 30 näytettä.

$$\text{herkkyys} = \frac{4}{4+2} \approx 0,66 \quad \text{spesifisyys} = \frac{28}{19+28} \approx 0,59$$

Kuvio 7. BRMS-maljan herkkyys ja spesifisyys.

BRMS:n herkkyys on 66 % ja spesifisyys 59 % (kuvio 7). BRMS-maljalla eniten MRSP-tyypillistä kasvua muistuttivat *C. auriscanis* ja *Rothia nasimurium* sekä erinäiset enterokokkilajit (kuva 13), mukaan lukien *Enterococcus hirae* ja *Enterococcus gallinarum*. Suurimman osan tarpeettomia jatkotutkimuksia aiheuttivat toiset stafylokokit, useimmiten *S. haemolyticus*, *S. epidermidis* tai *S. cohnii*. Positiiviselta näyttävistä 23:sta näytteestä neljä näytettä todettiin BRMS:lla MRSP-positiiviseksi ensimmäisen tai toisen inkubaation jälkeen, eli 17,4 % jatkotutkimuksia vaatineista viljelmistä oli MRSP-positiivisia. BRMS-maljalla runsaanakin kasvavista MRSP-pesäkkeistä ei yleensä saatu ensimmäisen inkubaation jälkeen tehtyä herkkyysmäärittystä, koska pesäkkeet olivat liian pieniä, pesäkkeet eivät olleet riittävän erillään muista kasvavista bakteerilajeista tai pesäkkeitä ei vielä voinut varmistaa *S. pseudintermedius*-lajisiksi. Kuvassa 13 on maljalle tyypillinen vaalea lohenpunainen MRSP-pigmenti ja alkavaa pesäkekasvua.



Kuva 13. MRSP-positiivinen SP3-näyte kaikilla tutkittavilla maljoilla ensimmäisen inkubaation jälkeen.

Taulukoissa 9, 10 ja 11 ei ole eritelty ensimmäisen ja toisen inkubaation jälkeisiä löydöksiä, vaan ainoastaan kasvun ilmeneminen epäilyttävänä tai ei-epäilyttävänä. Niitä löydöksiä, jotka ovat näyttäneet positiivisilta ensimmäisen vuorokauden jälkeen, ei ole enää laskettu positiivisen näköiseksi toisen vuorokauden jälkeen. Negatiivisia tuloksia ei voi erotella ensimmäisen ja toisen inkubaation jälkeisiksi, koska toisen inkubaation jälkeinen negatiivinen on ollut negatiivinen jo ensimmäisen inkubaation jälkeen. Negatiivinen tulos nimittäin voi muuttua positiiviseksi, mutta positiivinen ei negatiiviseksi.

7.1.2 Seulontanäytteet OXMA-maljalla

53:stä seulontanäytteestä yhteensä 21 näytettä kasvoi OXMA:lla MRSP-epäilyttävän näköisenä (taulukko 9). Näistä 12 näytettä vaati jatkotutkimuksia jo ensimmäisen inkubaation jälkeen ja yhdeksän näytettä toisen inkubaation jälkeen. Negatiivisen näköisinä kasvoi 32 näytettä.

Taulukko 9. Seulontanäytteiden todelliset löydökset ristiintaulukoituna OXMA:n MRSP-epäilyttävien (POS) ja ei-MRSP-epäilyttävien (NEG) löydösten kanssa.

		Todelliset löydökset		
		POS	NEG	YHT.
OXMA	POS	6	15	21
	NEG	0	32	32
	YHT.	6	47	53

OXMA:lla ei kasvanut montaa MRSP-epäilyttävää lajia. Useimmiten enterokokit kasvoivat pieninä ja vaihtelevan sävyisinä vaaleanpunaisina, mutta joissain tapauksissa ne saattoivat olla sinertäviä ja muistuttaa nuoria MRSP-pesäkkeitä. *S. epidermidis* kasvoi joistain näytteistä vaaleansinisenä ja stafylokokkimaisen pyöreinä, ja oli siten sekoitettavissa *S. pseudintermedius* -pesäkkeiksi. *Bacillus licheniformis* saattoi myös kasvaa vaaleansinisenä, mutta oli muutoin morfologialtaan aina riittävän erilainen stafylokokkeihin nähden, eikä siksi muutoin muistuttanut *S. pseudintermediusta*. Kuvassa 13 (s. 38) on MRSP-positiivinen seulontanäyte, jonka *S. pseudintermedius* -pesäkkeistä pystyi tekemään herkkyysmäärittelyn jo ensimmäisen inkubaation jälkeen, koska erillis-pesäkkeistä sai luotettavasti MALDI-TOF-tunnistuksen ja herkkyysmäärittelyn.

$$\text{herkkyys} \frac{6}{6+0} = 1 \quad \text{spesifisyys} \frac{32}{15+32} \approx 0,68$$

Kuvio 8. OXMA-maljan herkkyys ja spesifisyys.

OXMA:n herkkyys on 100 % ja spesifisyys 68 % (kuvio 8). OXMA:lla on ollut vähemmän MRSP-epäilyttävää kasvua ($n = 21$), kuin BRMS:lla ($n = 23$). OXMA:lla on myös todettu MRSP-löydöksiä (taulukko 7, s. 37) useammin ensimmäisen inkubaation jälkeen ($n = 6$), kuin BRMS:lla ($n = 2$). Positiiviselta näyttävistä 21:sta viljelmästä kuusi todettiin OXMA:lla MRSP-positiiviseksi, eli 28,6 % jatkotutkimuksia vaatineista viljelmistä oli MRSP-positiivisia. BRMS-maljalta tehtyjen MRSP-löydösten osuus epäilyttävistä pesäkkeistä on tätä pienempi (17,4 %).

7.1.3 Seulontanäytteet TACM-maljalla

53:stä seulontanäytteestä MRSP-epäilyttävän näköisenä kasvoi TACM:lla yhteensä 37 näytettä (taulukko 10), joista jatkotutkimuksia vaati 30 näytettä ensimmäisen inkubaation jälkeen ja seitsemän näytettä toisen inkubaation jälkeen. Negatiivisen näköisinä kasvoi 16 näytettä.

Taulukko 10. Seulontanäytteiden todelliset löydökset ristiintaulukoituna TACM:n MRSP-epäilyttävien (POS) ja ei-MRSP-epäilyttävien (NEG) löydösten kanssa.

		Todelliset löydökset		
		POS	NEG	YHT.
TACM	POS	3	34	37
	NEG	3	13	16
	YHT.	6	47	53

TACM-maljalla MRSP-epäilyttäviltä näyttivät *Rothia nasimurium* ja *Staphylococcus saprophyticus* sekä monet enterokokit, joista yleisimmin MRSP-kasvuun sekoitetut olivat *Enterococcus hirae* ja *Enterococcus gallinarum*. Kuvassa 13 (s. 38) kasvaa MRSP-pesäkkeitä poikkeuksellisesti valkeina. Pesäkkeitä ei saatu tunnistettua suoraan maljalta, koska kasvu oli sekaista, ja siitä jouduttiin tekemään hajotusviljelämä.

$$\text{herkkyys} \quad \frac{3}{3+3} = 0,5 \quad \text{spesifisyys} \quad \frac{13}{34+13} \approx 0,28$$

Kuvio 9. TACM-maljan herkkyys ja spesifisyys.

TACM-maljan herkkyys on 50 % ja spesifisyys 28 % (kuvio 9). Maljalla on ollut enemmän MRSP-epäilyttävää kasvua ($n = 37$), kuin BRMS:lla ($n = 23$). TACM:lla on myös todettu MRSP-löydöksiä harvemmin ensimmäisen inkubaation jälkeen ($n = 1$), kuin BRMS:lla ($n = 2$). Positiiviselta näyttävistä 37:sta näytteestä kolme näytettä todettiin TACM:lla MRSP-positiiviseksi ensimmäisen tai toisen inkubaation jälkeen. Näin 8,1 % jatkotutkimuksia vaatineista viljelmistä oli MRSP-positiivisia, mikä on vähemmän, kuin BRMS:n maljan löydösosuus (17,4 %).

7.1.4 Seulontanäytteet BDCM-maljalla

BDCM-malja jätettiin seulontanäytteiden viljelyn jälkeen pois validoinnin toisesta vaiheesta eli B-osiosta. MRSP ei näkynyt maljalla riittävän tunnistettavana verrattuna muihin sillä kasvaviin bakteerilajeihin. BDCM:lla myös kasvoi paljon koirien normaalin mikrobiston bakteereita, joiden seasta oli haastavaa tehdä mahdollisia MRSP-löydöksiä. MRSP-pesäkkeiden morfologia vaihteli BDCM:lla enemmän, kuin muilla maljoilla (kuva 4, s. 10), ja MRSP:n ilmeneminen maljalla oli jokseenkin epä johdonmukaista, mahdollisesti MRSP:n erilaisista kannoista riippuen. Maljoilla myös oli paljon valuvaiheessa syntyneitä ilmakuplia, jotka hankaloittivat viljelyn tulkintaa varsinkin ensimmäisen inkubaation jälkeen, kun pesäkkeet olivat ajoittain pistemäisen pieniä (kuva 14).



Kuva 14. Pieniltä pesäkkeiltä näyttäviä ilmakuplia pigmentin alla BDCM-maljoilla.

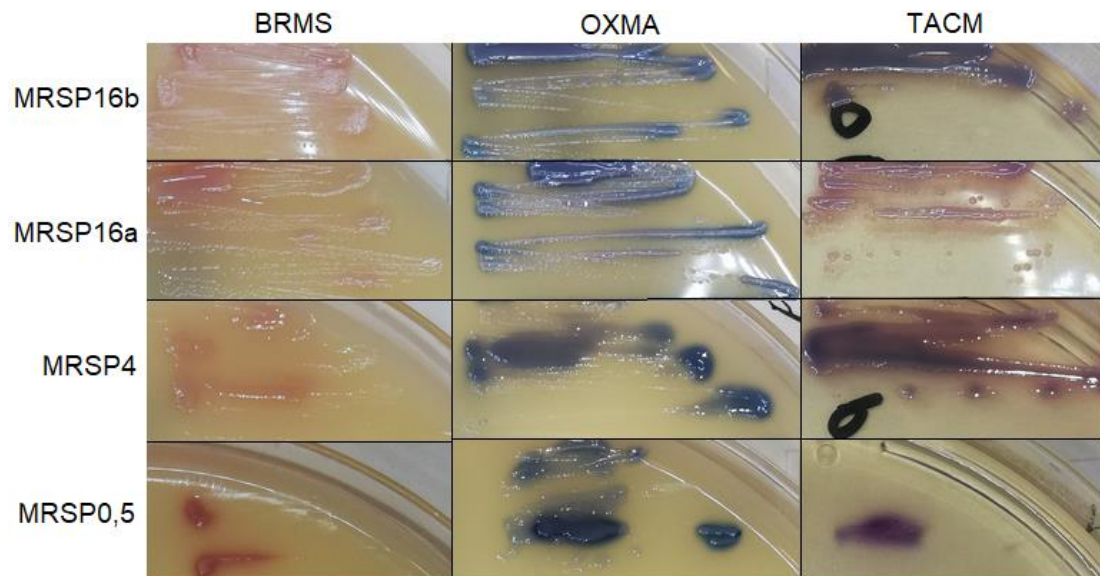
Seulontanäytteiden tuloksista ei ole tehty taulukkoa, jossa vertaillaan BDCM-maljaa BRMS-maljaan, koska BDCM:n pesäkemorfologiasta on ollut vaikea tehdä yhdenpitäviä johtopäätöksiä, joilla validointiparametreja pystyisi laskemaan. Maljan tuloksia ei myöskään ole analysoitu, koska sen hylkäämisestä tehtiin päätös jo tässä validointivaiheessa. Kuvassa 13 (s. 38) on maljalle viljelty MRSP-positiivinen seulontanäyte, jonka MRSP-pesäkkeet eivät kasvaneet maljalla ensimmäisen inkubaation jälkeen, ja toisen inkubaation jälkeen kasvoivat valkoisina. Enterokokit kasvoivat maljalla useimmiten runsaina, ja muista tutkituista maljoista poiketen BDCM:lla kasvoi *Proteus mirabilis*, joka oli ajoittain sekoitettavissa *S. pseudintermedius* -pesäkkeiksi. Eniten MRSP:tä maljalla kuitenkin muistuttivat enterokokit ja *Rothia nasimurium* sekä joissain näytteissä *Corynebacterium auriscanis*, joka kasvoi maljalla vaihtelevan värisenä.

7.2 Vertailu tunnetuilla bakteerikannoilla

Tunnettujen bakteerikantojen viljelytuloksia on esitetty liitteissä 1, 2, 3 ja 4. Pesäkemäärät on mahdollisuuksien mukaan laskettu ja ilmoitettu semikvantitatiivisesti. BDCM-malja ei enää kuulunut tähän validoinnin vaiheeseen.

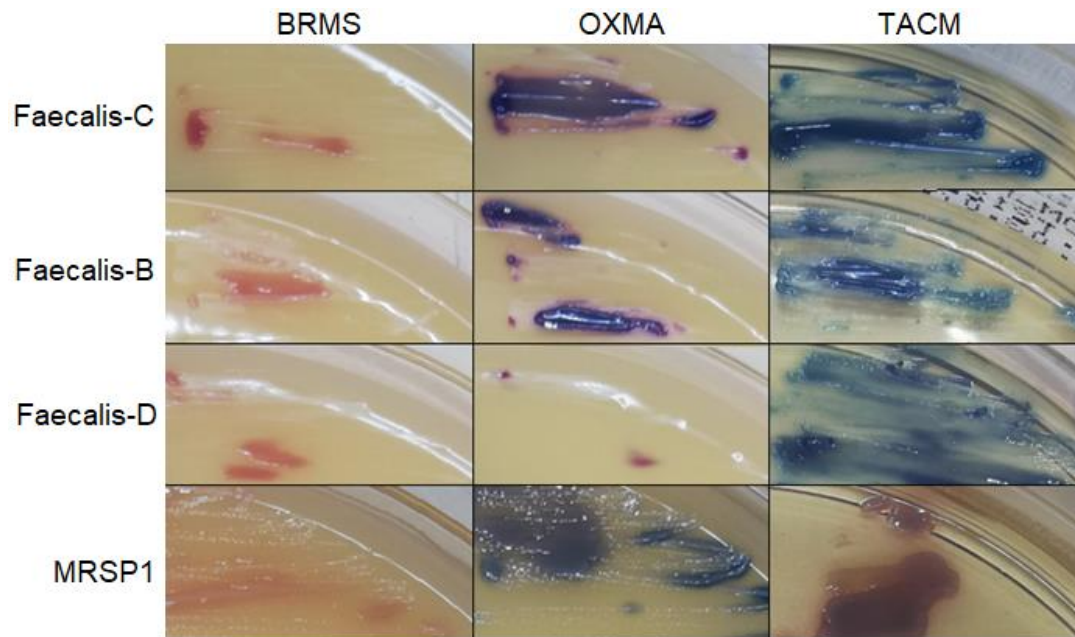
7.2.1 Tunnettujen kantojen kasvuominaisuudet

MRSP-kannat kasvoivat BRMS-maljalla pääosin haaleina lohenpunaisina pesäkkeinä ja OXMA-maljalla pääosin pastellin sävyisinä sinililoina (kuva 15). MRSP kasvoi TACM-maljalla vaaleanpunaisina, liloina tai sinisinä pesäkkeinä (kuva 15). Suorasiirrostickuksessa MRSP-kannat vaikuttivat kasvavan niukkimmin TACM-maljalla ja runsaimmin OXMA-maljalla. MRSP-kannat kasvoivat BRMS-maljalla lähes yhtä runsaina, kuin OXMA-maljalla. MSSA- ja MSSP-kannat muodostivat pigmenttiä kaikille maljoille, mutta kumpikaan kanta ei kasvanut pesäkkeinä. MRSA kasvoi runsaana kaikilla maljoilla ja muodosti tummia pigmenttejä kaikille maljoille.



Kuva 15. MRSP-kantoja BRMS-, OXMA- ja TACM-maljoilla ensimmäisen inkubaation jälkeen.

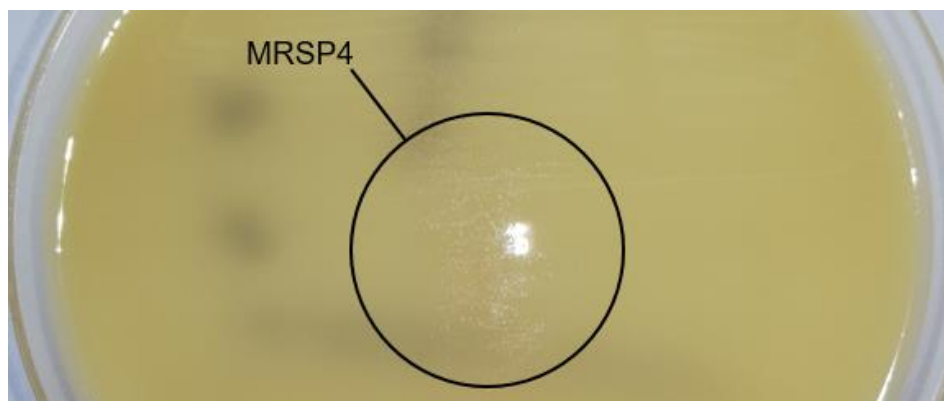
Tutkittu *Staphylococcus epidermidis* -kanta muodosti vähän pigmenttiä OXMA:lla, mutta ei muilla maljoilla, eikä kasvattanut pesäkkeitä millään maljalla. *Corynebacterium auriscanis* -kanta kasvoi ainoastaan TACM-maljalla. *Enterococcus faecium* -kannat kasvoivat hieman *Enterococcus faecalis* -kantoja paremmin OXMA:lla, mutta molemmat tekivät erilaista pigmenttiä, kuin MRSA ja MRSP (kuva 16). Enterokokkien kasvuominaisuuksissa ei ollut suuria eroja TACM-maljalla. Molemmat enterokokkikannat kasvoivat BRMS-maljalla yhtä hyvin, mutta muodostivat vaaleanpunaista pigmenttiä, joka voi olla sekoitettavissa MRSP:n samankaltaiseen pigmenttiin (kuva 16). TACM-maljan pigmentin muodostuksessa oli eniten vaihtelua bakteerilajien ja saman lajin eri kantojen välillä.



Kuva 16. *E. faecalis*-kantoja ja MRSP-kanta BRMS-, OXMA- ja TACM-maljoilla ensimmäisen inkubaation jälkeen.

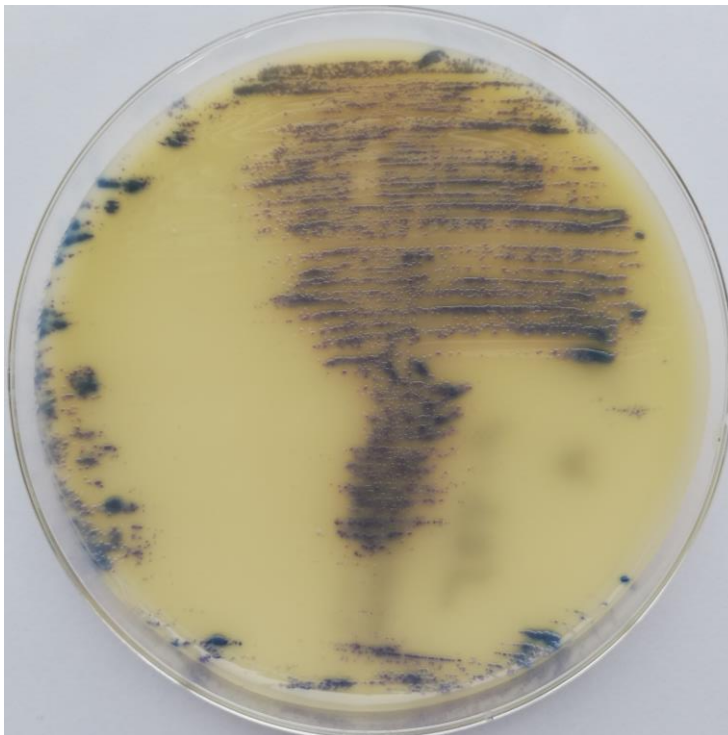
7.2.2 Pienten MRSA- ja MRSP-bakteerimäärien kasvuominaisuudet

Liitteen 4 tulosityhteenvedossa pesäkeluvut on muutettu asteikosta +...++++ asteikkoon 1–4 pienten bakteerimäärien kasvamisen laskemiseksi. Näitä arvoja tarvitaan keskiarvojen laskemiseen, vaikka ne eivät ole tarkkoja. Jos, esimerkiksi, kasvun keskiarvoksi tulee 0,5, kasvaa se silloin +...++ arvoisesti, eli kyseisen laimennoksen bakteerikantaa kasvaa maljalla keskimäärin 1–100 pesäkettä. Keskiarvolukemat ovat suuntaa antavia, koska jo alkuperäisellä +...++++ -asteikolla kasvua on arvioitu suurpiirteisesti, eikä ordinaaliasteikon arvoja voi käyttää luotettavan keskiarvon tai havaitsemisrajan laskemiseen.

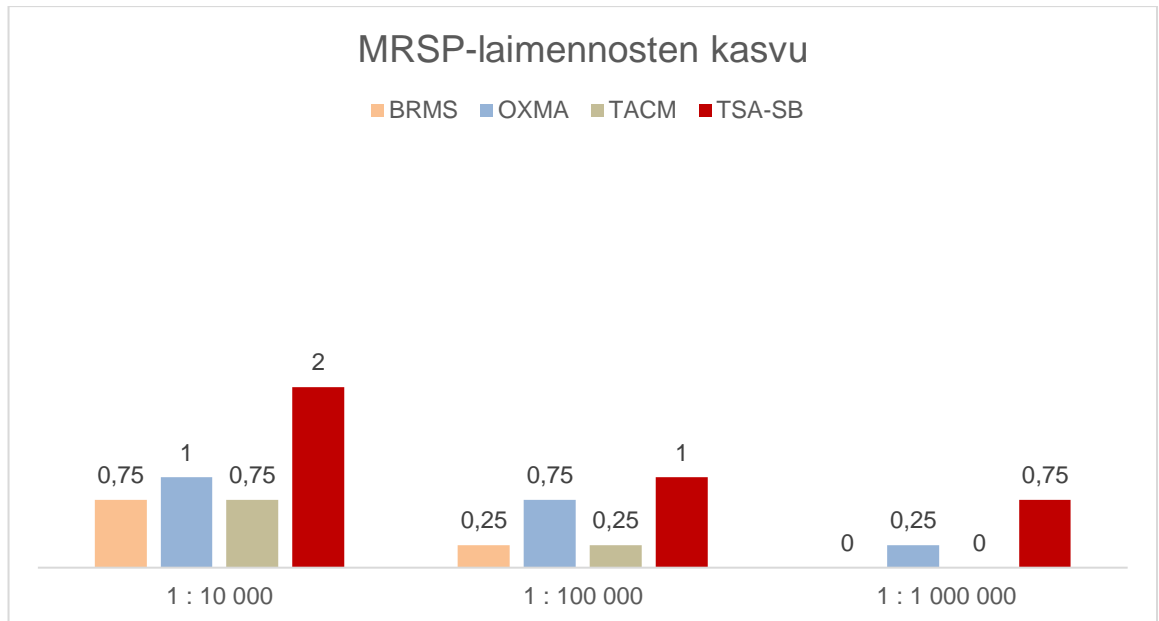


Kuva 17. Rikastettu 1 : 10 000 -MRSP-laimennos (MIC 4 mg/L) toisen inkubaation jälkeen BRMS:lla.

Pesäkkeet, jotka on merkitty liitteisiin 1–4 asteriskilla (*) ovat kasvaneet pistemäisen pieninä, eikä niistä pystyisi tunnistamaan bakteerilajia sen kasvaessa tavallisesta seulonnanäytteestä. Näin pienistä pesäkkeistä ei myöskään pysty tekemään MALDI-TOF-typitystä tai herkkyysmäärittystä. MRSP4-kannan rikastettu 10^{-4} -laimennos kasvoi BRMS:lla pistemäisinä pesäkkeinä, joita ei pystyisi tunnistamaan MRSP-kasvuksi, eikä laskemaan tai hyödyntämään sellaisenaan jatkotutkimuksiin (kuva 17). Vastaava näyte kasvoi OXMA:lla myös pieninä, mutta runsaslukuisina ja tunnistettavan värisinä pesäkkeinä (kuva 18).

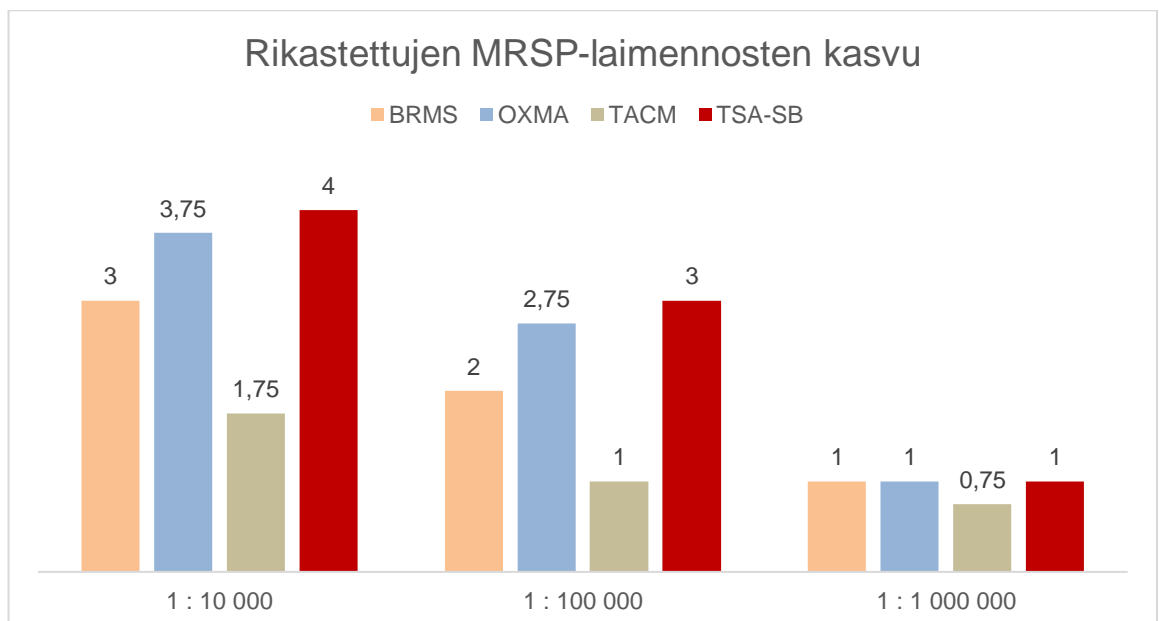


Kuva 18. Rikastettu 1 : 10 000 MRSP4-kannan laimennos (MIC 4 mg/L) toisen inkubaation jälkeä OXMA:lla.

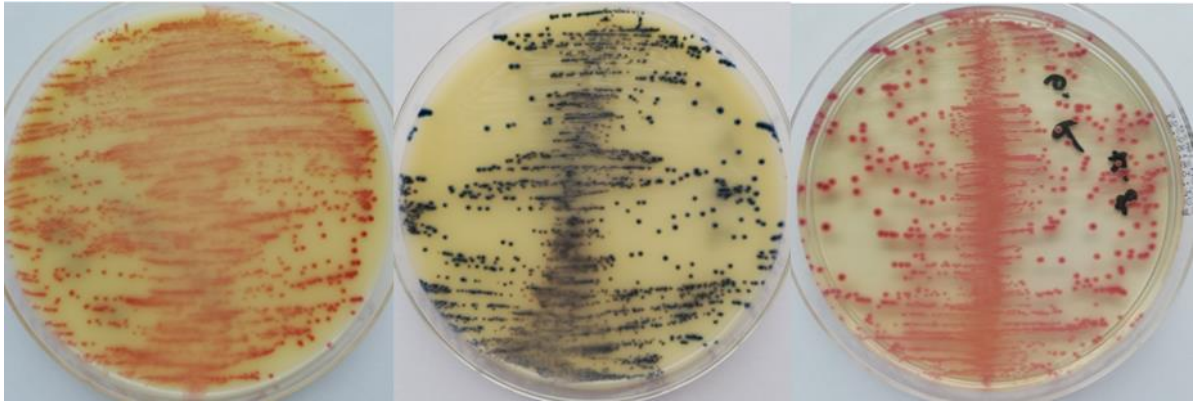


Kuvio 10. MRSP-kantojen laimennosten kasvun määrien keskiarvot vertailluilla maljoilla toisen inkubaation jälkeen asteikolla 0-4, jossa 0; ei kasvua, 1; 1-10 pes (pesäkettä), 2; 10-100 pes, 3; 100-1000 pes, 4; > 1000 pes. TSA-SB; veriagarmalja (kontrolli).

Kuviot 10 ja 11 esittävät MRSP-laimennosten keskimääräistä pesäkekasvua B2-osi-
ossa. Bakteeriliuoksen pitoisuuden ja kasvaneiden pesäkkeiden välillä vaikuttaa olevan
yhteys kaikilla maljoilla; pesäkemäärien keskiarvot laskivat laimennosten MRSP-pitoi-
suuksien pienentyessä.

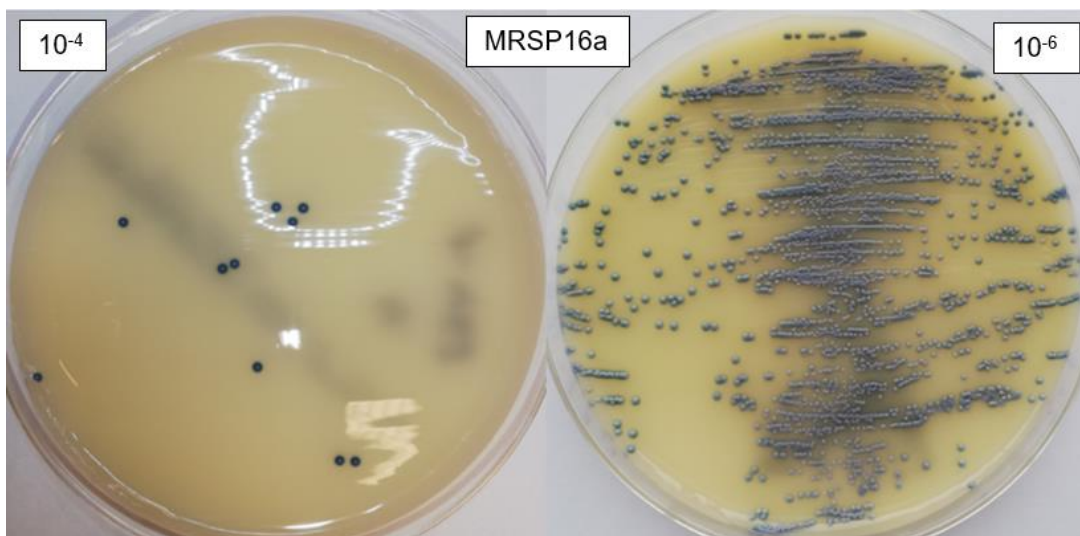


Kuvio 11. MRSP-kantojen rikastettujen laimennosten kasvun määrien keskiarvot vertailluilla mal-
joilla toisen inkubaation jälkeen asteikolla 0-4, jossa 0; kasvua, 1; 1-10 pes (pesäkettä),
2; 10-100 pes, 3; 100-1000 pes, 4; > 1000 pes. TSA-SB; veriagarmalja (kontrolli).



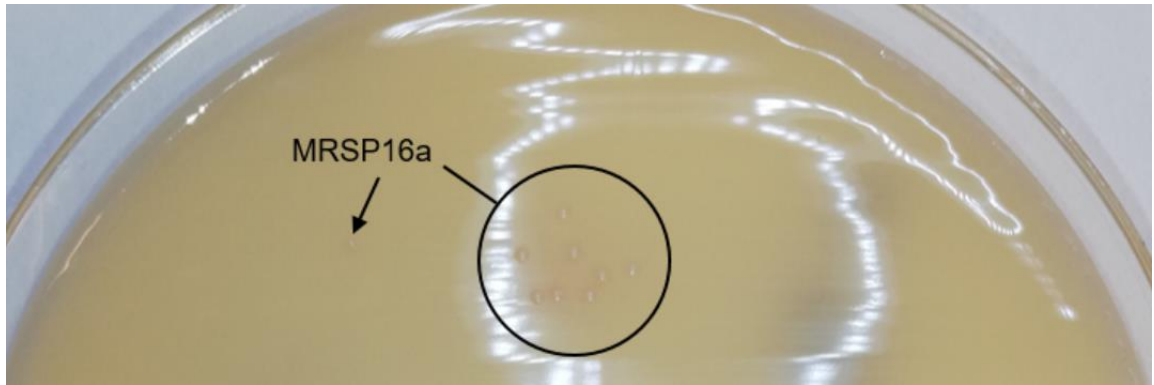
Kuva 19. MRSA32-laimennos (10^{-6}) rikastettuna BRMS:lla (vas.), OXMA:lla (kesk.) ja TACM:lla (oik.) toisen inkubaation jälkeen.

MRSA-laimennokset kasvoivat rikastettuina keskimääräisesti yhtä runsaina kaikilla maljoilla (kuva 19). Laimennosten rikastaminen kasvatti pesäkemäärää (kuva 20) suurimmassa osassa viljelmistä; 83 % kaikista MRSA- ja MRSP-kantojen laimennoksista kasvoi runsaampana selektiivisillä maljoilla ja kontrollimaljalla rikastuksen jälkeen.



Kuva 20. MRSP16a-kannan laimennos OXMA:lla rikastamattomana (vas.) ja rikastettuna (oik.) toisen inkubaation jälkeen. Rikastamattoman laimennoksen laimennossuhde on 1 : 10 000 ja rikastetun 1 : 1 000 000.

MIC-arvon 0,5 mg/L omaavan MRSP-kannan (MRSP0,5) laimennokset eivät kasvaneet edes rikastettuna BRMS:lla tai TACM:lla, mutta osa laimennoksista kasvoi OXMA:lla ja veriagarmaljalla (taulukko 7, s. 37). Kaikilla kolmella selektiivisellä maljalla pienin kasvava MRSP-bakteerimäärä oli 75 pmy/ml, eli 10^{-6} -laimennos, vaikka näin pieninä pitoisuuksina kasvoi vain MRSP16a, jonka MIC-arvo on >16 (kuva 21 ja taulukko 11).



Kuva 21. Rikastamaton 1 : 10 000 -MRSP16a-laimennos (MIC > 16 mg/L) BRMS:lla toisen inkubaation jälkeen.

Taulukossa 11 on MRSP-kantojen pienimmän pitoisuuden omannut laimennos, joka kullakin maljalla kasvoi MRSP-tyypillisen näköisenä. Muu kasvu on merkitty ei-MRSP-tyypilliseksi (ET).

Taulukko 11. MRSP-kantojen pienimmät maljoilla kasvaneet pitoisuudet rikastamattomina tai rikastettuina ensimmäisen tai toisen inkubaation jälkeen. ET; ei-MRSP-tyypillinen, EK; ei kasvua, TSA-SB; veriagarmalja (kontrolli).

	BRMS	OXMA	TACM	TSA-SB
MRSP16a	10⁻⁶	10⁻⁶	10⁻⁶	10⁻⁶
MRSP4	ET (10 ⁻⁴)	ET (10 ⁻⁵)	10⁻⁴	10⁻⁶
MRSP1	ET (10 ⁻⁵)	10⁻⁵	EK	10⁻⁵
MRSP0,5	EK	10⁻⁵	EK	10⁻⁶

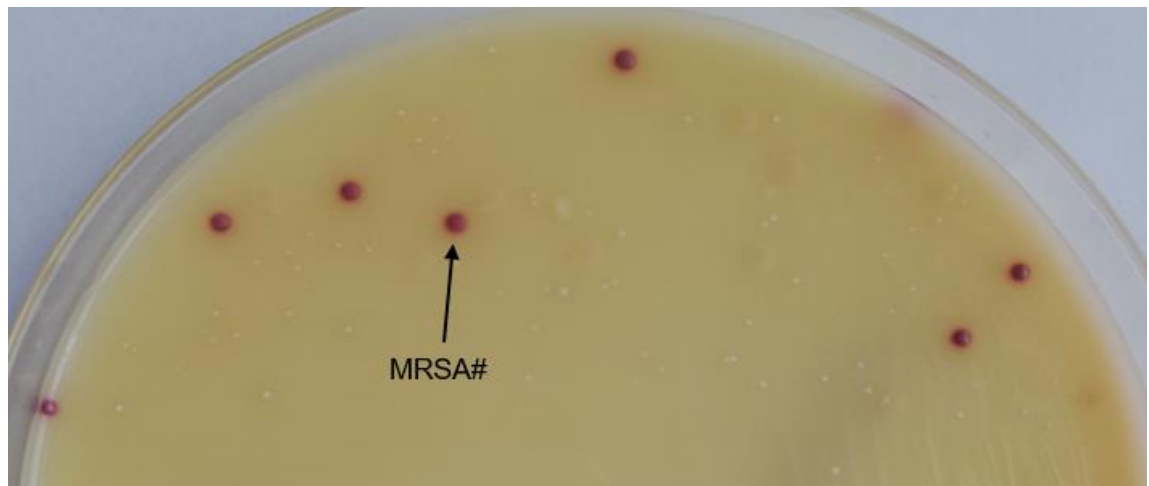
7.2.3 Simuloidut seulontanäytteet

Taulukossa 12 on esitetty simuloitujen seulontanäytteiden (osio B3) kasvuominaisuuksia kolmella vertailtavalla maljalla. Taulukkoon on merkitty jokaisen näytteen kohdalle, onko näyte tehty MRSA- vai MRSP-positiiviseksi (POS) vai sekä että. Pesäkelukumäärissä (PES) on esitetty maljalla kasvaneiden MRSA- tai MRSP-pesäkkeiden määrät (kpl). Sekä MRSA- että MRSP-kantoja sisältävistä näytteistä (SIM1 ja SIM2) on ilmoitettu ensin MRSA-kannan pesäkelukumäärä, jonka jälkeen MRSP-pesäkkeiden lukumäärä. Muuta kasvua-osiossa (MK) on arvioitu muiden, ei-merkitsevien bakteerilajien kasvun runsautta maljoilla vähäisestä runsaaseen kasvuun.

Taulukko 12. Simuloitujen seulontanäytteiden kasvu tutkittavilla maljoilla toisen inkubaation jälkeen. SIM; simuloitu seulontanäyte, PES; MRSA- ja MRSP-pesäkkeiden lukumäärä (MRSA + MRSP, kpl), MK; muuta kasvua, + vähäistä kasvua, ++ kohtalaista kasvua, +++ runsasta kasvua, - ei muuta kasvua.

	MRSA/MRSP		BRMS		OXMA		TACM	
	MRSA	MRSP	PES	MK	PES	MK	PES	MK
SIM 1	POS	POS	7+0	++	5+2	++	2+1	+++
SIM 2	POS	POS	0+0	+++	0+0	+++	0+0	+++
SIM 3	NEG	POS	6	-	4	-	5	-
SIM 4	NEG	POS	0	-	0	-	0	+
SIM 5	NEG	POS	0	+++	3	-	0	+
SIM 6	NEG	POS	0	+	0	-	0	+
SIM 7	POS	NEG	2	-	1	+	5	-
SIM 8	POS	NEG	6	++	1	+	3	-

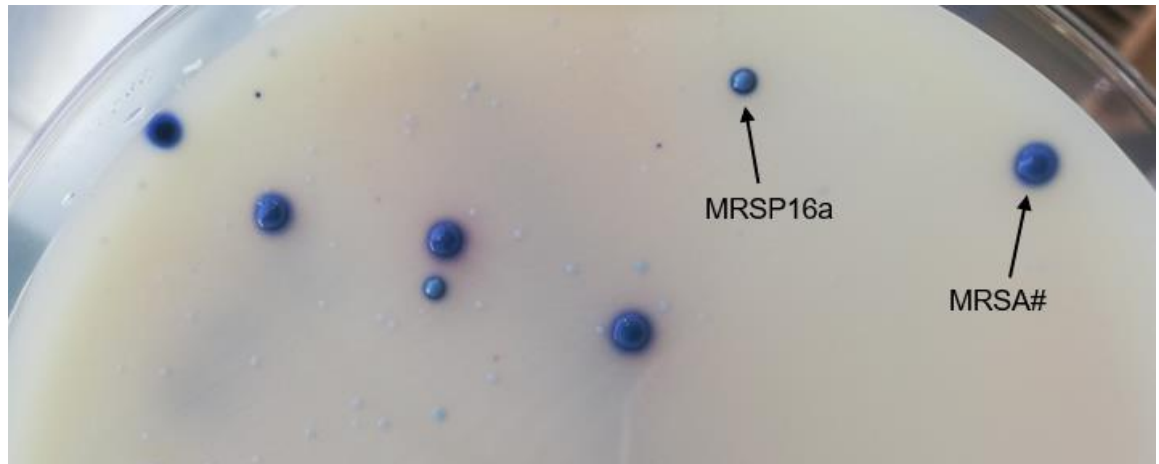
MRSA-MRSP-yhdistelmänäytteet eli SIM 1 ja SIM 2 kasvoivat yleisesti niukasti, muutama pesäkkeen verran ja nämäkin pesäkkeet kasvoivat tiheimmällä viljelyalueella. MRSP-positiiviksi simuloitunut näyte kasvoivat myös muutamien pesäkkeiden verran jokaisella maljalla. MRSA-kannat kasvoivat maljoilla MRSP:tä runsaampina.



Kuva 22. SIM 1-näyte BRMS:lla toisen inkubaation jälkeen. Maljalla kasvoi seitsemän MRSA-pesäkettä sekä näytteen normaalin mikrobiston bakteereita.

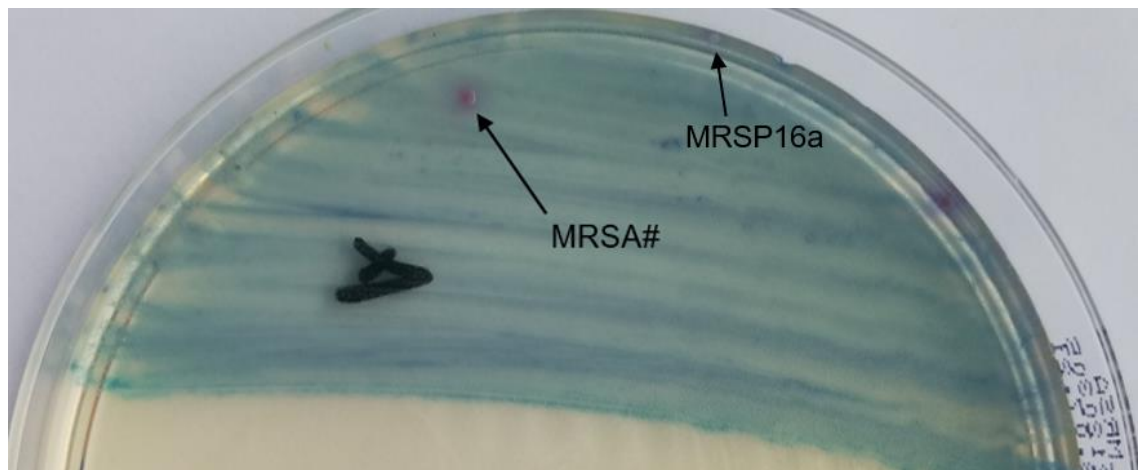
SIM1-yhdistelmänäyte sisälsi useita erilaisia visuaalisesti havaittavia normaalin mikrobiston bakteereita, joista ei tehty lajinmääryksiä. SIM1-näytteestä kasvoi BRMS:lla seitsemän MRSA-pesäkettä ja näytteen normaalia mikrobistoa, mutta ei yhtään tunnistettavaa MRSP-pesäkettä (kuva 22). Samasta näytteestä kasvoi OXMA:lla viisi MRSA-

pesäkettä ja kaksi MRSA-pesäkettä vaaleampaa MRSP-pesäkettä (kuva 23). Lisäksi maljalla kasvoi niukkana ei-merkitseviä bakteerilajeja.



Kuva 23. SIM 1-näyte OXMA:lla toisen inkubaation jälkeen.

SIM1-näytteestä kasvoi TACM:lla kaksi vaaleanpunaista MRSA-pesäkettä ja yksi haalean lila MRSP-pesäke (kuva 24). Pesäkkeiden ympärillä kasvoi pieniä läpikuultavia pesäkkeitä sinisellä pigmentillä.



Kuva 24. SIM 1-näyte TACM:lla toisen inkubaation jälkeen.

8 Pohdinta

8.1 Tulosten tarkastelu

S. aureus ja SIG-ryhmän bakteerilajit ovat koagulaasipositiivisia, gram-positiivisia ryhmäkokkeja (Lainhart ym. 2018). Koagulaasinegatiiviset (KN) metisilliiniresistentit stafylokokit (S) eivät muodosta väriä BRMS-maljalle (Bio-Rad 2016). MRSP saattaa kasvaa hieman KNS-lajeja paremmin, koska MRSP on MRSA:n tavoin koagulaasipositiivinen, vaikka MRSP kasvaakin lähes agarin värisenä, eikä siten vaikuta tuottavaan huomattavaa pigmenttiä. BDCM-maljassa taas on selektiivisiä yhdisteitä, jotka estävät muiden gram-positiivisten kokkibakteerien, paitsi *S. aureuksen*, kasvua (Becton, Dickinson and Company 2015). BDCM-malja oli mahdollisesti niin selektiivinen MRSA:lle, ettei MRSP voi kasvaa sillä johdonmukaisesti. MRSA-seulontaan suunnitellulla selektiivisellä maljalla MRSP todennäköisesti nähdään ei-merkitsevänä gram-positiivisena kokkina, jonka kasvu maljalla halutaan minimoida. *S. pseudintermedius* kuitenkin muistuttaa monin ominaisuuksin *S. aureusta* (Maali ym. 2018; Van Duijkeren ym. 2011). Tämä voi selittää sitä, miksi MRSA-maljoja pystytään soveltamaan MRSP:n tunnistukseen, vaikka maljojen soveltuvuuksissa onkin vaihtelua.

8.1.1 Vertailu seulontanäytteillä

Morfologian heterogeenisyys on yleistä stafylokokkeilla ja enterobakteereilla (CLSI 2019). *S. aureuksella* ja *S. pseudintermediuksella* on lisäksi pienipesäkkeisiä variantteja (SCV, small colony variant) (Savini ym. 2014). Morfologian heterogeenisyys ja erinäisten varianttien, kuten pienipesäkkeisten varianttien, kasvaminen tutkittavilla maljoilla luo lisähaasteita vertailuun. On mahdollista, että seulontanäytevertailussa eli A-osiossa löydöksiä on jäänyt toteamatta, jos ne ovat kasvaneet kovin epätyypillisen näköisinä. Ei-merkitsevät bakteerit voivat myös näyttää ajoittain MRSA- tai MRSP-epäilyttäville. Näitä poikkeamia voidaan käytännössä todeta vasta, kun valittua maljaa käytetään rutiinianalytiikan tutkimuksissa. MRSP-positiivisissa seulontanäytteissä myös on vaihtelevia määriä MRSP-bakteeria, ja vähäiset määrät eivät välttämättä edes rikastuksen jälkeen päädy kaikille tutkittaville maljoille. Rikastusmenetelmä kuitenkin todettiin tehokkaaksi rikastetuilla laimennoksilla.

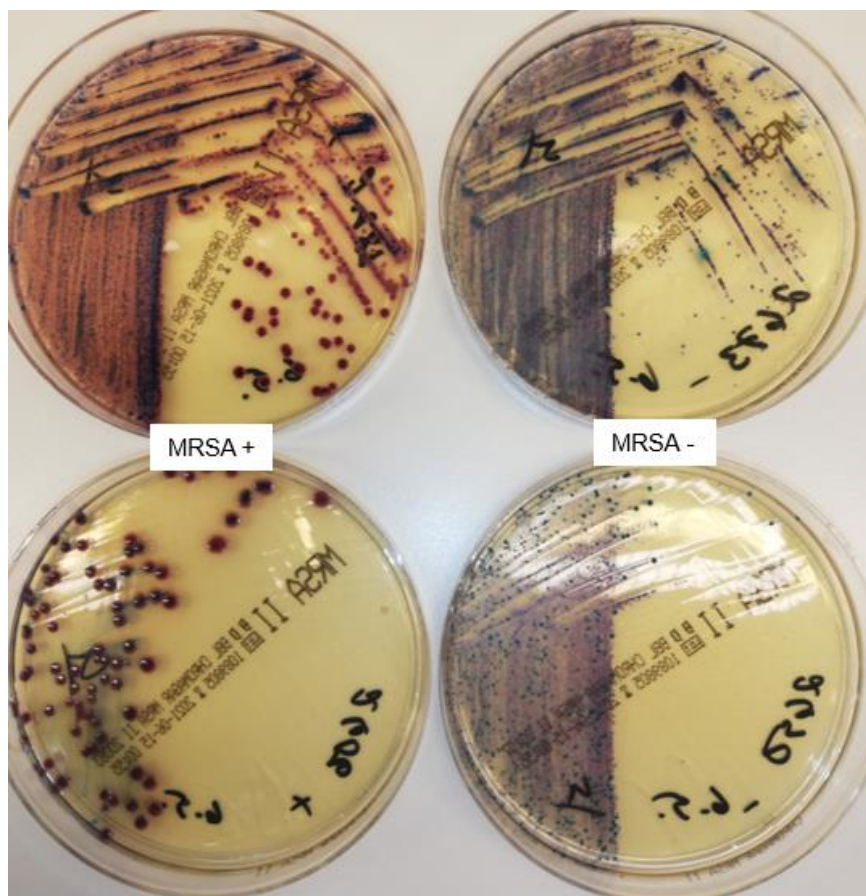
Corynebacterium auriscanis tunnetaan koirien korvien korynebakteerina (Collins ym. 1999). *C. auriscanis* voi kasvaa varsinkin seulontanäytteissä, joita on otettu korvien iholta. Seulontanäytevertailun tuloksiin ei yhdistetty näytteiden näytteenottoa, ja

osa näytteistä on voinut sisältää korvista otettuja lisänäytteitä. Seulontanäytteet kontaminoituvat herkästi myös peräaukon seudun bakteereista (YESLAB b). Seulontanäytteissä kasvoi runsaasti erilaisia peräaukon normaalin mikrobiston bakteereita, kuten enterokokkeja (*E. faecalis*, *E. faecium*, *E. hirae* ja *E. gallinarum*) ja *Proteus mirabilis*. Myös *Staphylococcus epidermidis* tunnetaan kliinisten bakteeriviljelyiden yleisenä kontaminanttina (Widerström 2016). *S. epidermidis* ohella merkittävimpiä KNS-lajeja ovat mm. *S. haemolyticus* ja *S. cohnii* (Becker ym. 2014). KNS-stafylokokkien suuri esiintyvyys on huomioitu maljojen valmistuksessa, mikä saa ne kasvamaan niukasti tai MRSA:sta erilaisena. Koska maljoja ei tiettävästi ole testattu MRSP:lle, voi maljoilla kasvaa ei-merkitseviä stafylokokkeja MRSP:n näköisinä. MRSA-selektiiviseksi suunnitellulla maljalla kuitenkin myös MRSP on ei-merkitsevä stafylokokki. BRSM-maljalla, esimerkiksi, MRSP-epäilyttävänä kasvoivat mm. KNS-stafylokokit *S. haemolyticus*, *S. epidermidis* ja *S. cohnii*.

TACM-maljalla kasvavien pesäkkeiden lajittelu positiivisen ja negatiivisen näköisiin oli suhteellisen haastavaa, sillä tietoa odotetuista kasvuominaisuuksista edes MRSA:n suhteen ei ollut saatavilla. Maljan yleisiä ominaisuuksia tutkittaessa oli testattava etäisesti MRSP:tä muistuttavia pesäkkeitä, koska tulkintaan ei ollut viitteellisiä ohjeita, mikä todennäköisesti on nostanut väärin positiivisten tulosten lukumäärää. BDCM-maljan valmistaja mainitsi maljansa tuoteselosteessa, että maljalla kasvavat ei-merkitsevät bakteerilajit voivat vääristää niiden kanssa kasvavien MRSA-pesäkkeiden tunnusomaista väriä (Becton, Dickinson and Company 2015). TACM-maljalla voi tapahtua samanlaista entsyymaattista väritysten vääristymää, minkä vuoksi MRSP-tyypillistä kasvua olisi vaikea määrittää.

Kasvun luokittelu MRSP-epäilyttäväksi on osin subjektiivista, ja rajanveto positiiviselta ja negatiiviselta näyttävän kasvun välillä oli ajoittain haastavaa. Herkkyyttä ja spesifisyyttä laskettaessa oli päätettävä, mikä luokitellaan oikeaksi positiiviseksi löydökseksi ja mikä vääräksi positiiviseksi. Metisilliiniherkät *S. pseudintermedius*-kannat (MSSP) ovat toisaalta oikeita positiivisia, koska bakteerilaji on sama kuin metisilliini-resistentillä *S. pseudintermediuksella* (MRSP), ja malja on tällöin tunnistanut lajin oikein. MSSP ei kuitenkaan ole MRSP-seulonnan kannalta kliinisesti merkitsevä, koska kannalla ei ole seulonnalla haettua resistenssiä. Ihanteellisessa tilanteessa MSSP-kannat myöskään eivät kasvaisi selektiivisellä maljalla. Näistä syistä maljoilla kasvaneet MSSP-pesäkkeet luokiteltiin vääriksi positiivisiksi.

Koska maljoja ei ole suunniteltu MRSP:n tunnistukseen, testattiin maljat myös MRSA:lla, jonka tunnistukseen ne on tarkoitettu. BDCM:n kyky tunnistaa MRSA tutkittiin ennen sen hylkäämistä, millä poissuljettiin mahdolliset valmistuserän viat, jotka olisivat voineet vaikuttaa tuloksiin. BDCM:lle viljeltiin jo tutkittuja hevosten näytteitä, kolme MRSA-positiivista ja kolme MRSA-negatiivista. Testaukseen käytettiin hevosten näytteitä, koska koirilla MRSA on harvinainen. Kaikista kolmesta positiivisesta näytteestä löytyi BDCM:lta selvät *S. aureus*-pesäkkeet jo ensimmäisen inkubaation jälkeen. Negatiivisista näytteistä viljellyillä maljoilla ei ollut *S. aureus*-epäilyttäviä pesäkkeitä edes toisen inkubaation jälkeen (kuva 25). MRSA vaikuttaa kasvavan maljalla runsaana, pesäkemorfologialtaan johdonmukaisena sekä selvästi erottuen ei-MRSA-pesäkkeistä.



Kuva 25. MRSA-positiiviset (vas.) ja -negatiiviset (oik.) hevosten seulontanäytteet toisen inkubaation jälkeen. MRSA-pesäkkeet kasvavat BDCM-maljalla tumman punaisina, suurina ja pyöreinä.

8.1.2 Vertailu tunnetuilla bakteerikannoilla

B2-osiossa MRSP-laimennokset kasvoivat runsaimmin OXMA:lla, toiseksi runsaimmin BRMS:lla ja niukkimmin TACM:lla (kuviot 10 ja 11, s. 46). OXMA:a runsaammin laimennokset kasvoivat ainoastaan kontrollimaljoilla eli verimaljoilla, mikä selittyy osittain sillä,

että kontrollimaljat ovat yleiselatusaineita, joilla MRSP:n tulisi kasvaa niin runsaana, kuin näytteen MRSP-pitoisuuden puolesta on mahdollista. B2-osiossa kannat viljeltiin duplikaatteina ainoastaan verimaljoille, mikä voi myös nostaa verimaljan pesäkemäärien keskiarvoja. Myös tutkittavat maljat olisi ollut hyvä viljellä duplikaatteina, mutta tämä ei onnistunut aikataulullisista syistä.

BRMS:n valmistajan mukaan maljalla voi kasvaa MSSA-kantoja, joiden MIC-arvot ovat lähellä MRSA:n MIC-arvoja (Bio-Rad 2016). Vastaavasti OXMA:lla, jolla MRSP:n todettiin kasvavan parhaiten, kasvoi myös muutamia MSSP-pesäkkeitä. B2-osiossa MRSP0,5-kanta kasvoi rikastettuna ainoastaan OXMA:lla (liitteet 2 ja 3). *S. pseudintermedius* on MRSP, jos sen oksasilliini-MIC-arvo on $\geq 0,5 \mu\text{g/ml}$ (Bemis ym. 2009). MRSP0,5 -kannan oksasilliini-MIC-arvo on metisilliiniresistenssin rajalla.

B2-osiossa MRSP-kannat vaikuttivat kasvavan niukimmin siirryttäessä pienempiä MIC-arvoja kohti, mikä on huomattavissa esimerkiksi MRSP16a:n ja MRSP0,5:n kasvua vertailtaessa (taulukko 11, s. 48). MIC-arvon >16 omaava MRSP-kanta MRSP16a kasvoi kaikilla MRSA-maljoilla 10^{-6} -laimennoksesta. MIC-arvon 0,5 omaava MRSP0,5 taas kasvoi vain kahdella MRSA-maljalla, joista toisella 10^{-6} -laimennoksesta ja toisella 10^{-5} -laimennoksesta. Kaikilla kolmella MRSA-maljalla pienin kasvava MRSP-bakteerimäärä oli 75 pmy/ml. Havaitsemisrajan teoreettiseksi arvioimiseksi pesäkkeiden tulisi kasvaa maljoilla MRSP-tunnistettavina, mutta useat kantalaimennokset kasvoivat pistemäisinä ja ilman pigmenttiä. Luotettavan havaitsemisrajan määrittämiseksi maljat tulisi viljellä mielellään kolmoiskappaleina, millä satunnaisvirheitä voisi minimoida. Erityisesti validointitutkimuksessa tutkimukseen valmistetut näytteet, kuten laimennokset ja simuloituvat näytteet, olisi tärkeää viljellä samaan aikaan usealle saman maljan yksittäiskappaleelle.

Simuloituvat seulontanäytteet (osio B3) koostuivat rikasteesta, jota oli 10 ml, alkuperäisen seulontanäytteen sisältämistä mikrobeista, jotka ovat laadultaan ja määrältään tuntemattomia, sekä suhteellisen pienestä määrästä moninkertaisesti laimennettua MRSA- tai MRSP-kantaa. MRSA- ja MRSP-kannat ovat voineet jäädä kasvamatta muun mikrobiston joukossa, jos näytteessä on ollut paljon ei-merkitseviä bakteerilajeja. Ei-merkitsevien bakteerilajien kasvun määrästä ei myöskään pysty suoraan päättelemään, mikä malja kasvattaa ei-toivottuja bakteerilajeja eniten. MRSA-kannat kasvoivat maljoilla MRSP:tä runsaampina, mikä on odotettavaa MRSA:n seulontaan suunnitelluilta maljoilta.

B3-osion MRSA-MRSP-sekanäytteet vaikuttivat kasvavan parhaiten OXMA:lla, jolla MRSA ja MRSP sekä kasvoivat että erottuivat toisistaan selvästi. B3-osio kuitenkin oli tarkoitettu ainoastaan täydentämään A- ja B2-osioita, eikä näin pienellä määrällä simuloituja näytteitä voida tehdä pitäviä johtopäätöksiä. B3-osion tulokset kuitenkin puolsivat OXMA:n hyvää soveltuvuutta MRSP-seulontatutkimuksiin.

8.2 Luotettavuus

Tutkimuksen luotettavuutta lisää oikein valittu otos, jonka on oltava tarkoituksenmukaisesti edustava ja kooltaan riittävän suuri. Aihealueen valinnan lisäksi päätetään tutkimuksen tavoitteet ja perehdytään taustatietoon. Tehtyjä valintoja myös perustellaan. Tutkimuksen luotettavuutta voidaan arvioida validiteetin ja reliabiliteetin kautta. Validi tutkimus antaa keskimäärin oikeita tuloksia ja mittaa juuri sitä, mitä oli tarkoitus mitata. Validius varmistetaan huolellisella suunnittelulla ja kattavalla tiedonkeruulla. Reliaabeli tutkimus antaa tarkkoja tuloksia, jotka ovat samanlaisia myös tutkimusta toistettaessa. Tutkijan tulee arvioida kriittisesti tutkimuksen luotettavuutta ja huomioida luotettavuutta alentavat tekijät. (Heikkilä 2014.)

Maljavertailun luotettavuutta lisää se, että maljojen ominaisuuksia testattiin monin erilaisin tavoin. Useiden erilaisten vertailumenetelmien käyttö on erityisen tärkeää silloin, kun vertailtavien kohteiden arviointi on osin subjektiivista, tai kun täysin vertailukelpoisia numeerisia arvoja ei pystytä tuottamaan. Tutkimuksessa käytettiin useita erilaisia näytteitä, joilla tarkasteltiin maljojen eri ominaisuuksia. Tutkimuksen tavoite oli realistinen ja valitut menetelmät tarkoituksenmukaisia, koska niillä mitattiin haluttuja tutkimusongelmia, mikä tekee tutkimuksesta validin. Tutkimuksen reliabiliteetti on hieman haluttua heikompi, koska luotettavien tulosten saavuttamiseksi joitain näytteitä olisi tullut välttää vähintään duplikaatteina. Tulosten osin subjektiivinen tulkinta heikentää tutkimuksen toistettavuutta ja luotettavuutta, vaikka aistinvaraisen tulkinnan subjektiivisuus kuuluu bakteriologisiin tutkimuksiin.

Opinnäytetyön kirjallisessa suunnitelmassa oli kuvattu tarkasti tehtävän työn suoritus, menetelmät, tavoitteet ja tulosten tulkinta sekä perehdytty työhön liittyvään teoriaan ennen sen suoritusta. Luotettavuutta lisää se, että raportissa on kuvattu opinnäytetyön toteutusvaihe mahdollisimman tarkasti ja toteutusta on havainnollistettu tutkimuksen etenemistä kuvaavilla kuvioilla 1, 3, 4, 5 ja 6. Ennen työn suoritusta varmistettiin tutkittavien elatusaineiden ja valmiiden liuosten käyttökelpoisuus. Maljojen tuli olla puhtaat ja agarien ehjiä, eikä elatusaineiden ja liuosten viimeinen käyttöajankohta saanut olla ylitt-

tynyt. Käytettäville laitteille, elatusaineille ja antibioottikiekoille tehtiin määräaikaikontrollit. Automaattipipetti kalibroitiin ennen työn aloitusta. Näytteitä koskevat välineet, kuten sakset, vanupuikot ja viljelyvälineet olivat steriilejä. Lämpökaappien ja lämpöhuoneen lämpötilat tarkastettiin joka aamu niiden ensimmäisen avauksen yhteydessä. Näytteiden saapuessa laboratorioon niistä katsottiin sekä kuljetusputkien päiväys että näytteenottoajankohta. Tutkimukset suoritettiin noudattaen tavanomaisia bioturvatason 2 työskentelytapoja, mm. käsittelemällä näytteet mikrobiologisessa suojakaapissa. Viljelyjärjestyksen vaikutuksen testaaminen bakteerikasvuun oli oleellista ennen työn aloitusta, koska viljelyjärjestys voisi teoriassa vaikuttaa kasvuun jollain tutkittavista maljoista, eikä siitä löytynyt valmista tutkittua tietoa.

Positiivisilta näytäneistä pesäkkeistä ei välttämättä pysty tekemään MALDI-TOF-tyypitystä tai herkkyysmäärittystä, jos pesäkkeet ovat liian pieniä tai kasvu liian niukkaa. Tällöin viljelmä on A-osiossa merkitty positiivisen näköiseksi, mutta siitä ei ole saatu tehtyä jatkotutkimuksia, mikä osaltaan heikentää validointiparametrien arvojen luotettavuutta. Näissä tilanteissa MRSP:n tunnistettavan näköinen kasvu maljalla ei nopeuta tutkimusprosessia, jos pesäkkeille ei voi tehdä jatkotutkimuksia. Jokaisesta maljasta, jolla kasvaa jotain, voi tehdä hajotusviljelmän, josta voi seuraavana päivänä tehdä lajinmäärittäyksen ja herkkyysmäärittäyksen, mutta tämä viivästyttää tutkimusta yhdellä työpäivällä. Merkitsevän bakteerilajin tulisi kasvaa selektiivisellä maljalla tunnistettavana ja runsaana, jolloin bakteerimassaa on riittävästi jatkotutkimuksiin jo ensimmäisen inkubaation jälkeen. Jos maljalla kasvaa paljon erilaisia näytteen bakteerilajeja tai yleiset normaalin mikrobiston lajit kasvavat runsaina, ei jatkotutkimuksia yleensä voida tehdä luotettavasti viljelmän sekakasvuisuuden vuoksi, ja puhtasviljelmät viivästyttävät analyysiprosessia työpäivällä.

Seulontanäytevertailussa (osio A) herkkyiden ja spesifisyyden laskemiseen ei käytetty kultaista standardia, koska ainoa mahdollinen kultainen standardi olisi ollut BRMS-malja. BRMS koettiin jo ennen vertailua puutteelliseksi MRSP:n tunnistuksen suhteen, ja sen käyttö referenssimenetelmänä olisi synnyttänyt liikaa poikkeamia. Ylimääräiset poikkeamat olisivat heikentäneet herkkyys- ja spesifisyyden arvojen hyödynnettävyyttä uuden maljan valinnassa. BRMS-maljaa ei myöskään missään vaiheessa käytetty indikoimaan tulosten oikeellisuutta, vaan kaikilta maljoilta todetut MRSP-epäilykset vahvistettiin MALDI-TOF-lajintunnistuksella ja oksasilliiniherkkyysmäärittäyksellä. Tästä syystä maljojen oikeat positiiviset ja negatiiviset tulokset sekä väärät positiiviset ja negatiiviset tulokset ristiintaulukoitiin todenmukaisten positiivisten ja negatiivisten tulosten kanssa. MALDI-TOF-analyysiä ja herkkyysmäärittystä yhdessä lajityypillisen pesäkemorfologian

kanssa voi pitää luotettavina indikaatioina MRSP:n mahdollisesta läsnäolosta näytteessä, joten MRSP-positiivisten näytteiden lukumäärää ($n = 6$) voi pitää luotettavana. MALDI-TOF-määritykset tehtiin aina herkkyysmääritysten viljelypäivinä ja herkkyysmääritysten lukupäivinä. On myös käytännössä epätodennäköistä, että kaikilla maljoilla negatiivisiksi jääneet näytteet olisivat todellisuudessa sisältäneet MRSP:tä, joten myös negatiivisten tulosten yhteislukumäärää ($n = 47$) voi pitää luotettavana.

Herkkyysarvojen luotettavuutta laskee se, että niiden laskemiseen käytettiin todellisia positiivisia näytteitä, joita koko seulontanäytemäärästä ($n = 53$) oli vain kuusi. Spesifisyys taas on laskettu todellisista negatiivisista tuloksista, joita oli huomattavasti enemmän ($n = 47$). Seulontanäytteistä kasvaa maljoilla usein myös ei-merkitseviä bakteerilajeja, jotka voivat peittää alleen MRSP-kasvua, jolloin osa todellisista positiivista näytteistä voi vaikuttaa joillain maljoilla negatiivisilta. Tämä taas laskee arvojen luotettavuutta. Toisaalta spesifisyydellä juuri mitataan menetelmän kykyä löytää tutkittava mikrobi näytteen häiriötekijöistä huolimatta (Hägg 2016; Sandle 2015; UNODC 2009). Taulukossa 7 (s. 37), esimerkiksi, veriagarmaljoilla kasvaneet MRSP-löydökset ovat peräisin MRSA-maljoilta. Tällöin kyseessä olevilla MRSA-maljoilla on ollut MRSP:tä, joka jostain syystä ei ole kasvanut niillä maljoilla näkyvänä.

Suoraviljelmien (osio B1) tulosten tulkinta on subjektiivista ja perustuu pääosin tulosten lukijan visuaalisiin arvioihin. Bakterimassaa on siirretty tutkittaville maljoille viljelysautalla, eivätkä siirrostuneet määrät ole tarkkoja. Yksittäispesäkkeiden kokoja ei pääsääntöisesti voi vertailla tässä validoinnin vaiheessa. Suoraviljelmien tulosten (liite 1) vertailukelpoisuutta vähentää myös se, että suoraviljelyt on tehty kullakin bakteerikannalla kunkin maljan neljännesosalle kerran. Jotkin bakteerikannat muodostivat tutkittaville maljoille vain vähän pigmenttiä, mutta pigmentin muodostumista arvioitiin vain kvalitatiivisesti.

Pienen bakteerikonsentraation omaavista laimennoksista ei välttämättä päädy viljelymaljalle yhtään pesäkettä muodostavaa yksikköä, koska bakteerimäärä liuoksessa on niin pieni (Sharp 2001). Laimennosten (osio B2) viljelyssä käytettiin 10 μ l:n silmukkaa, milloin maljalle siirrettävä liuosmäärä on koko liuosmäärään nähden (1,8 ml) todella pieni. Tällöin ei ole varmuutta siitä, onko maljalle siirrostunut kyseistä bakteerikantaa, vai eikö siirrostunut kanta kasva maljalla. Veriagarmaljan rinnakkaiskäyttö lisää laimennosten viljelyn luotettavuutta, koska kaikki tutkittavat bakteerit kasvavat yleiselatusaineella, jos niitä on siirrostunut maljalle. Jos verimaljoilla kasvaa jonkin kannan laimennosta, on silloin laimennosliuoksessa bakteeria, mutta se joko ei ole siirtynyt tutkittaville maljoille, tai se ei kasva tutkittavilla maljoilla. Erityisesti 10^{-6} -laimennoksissa liuosten

bakteerikonsentraatio oli todella pieni, laskennallisesti 150 bakteeriyksilöä 1,8 ml:ssa natriumkloridia. Sama epävarmuus bakteerin siirrostumisesta koskee myös simuloituja seulontanäytteitä (osio B3).

8.3 Eettisyys

Hyvän tieteellisen käytännön mukaan tutkimustyössä tulee noudattaa rehellisyyttä, huolellisuutta ja tarkkuutta läpi työprosessin. Työssä on huomioitava muiden tutkijoiden saavutukset ja käytettävä niitä kunnioittavasti sekä annettava niille arvoa asianmukaisin lähdeviittein. (Tutkimuseettinen tiedekunta.) Opinnäytetyö on pyritty suunnittelemaan, toteuttamaan ja raportoimaan mahdollisimman tarkasti ja tietolähteiden luojia kunnioittaen.

Bioanalyytikon on aina työssään kunnioitettava tutkittavan oikeuksia ja yksityisyyttä sekä noudatettava salassapitovelvollisuutta. Laboratorioprosessin korkeasta laadusta huolehditaan yhdessä työyhteisön kanssa, ja sitä tulisi pyrkiä kehittämään jatkuvasti. (Suomen Bioanalytikkoliitto ry 2017.) Tutkimukset toteutettiin salassapitovelvollisuutta noudattaen, eikä eläinten nimiä käytetty näytteiden tunnistamiseen, vaan näytteet käsiteltiin juoksevin diaarinumerosarjoin, joista eläimiä ei voi identifioida. Tämän työn havainnollistavissa maljakuvissa voi näkyä koirien nimiä, mutta koiria ei voi tunnistaa pelkästään niiden kutsumanimistä. Tutkimuksessa ei käytetty koirien muita tietoja, kuten ikää, sukupuolta, rotua tai terveyshistoriaa koskevia tietoja.

Tutkimusta suunniteltaessa on harkittava tarkasti sen toteutustapa sekä siitä mahdollisesti aiheutuvia haittoja eläimille tai eläinten omistajille. Tutkimus jää kuitenkin koe-eläinlain ulkopuolelle, jos sen toteutus aiheuttaa tutkittaville eläimille neulanpistoa vähäisempiä haittoja. Suunnitellessa on pohdittava myös laajoja hyötynäkökulmia, sekä mahdollisia tutkimuksen aiheuttamia haittoja suhteessa tavoiteltavaan tietoarvoon. Riskejä ja vahinkoja tulisi hallita ja estää mahdollisuuksien mukaan, sekä perustella eläinten käyttöä tutkimuksessa. Henkilö- ja potilastietojen kerääminen ja käsittely on suunniteltava tarkasti ja yksityisiä tietoja suojaten. (Helsingin yliopisto a.)

Tämän opinnäytetyön tutkimukseen ei tarvittu tutkimuslupaa, koska tutkimukseen tarvittavat näytteet on otettu eläimistä seulontatutkimusta varten, eikä tätä validointitutkimusta varten. Päätös näytteiden ottamisesta ja tutkimisesta on syntynyt eläimen hoitosuhteessa. MRSA-MRSP-seulontanäytteiden ottaminen ei aiheuta eläimelle tarpeetonta kipua tai epämukavuutta, koska näytteet otetaan limakalvoilta pyyhkimällä, eikä tutkimus siten kuulu koe-eläinlain piiriin.

Tutkimuksesta saadaan yhteiskunnallista hyötyä, koska sillä pyritään ehkäisemään tarttuvien tautien leviämistä. Valitun maljan katsotaan soveltuvat koirien MRSP-tutkimuksiin aiemmin käytössä ollutta maljaa paremmin, mikä vähentää väärin negatiivisten löydösten todennäköisyyttä ja siten lisää seulonnan kokonaisvarmuutta. Tutkimuksella kehitetään eläinlääketieteellisen mikrobiologian kliinisen diagnostiikan menetelmiä. Helsingin yliopisto hyötyy tutkimuksen tuloksista kustannustehokkuutena, koska spesifisen maljan käyttö vähentää jatkotutkimusten määrää ja siten myös työmäärää ja analyysikustannuksia. Seulottavat eläimet, eläinten omistajat sekä tutkittavaa eläintä hoitavat tahot hyötyvät uuden, spesifisemmän maljan käyttöönotosta seulontatulosten nopeamman vahvistumisen kautta.

8.4 Johtopäätökset

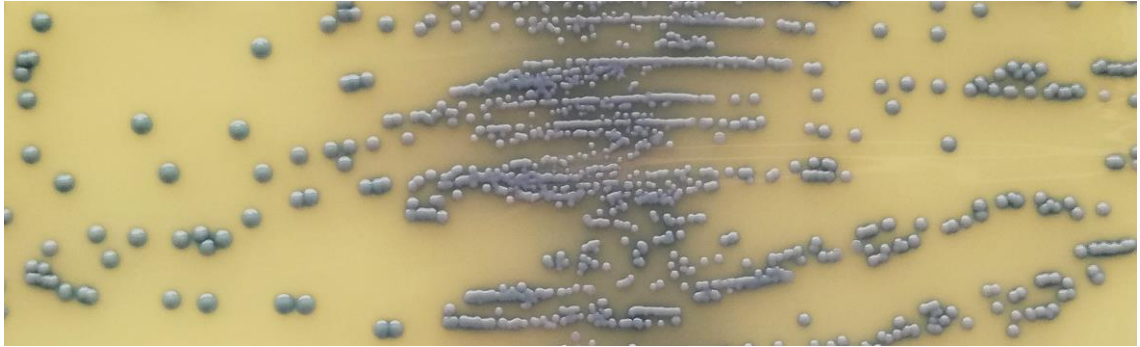
Tämän opinnäytetyön tarkoitus oli selvittää, että mikä neljästä vertailusta MRSA-maljasta sopii parhaiten koirien MRSP-seulontaan. Vertailun perusteella suosittelen Oxoid Brilliance™ MRSA 2 Agar -maljaa (OXMA) YESLAB:n käyttöön koirien MRSP-seulontoihin. Toiseksi parhaiten soveltuvaksi osoittautui Bio-Rad MRSA Select™ II (BRMS). BD BBL™ CHROMagar™ MRSA II -maljan (BDCM) voisi luokitella huonoimmin soveltuvaksi, mutta tämän tutkimuksen perusteella myöskään Tammer BioLab Chrom Agar MRSA -maljaa (TACM) ei voi pitää MRSP:n seulontaan sopivana. Jos OXMA ei olisi ollut BRMS-maljaa parempi, olisi ollut suositeltavaa jatkaa BRMS:n käyttöä, kunnes sille löytyisi selkeästi parempi vaihtoehto.

OXMA todettiin neljästä tutkimuksessa käytetystä maljasta parhaaksi MRSP:n toteamiseen ja eristämiseen koirien seulontanäytteistä. OXMA:n herkkyys oli 100 % ja spesifisyys 68 %, mitkä olivat vertailun parhaat tulokset (taulukko 13). OXMA:lta tehtiin vähiten tarpeettomia jatkotutkimuksia ja MRSP:n kasvu oli nopeampaa muihin maljoihin verrattuna. OXMA:lla esiintyi vähiten MRSP-epäilyttävää kasvua ($n = 21$), joten jatkotutkimuksia vaatineiden pesäkkeiden määrä oli pienempi muihin maljoihin verrattuna. OXMA on merkittävästi BRMS-maljaa edullisempi.

Taulukko 13. Yhteenveto seulontanäytevertailun tuloksista kolmella vertailtavalla maljalla. BDCM-malja hylättiin ennen laskelmien tekemistä. MRSP-epäilyttävällä kasvulla tarkoitetaan jatkotutkimuksia vaatineen kasvun määrää.

	BRMS	OXMA	TACM
Herkkyys (%)	66 %	100 %	50 %
Spesifisyys (%)	59 %	68 %	28 %
MRSP-epäilyttävä kasvu	23	21	37
Ei-MRSP-epäilyttävä kasvu	30	32	16
Maljalta tehdyt todelliset MRSP-löydökset	4	6	3
Todelliset MRSP-löydökset jatkotutkimuksia vaatineista	17,4 %	28,6 %	8,1 %

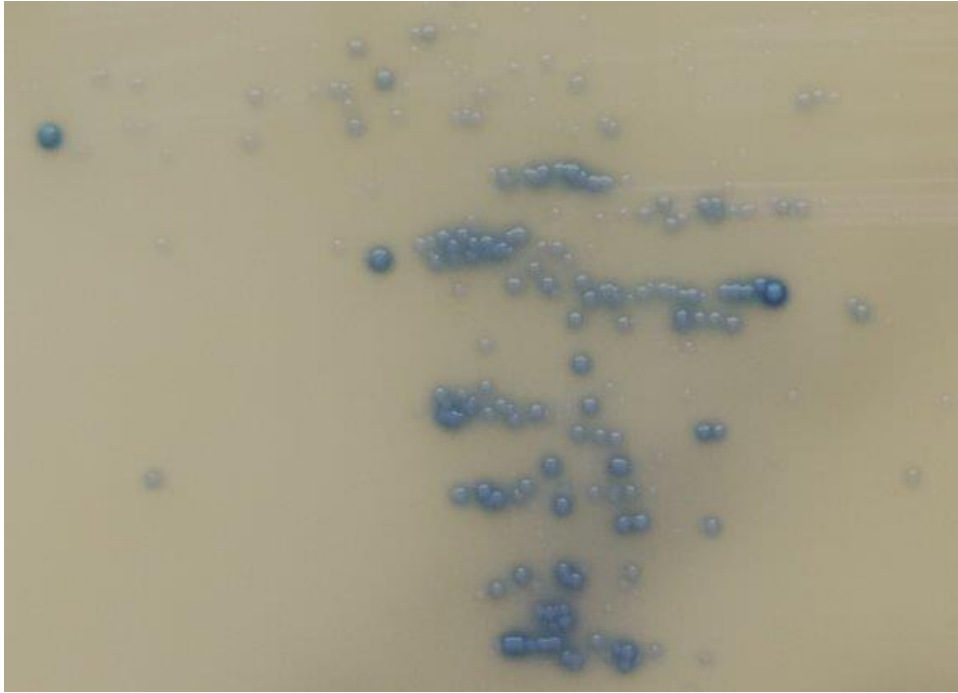
OXMA:n valmistajan mukaan MRSA-pesäkkeet kasvavat maljalla poikkeuksellisen suurina ja väritykseltään helpommin tunnistettavina. MRSA-pesäkkeet kasvavat maljalla sinisinä, ja negatiivinen tulos näkyy punertavina, liloina tai valkoisina pesäkkeinä. (Thermo Fisher Scientific 2010.) MRSA kasvoi helposti huomattavina pesäkkeinä ja suurin osa ei-merkitsevistä lajeista kasvoi luvatus värisinä eli ei-sinisinä. MRSP:n tunnusomainen väritys vaihteli vaaleansinisestä vaalean lilaan, jolloin se on väritykseltään teoreettisesti positiivisen ja negatiivisen värisen kasvun välissä. MRSP-pesäkkeissä oli aina tunnistettava pastellinen sävy. Pesäkkeet olivat aina pyöreitä, kiiltäviä ja tasaisia ja kooltaan useimmiten keskikokoisia tai suuria (kuva 26). MRSP-kantojen todettiin kasvavan OXMA-maljalla runsaimmin ja selkeimmin muista bakteerilajeista erottuvana. MRSP-pesäkkeet erottuivat OXMA:lla helpoimmin paitsi viljelyalustastaan, myös normaalin mikrobiston bakteerilajeista. MRSP-pesäkkeet kasvoivat suhteellisen tasalaatuisina ja sininen pigmentti korosti vaaleita pesäkkeitä kellertävän kerman värisellä agarilla. OXMA:lla myös kasvoi harvempia bakteerilajeja kuin muilla tutkittavilla maljoilla. Muut kolme maljaa ovat todennäköisesti spesifisempiä MRSA:lle ja sisältävät enemmän MRSP:n kasvua estäviä antibiootteja.



Kuva 26. MRSP-kontrollikannan puhtasviljelmä OXMA:lla.

Vuonna 2011 julkaistussa saksalaistutkimuksessa vertailtiin viittä selektiivistä MRSA-maljaa, mukaan lukien BD BBL™ CHROMagar™ MRSA (BD Diagnostics) ja Brilliance MRSA agar (Oxoid). MRSP kasvoi huonosti tai kohtalaisesti BD BBL™ CHROMagar™ MRSA (BD Diagnostics) -maljalla ja parhaiten Oxoidin Oxacillin Resistance Screening Agar Base- ja Brilliance MRSA agar -maljoilla. (Horstmann ym. 2011.) Tämän opinnäytetyön vertailtaviin maljoihin kuului samojen valmistajien MRSA-maljojen uudemmat versiot. Tämän opinnäytetyön lopputulokset ovat samankaltaiset, kuin saksalaistutkimuksessa, jossa BD Diagnosticsin malja (opinnäytetyössä BDCM) soveltui MRSP:n tutkimiseen huonoimmin ja Oxoidin maljat (opinnäytetyössä OXMA) parhaiten. Myös Horstmann ym. (2011) tekemässä tutkimuksessa MRSP-pesäkkeiden kuvailtiin kasvavan Oxoidin maljalla kalpean sinisinä (pale blue), joka todennäköisesti on samanlainen tässä opinnäytetyössä kuvaillun pastellisen vaaleansinisen kanssa.

Syksyllä 2021 YESLAB otti käyttöön Oxoid Brilliance™ MRSA 2 Agar -maljan (OXMA), jota siirtymäaikana käytettiin rinnakkain vanhan Bio-Rad MRSA Select™ II -maljan (BRMS) kanssa. BRMS- ja OXMA-maljojen rinnakkaiskäyttö lisäsi tulosten luotettavuutta. Rinnakkaiskäytöllä varmistettiin YESLAB-henkilökunnan perehtyminen maljan ominaisuuksiin ja saatiin laajempaa näyttöä maljan soveltuvuudesta koirien MRSP-seulontatutkimuksiin. OXMA:n ominaisuuksista tehtiin kesällä 2021 lyhyet ohjeet YESLAB-henkilökunnalle maljan käyttöönottoa varten. OXMA korvasi BRMS:n myös hevosten MRSA-diagnostiikassa myöhemmin samana syksynä. OXMA todettiin rinnakkaiskäytössä nopeammaksi ja selkeämmäksi, kuin BRMS. BRMS-maljaan verrattuna MRSP-pesäkkeet ovat kasvaneet OXMA:lla usein yhtä työpäivää aiemmin ja erottuneet selvemmin ei-merkitsevästä kasvusta. OXMA:lla on todettu kasvavan ajoittain myös MSSP-pesäkkeitä, mikä oli odotettavaa, koska maljalla kasvoi suhteellisen hyvin myös MIC-arvon 0,5 mg/L omaava MRSP-kanta (kuva 27), joka on MIC-arvoltaan metisilliini-resistentin (MRSP) ja -herkän (MSSP) rajalla.



Kuva 27. Rikastettu MRSP0,5 -kannan (MIC 0,5 mg/L) 1 : 10 000 -laimennos OXMA:lla toisen inkubaation jälkeen.

8.5 Kehittämisehdotukset

Luotettavien tulosten saamiseksi tutkittavat näytteet tulisi viljellä maljoille vähintään kolminkertaisina, paitsi oikeat potilasnäytteet, jotka viljellään rutiinianalytiikassa vain yhdelle maljakappaleelle. MRSP4- ja MRSP0,5 -kantojen 10^{-6} -laimennokset, esimerkiksi, kasvoivat verimaljaduplikaateilla vain rikastamattomina. Tämä osoittaa, että edes duplikaattiviljely ei välttämättä tuota riittävän luotettavia tuloksia, koska rikastetun näytteen tulisi kasvaa rikastamatonta runsaampana. Erityisesti pienen MIC-arvon omaavia kantoja ja laimennoksia kannattaa tutkia moninkertaisina viljelminä, eli viljellä näytteitä esimerkiksi kolmoiskappaleina.

Maljavertailusta toteutettiin ensin A-osio ja sen jälkeen B-osio. B-osiossa käytetyt bakteerikannat, joilla tutkittiin ei-merkitsevien bakteerilajien kasvuominaisuuksia, valittiin validointisuunnitelman perusteella ennen työn toteutusta. Vaihtoehtoisesti A- ja B-osioiden väliin voisi jättää enemmän aikaa, jolloin B-osioon valittavat ei-merkitsevät bakteerilajit voisivat määräytyä A-osion seulontanäytteiden perusteella. *Corynebacterium auriscanis* lisättiin B-osioon tällä tavalla, mutta YESLAB:lla ei ollut monia pakastettuja *C. auriscanis* -kantoja. Jos tarvittavia kantoja ei olisi valmiina pakastimessa, voisi niitä A- ja B-osioiden väliin jäävänä aikana eristää kaikenlaisista eläinten potilasnäytteistä ja

pakastaa myöhempää käyttöä varten. Jos B-osion näytteet valittaisiin A-osion perusteella, tulisi maljat vertailtua myös sellaisilla lajeilla, joita näytteissä ilmenee odotettua useammin. Myöskin se, mitkä bakteerilajit todellisuudessa näyttävät MRSA- tai MRSP-epäilyttäviltä kullakin maljalla, ilmenee vasta A-osiossa. B-osion *S. aureus*- ja *S. pseudintermedius* -kannat voisivat kuitenkin edelleen määräytyä etukäteen, koska maljat on vertailtava erilaisilla MRSA- ja MRSP- sekä MSSA- ja MSSP-kannoilla. B-osioon voisi myös tehdä itse täysin simuloituja sekanäytteitä niin, että kaikki näytteen bakteerilajit ja niiden kannat sekä tarkat määrät ja suhteet olisivat tiedossa. B3-osion näytteet olivat vain osittain simuloituja, koska ne simuloitiin MRSA- ja/tai MRSP-positiivisiksi, mutta minkään näytteen muu mikrobisto ei ollut tiedossa. Simuloitujen näytteiden valmistus alusta asti useanlaisilla laimennoksilla olisi kuitenkin erittäin työlästä.

YESLAB:n on suositeltavaa edelleen rikastaa seulontanäytteet käytössä olevalla tai sitä vastaavalla rikasteella. Kahden vuorokauden inkubointi on jatkossakin suositeltavaa. OXMA:lle tehdään, kuten BRMS:lle on tehty, kontrollit tunnetuilla MRSA-, MRSP- ja MSSP-kannoilla vähintään viikoittain ja aina maljaerän vaihtuessa. Hevosten MRSA-tutkimusten työ- ja laadunvarmistusohjeista vastaa YESLAB itse.

YESLAB voi halutessaan viljellä OXMA:lle lisälaimennoksia, esimerkiksi $1 : 10^{-7}$, tarkemman havaitsemisrajan määrittämiseksi. Kyseiset viljelmät suositellaan viljeltävän vähintään kolmoiskappaleina. Jos maljavalmistaja myöhemmin tekee OXMA:sta uuden version, on uudelle maljalle tehtävä oma validointi, koska elatusaineen koostumuksen muuttuessa myös sen soveltuvuus MRSP:n seulontaan voi muuttua. Jos OXMA:ssa todetaan rajoituksia tai puutteita, esimerkiksi liiallista MSSP-kantojen kasvua, voi YESLAB tulevaisuudessa toteuttaa uuden maljaverailun halutuilla MRSA-maljoilla. Tällöin vertailuun kannattaa sisällyttää samoja maljoja kuin tässä vertailussa, jos niistä on tulut uusia versioita, tai ottaa vertailuun uusia Suomessa saatavilla olevia maljoja.

MRSA:n esiintyminen koirissa voi tulevaisuudessa olla kasvavaa myös Suomessa, vaikka siitä ei opinnäytetyön teon hetkellä ole ollut ajankohtaista tutkimustietoa. MRSA:n esiintyvyyden lisääntymisen varalta MRSP:n seulontaan käytettävän selektiivisen maljan olisi hyvä tunnistaa jatkossakin myös MRSA, vaikka MRSP-spesifisiä maljoja ei tiettävästi ole toistaiseksi kehitteillä.

8.6 Ammatillinen kasvu

Bioanalyttikko on laboratoriotutkimusprosessin asiantuntija, jonka yleisimpiin työkuviin kuuluvat tutkiminen ja tutkimustulosten luotettavuudesta vastaaminen. Bioanalyttikolla on oltava teknistä osaamista, ongelmanratkaisutaitoja ja halua oppia uutta. Bioanalyttikon työ vaatii huolellisuutta, tarkkuutta ja järjestelmällisyyttä sekä kykyä erottaa visuaalisesti erilaisia värejä ja rakenteita. (Suomen Bioanalyttikkoliitto ry.) Opinnäytetyöprosessi on lisännyt yleistä tarkkuutta, huolellisuutta ja järjestelmällisyyttä työskentelyssäni. Laboratoriotutkimusprosesseihin liittyvä tekninen osaamiseni on lisääntynyt mm. laimennossarjojen ja erilaisten näytemateriaalien käsittelyn osalta, kuin myös laboratoriovälineistön, -laitteiden ja -järjestelmien suhteen. Opinnäytetyön toteuttaminen yksilötyönä on kehittänyt monipuolisesti ongelmanratkaisutaitojani ja vahvistanut valmiuttani työskennellä itsenäisesti.

Opinnäytetyöprosessi on laajentanut ammatillista näkemystäni omasta alastani ja kliinisestä mikrobiologiasta. Olen kehittänyt perusosaamistani perehtymällä eläinlääketieteellisen diagnostiikan menetelmiin ja eläinten ongelmamikrobeihin opinnäytetyön teoreettisen teeman myötä. Olen harjaantunut bakteeriviljelmien visuaalisessa tulkinnassa ja tarkkuuteni erilaisten morfologisten ominaisuuksien, kuten värisävy- ja rakenne-erojen suhteen on kehittynyt. Opinnäytetyöprosessi on kehittänyt kykyäni suunnitella ja toteuttaa tutkimuksia sekä arvioida ja soveltaa niistä saamiani tuloksia.

Opinnäytetyöprosessi on vahvistanut tietoteknillistä osaamistani, lisäämällä valmiuksiani esittää hankkimaani tietoa ja dokumentoida tutkimustuloksia valokuvoin, taulukoin ja kaavioin. Monivaiheisen tutkimusprosessin kirjallinen kuvaaminen on kehittänyt kielellistä ilmaisukykyäni ja lisännyt ammatillista itsevarmuuttani tieteellisen tekstin tuottamisessa. Opinnäytetyöprosessi on myös kehittänyt kykyäni hyödyntää erilaisia tietokantoja ja hakusanoja tiedonhankinnassa sekä arvioida tietolähteiden luotettavuutta ja tiedon käyttökelpoisuutta.

Lähteet

Ballantine, Kirsi-Marja 2021. Tavanomaiset varotoimet ja potilaiden riskiluokittelu Yliopistollisessa eläinsairaalassa. *Infektioidentorjunta* 39. 50–55.

Becker, Karsten & Heilmann, Christine & Peters, Georg 2014. Coagulase-Negative Staphylococci. *Clinical Microbiology Review* 27 (4). 870–926. <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4187637/>>. Viitattu 16.10.2021.

Becton, Dickinson and Company 2015. BBL™ CHROMagar™ MRSA II. Menetelmäohje. <[https://legacy.bd.com/ds/technicalCenter/inserts/L010678\(02\).pdf](https://legacy.bd.com/ds/technicalCenter/inserts/L010678(02).pdf)>. Viitattu 19.1.2021.

Bemis, David A. & Jones, Rebekah D. & Frank, Linda A. & Kania, Stephen A. 2009. Evaluation of susceptibility test breakpoints used to predict mecA-mediated resistance in *Staphylococcus pseudintermedius* isolated from dogs. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 21. 53–58. <<https://journals.sagepub.com/doi/pdf/10.1177/104063870902100108>>. Viitattu 19.8.2021.

Bio-Rad 2016. MRSA Select™ II. Menetelmäohje. <https://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/inserts/CDG/en/63757_2016_03_EN.pdf>. Viitattu 13.1.2021.

Boukouvalas, D. A. & Prates, R. A. & Lima Leal, C. R. & Araújo, S. A. 2019. Automatic segmentation method for CFU counting in single plate-serial dilution. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* 195. <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0169743919303910#!>>. Viitattu 25.8.2021.

Bünsow, Dorothea & Tantawy, Eshraq & Ostermeier, Tjorven & Bähre, Heike Bähre & Garbe, Annette & Larsen, Jesper & Winstel, Volker 2021. Methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* synthesizes deoxyadenosine to cause persistent infection. *Virulence* 12 (1). 989–1002. <<https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/21505594.2021.1903691>>. Viitattu 9.9.2021.

Carlson, Petteri & Koskela, Markku 2011. Bakteriologian perustekniikat. Teoksessa Hedman, Klaus & Heikkinen, Terho & Huovinen, Pentti & Järvinen, Asko & Meri, Seppo & Vaara, Martti (toim.): *Infektiosairaudet*. E-kirja. Helsinki: Duodecim.

Castillo-Rojas, Gonzalo & Mazari-Hiriart, Marisa & Ponce de León, Sergio & Amieva-Fernández, Rosa I. & Agis-Juárez, Raúl A. & Huebner, Johannes & López-Vidal, Yolanda 2013. Comparison of *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* Strains Isolated from Water and Clinical Samples: Antimicrobial Susceptibility and Genetic Relationships. *PLoS One* 8 (4). e59491. <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3613387/>>. Viitattu 19.1.2021.

CLSI 2019. Understanding Susceptibility Test Data as a Component of Antimicrobial Stewardship in Veterinary Settings. CLSI report VET09. Clinical and Laboratory Standards Institute.

Collins, Matthew D. & Hoyles, Lesley & Lawson, Paul A. & Falsen, Enevold & Robson, Robert L & Foster, Geoffrey 1999. Phenotypic and Phylogenetic Characterization of a New *Corynebacterium* Species from Dogs: Description of *Corynebacterium auriscanis* sp. Nov. *Journal of Clinical Microbiology* 37 (11). 3443–3447. <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC85662/>>. Viitattu 22.9.2021.

Evidensia. Antibiooteille vastustuskykyinen bakteeri koiralla - mikä on MRSP? Päivitetty 24.4.2019. <<https://evidensia.fi/hoitovinkit/antibiooteille-vastustuskykyinen-bakteeri-koiralla-mika-mrsp/>>. Viitattu 22.12.2020.

Fox, Matthew P. & Lash, Timothy, L. & Bodnar, Lisa M. 2020. Common Misconceptions about validation studies. *International Journal of Epidemiology* 49 (4). 1392–1396. <<https://academic.oup.com/ije/article/49/4/1392/5866675>>. Viitattu 8.10.2021.

French, G. L. 2009. Methods for screening for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carriage. *Clinical Microbiology and Infection* 15 (7). 10-16. <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1198743X14606315#!>>. Viitattu 3.1.2021.

Garbacz, Katarzyna & Żarnowska, Sabina & Piechowicz, Lidia & Haras, Krystyna 2013. Pathogenicity potential of *Staphylococcus pseudintermedius* strains isolated from canine carriers and from dogs with infection signs. *Virulence* 4 (3). 255–259. <<https://www.tandfonline.com/doi/pdf/10.4161/viru.23526?needAccess=true>>. Viitattu 10.1.2021.

Giles Scientific Inc. BIOMIC® V3 – Antibiotic Disc Diffusion Testing. <<https://www.biomic.com/disk-diffusion.html>>. Viitattu 17.6.2021.

Grönthal, Thomas & Eklund, Marjut & Thomson, Katariina & Piiparinen, Heli & 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* 72 (4). 1021–1030. <<https://academic.oup.com/jac/article/72/4/1021/2870687?login=true>>. Viitattu 16.1.2021.

Hajek, V. 1976. *Staphylococcus intermedius*, a new species isolated from animals. *International Journal of Systematic Bacteriology* 26 (4). 401–408. <<https://www.microbiologyresearch.org/docserver/fulltext/ijsem/26/4/ijsem-26-4-401.pdf?expires=1636617257&id=id&accname=guest&checksum=24E9638EC-DFD7860A90645A9448C2E4D>>. Viitattu 11.1.2021.

Harju, Inka & Grönroos, Juha O. 2020. MALDI-TOF-massaspektrometria kliinisessä mikrobiologiassa. *Lääketieteellinen aikakauskirja Duodecim* 136 (15). 1660–1667. <<https://www.duodecimlehti.fi/duo15709>>. Viitattu 7.1.2021.

Heikkilä, Tarja 2014. Kvantitatiivinen tutkimus. Edita Publishing Oy. <<http://tilastollinen-tutkimus.fi/1.TUTKIMUSTUKI/KvantitatiivinenTutkimus.pdf>>. Viitattu 26.1.2021.

Helsingin yliopisto a. Eläimiin kohdistuvan tutkimuksen eettinen ennakoarviointi. Päivitetty 24.2.2021. <<https://www.helsinki.fi/fi/tutkimus/palvelut-tutkijoille/tutkimuksen-eettinen-ennakoarviointi/elaimiin-kohdistuva-tutkimus>>. Viitattu 13.3.2021.

Helsingin yliopisto b. YESLAB – kliinisen mikrobiologian laboratorio. <<https://www.helsinki.fi/fi/tutkimusryhmat/yeslab-kliinisen-mikrobiologian-laboratorio>>. Viitattu 26.1.2021.

Horstmann, C. & Mueller, R.S. & Straubinger, R.K. & Werckenthin, C. 2011. Detection of methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* with commercially available selective media. *Letters in Applied Microbiology* 54. 26-31. <<https://sfamjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1472-765X.2011.03167.x>>. Viitattu 4.7.2021.

Hryniewicz, Maria M. & Garbacz, Katarzyna 2017. Borderline oxacillin-resistant *Staphylococcus aureus* (BORSA) - a more common problem than expected? <<https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/jmm/10.1099/jmm.0.000585#tab2>>. Viitattu 10.11.2021.

Hägg, Margareta 2016. Validoinnin suunnittelun opas. VTT Technology. <<https://www.vttresearch.com/sites/default/files/pdf/technology/2016/T276.pdf>>. Viitattu 28.12.2020.

Kandi, Venkataramana 2015. Bacterial Colony: First Report of Donut Colony Morphology among Diphtheroids Isolated in Blood. *Cureus* 7 (11). e374. <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4671912/>>. Viitattu 10.7.2021.

Lainhart, William & Yarbrough, Melanie L. & Burnham Carey-Ann D. 2018. The Brief Case: *Staphylococcus intermedius* Group – Look What the Dog Dragged In. *Journal of Clinical Microbiology* 56 (2). e00839-17. <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5786732/>>. Viitattu 13.10.2021.

Lumio, Jukka 2020a. Antibiootit. Terveyskirjasto. Lääkärikirja Duodecim. <https://www.terveyskirjasto.fi/terveyskirjasto/tk.koti?p_artikkeli=dlk01177>. Viitattu 2.2.2021.

Lumio, Jukka 2020b. Infektioiden aiheuttajat: loiset, bakteerit, arkit, sienet, alkueläimet, virukset ja prionit. Terveyskirjasto. Lääkärikirja Duodecim. <https://www.terveyskirjasto.fi/terveyskirjasto/tk.koti?p_artikkeli=dlk00562>. Viitattu 28.12.2020.

Lynch, Stephanie A. & Helbig, Karla J. 2021. The Complex Diseases of *Staphylococcus pseudintermedius* in Canines: Where to Next? *Veterinary Science* 8. 11. <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7831068/>>. Viitattu 10.7.2021.

Lyytikäinen, Outi & Vuopio, Jaana & Järvinen, Asko 2020. *Staphylococcus epidermidis* ja muut koagulaasinegatiiviset stafylokokit. Teoksessa Heikkinen, Terho & Järvinen, Asko & Meri, Seppo & Vapalahti, Olli & Vuopio, Jaana (toim.): *Mikrobiologia, immunologia ja infektiosairaudet 1: Mikrobiologia*. 4., uudistettu painos. E-kirja. Helsinki: Duodecim. Luku 7.

Maali, Yousef & Badiou, Cedric & Martins-Simões, Patricia & Hodille, Elisabeth & Bes, Michele & Vandenesch, Francois & Lina, Gerard & Diot, Alan & Laurent, Frederic & Trouillet-Assant, Sophie 2018. Understanding the Virulence of *Staphylococcus pseudintermedius*: A Major Role of Pore-Forming Toxins. *Front. Cell. Infect. Microbiol.*

8(221). <<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcimb.2018.00221/full>>. Viitattu 10.2.2021.

Madigan, Michael T & Bender, Kelly S. & Buckley, Daniel H. & Sattley, W. Matthew & Stahl, David A. 2018. Brock Biology of Microorganisms. 15th edition. New York: Pearson Education.

MIKES 2011. Laadukkaan mittaamisen perusteet. Hiltunen, Erkki & Linko, Linnéa & Hemminki, Sari & Hägg, Margareta & Järvenpää, Eila & Saarinen, Pertti & Simonen, Seppo & Kärhä, Petri (toim.). Mittatekniikan keskus.

Missiakas, Dominique M. & Schneewind, Olaf 2013. Growth and Laboratory Maintenance of *Staphylococcus aureus*. Current Protocols in Microbiology 28. 9C.1.1-9C.1.9.

Penna, Bruno & Silva, Marcella B. & Soares, André E. R. & Vasconcelos, Ana T. R. & Ramundo, Mariana S. & Ferreira, Fabienne A. & Silva-Carvalho, Maria C. & de Sousa, Viviane S. & Rabello, Renata F. & Bandeira, Paula T. & de Souza, Viviane S. & Planet, Paul J. & Vieira-da-Motta, Olney & Botelho, Ana M. N. & Figueiredo, Agnes M. S. 2021. Comparative genomics of MRSA strains from human and canine origins reveals similar virulence gene repertoire. Scientific Reports 11. <<https://www.nature.com/articles/s41598-021-83993-5#citeas>>. Viitattu 9.9.2021.

Perry, John 2014. Identification tests. Teoksessa Ford, Michael (toim.): Medical Microbiology. Iso-Britannia: Oxford University Press. 12–29.

Pro-Lab Diagnostics 2012. McFarland Standards. Tuoteseloste. <https://www.pro-lab.com/wp-content/uploads/2017/01/SD2300-SD2350_en.pdf>. Viitattu 16.8.2021.

Quach, D. T. & Sakoulas, G. & Nizet, V & Pogliano, J. & Pogliano, K. 2016. Bacterial Cytological Profiling (BCP) as a Rapid and Accurate Antimicrobial Susceptibility Testing Method for *Staphylococcus aureus*. EBioMedicine 4. 95–103. <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2352396416300160#!>>. Viitattu 19.1.2021.

Rhen, Mikael & Kuusela, Pentti 2020. Bakteerien virulenssitekijät. Teoksessa Heikkinen, Terho & Järvinen, Asko & Meri, Seppo & Vapalahti, Olli & Vuopio, Jaana (toim.): Mikrobiologia, immunologia ja infektiosairaudet 1: Mikrobiologia. 4., uudistettu painos. E-kirja. Helsinki: Duodecim. Luku 4.

Ruiz-Ripa, Laura & Simón, Carmen & Ceballos, Sara & Ortega, Carmelo & Zarazaga, Myriam & Torres, Carmen & Gómez-Sanz, Elena 2021. *S. pseudintermedius* and *S. aureus* lineages with transmission ability circulate as causative agents of infections in pets for years. BMC Veterinary Research 17. <<https://bmcvetres.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12917-020-02726-4#ref-CR15>>. Viitattu 12.7.2021.

Ruokavirasto a. Metisilliiniresistentti *Staphylococcus aureus* (MRSA). Päivitetty 9.9.2021. <<https://www.ruokavirasto.fi/teemat/zoonosikeskus/mikrobilaakeresistenssi/zoonosibakteerien-resistenssi/metisilliiniresistentti-staphylococcus-aureus-mrsa/>>. Viitattu 11.11.2021.

Ruokavirasto b. *Staphylococcus aureus*. Päivitetty 10.1.2019. <<https://www.ruokavirasto.fi/henkilöasiakkaat/tietoa-elintarvikkeista/elintarvikkeiden-turvallisen-kayton-ohjeet/ruokamyrkytykset/ruokamyrkytyksia-aiheuttavia-bakteereja/staphylococcus-aureus/>>. Viitattu 22.12.2020.

Rutjes, AWS & Reitsma, JB & Coomarasamy, A & Khan, KS & Bossuyt, PMM 2007 Evaluation of diagnostic tests when there is no gold standard. A review of methods. *Health Technology Assessment* 11 (50).

Sandle, Tim 2015. *Approaching Microbiological Method Validation*. Institute of Validation Technology. <<https://www.ivtnetwork.com/article/approaching-microbiological-method-validation>>. Viitattu 16.8.2021.

Savini, Vincenzo & Carretto, Edoardo & Polakowska, Klaudia & Fazii, Paolo & Mięzobrodzki, Jacek & D'Antonio, Domenico 2013. May *Staphylococcus pseudintermedius* be non-haemolytic? *Journal of Medical Microbiology* 62 (8). <https://www.microbiologyresearch.org/docserver/fulltext/jmm/62/8/1256_jmm061952.pdf?expires=1636615884&id=id&accname=guest&checksum=E8B03B9CBE7CCD8DD1137BCCDFCA804B>. Viitattu 14.6.2021.

Savini, Vincenzo & Carretto, Edoardo & Polilli, Ennio & Marollo, Roberta & Santarone, Stella & Fazii, Paolo & D'Antonio, Domenico & Rossano, Alexandra & Perretend, Vincent 2014. Small Colony Variant of Methicillin-Resistant *Staphylococcus pseudintermedius* ST71 Presenting as a Sticky Phenotype. *Journal of Medical Microbiology* 52 (4). 1225-1227. <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3993511/>>. Viitattu 25.8.2021.

Schumacher, A. & Vranken, T. & Malhotra, A. & Arts, J. J. C. & Habibovic, P. 2018. In vitro antimicrobial susceptibility testing methods: agar dilution to 3D tissue-engineered models. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* 37. 187–208. <<https://link.springer.com/article/10.1007/s10096-017-3089-2>>. Viitattu 19.1.2021.

Sharp, Julia L. 2001. *Detection Limits in Microbiology*. Department of Mathematical Sciences. <<https://math.montana.edu/jobowriting/documents/sharp.pdf>>. Viitattu 25.8.2021.

Skov, R. & Varga, A. & Matuschek, E. & Westblade, L. & Guardabassi, L. & Kahlmeter, G. 2019. EUCAST disc diffusion criteria for the detection of *mecA*-Mediated β -lactam resistance in *Staphylococcus pseudintermedius*: oxacillin versus cefoxitin. *Clinical Microbiology and Infection* 26. 122.E1-122.E6. <[https://www.clinicalmicrobiologyandinfection.com/article/S1198-743X\(19\)30215-0/fulltext#%20](https://www.clinicalmicrobiologyandinfection.com/article/S1198-743X(19)30215-0/fulltext#%20)>. Viitattu 18.8.2021.

Skurnik, Mikael & Vuopio, Jaana 2020. *Bakteerisolun rakenne ja toiminta*. Teoksessa Heikkinen, Terho & Järvinen, Asko & Meri, Seppo & Vapalahti, Olli & Vuopio, Jaana (toim.): *Mikrobiologia, immunologia ja infektiosairaudet 1: Mikrobiologia*. 4., uudistettu painos. E-kirja. Helsinki: Duodecim. Luku 1.

Suomen Bioanalytikkoliitto ry. Mikä ihmeen bioanalytikko? <<https://www.bioanalytikkoliitto.fi/mika-ihmeen-bioanalytikko/>>. Viitattu 15.10.2021

Suomen Bioanalytikkoliitto ry 2017. Bioanalyytikon, laboratoriohoitajan eettiset ohjeet. <https://www.bioanalytikkoliitto.fi/@Bin/659271/Eettiset+periaatteet_FI_print_2017.pdf>. Viitattu 19.1.2021.

Tammer BioLab. Tuotteet. <<https://www.tammerbiolab.fi/tuotteet>>. Viitattu 19.1.2021.

Terveyden ja hyvinvoinnin laitos. MRSA. Päivitetty 22.6.2020. <<https://thl.fi/fi/web/infektioitaudit-ja-rokotukset/taudit-ja-torjunta/taudit-ja-taudinaiheuttajat-a-o/mrsa>>. Viitattu 22.12.2020.

Thermo Fisher Scientific 2010. Oxoid Brilliance™ MRSA 2 Agar. Tuote-esite. <<http://www.oxid.com/pdf/uk/27368-oxid-brilliance-mrsa2.pdf>>. Viitattu 19.1.2021.

Thomson, Katariina & Aaltonen, Hanna 2019. Hygieniaopas eläinlääkärin vastaanotolle. Maa- ja metsätalousministeriö. <https://julkaisut.valtioneuvosto.fi/bitstream/handle/10024/161770/MMM_19_2019_Hygieniaopas.pdf?sequence=4&isAllowed=y>. Viitattu 16.8.2021.

Tutkimuseettinen tiedekunta. Hyvä tieteellinen käytäntö (HTK). <<https://tenk.fi/fi/tiedevilppi/hyva-tieteellinen-kaytanta-htk>>. Viitattu 19.1.2021.

UNODC 2009. Guidance for the Validation of Analytical Methodology and Calibration of Equipment used for Testing of Illicit Drugs in Seized Materials and Biological Specimens. United Nations Office on Drugs and Crime. <https://www.unodc.org/documents/scientific/validation_E.pdf>. Viitattu 19.8.2021.

Van Duijkeren, Engeline & Catry, Boudewijn & Greko, Christina & Moreno, Miguel A. & Pomba, M. Constança & Pyörälä, Satu & Ružauskas, Modestas & Sanders, Pascal & Threlfall, E. John & Torren-Edo, Jordi & Törneke, Karolina 2011. Review on methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 66 (12). 2705–2714. <<https://academic.oup.com/jac/article/66/12/2705/696152>>. Viitattu 11.1.2021.

Valtioneuvoston asetus eräiden lääkeaineiden käytön kieltämisestä eläimille 1054/2014. Annettu Helsingissä 11.12.2014. <<https://www.finlex.fi/fi/laki/alkup/2014/20141054>>. Viitattu 28.10.2021.

Vuopio, Jaana & Kuusela, Pentti & Järvinen, Asko 2020. *Staphylococcus aureus*. Teoksessa Heikkinen, Terho & Järvinen, Asko & Meri, Seppo & Vapalahti, Olli & Vuopio, Jaana (toim.): *Mikrobiologia, immunologia ja infektiosairaudet 1: Mikrobiologia*. 4., uudistettu painos. E-kirja. Helsinki: Duodecim. Luku 6.

Wang, Jinghua & Wang, Hualiang & Cai, Keya & Yu, Peijuan & Liu, Yajuan & Zhao, Gaoling & Chen, Rong & Xu, Rong & Yu, Maowen 2020. Evaluation of three sample preparation methods for the identification of clinical strains by using two MALDI-TOF MS systems. *Journal of Mass Spectrometry* 56 (2). <<https://analyticalsciencejournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/jms.4696>>. Viitattu 15.6.2021.

Widerström, Micael 2016. Significance of *Staphylococcus epidermidis* in Health Care-Associated Infections, from Contaminant to Clinically Relevant Pathogen: This Is a Wake-Up Call! *Journal of Clinical Microbiology* 54 (7). 1679–1681. <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4922076/>>. Viitattu 21.1.2021.

YESLAB a. Laboratoriokäsikirja. Helsingin yliopisto. Päivitetty 8.4.2020. <<https://www.helsinki.fi/fi/tutkimusryhmat/yeslab-kliinisen-mikrobiologian-laboratorio/elainlaakarille/laboratoriokasikirja>>. Viitattu 22.12.2020.

YESLAB b. Näytteenotto-ohjeet. Helsingin yliopisto. Päivitetty 9.9.2020. <<https://www.helsinki.fi/fi/tutkimusryhmat/yeslab-kliinisen-mikrobiologian-laboratorio/elainlaakarille/naytteenotto-ohjeet#section-90803>>. Viitattu 11.1.2021.

Zhou, Wei & Wang, Ying & Lin, Jun 2012. Functional Cloning and Characterization of Antibiotic Resistance Genes from the Chicken Gut Microbiome. *Applied and Environmental Microbiology* 78 (8). 3028–3032. <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3318844/#B22>>. Viitattu 21.7.2021.

Taulukko tunnettujen bakteerikantojen kasvuominaisuuksista

Taulukko 14. Tunnettujen kantojen kasvuominaisuudet vertailtavilla maljoilla. Viljelmät on tehty suoraviljelyinä sektoreille. Taulukossa esitetyt ominaisuudet kuvaavat toisen inkubaation jälkeisiä ominaisuuksia eli mahdollista pigmenttiä ja pigmentin väritystä, sekä mahdollisen kasvun runsautta ja väriä. Taulukon merkit on selitetty taulukon alla. Näytteiden bakteerilajit ja -kannat on esitetty taulukoissa 3 (s. 30) ja 4 (s. 31).

	BRMS		OXMA		TACM	
	PIGMENTTI	PESÄKKEET	PIGMENTTI	PESÄKKEET	PIGMENTTI	PESÄKKEET
<i>MRSA32</i>	HAP	+++ VP	TS/SH	+++ SH	HAP	+++ VP
<i>MRSA#</i>	HAP	+++ VP	V/SH	+++ SL	HAL	+++ VP
<i>MSSA0,25</i>	PV	0	TS	0	PV	0
<i>MRSP16a</i>	VP	+++ H-VP	SH/L	+++ L/VP	L	+++ VP
<i>MRSP16b</i>	VP	+++ VP	VS/L	+++ H-L/VS	HAL	+ L, VS
<i>MRSP4</i>	VP	++ VA *	SH	+++ VA	L/S/V	++ VA, VP, S
<i>MRSP1</i>	VP	+++ VA	S, L	+++ VA	L	+ VP
<i>MRSP0,5</i>	P	+ VA	HAL, VS	++ VA	V	+ SL
<i>MSSP0,12</i>	VA	0	SH	0	V	0
<i>STEP</i>	-	0	VS	0	-	0
<i>CORAU</i>	-	0	-	0	VP	+++ PV
<i>Faecalis-A</i>	VP	+ VA *	SV	0	V, VS	+ VS
<i>Faecalis-B</i>	VP	0	V, P	0	SV, VS	+ VS *
<i>Faecalis-C</i>	P	+ VA *	V, P	0	SV	+ VA *
<i>Faecalis-D</i>	VP	0	P	+ P *	V	+ VA *
<i>FAECIUM-a</i>	VP	0	SV, P	+ VA *	S, V	0
<i>FAECIUM-b</i>	VP	+ VA *	V	+ VA *	S, V, P	+ VA *

- ei pigmenttiä

0 ei kasvua

SV sinivioletti

P voimakas vaaleanpunainen HAL harmaan lila

* pesäkkeet pistemäisen

+ vähän pesäkkeitä

TS tumman sininen

L lila

VA vaalea

HAP harmaan punainen

pieniä, määrä arvioitu

++ kohtalaisesti pesäkkeitä

SH siniharmaa

VS vaaleansininen

PV punavioletti

/ kahta eri väriä

+++ runsaasti pesäkkeitä

SL sinilila

VP vaaleanpunainen

H haalea sävy

Taulukko rikastamattomien laimennosten kasvuominaisuuksista

Taulukko 15. Pienten MRSA- ja MRSP-bakteerimäärien tutkimiseksi tehtyjen laimennosten kasvu tutkittavilla maljoilla sekä kontrollimaljalla (TSA-SB; veriagar-malja). Taulukon laimennoksia ei ole rikastettu. Taulukon merkit on selitetty taulukon alla. Näytteiden kannat on ilmoitettu taulukossa 3 (s. 30).

	BRMS			OXMA			TACM			TSA-SB		
	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶
MRSA32 - 1	++ VP	+ VP	-	-	-	-	++ VP	+ VP	-	++	+	-
MRSA32 - 2	++ VPL	+ VPL	+ VPL	+ S	-	-	++ VPL	++ VPL	-	++	+	-
MRSA# - 1	++ VP	+ VP	-	++ VS	+ VS	-	++ VP	+ VP	-	++	+	-
MRSA# - 2	++ VP	+ VP	-	++ S	+ S	-	++ L	+ L	-	++	+	-
MRSP16a - 1	++ V *	+ V *	-	+ VS	+ VS	+ VS	++ V	-	-	++	+	+
MRSP16a - 2	++ V	+ V	-	+ VSP	+ VSP	+ VSP	++ VP	+ VP	-	++	+	+
MRSP4 - 1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++	+	+
MRSP4 - 2	-	-	-	+ V *	+ V *	-	+ V	-	-	++	+	+
MRSP1 - 1	+ V *	-	-	++ V *	+ V *	-	-	-	-	++	+	-
MRSP1 - 2	+ V *	-	-	++ VS	+ VS	-	-	-	-	++	+	-
MRSP0,5 - 1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++	+	+
MRSP0,5 - 2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++	+	+

1 ensimmäisen inkubaation jälkeen

2 toisen inkubaation jälkeen

V vaalea

VSP vaaleansininen tummansinisellä pigmentillä

VS vaaleansininen

VP vaaleanpunainen

L lila

S sininen

VPL vaaleanpunainen-lila

* pesäkkeet pistemäisen pieniä, määrä arvioitu

- ei kasvua

+ 1–10 pesäkettä

++ 10–100 pesäkettä

Taulukko rikastettujen laimennosten kasvuominaisuuksista

Taulukko 16. Pienten MRSA- ja MRSP-bakteerimäärien tutkimiseksi tehtyjen laimennosten rikastusviljelyiden kasvu tutkittavilla maljoilla sekä kontrollimaljalla (TSA-SB; veriagarmalja). Taulukon merkit on selitetty taulukon alla. Näytteiden kannat on ilmoitettu taulukossa 3 (s. 30).

	BRMS			OXMA			TACM			TSA-SB		
	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶
MRSA32 - 1	++++ VP	++++ VP	++++ VP	++++ VS, M	++++ VS, M	++++ VS, M	++++ VP	++++ VP	++++ VP	++++	++++	++++
MRSA32 - 2	++++ VP	++++ VP	++++ VP	++++ S, L, HB	++++ S, L, HB	++++ S, L, HB	++++ VP	++++ VP	++++ VP	++++	++++	++++
MRSA# - 1	++++ VP	++++ VP	-	++++ SL	++++ SL	-	++++ L	++++ L	-	++++	++++	-
MRSA# - 2	++++ VP	++++ VP	-	++++ SL, M	++++ SL, M	-	++++ VPL	++++ VPL	-	++++	++++	-
MRSP16a - 1	++++ VP	++++ VP	++++ VP	++++ VSL	++++ VSL	++++ VSL	+++ VP	+++ VP	+++ VP	++++	++++	++++
MRSP16a - 2	++++ VP	++++ VP	++++ VP	++++ VSL	++++ VSL	++++ VSL	+++ VPL	+++ L	+++ L	++++	++++	++++
MRSP4 - 1	+ V *	-	-	++++ VS *	-	-	+ V *	-	-	++++	-	-
MRSP4 - 2	++++ V *	-	-	++++ VSL *	-	-	+++ VP	-	-	++++	-	-
MRSP1 - 1	++++ V *	++++ V *	-	++++ VS	++++ VS	-	+ V *	+ V *	-	++++	++++	-
MRSP1 - 2	++++ V *	++++ V *	-	++++ VS	++++ VS	-	+ VP	+ VP	-	++++	++++	-
MRSP0,5 - 1	-	-	-	+ V *	+ V *	-	-	-	-	++++	++++	-
MRSP0,5 - 2	-	-	-	+++ VS	+++ VS	-	-	-	-	++++	++++	-

- ei kasvua

+ 1–10 pesäkettä

++ 10–100 pesäkettä

+++ 100–1000 pesäkettä

++++ > 1000

1 ensimmäisen inkubaation jälkeen

2 toisen inkubaation jälkeen

HB harmaan beige

M hento metallinen hohde

V vaalea, hankalaa tarkentaa sävyä

VS vaaleansininen

VP vaaleanpunainen

L lila

S sininen

SL sinilila

VPL vaaleanpunainen-lila

VPS vaaleansininen-lila

* pesäkkeet pistemäisen pieniä, määrä

arvioitu

Taulukko MRSA- ja MRSP-laimennosten kasvumääristä

Taulukko 17. Taulukko MRSA- ja MRSP-laimennosten kasvumääristä ja laimennosten keskimääräisestä kasvusta tutkittavilla maljoilla sekä kontrollimaljalla (TSA-SB; veriagarmalja). Taulukon merkit on selitetty taulukon alla. Näytteiden kannat on ilmoitettu taulukossa 3 (s. 30).

	BRMS			OXMA			TACM			TSA-SB		
	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶
MRSA32 - L	2 / 2	1 / 2	0 / 1	0 / 1	0 / 0	0 / 0	2 / 2	1 / 2	0 / 0	2 / 2	1 / 1	0 / 0
MRSA32 - RL	4 / 4	4 / 4	4 / 4	4 / 4	4 / 4	4 / 4	4 / 4	4 / 4	4 / 4	4 / 4	4 / 4	4 / 4
MRSA# - L	2 / 2	1 / 1	0 / 0	2 / 2	1 / 1	0 / 0	2 / 2	1 / 1	0 / 0	2 / 2	1 / 1	0 / 0
MRSA# - RL	4 / 4	4 / 4	0 / 0	4 / 4	4 / 4	0 / 0	4 / 4	4 / 4	0 / 0	4 / 4	4 / 4	0 / 0
MRSA KA - L	2 / 2	1 / 1,5	0 /	1 / 1,5	0,5 / 0,5	0 / 0	2 / 2	1 / 1,5	0 / 0	2 / 2	1 / 1	0 / 0
MRSA KA - RL	4 / 4	4 / 4	2 / 2	4 / 4	4 / 4	2 / 2	4 / 4	4 / 4	2 / 2	4 / 4	4 / 4	2 / 2
MRSP16a - L	2 * / 2	1 * / 1	0 / 0	1 / 1	1 / 1	1 / 1	2 / 2	0 / 1	0 / 0	2 / 2	1 / 1	1 / 1
MRSP16a - RL	4 / 4	4 / 4	4 / 4	4 / 4	4 / 4	4 / 4	3 / 3	3 / 3	3 / 3	4 / 4	4 / 4	4 / 4
MRSP4 - L	0 / 0	0 / 0	0 / 0	0 / 1 *	0 / 1 *	0 / 0	0 / 1	0 / 0	0 / 0	2 / 2	1 / 1	1 / 1
MRSP4 - RL	1 * / 4 *	0 / 0	0 / 0	4 * / 4 *	0 / 0	0 / 0	1 * / 3	0 / 0	0 / 0	4 / 4	0 / 0	0 / 0
MRSP1 - L	1 * / 1 *	0 / 0	0 / 0	2 * / 2	1 * / 1	0 / 0	0 / 0	0 / 0	0 / 0	2 / 2	1 / 1	0 / 0
MRSP1 - RL	4 * / 4 *	4 * / 4 *	0 / 0	4 / 4	4 / 4	0 / 0	1 * / 1	1 * / 1	0 / 0	4 / 4	4 / 4	0 / 0
MRSP0,5 - L	0 / 0	0 / 0	0 / 0	0 / 0	0 / 0	0 / 0	0 / 0	0 / 0	0 / 0	2 / 2	1 / 1	1 / 1
MRSP0,5 - RL	0 / 0	0 / 0	0 / 0	1 * / 3	1 * / 3	0 / 0	0 / 0	0 / 0	0 / 0	4 / 4	4 / 4	0 / 0
MRSP KA - L	0,75 / 0,75	0,25 / 0,25	0 / 0	0,75 / 1	0,5 / 0,75	0,25 / 0,25	0,5 / 0,75	0 / 0,25	0 / 0	2 / 2	1 / 1	0,75 / 0,75
MRSP KA - RL	2,25 / 3	2 / 2	1 / 1	3,25 / 3,75	2,25 / 2,75	1 / 1	1,25 / 1,75	1 / 1	0,75 / 0,75	4 / 4	3 / 3	1 / 1

L laimennos, rikastamaton

RL rikastettu laimennos

ensimmäisen inkubaation jälkeen / toisen inkubaation jälkeen

* pesäkkeet pistemäisen pieniä, määrä arvioitu

MRSA KA viljeltyjen MRSA-laimennosten kasvun keskiarvo

MRSP KA viljeltyjen MRSP-laimennosten kasvun keskiarvo

0; - (ei kasvua)

1; + (1–10 pesäkettä)

2; ++ (10–100 pesäkettä)

3; +++ (100–1000 pesäkettä)

4; ++++ (>1000 pesäkettä)