

Mira Id ja Elina Simola
Vaikuttaako suosituksesta poikkeaminen
kiekkomenetelmällä suoritettavan
antibioottiherkkyyismäärityksen tulokseen?

Tekijät Otsikko Sivumäärä Aika	Mira Id, Elina Simola Vaikuttaako suosituksesta poikkeaminen kiekkomenetelmällä suoritettavan antibioottiherkkyyismäärityksen tulokseen 63 sivua + 7 liitettä 26.10.2011
Tutkinto	Terveys- ja hoitoala
Koulutusohjelma	Bioanalytiikka
Suuntautumisvaihtoehto	Bioanalytiikka
Ohjaajat	Laboratoriohoitaja Hanna Ihala Kasvatustieteiden maisteri Tuula Kurkinen Sairalamikrobiologi Eveliina Tarkka
<p>Kiekkoherkkyyismääritys on standardoitu menetelmä, joka on siitä huolimatta altis virheille. Vuoden 2011 alussa Suomi siirtyi noudattamaan EUCASTin suositusta antibioottiherkkyyismäärityksen teossa ja tulkinnessa. Opinnäytetyön tarkoitus oli selvittää vaikuttaako antibioottiherkkyyismäärityksen suorittamisen suosituksista poikkeaminen antibioottiherkkyyistulokseen. Tutkimme vaikuttavatko standardeista poikkeavat tekijät antibioottien estorenkaiden halkaisijoihin. Tutkittavat tekijät olivat 1) bakteerisuspension levitystapa 2) bakteerisuspension vahvuus 3) aika, joka kuluu ennen kuin bakteerisuspensio levitetään herkkyysmaljalle 4) aika, joka kuluu ennen kuin herkkyysmalja, jolle on lisätty antibioottikiekot, siirretään bakteerilajin vaatimiin kasvuolosuhteisiin.</p> <p>Tutkimme tekijöiden vaikutusta kuudella eri bakteerilajilla, joista käytimme sekä herkkää että herkkyydeltään alentunutta kantaa. Tutkittavat bakteerilajit olivat <i>Escherichia coli</i>, <i>Staphylococcus aureus</i>, <i>Klebsiella pneumoniae</i>, <i>Haemophilus influenzae</i>, <i>Streptococcus pneumoniae</i> ja <i>Streptococcus pyogenes</i>. Tavoitteenamme oli saada selville, onko valituilla tekijöillä tilastollista merkitsevyyttä bakteerilajikohtaisesti. Toteutimme työn HUSLABin kliinisen mikrobiologian bakteriologian osastolla.</p> <p>Opinnäytetyö perustui kokeelliseen tutkimukseen. Tutkimusmenetelminä käytimme sekä kvantitatiivista että kvalitatiivista menetelmää. Kokeellisen osuuden tulokset analysoimme tilastollisten testien avulla. Tuloksista voimme päätellä, että bakteerisuspension vahvuudella on vaikutusta estorenkaiden halkaisijoihin. Tämä ilmentyi neljän bakteerilajin kohdalla. Huomasimme myös bakteerilajien sisäisten kantojen välillä tilastollista merkitsevyyttä estorenkaiden halkaisijoita verratessa. Tulokset ovat kuitenkin ainoastaan suuntaantavia, johtuen toistojen vähäisestä määrästä. Muilla tutkittavilla tekijöillä ei ollut tilastollista merkitsevyyttä kiekkoherkkyyismenetelmän tuloksiin.</p> <p>Työmme perusteella olisi hyödyllistä tutkia tarkemmin bakteerisuspension vahvuuden vaikutusta herkkyysmäärityksen tuloksiin useammalla toistolla. Tällöin voitaisiin todeta luotettavasti tarve suspensiovahvuuden kontrollointiin herkkyysmäärityksiä tehdessä. Suspension levittämiskiiveen ja maljan siirtämiskiiveen vaikutusta olisi hyödyllistä tutkia enemmän, pidemmällä odotusajolla ja useammilla toistoilla.</p>	
Avainsanat	antibioottiherkkyyismääritys, kiekkomenetelmän suoritus

Authors	Mira Id, Elina Simola
Title	Does the Deviation From the EUCAST Recommendations Have an Effect on the Results of the Disc Diffusion Test?
Number of Pages	63 pages + 7 appendices
Date	26 October 2011
Degree	Bachelor of Health Care
Degree Programme	Biomedical Laboratory Science
Specialisation option	Biomedical Laboratory Science
Instructors	Hanna Ihala, Biomedical Laboratory Scientists Tuula Kurkinen, Senior Lecturer Eveliina Tarkka, Clinical Microbiologist
<p>At the beginning of the year 2011, Finland started to follow the recommendations of the disc diffusion test that EUCAST had set. The purpose of our final project was to study whether neglecting the recommendations affected the results of the disk diffusion tests. Moreover, we studied whether the selected factors had any effect on disk diffusion tests' results. The selected factors were the techniques of spreading bacterial suspension, the strength of bacterial suspension, the time from the preparation of the bacterial suspension to the point of spreading the bacterial suspension to Müller-Hinton agar and the time the finished agar plates stood still before incubating at +35°C.</p> <p>We studied these selected factors with six different species of bacteria. Of each species of bacteria, we studied a susceptible strain and a strain of which susceptibility had decreased. Species that we studied were <i>Escherichia coli</i>, <i>Staphylococcus aureus</i>, <i>Klebsiella pneumoniae</i>, <i>Haemophilus influenzae</i>, <i>Streptococcus pneumoniae</i> and <i>Streptococcus pyogenes</i>. Our purpose was to settle the effects and significance of the selected factors in disk diffusion testing. We conducted our final project in the HUSLAB Laboratory of Clinical Bacteriology, Helsinki, Finland.</p> <p>Our final project was based on the empirical experimental research method. We used both quantitative and qualitative methods. Furthermore we analyzed our results with a statistical programme. However, our results were only suggestive because of the amount of samples. We compared the variations in diameter of the zones with selected factors. Our result was that diameter of the zones differed only slightly between individual species of bacteria. We noticed the most significant variations in the results with the strength of bacterial suspension. The results lead to the conclusion that other selected factors do not have significant meaning in disk diffusion test. Based on our results, we suggest further studies. It could be very worthwhile to study further how the strength of the bacterial suspension affects the diameter of the zones with more recursions. In addition, it would be interesting to conduct a study with a longer time period before spreading the suspension and incubating the plates.</p>	
Keywords	antimicrobial susceptibility, performing of disk diffusion test

Sisällys

1	Johdanto	1
2	Antibioottiherkkyuden määrittäminen kiekkomenetelmällä	2
2.1	Aikaisemmat tutkimukset	3
2.2	Kiekkomenetelmä	4
2.3	Agarmaljat herkkyysmaljoina	7
3	Antibioottien vaikutus bakteerisoluuun	8
3.1	Vaikutus soluseinään	9
3.2	Vaikutus solukalvoon	10
3.3	Vaikutus proteiinisynteesiin	11
3.4	Vaikutus nukleiinihappo- ja foolihapposynteesiin	12
4	Tutkittavat bakteerilajit	13
4.1	<i>Escherichia coli</i>	14
4.2	<i>Staphylococcus aureus</i>	16
4.3	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	17
4.4	<i>Haemophilus influenzae</i>	18
4.5	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	20
4.6	<i>Streptococcus pyogenes</i>	21
5	Tutkimustehtävä	22
6	Tutkimusmenetelmät ja aineiston käsittely	24
7	Toteutus	27
7.1	Esikartoitus	27
7.2	Työn suoritus	28
8	Tulokset	32
9	Pohdinta	49
	Lähteet	57
	Liitteet 1–7	

1 Johdanto

Bakteerilajien antibioottiliherkkyyssmääritykset ovat osa potilaan hoitoa. Herkkyyssmääritysten tarkoituksena on mitata bakteerilajien vastustuskykyä eli resistenssiä antibiootteja kohtaan. Lisääntynyt antibioottien käyttö on lisännyt bakteerilajien resistenssiä lääkehoidossa käytettäville antibiooteille. Bakteerisolulla on kyky kehittää resistenssiä ja siirtää sitä saman lajin sisällä sekä toisille bakteerilajeille. (Nissinen 2006b; 201.) Kansainvälisesti verrattuna Pohjoismaiden antibioottiresistenssitasot ovat alhaisia (Kronvall 2010; 632).

Oikein ja luotettavasti toteutettu antibioottiliherkkyyssmääritys takaa potilaalle parhaan mahdollisen antibioottilääkityksen. Kiekkoherkkyyssmenetelmässä bakteeripesäkkeistä tehtyä suspensiota levitetään herkkyyssmaljalle, jolle lisätään antibiootतिकiekkoja. Bakteerilajien herkkyys antibiootteja kohtaan voidaan arvioida muodostuvien estorenkaiden halkaisijoiden perusteella. (EUCAST disk diffusion method for antimicrobial susceptibility testing 2010.) Kiekkoherkkyyssmenetelmästä on tullut yksi käytetyimmistä menetelmistä, sillä se on edullinen ja helppo suorittaa. Kun menetelmä otettiin käyttöön, sen suorittamisesta oli useita erilaisia suosituksia ympäri maailmaa. (Kronvall 2010; 622.) Antibioottiliherkkyyssmääritysten avulla seurataan bakteerilajien resistenssin kehittymistä. Suomessa mikrobilääkeresistenssiä seuraavat FiRe (Finnish Study Group for Antimicrobial Resistance), TTR (Tartuntatautirekisteri) ja Siro (Sairaalainfektio-ohjelma). FiRe on ainutlaatuinen maanlaajuinen mikrobilääkeresistenssin seurantaverkosto, joka tekee yhteistyötä EUCAST -komitean kanssa. (Bergman.)

Tämän vuoden alussa Suomessa on siirrytty noudattamaan EUCASTin antamaa standardia kiekkoherkkyyssmenetelmän suorittamisesta. Antibioottiliherkkyyden määrittäminen kiekkomenetelmällä on standardoinnista huolimatta altis virheille. EUCAST (The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) on kolmen järjestön muodostama komitea, jonka toiminnan pääpaino on yhdistää antibioottiliherkkyyssrajoja (SIR-rajat) eri Euroopan maiden kesken. Suurimmat muutokset, joita siirtyminen Suomessa on aiheuttanut, ovat estorenkaiden halkaisijoiden tulkintarajojen ja työhöjen muuttuminen. (EUCAST disk diffusion method for antimicrobial susceptibility testing 2010). EUCAST on tehnyt Euroopassa uraa uurtavaa standardointia, jotta suositukset kiekkoherkkyyssmenetelmän suorittamisesta olisivat yhteneväiset eri maiden kesken

(Kronvall 2010; 622). Yhteisten standardien noudattaminen mahdollistaa bakteerilajien antibioottil herkkyystilanteiden vertailua Euroopassa. EUCAST tekee epävirallista tiedonvaihtoa myös Yhdysvalloissa toimivan CLSI:n (Clinical and Laboratory Standards Institute) kanssa. Näiden komiteoiden virallisen yhteistyön estää niiden erilainen rakenne, rahoitus ja suhteet toimintaa sääteleviin viranomaisiin. (Kahlmeter ym. 2006; 501.)

Tässä työssä tutkimme vaikuttavatko yhdessä ohjaajien kanssa valitut tekijät herkkyyslukuihin. Tutkittavat tekijät olivat: bakteerisuspension levitys kolmella eri tavalla, erivahvuiset bakteerisuspensiot ja bakteerimaton paksuus. Lisäksi tutkimme vaikuttaako bakteerisolujen hengissä säilymiseen tunnin odotusaika ennen bakteerisuspension levittämistä herkkyysmaljalle. Tutkimme myös, vaikuttaako tunnin viive ennen herkkyysmaljan siirtämistä bakteerilajien vaatimiin kasvuolosuhteisiin bakteerisolujen hengissä säilymiseen. Toteutimme työn HUSLABin kliinisen mikrobiologian bakteriologian osastolla. Käytimme kuutta eri bakteerilajia, joista jokaisesta tutkimme kahta antibioottil herkkyydeltään eroavaa kantaa. Työssä käytettävät bakteerilajit ovat kliinisesti merkittäviä taudinaiheuttajia.

Käytimme työssämme kokeellista tutkimusstrategiaa hyödyntäen sekä kvantitatiivista että kvalitatiivista tutkimusmenetelmää. Kokeellisen osuuden tulokset analysoimme tilastollisesti. Tulokset vaihtelivat bakteerilajien välillä. Eroja esiintyi myös herkkyydeltään eroavien bakteerikantojen välillä. Työn tavoitteena oli selvittää, vaikuttaako työohjeen suosituksesta poikkeaminen antibioottil herkkyysmäärityksen tulokseen. Tavoitteenamme oli myös nostaa esille uusia jatkotutkimusaiheita.

2 Antibioottil herkkyuden määrittäminen kiekkomenetelmällä

Mikrobilääke on yleisnimi kaikille lääkkeeksi sopiville aineille, jotka estävät mikrobeja lisääntymästä tai tuhoavat niitä. Bakteerisoluihin vaikuttavia mikrobilääkkeitä kutsutaan bakteerilääkkeiksi. Toisten mikrobien tuottamia aineita kutsutaan puolestaan antibiooteiksi. Ne ovat tärkein osa bakteerilääkkeitä. Osa antibiooteista valmistetaan kemiallisesti. (Mäkelä 2002: 510–511.) Kliiniseen käyttöön otettavan uuden antibiootin teho ja vaikutus bakteerilajeihin tunnetaan aina tarkasti. Bakteerilajeilla on luonnollista resistenssiä antibiootteja kohtaan. Tämän lisäksi bakteerilajeilla on myös kyky hankkia resistenssiä eri mekanismein. Herkkyysmäärityksen indikaationa on hankitun resistenssin

osoittaminen antibiootti- ja bakteerilajikohtaisesti, jotta tarvittaessa potilaalle voidaan antaa tehokas antibioottilääkitys. (Nissinen 2006b: 201.)

Luonnollinen resistenssi eri antibiootteja kohtaan on bakteerilajikohtainen ominaisuus. Hankitulla resistenssillä tarkoitetaan normaalisti antibiootille herkkien bakteerilajien muuttumista resistenteiksi. Hankittu resistenssi perustuu joko kromosomaalisten geenien muutokseen tai plasmidin siirtymiseen. Kromosomaalinen mutaatio aiheuttaa bakteerisolussa muutoksen lääkkeen vaikutuskohdassa. Kromosomaalisen resistenssin syntyminen voidaan ehkäistä tarpeeksi suurella lääkeannoksella, joka tappaa nekin bakteeripopulaation jäsenet, jotka ovat hieman resistentimpiä kyseiselle lääkeaineelle. (Järvinen – Vaara – Huovinen – Liippo – Vasankari 2011: 122–129; Vuento – Vaara 2010: 68–71.)

2.1 Aikaisemmat tutkimukset

Kiekkoherkkyysmenetelmän suorituksesta oli useita eri käytäntöjä ja ohjeita laboratorioista riippuen ennen 1960 -lukua. Menetelmän standardoinnin puuttuminen muodostui kuitenkin ongelmaksi vasta 1960 -luvulle siirryttäessä. Tämän vuoksi tutkijat Kirby ja Bauer alkoivat kehittää kiekkoherkkyysmenetelmän ohjeita yhdistämällä ja päivittämällä aikaisempia tutkimuksia. He julkaisivat aikaisempiin tutkimuksiin perustuvat omat tutkimustuloksensa. Näiden tulosten perusteella WHO (World Health Organization) perusti komitean vuonna 1961, jonka tehtävänä oli standardoida kiekkoherkkyysmenetelmää. Tämän tuloksena syntyi standardoitu suositus kiekkoherkkyysmenetelmän suorittamisesta. Nykyään CLSI vastaa kiekkoherkkyysmenetelmän päivittämisestä ja tarvittavista muutoksista Yhdysvalloissa. Tällä tavalla varmistetaan menetelmän yhdenmukainen suorittaminen ja tulosten luotettavuus sekä vertailukyky. (Hudzicki 2009.) CLSI on julkaissut tutkimuksia ja suosituksia muun muassa agarmaljojen valmistuksesta, bakteerisuspension vahvuudesta, inkubaatioajoista ja -lämpötiloista sekä tulosten tulokinnasta ja menetelmän luotettavuudesta (M02-A10: Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard - Tenth Edition 2011).

Ennen EUCAST -komitean perustamista, Euroopassa eri mailla oli omat komiteat, jotka määrittivät omia SIR -rajoja. Jokaisen maan itsenäiset komiteat ovat tutkineet kiekkoherkkyysmenetelmää ja siihen vaikuttavia tekijöitä sekä standardoineet kiekkomenetelmää. Komiteat ovat olleet yhteistyössä toistensa kanssa, mutta eivät ole harmonisoi-

neet omia käytäntöjään yhtenäisiksi. EUCAST on yhtenäistänyt kansallisten komiteoiden ohjeistuksista eurooppalaisen standardin kiekkoherkkyysmenetelmän suorittamisesta tehden samalla uusia tutkimuksia sekä julkaissut yhtenäisiä SIR-rajoja. (Kahlmeter – Brown 2004: 187–188.) EUCASTin ja CLSI:n antamat standardit kiekkoherkkyysmenetelmään eroavat jonkin verran toisistaan. Esimerkiksi EUCAST suosittelee vähäsoluisempaa bakteerisuspensiota kuin CLSI. Uudet standardit ovat syntyneet pienillä muutoksilla vanhoista standardeista. (Kahlmeter ym. 2003: 146.)

2.2 Kiekkomenetelmä

Antibioottiherkkyysmääritys kiekkomenetelmällä perustuu agardiffuusion. Vuonna 1928 Alexander Fleming keksi penisilliinin agardiffuusion avulla. Ensin agardiffuusiomenetelmää käytettiin ainoastaan penisilliiniliuosten aktiivisuuden mittaamiseen. 1940-luvulla agardiffuusiomenetelmää alettiin kehittää. Tällöin päädyttiin matemaattiseen kaavaan, joka toimii nykyisen kiekkoherkkyysmenetelmän teoreettisena perustana. Huomattiin myös, että menetelmää voidaan käyttää käänteisesti, bakteerilajien antibioottiherkkyysien mittaamiseen. Kuoppaan pipetoitavan lääkeliuoksen sijasta agarin pinnalle asetettiin paperinen lääkekierokko, josta lääkeaine imeytyy agariin. (Nissinen 2009.) Kiekkoherkkyysmenetelmä on otettu laajasti käyttöön kliinisissä laboratorioissa jo 1960-luvulla, jolloin alkoi myös sen standardointi (Hindler – Jorgensen 2000: 73). Tänä vuonna Suomessa käyttöön otetun EUCASTin standardoiman ohjeen pääkohdat kiekkoherkkyysmenetelmälle ovat:

- 0,5 McFarlandin vahvuinen bakteerisuspensio valmistetaan 3–5 erillisestä bakteeripesäkkeistä.
- Bakteerisuspension vahvuus tarkistetaan densitometrillä.
- Bakteerisuspensio tulee levittää herkkyysmaljalle dreijan avulla 15 minuutin kuluessa sen valmistamisesta, kuitenkin viimeistään tunnin sisällä.
- Antibioottikiekot lisätään herkkyysmaljalle 15 minuutin kuluessa bakteerisuspension levittämisestä.
- Herkkyysmaljat siirretään kasvuolosuhteisiin 15 minuutin kuluessa antibioottikiekkojen lisäämisestä. Maljojen annetaan olla bakteerilajin vaatimissa kasvuolosuhteissa vähintään 16–18 tuntia.

- Tavallisilla Müller-Hinton herkkyysmaljoilla olevien antibioottien estorenkaiden halkaisijat mitataan tummaa taustaa vasten maljan pohjan puolelta hyvässä valaistuksessa.
- Rikastetuilla Müller-Hinton herkkyysmaljoilla olevien antibioottien estorenkaiden halkaisijat mitataan maljalta ilman kantta hyvässä valaistuksessa.
(EUCAST disk diffusion method for antimicrobial susceptibility testing 2010.)

Kiekkoherkkyysmenetelmässä käytettävä bakteerisuspensio valmistetaan valitsemalla bakteeriviljelmästä kolmesta viiteen erillistä, ulkonäöltään samanlaista bakteeripesäkettä ja sekoitetaan pesäkkeet keittosuolaliuokseen (0,9 % NaCl). Bakteerisuspension suositeltava vahvuus on 0,5 McFarlandia. Suspension vahvuuden voi tarkistaa densitometrin avulla tai vertaamalla sitä silmämääräisesti McFarlandin standardiin. Bakteerisuspensio levitetään kostutetulla pumpulitikulla mahdollisimman tasaisesti herkkyysmaljalle. Levittämisessä suositellaan käyttämään apuna dreijaa. (EUCAST disk diffusion method for antimicrobial susceptibility testing 2010; Meurman – Nissinen 2006: 205; Carlson – Koskela 2011: 44; Hindler – Jorgensen 2000: 73; Antimicrobial Susceptibility Testing (Agar Disk Diffusion Method):62–67.)

Bakteerisuspension levittämisen jälkeen herkkyysmaljalle lisätään antibioottikiekot kiekkoonostelijalla (kuvio 1). Bakteerilajista riippuen, herkkyysmaljalle asetetaan tietty määrä antibioottikiekoja. Nykyään menetelmässä käytettävät nestemäiset antibiootit on imeytetty kaupallisiin paperikiekkoihin, jonka jälkeen ne on kuivattu. Antibioottikiekoja säilytetään jääkaappilämpötilassa. Niiden tulisi kuitenkin olla huoneenlämmössä vähintään tunnin ajan ennen niiden käyttämistä, etteivät ne keräisi kosteutta. (EUCAST disk diffusion method for antimicrobial susceptibility testing 2010; Meurman – Nissinen 2006: 205; Carlson – Koskela 2011: 44; Hindler – Jorgensen 2000: 73; Antimicrobial Susceptibility Testing (Agar Disk Diffusion Method):62–67.)



Kuvio 1. Antibioottikiekkoonostelija

Antibiootti alkaa diffundoitua välittömästi paperikiekosta herkkyysmaljan elatusaineeseen. Bakteerisolut alkavat lisääntyä vasta päästyään tarvitsemiinsa kasvuolosuhteisiin. Herkkyysmaljan annetaan olla kasvuolosuhteissa vähintään 16–18 tuntia. Maljan alueella, jolla antibioottipitoisuus ylittää inhibitorisen pitoisuuden rajan, bakteerisolujen lisääntyminen estyy ja antibioottikiekon ympärille muodostuu estorengas. (EUCAST disk diffusion method for antimicrobial susceptibility testing 2010; Hindler – Jorgensen 2000: 73; Nissinen 2002: 532–533; Lalitha: 10–14; Antimicrobial Susceptibility Testing (Agar Disk Diffusion Method): 62–67; Meurman–Nissinen 2006: 205–206.)

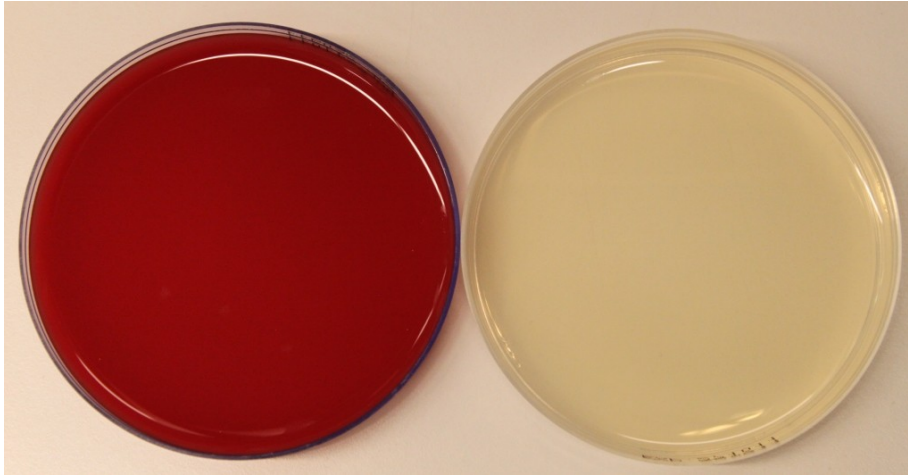
Estorenkaiden halkaisijat mitataan millimetrin tarkkuudella heti seuraavana päivänä bakteerisuspension levityksestä herkkyysmaljalle. Estorenkaiden halkaisijat olisi hyvä mitata tummaa taustaa vasten ja hyvässä valaistuksessa. Estorenkaiden halkaisija on sitä suurempi, mitä herkempi tutkittava bakteerilaji on kyseiselle antibiootille. Estorenkaiden ollessa suuria on mahdollista, että vierekkäiset estorengaat yhtyvät maljalla, jolloin halkaisijoiden mittaaminen ei onnistu. Jos halkaisijaa ei pystytäkään mittaamaan, voidaan estorengasta mitata säde ja kertoa se kahdella. Estorenkaiden halkaisijan mukaan voidaan määrittää bakteerilajikohtaisesti, onko bakteerilaji herkkä (S), herkkyydeltään alentunut (I) vai resistentti (R) tietyille antibiootille. (EUCAST disk diffusion method for antimicrobial susceptibility testing 2010; Hindler – Jorgensen 2000: 73; Nissinen 2002: 532–533.) Jos herkkyystulos on epäselvä tai poikkeuksellinen, se varmistetaan MIC -määrityksellä antibioottigradientin sisältävän kaupallisen E-testin avulla (Epsilon testi).

MIC-arvolla voidaan määrittää lääkkeen pienin pitoisuus, joka estää bakteerisolujen kasvun. (Nissinen 2002: 532–533.)

Kiekkoherkkyysmenetelmän luotettavuuteen ja tulosten tulkintaan vaikuttavat useat tekijät. Bakterilajin resistenssi antibiootille voidaan todeta kiekkoherkkyysmenetelmällä luotettavasti vasta kun vastustuskyvyn muutos on kasvanut kymmenkertaiseksi. Tästä johtuen kiekkoherkkyysmääritys on suhteellinen menetelmä. (Nissinen 2006a: 202–203.) Kiekkomenetelmän yksi suurimmista ongelmista on standardoinnista huolimatta sen herkkyys virheille. Se muun muassa soveltuu huonosti anaerobisille bakterilajeille, niiden hitaan kasvun vuoksi. (Carlson – Koskela 2011. 43–44.) Muodostuneen estorenkkaan reunojen selkeyteen vaikuttavat eri antibioottiryhmät ja eri bakterilajit (Nissinen 2006a: 202–203). Aina muodostunut estorengas ei ole selkeäreunainen, jolloin sitä on hankala mitata (Nissinen 2009). Useimmilla bakterilajeilla estorenkkaan halkaisija mitataan siitä, mistä alkaa pienikin bakterikasvu. Tietyillä bakterilajeilla halkaisijan mitta mitataan selvän estorenkkaan reunasta, vaikka reunan sisäpuolella olisi pientä bakterikasvua. (Hindler – Jorgensen 2000: 75–76; Myllyniemi 2010.) Esimerkiksi *H. influenzae* -lajin estorenkaiden mittaaminen voi olla hankalaa. Mittaamisen hankaluus johtuu yleensä pienestä kasvusta estorenkaiden reunalla, joka tulee ottaa huomioon estorenkaiden halkaisijoita mitattaessa. (Kärpänoja – Nissinen – Huovinen – Sarkkinen 2004: 662.) Antibioottikiekon huono kontakti herkkyysmaljan pintaan voi myös aiheuttaa epäselvän estorenkkaan. Kosteus vaikuttaa antibioottien imeytymiseen kiekosta agarmaljalle. (Myllyniemi 2010.)

2.3 Agarmaljat herkkyysmaljoina

Agar-agar maljat kehitettiin jo 1880-luvun alkupuolella. Agar-agar on valtamerissä kasvavasta levästä eristetty polysakkaridiseos. Vain harvat bakterisolut kykenevät hajottamaan agaria ravinnokseen. Tämän vuoksi agar sopii hyvin bakterisolujen kasvualustaksi. (Salkinoja-Salonen 2002: 57.) EUCAST suosittelee suurimmalle osalle bakterilajeja käytettäväksi herkkyysmäärityksissä Müller-Hinton (MH) agarmaljoja. Vaativille bakterilajeille EUCAST suosittelee herkkyysmäärityksissä käytettäväksi rikastettuja Müller-Hinton agarmaljoja (MH-F) (kuvio 2). Näille maljoille on lisätty viisi prosenttista defibrinoitua hevosen verta. Maljoille on lisätty myös 20 mg/l β -nikotiiniamidiadeniini-nukleotidiä (β -NAD). (EUCAST disk diffusion method for antimicrobial susceptibility testing 2010.)



Kuvio 2. Rikastettu Müller-Hinton herkkyysmalja (MH-F) ja tavallinen Müller-Hinton (MH) herkkyysmalja.

Tavallisia Müller-Hinton herkkyysmaljoja voidaan käyttää muun muassa *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* ja *Klebsiella pneumoniae* bakteerilajeille. Rikastettuja Müller-Hinton herkkyysmaljoja käytetään esimerkiksi *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae* ja *Streptococcus pyogenes* bakteerilajeille. (EUCAST disk diffusion method for antimicrobial susceptibility testing 2010.)

3 Antibioottien vaikutus bakteerisoluuun

Antibioottien tavoite on tuhota bakteerisoluja tai estää niiden lisääntyminen. Bakterisidisten lääkkeiden tarkoitus on tappaa bakteerisolua. Bakteriostaattiset lääkkeet estävät bakteerisolujen kasvua ja lisääntymistä, mutta ne eivät tapa bakteerisoluja. Antibiootit voidaan jakaa laaja- ja kapeakirjosiin lääkkeisiin. Laajakirjoinen antibiootti vaikuttaa moniin erilaisiin bakteerilajeihin, kapeakirjoinen puolestaan vain tietynlaisiin lajeihin. Lääkeaineen valinnassa tulisi käyttää mahdollisimman kapeakirjoisia antibiootteja, että resistenttejä bakteerikantoja ei kehittyisi. (Järvinen ym. 2011: 113–114; Koleratar 2000: 53–54; Järvinen 2006: 171.) Bakteerisolujen rakenne eroaa bakteerilajien kesken, mikä tulee ottaa huomioon antibioottia valittaessa. Esimerkiksi gramnegatiivisilla bakteerisolulla on solukalvon ja soluseinän lisäksi ulkokalvo, jota grampositiivisilla bakteerisolulla ei esiinny. Ulkokalvo suojaa gramnegatiivisia bakteerisoluja tietyiltä antibiooteilta, jotka kykenevät tuhoamaan grampositiivisia bakteerisoluja. (Vaara 2006: 178; Vaara – Skurnik – Sarvas 2010: 26–27.)

Antibioottien käytön ja lisääntyneen bakteerien lääkeresistenssin välille on voitu osoittaa yhteys (Kärpänoja ym. 2008: 2480). Antibioottien liiakäyttö aiheuttaa siis resistenssiuhkaa. Tarkoituksenmukaisella antibiootilla ja annoskoolla voidaan vaikuttaa muodostuvan resistenssin ehkäisyyn. (Meurman 2006: 166.) Jos annoskoko jää liian pieneksi, resistentimmät taudin aiheuttavat bakteerisolut eivät kuole, jolloin on todennäköistä, että resistenssiä muodostuu. (Järvinen 2006: 175.) Yhdistelemällä eri antibiootteja voidaan myös vähentää bakteerilajien resistenssin kehittymistä (Järvinen ym. 2011: 119). Gramnegatiivisten bakteerilajien kehittyvä moniresistenssi aiheuttaa tarvetta uusille tehoaville antibiooteille. (Vaara 2009: 2001).

Antibiootit pystyvät häiritsemään bakteerisolujen toimintoja vain, jos lääkkeen sitoutumiskohta on muuttumaton ja vapaa. Bakteerisoluilla on useita erilaisia mekanismeja, joilla ne pyrkivät estämään lääkeaineen vaikutuksen. Bakteerisolut pystyvät esimerkiksi muuntelemaan lääkkeiden vaikutuskohtia niin, että vaikuttava lääkeaine ei pysty sitoutumaan siihen. (Järvinen ym. 2011: 122–124; Koletar 2000: 59–60; Madigan – Martinko – Parker 2000: 765–766.) Antibiootit voidaan jakaa vaikutustapansa perusteella viiteen ryhmään. Ne voivat vaikuttaa bakteerisolun soluseinään, solukalvoon, proteiini-synteesiin, nukleiinihapposynteesiin tai foolihapposynteesiin. (Järvinen ym. 2011: 114–115.)

3.1 Vaikutus soluseinään

Lukuisat antibiootit vaikuttavat bakteerisolun soluseinään. Soluseinä antaa bakteerisolulle ominaisen muodon ja lisää sen mekaanista kestävyyttä. Bakteerisolujen soluseinä muodostuu peptidoglykaanista ja on hyvin omalaatuinen, minkä vuoksi monet antibiootit vaikuttavat juuri soluseinään. (Vaara ym. 2010: 20–21; Manuselis – Mahon 2000: 9; Salkinoja-Salonen – Puhakka 2002: 112–114; Madigan ym. 2000: 60–63.) Bakteerilajit jaetaan soluseinän perusteella grampositiivisiin ja gramnegatiivisiin (Järveläinen – Miettinen 2001: 2015).

Peptidoglykaanirakennetta tavataan vain bakteerisoluilla. Grampositiivisilla bakteerisoluilla on useita peptidoglykaanikerroksia päällekkäin, kun taas gramnegatiivisilla bakteerisoluilla kyseisiä kerroksia on vain muutama. Peptidoglykaani vastaa soluseinän jäykkyydestä. (Koletar 2000: 54–55). Jos peptidoglykaaniin syntyy riittävän suuri reikä, bakteerisolu ei pysty ylläpitämään osmoottista painetta ja kuolee. Antibiootit, jotka

estävät peptidoglykaanin muodostumista ovat tehokkaita, bakteerisoluja tappavia aineita. (Vaara ym. 2010. 21–27; Manuselis – Mahon 2000: 9–10; Puhakka – Salkinoja-Salonen 2002: 98–101; Madigan ym. 2000: 69–74.)

Bakteerisolut tarvitsevat peptidoglykaanin muodostamiseen useita entsyymeitä. Osa antibiooteista kykenee häiritsemään peptidoglykaanin muodostumiseen tarvittavien entsyymien toimintaa tai rakennetta. Beetalaktaamirakenteiset antibiootit kykenevät spesifin rakenteensa ansiosta sitoutumaan peptidoglykaanisynteesissä tarvittaviin entsyymeihin. Sitoutuminen estää tai muuttaa entsyymien toimintaa. (Järvinen ym. 2011: 114–115; Koletar 2000: 54–55; Vuento – Vaara 2010: 68.) Tämä aiheuttaa bakteerisolun soluseinän heikkenemisen, jolloin osmoottinen paine kasvaa, bakteerisolu turpoaa ja lopulta hajoaa (Lääkeluettelo 2011).

Beetalaktaamit ovat suurin antibioottiryhmä, johon kuuluu useita eri antibiootteja. Ryhmä saa nimensä beetalaktaamirenkään mukaan. Beetalaktaamiryhmän antibioottien tärkein resistenssimekanismi perustuu beetalaktamaasiin, hajottavaan entsyymiin. Osa beetalaktaamiryhmän antibiooteista on penisilliinejä. Beetalaktaameihin kuuluu myös karbapeneemit ja kefalosporiinit. Kefalosporiinit voidaan jakaa kolmeen eri sukupolveen vaikutuskirjonsa perusteella. (Vuento 2006: 168–169.)

3.2 Vaikutus solukalvoon

Solukalvoon vaikuttavia lääkkeitä käytetään vähän, sillä ne vaikuttavat myös eukaryoottisoluihin. Tämä johtuu prokaryoottien ja eukaryoottien solukalvojen samantapaisesta rakenteesta. Bakteerisolujen solukalvo muodostuu lipidikaksoiskalvosta. Sen tärkein tehtävä on säädellä bakteerisolun osmoottista painetta ja aineiden kulkua bakteerisoluun. Kalvo läpäisee molekyylejä valikoivasti. Tämän vuoksi bakteerisolu kuljettaa aineita sekä passiivisesti että aktiivisesti. (Vaara ym. 2010: 20–21; Manuselis – Mahon 2000: 9; Salkinoja-Salonen – Puhakka 2002: 112–114; Madigan ym. 2000: 60–63.)

Gramnegatiivisilla bakteerisoluilla on soluseinän ja solukalvon lisäksi ainutlaatuinen ulkokalvo, joka suojaa ulkopäin tulevilta haitallisilta aineilta (Vaara ym. 2010: 27; Manuselis – Mahon 2000: 9–10; Madigan ym. 2000: 69–74). Vaikuttaakseen gramnegatiivisten bakteerisolujen solukalvoon antibiootin tulee ensin vaurioittaa ulkokalvoa. Vasta tämän jälkeen vaikuttava antibiootti pääsee solukalvolle ja tuhoaa sen. Grampositiivi-

silla bakteerisoluilla ei ole ulkokalvoa, joten vaikuttavien antibioottien on helpompi päästä bakteerisolujen solukalvolle. (Järvinen ym. 2011: 117.) Esimerkiksi vankomysiini on solukalvon vaikuttava antibiootti. Sen vaikutuskohteena on bakteerisolun solukalvon biosynteesi ja sen estäminen. Vankomysiini aiheuttaa muutoksia myös bakteerisolun solukalvon läpäisevyydessä ja RNA-synteesissä. (Valmisteyhteenveto 2002.)

3.3 Vaikutus proteiinisynteesiin

Prokaryootti- ja eukaryoottisolujen proteiinisynteesit ovat hyvin samankaltaisia. Osa proteiinisynteesin vaiheista tapahtuu ribosomien pinnalla. Bakteerisolujen ribosomien rakenne on 70S. S kuvaa ribosomaalisen RNA:n kokoa. Ribosomi koostuu kahdesta osasta, 50S ja 30S. Eukaryoottien rakenne on puolestaan 80S ja se koostuu osista 60S ja 40S. Tämän vuoksi monet antibiootit vaikuttavat vain bakteerisolujen ribosomeihin. (Vaara ym. 2010: 18–20; Manuselis – Mahon 2000: 7–11; Salkinoja-Salonen – Puhakka 2002: 158; Madigan ym. 2000: 7–9.) Proteiinisynteesiin vaikuttavat antibiootit sitoutuvat joko ribosomin 50S tai 30S alayksikköön, jolloin ne vaikuttavat proteiinisynteesin eri vaiheisiin. Antibiootin sitoutuminen voi olla peruutettavissa olevaa tai peruuttamatonta. Peruuttamaton sitoutuminen aiheuttaa bakteerisolujen kuoleamisen. (Järvinen ym. 2011: 116–117; Koletar 2000: 57–58; Vuento – Vaara 2010: 68.)

Ribosomin alayksikköön 30S vaikuttavia antibiootteja ovat esimerkiksi aminoglykosidit ja tetrasykliinit. Aminoglykosidit sitoutuvat peruuttamattomasti bakteerisolun ribosomin alayksikköön. Sitoutuminen aiheuttaa virheellisiä peptidejä ja lopulta proteiinisynteesi estyy kokonaan. (Järvinen ym. 2011: 162.) Aminoglykosidit aiheuttavat bakteerisolussa myös DNA:n lukuvirheitä. Tetrasykliinien sitoutuminen on puolestaan peruutettavissa olevaa. (Järvinen ym. 2011: 116–117; Koletar 2000: 57–58; Vuento – Vaara 2010: 68.)

Ribosomin alayksikköön 50S vaikuttavia antibiootteja ovat esimerkiksi makrolidit, klo-ramfenikoli, linetsolidi ja fusidiinihappo. Makrolidien sitoutuminen on palautuvaa. Klo-ramfenikoli estää peptidisidoksen syntymistä mutta sen käyttöä hoidossa rajoittaa myrkyllisyys ja sivuvaikutukset. (Järvinen ym. 2011: 116–117; Koletar 2000: 57–58; Vuento – Vaara 2010: 68.) Linetsolidin sitoutuminen estää toiminnallisen 70S kompleksin muodostumisen, joka on tärkeä osa bakteerisolun translaatiota (Lääkealan turvallisuus ja kehittämiskeskus 2011a). Fusidiinihappo estää elongaatiotekijä G:tä sitoutumasta

bakteerisolun ribosomeihin. Tämä aiheuttaa bakteerisolun proteiinisynteesin estymisen. (Lääkealan turvallisuus ja kehittämiskeskus 2011b.)

3.4 Vaikutus nukleiinihappo- ja foolihapposynteesiin

Bakteerisolujen DNA on solulimassa nukleoidina (Vaara ym. 2010: 15). Nukleiinihapposynteesiin vaikuttavat antibiootit ovat haitallisia sekä prokaryootti- että eukaryootisoluille. Osa vaikuttavista antibiooteista häiritsee DNA replikaatiota ja osa puolestaan valmista DNA:ta. Eräät antibiootit vaikuttavat sellaisenaan DNA:han, mikä aiheuttaa siinä mutaatioita ja katkoksia. Osa antibiooteista voi puolestaan vaikuttaa polymeraasien toimintaan. (Järvinen ym. 2011: 117; Koletar 2000: 59; Vuento – Vaara 2010: 68.) Antibiooteista fluorokinolonit, vaikuttavat nukleiinihappojen transkriptioihin ja replikaatioihin (Salkinoja-Salonen 2002: 521). Rifampisiini estää bakteerisolun DNA-riippuvaista RNA-polymeraasia, jolloin RNA:n transkriptio estyy (Lääkealan turvallisuus ja kehittämiskeskus 2010).

Bakteerisolut tarvitsevat foolihappoa DNA synteesiinsä. Useat bakteerilajit eivät kykene ottamaan foolihappoa ympäristöstään, jolloin niiden täytyy valmistaa sitä para-aminobentsoehaposta. Antibiootit vaikuttavat estävästi para-aminobentsoehapon tai foolihapon muodostamiseen, jolloin bakteerisolun replikaatio estyy. (Koletar 2000: 58; Vuento – Vaara 2010: 68.) Esimerkiksi sulfa-trimetopriimi, joka on sulfadiatsiinin ja trimetopriimin yhdistelmä, vaikuttaa bakteerisolun foolihapposynteesiin (Terveyskirjasto). Sulfadiatsiini kilpailee para-aminobentsoehapon kanssa estäen dihydrofoolihapon synteesin. Trimetopriimi on foolihappoantagonisti, joka estää dihydrofoolihapon muuttumisen tetrahydrofoolihapoksi. (Valmisteyhteenveto 2010.) Työssämme käytetyt antibiootit on koottu vaikutustapojen perusteella taulukkoon (taulukko 1).

Taulukko 1. Työssä käytettävät antibiootit.

Vaikutuskohta bakteerisolussa ja antibioottiryhmät	Työssä käytettävät antibiootit
Soluseinä: Beetalaktaamit Karbapeneemi Kefalosporiinit	Ampisilliini, Amoksisilliini-klavuliinihappo, Oksasilliini, Penisilliini, Piperasilliini-tatsobaktaami Meropeneemi Kefalotiini, Kefoksiitiini, Kefotaksiimi, Keftatsidiimi, Kefaklori, Kefuroksiimi
Solukalvo Trisyklinen glukopeptidi	Vankomysiini
Proteiinisynteesi, ribosomin alayksikkö 30S Aminoglykosidit Tetrasykliinit	Tobramysiini, Netilmysiini Tetrasykliini
Proteiinisynteesi, ribosomin alayksikkö 50S Makrolidit Oksatsolidinoni Fusidaani	Erytromysiini, Klindamysiini Linetsolidi Fusidaanihappo Kloramfenikoli
Nukleiinihapposynteesi Fluorokinolonit Rifamysiini	Levofloksasiini, Siprofloksasiini Rifampisiini
Foolihapposynteesi	Sulfa-trimetopriimi

4 Tutkittavat bakteerilajit

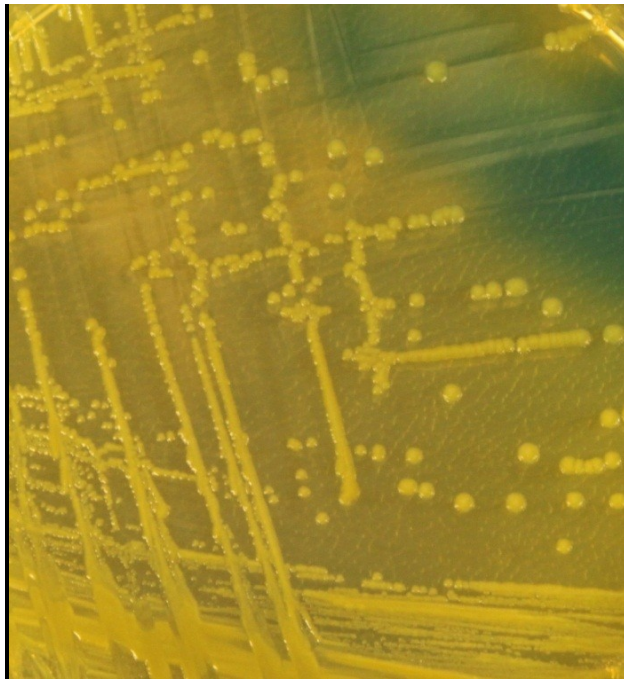
Bakteerilajit eroavat toisistaan muodoltaan, rakenteeltaan ja biokemiallisilta ominaisuuksiltaan. Bakteerilajien luokitus perustuu enimmäkseen gram-värijäytyvyyteen, biokemiallisiin ominaisuuksiin ja DNA -sekvensointiin. (Puhakka – Salkinoja-Salonen 2002: 92.) Bakteerisolujen yleisimpiä muotoja ovat pyöreät kokkibakteerit ja sauvabakteerit (Puhakka – Salkinoja-Salonen 2002: 98). Aerobiset bakteerilajit kykenevät lisääntymään ilmassa tai hiilidioksidilla rikastetussa ilmassa. Anaerobiset bakteerilajit tarvitsevat lisääntyäkseen hapettomat olosuhteet. Ihmisen taudinaiheuttajista useat gramnegatiiviset sauvabakteerit ovat hyvin vaatimattomia kasvuolosuhteidensa suhteen, osa taudinaiheuttajista on kuitenkin hyvin vaativia. Useat patogeenit bakteerilajit viihtyvät parhaiten 35–37°C:n lämmössä. (Vaara ym. 2010: 35–37; Manuselis – Mahon 2010: 14; Salkinoja-Salonen 2002: 183–191.) Bakteerisolujen lisääntyessä kiinteällä elä-

tusalustalla, ne muodostavat paljain silmin havaittavia pesäkkeitä. Yhdessä pesäkkeessä on miljoonia bakteerisoluja. (Vaara ym. 2010: 15.)

Bakteerilajien antibioottiresistenssi on usein plasmidivälitteinen ominaisuus, joka voi johtua esimerkiksi epäonnistuneesta antibiootihoidosta. Plasmidi on bakteerisolun genomien ulkopuolinen pieni rengasmainen kaksisäikeinen DNA-molekyyli. Plasmidin välityksellä voi siirtyä yksi tai useampi lääkeresistenssigeeni. (Skurnik 2010: 47–49; Manuselis – Mahon 2000: 21; Madigan ym. 2000: 314–318.) Plasmidi voi siirtyä bakteerisolusta toiseen konjugaation avulla, jolloin kahden bakteerisolun välille muodostuu pilus. Antibioottiresistenssin yleistyminen perustuu usein siihen, että antibioottiresistenssigeenit sijaitsevat joko konjugatiivisessa plasmidissa tai transposonissa. (Skurnik 2010: 47–49; Madigan ym. 2000: 314–318.) Transposonilla tarkoitetaan DNA:n osaa, joka kykenee vaihtamaan paikkaansa kromosomissa tai siirtymään uuteen kromosomiin (Vilen 2006).

4.1 *Escherichia coli*

Escherichia coli kuuluu *Enterobacteriaceae* -sukuun ja on aerobinen gramnegatiivinen sauvabakteeri (kuvio 3). *E. coli* nimitys kattaa useita bakteerikantoja, joiden virulenssiominaisuudet ovat erilaisia. Eroavista virulenssiominaisuuksista johtuen erilaiset kannat aiheuttavat erityyppisiä infektioita. Useilla kannoilla on ympärillään kapseli, joka estää fagocytoosia. *E. coli* -lajin kannat voidaan tyypittää antigeenien perusteella. *E. coli* bakteerisolut muodostavat valtaosan suoliston aerobisesta normaalifloorasta ja ne tuottavat myös K-vitamiinia. Yleisimpiä *E. colin* aiheuttamia infektioita ovat virtsatieinfektiot. Yleensä infektoivat bakteerisolut ovat peräisin potilaan omasta suoliston normaalifloorasta. *E. coli* aiheuttaa myös munuaistulehduksia, kirurgisia infektioita, sekainfektioita, sepsistä ja entriittiä. (Siitonen – Vaara 2010: 177–179; Mahon – Manuselis 2000: 468–473.) *E. colin* aiheuttamat sepsikset ovat lisääntyneet 2000 -luvulla (Gagliotti ym. 2011).



Kuvio 3. *E. coli* pesäkkeitä cled-maljalla.

Enterobakteerit ovat luonnostaan resistenttejä monille antibiooteille ulkokalvonsa vuoksi. Ne ovat kuitenkin herkkiä gramnegatiivisille bakteerilajeille suunnatuille antibiooteille. Hankittu resistenssi on tyypillistä enterobakteereille. Hankittua, plasmidiperäistä moniresistenssiä esiintyy yleisesti *E. coli* -kannoilla sairaaloissa, jolloin herkkyysmääritys on erityisen tarpeellinen. (Siitonen – Vaara 2010: 177.) *E. coli* tuottaa kromosomaalista beetalaktamaasia, joka voi siirtyä myös plasmidin välityksellä. Osa *E. coli* -kannoista tuottaa myös karbapenemaaseja. (Järvinen ym. 2011: 126–128.)

Avoterveydenhuollossa tavattavien virtsatieinfektioita aiheuttavien *E. coli* -kantojen ampicilliini- ja trimetopriimiresistenssi on kohonnut. Muille antibiooteille nämä kannat ovat hyvin herkkiä. *E. coli* -kantojen resistenssitaso fluorokinoloneja, nitrofurantoiinia, mesillinaamia ja kefalotiinia kohtaan on säilynyt hyvänä, mutta alueellisia resistenssieroja ilmenee. Avohoidon *E. coli* -kannoissa esiintyy myös ESBL-kantoja, jotka ovat kaikille muille beetalaktaameille paitsi karbapeneemille resistenttejä. Tällaiset kannat ovat yleensä resistenttejä myös monille muille antibiooteille. Sairaalassa tavattavilla *E. coli* -kannoilla kefuroksiimin ja fluorokinolonien herkkyys on jonkin verran alentunut. (Järvinen ym. 2011: 133.) Ruotsalainen pitkäaikaistutkimus osoitti, että *E. coli* -resistenssi kaikille käytössä oleville antibiooteille on noussut 1990-luvun alun jälkeen (Kronvall 2010: 634).

4.2 *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus on aerobinen grampositiivinen kokkibakteeri (kuvio 4), joka voi esiintyä yksin, pareittain tai ryhmässä (Larsen – Mahon 2000: 330.) Se kuuluu ihmisen nenänielun ja ihon normaaliflooraan, mutta on myös tärkeä taudinaiheuttaja. Suurin osa *S. aureus* -kannoista muodostaa ympärilleen kapselin, joka suojaa fagosytoosilta. Kapselin perusteella kannat voidaan serotyypittää eri tyyppeihin. *S. aureuksen* taudinaiheuttamiskykyyn vaikuttaa erilaiset tekijät kuten adhesiinit ja eksoentsyymit. (Vuopio-Varkila – Kuusela – Kotilainen 2010: 83–84; Larsen – Mahon 2000: 332.)



Kuvio 4. *S. aureus* suklaamaljalla.

S. aureus aiheuttaa infektioita sekä terveille että sairaille ihmisille (Vuopio-Varkila ym. 2010: 83–84). Stafylokokit ovat yleisimpiä ihoinfektioiden aiheuttajia, sillä niitä on iholla runsaasti (Vuento 2010: 45). *S. aureuksen* aiheuttamia infektioita ovat muun muassa karvatuppitulehdus, märkärupi, selluliitti ja rintarauhaskudoksen infektio. Se aiheuttaa myös bakteremioita, sepsiksiä ja endokardiittia. *S. aureuksesta* on tullut myös merkittävä sairaalaepidemioiden aiheuttaja. (Vuopio-Varkila ym. 2010: 86–89; Larsen – Mahon 2000: 333, 341.)

S. aureuksella on resistenssiä käytännössä kaikkia kliinisessä käytössä olevia antibiootteja kohtaan. Yli 80 % *S. aureus* -kannoista tuottavat beetalaktamaasia ja ne ovat siten tavalliselle penisilliinille resistenttejä. Beetalaktamaasigeeni siirtyy stafylokokista toiseen transduktion välityksellä. Transduktiolla tarkoitetaan perintöaineksen siirtymistä bakteerisolusta toiseen bakteriofagien välityksellä (Skurnik 2010: 47–49). On olemassa myös penisillinaasia kestäviä penisiliinejä, joita kutsutaan stafylokokkipenisilliineiksi,

joihin luokitellaan muun muassa kloksasilliini ja dikloksasilliini. Osa *S. aureus*-kannoista on resistenttejä myös näille. Tällaisia kantoja kutsutaan metisilliniresistenteiksi *S. aureus*-kannoiksi eli MRSA -kannoiksi. Nämä kannat ovat aina resistenttejä kaikille muillekin beetalaktaamiantibioteille. (Vuopio-Varkila ym. 2010: 89–90.; Järvinen ym. 2011: 125.)

MRSA, kehittyi 1980-luvun puolella välissä (Larsen – Mahon 2000: 341). Ensimmäisestä MRSA löydöstä seuranneina vuosikymmeninä, se muodosti suhteellisen pienen osuuden koko *S. aureus* populaatiosta. MRSA kuitenkin lisääntyi dramaattisesti 1990-luvulla. Samalla kun metisilliniresistenssistä tuli yhä laajemmin levinnyt, MRSA -kannat erotettiin muista *S. aureus*-kannoista. (Hunt ym. 2011.) Vuosien 2006–2009 aikana useissa Euroopan maissa MRSA tapausten määrät ovat vähentyneet (Kronvall 2010: 632). MRSA potilaita on hoidettu vankomysiinillä. Sillä on ollut hyvä hoitovaste, mutta vankomysiinille resistenteistä *S. aureus*-kannoista on kuitenkin jo raportoitu. (Larsen – Mahon 2000: 341.) Suomessa vankomysiiniresistenssiä ei ole vielä havaittu. Avohoidossa *S. aureus* kantojen herkkyystilanne on hyvä. (Järvinen ym. 2011: 133.)

4.3 *Klebsiella pneumoniae*

Klebsiella pneumoniae on gramnegatiivinen sauvabakteeri. Se muodostaa polysakkariidikapselin, joka on tärkeä sen taudinaiheuttamiskyvyn kannalta. Muodostuneen polysakkariidikapselin perusteella *Klebsiella*-bakteerilajit voidaan jakaa K-antigeenityyppeihin. Kapseli suojaa bakteerisolua myös fagosytoosilta ja se estää myös joidenkin antibioottien imeytymistä. Kapseli vastaa myös bakteerisolun kosteudesta ja liman tuottamisesta (kuvio 5). *Klebsiella*-lajit kuuluvat ihmisen suoliston normaaliflooraan ja ne harvoin aiheuttavat infektioita perusterveille ihmisille, mutta ovat merkittäviä sairaalainfektioiden aiheuttajia. *K. pneumoniae* aiheuttaa esimerkiksi alahengitystieinfektioita, lohkokeuhkokuumetta, virtsatieinfektioita ja bakteremiaa. (Tissari – Anttila 2010: 196–197; Mahon – Manuselis 2000: 473–474.)



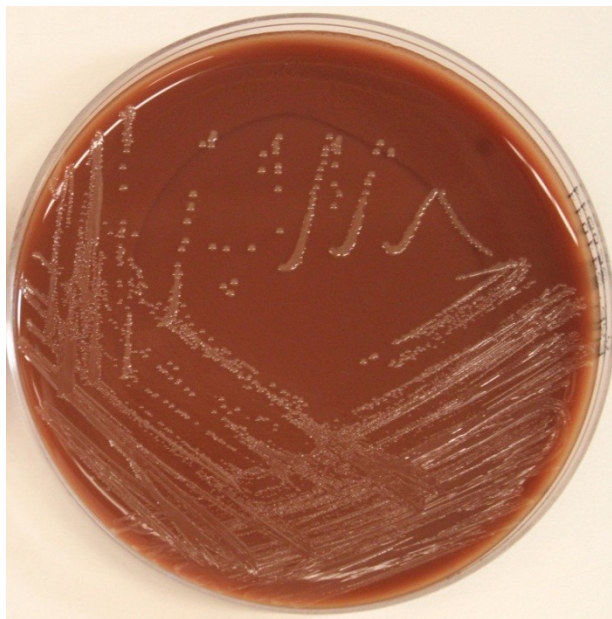
Kuvio 5. *Klebsiella pneumoniae*lle tyypillinen limainen pesäke.

Klebsiella -bakteerilajit tuottavat beetalaktamaasia ja ovat siksi luonnostaan resistenttejä esimerkiksi ampisilliinille. Ne ovat yleensä herkkiä muun muassa amoksisilliinin ja klavulaanihapon yhdistelmälle, II ja III polven kefalosporiinille, aminoglykosideille ja karbapeneemeille. (Tissari – Anttila 2010: 196–197.) Nitrofurantoiinia, trimetopriimia ja sulfa-trimetopriimia kohtaan *K. pneumoniae*lla on hieman korkeammat resistenssitasot. Beetalaktamaasigeenin siirtyminen plasmidin välityksellä on tavallista *K. pneumoniae*lle. Osa *K. pneumoniae* -kannoista tuottaa myös karbapenemaaseja. Kyseiset kannat ovat levinneet nopeasti ympäri maailman. (Järvinen ym. 2011: 126–128, 133.) Karbapeneemille resistenttiä *K. pneumoniae*ta voidaan pitää ongelmallisena, koska tällöin hoidossa voidaan käyttää enimmäkseen vain kolistiinia ja tigesyliinillä. Tigesyliinille resistenssejä *K. pneumoniae* tapauksia on kuitenkin löydetty myös jo Euroopasta. Kehittynyt tigesyliiniresistenssi on suuri huolenaihe. (Neonakis – Stylianou – Daphnis – Maraki 2011: 78.)

4.4 *Haemophilus influenzae*

Haemophilus influenzae on gramnegatiivinen sauvabakteeri, joka muodostaa hentoja pesäkkeitä (kuvio 6). Sille on tyypillistä, että se kasvaa suklaamaljalla mutta ei verimaljalla. Se on kasvuolosuhteiltaan hyvin vaativa. Se kuuluu ylähengitysteiden normaaliin flooraan. *H. influenzae*n taudinaiheuttamiskyky määräytyy sen mukaan, onko bakteerisolulla kapseli vai ei. Kapseli suojaa bakteerisolua elimistön vasta-aineilta ja fagosytoosilta. Kapselin avulla bakteerisolu myös kykenee aiheuttamaan huomattavasti vakavampia tauteja kuin kapseliton bakteerisolu. *H. influenzae* bakteerit voidaan jakaa kuu-

teen eri serotyyppeihin. (Käyhty – Peltola 2010: 166; Manuselis – Barnishan 2000: 428.) *H. influenzae* taudinaiheuttamiskykyyn kapselin lisäksi vaikuttavat myös IgA proteaasi, ulkokalvon proteiinit ja lipo-oligosakkaridit sekä adheesiokyky (Manuselis – Barnishan 2000: 428–429). *H. influenzae* tyyppi b on yleisin vakavan infektion aiheuttaja. Sen aiheuttamia infektiota esiintyy pääasiassa nuorilla lapsilla. Ennen Hib -rokotusten käyttöönottoa, tyyppi b aiheutti yli 90 % vakavista *H. influenzae* -tauditapauksista. *H. influenzae* aiheuttamia vakavia tauteja ovat aivokalvontulehdus, kurkunkansitulehdus, keuhkokuume ja septikemia. Kapselittomat *H. influenzae* bakteerisolut aiheuttavat tavallisimmin paikallistulehduksia kuten välikorvantulehdusta ja akuutteja keuhkoputkentulehduksia. (Käyhty – Peltola 2010: 166–168.)



Kuvio 6. Hentoja *H. influenzae* pesäkkeitä suklaamaljalla.

Ensimmäisistä ampisilliinille resistentteistä *H. influenzae* tapauksista raportoitiin jo 1974. Beetalaktaameille herkkiä, mutta ampisilliinille resistenttejä *H. influenzae* -kantoja esiintyi ensimmäisen kerran 1980-luvulla. (Kärpänoja ym. 2004: 660.) Beetalaktaamiresistenssi on lisääntynyt viimeisten vuosikymmenien aikana. *H. influenzae* voi hankkia ampisilliiniresistenssin monella eri tavalla. Suomessa *H. influenzae* -kannoista noin 20 % on resistenttejä ampisilliinille ja sulfa-trimetopriimille. (Käyhty – Peltola 2010: 168; Järvinen ym. 2011: 132.) Resistenssistä huolimatta ampisilliiniä on käytetty yhtenä vaihtoehtona infektioiden hoidossa 2000-luvulla (Arendrup – Dahl Knudsen – Tvenstrup Jensen – Jensen – Frimodt-Møller 2001: 269). On harvinaista, että *H. influenzae* olisi resistentti amoksisilliini-klavulaanilahapelle, kefuroksiimille, keftriaksonille ja

siprofloksasiinille (Käyhty – Peltola 2010: 168; Järvinen ym. 2011: 132). Amoksisilliini-klavuliinihappo ja kefuroksiimi ovat tehokkaita antibiootteja *H. influenzae* bakteerilajin aiheuttamien infektioiden hoidossa. *H. influenzae* -kannoilla on hyvä resistenssitilanne tetrasykliinejä kohtaan. Vain alle 3 % kannoista omaa tetrasykliiniresistenssin. *H. influenzae* -kantojen makrolidiherkkyys on usein alentunut. (Järvinen ym. 2011: 132.) Viimeisten vuosikymmenien aikana *H. influenzae* bakteerilajille on kehittynyt monia eri antibioottiresistenssejä (Arendrup ym. 2001: 270).

4.5 *Streptococcus pneumoniae*

Streptococcus pneumoniae eli pneumokokki on grampositiivinen kokkibakteeri. *S. pneumoniae* luokitellaan fakultatiiviseksi anaerobiksi, eli se kykenee lisääntymään sekä hapellisissa että hapettomissa olosuhteissa. Se esiintyy useimmiten diplokokkina. Vaikka pneumokokkia vastaan on tehokkaita antibiootteja, sen aiheuttamiin sairauksiin liittyy edelleen suuri sairastavuus ja kuolleisuus. Kapseli on tärkeä tekijä bakteerisolun taudinaiheuttamiskyvyn kannalta. (Kauma – Virolainen-Julkunen 2010: 112–113.) Ne bakteerikannat, jotka eivät pysty muodostamaan kapselia, eivät ole patogeenejä. Pneumokokki tuottaa myös useita toksiineja. (Larsen 2000: 364.)

Pneumokokkia esiintyy ihmisten hengitysteiden normaalifloorassa. Pneumokokki-infektioon sairastuneella on usein jokin altistava tekijä, kuten esimerkiksi heikentynyt immuunipuolustus. Vakavia pneumokokki infektoita tavataan useimmin pienillä lapsilla ja vanhoilla ihmisillä. Se on tärkein lasten ja aikuisten akuuttien välikorvatulehdusten aiheuttajabakteeri. Se aiheuttaa myös keuhkokuumetta, sepsistä, aivokalvontulehdusta, endokardiittia ja bakteremiaa. (Kauma – Virolainen-Julkunen 2010: 113–116; Larsen 2000: 365.) Pneumokokkia vastaan on jo 1900-luvun alussa kehitetty rokote, jota päivitetään säännöllisesti (Kauma – Virolainen-Julkunen 2010: 120).

Pneumokokin herkkyys eri antibiootteja kohtaan on pysynyt kohtuullisen hyvänä, mutta viime aikoina se on heikentynyt. Ainoastaan penisilliinille resistenttien kantojen osuus on lisääntynyt 2000-luvun aikana, mutta niiden osuus on vieläkin pieni. (Järvinen ym. 2011: 131–132.) Tutkimuksissa on pystytty osoittamaan yhteys kefalosporiinien ja beetalaktaamiantibioottien käytön ja penisilliiniresistenssin muodostumisen välille (Bergman ym. 2006: 3648). Muodostuneesta penisilliiniresistenssistä huolimatta penisilliini on yhä yksi käytetyimmistä lääkeaineista. Amoksisilliinin teho pneumokokkiin on sama

kuin penisilliinillä. Penisilliinin tehon laskiessa heikkenee myös I ja II polven kefalosporiinien teho. Tällöin suurinta osaa III polven kefalosporiineista voidaan käyttää tehokkaana hoitona. (Kauma – Virolainen-Julkunen 2010: 118–119; Järvinen ym. 2011: 131–132.) Pneumokokkiin tehoaa vielä tällä hetkellä karbapeneemit, vankomysiini ja teliromysiini (Kauma – Virolainen-Julkunen 2010: 118–119; Järvinen ym. 2011: 131–132).

Pneumokokki on kehittänyt myös resistenssin makrolideille, joka on lisääntynyt koko 2000-luvun ajan (Kauma – Virolainen-Julkunen 2010: 118–119; Järvinen ym. 2011: 131–132). Tutkimuksissa on voitu osoittaa yhteys makrolidien käytölle ja lisääntyneelle makrolidiresistenssille (Bergman ym. 2006: 3646). Monissa Euroopan maissa *S. pneumoniae* makrolidiresistenssi on korkeampi kuin penisilliiniresistenssi (Imöhl – Reinert – Mutscher – van der Linden 2010). Klindamysiini- ja sulfa-trimetopriimiresistenssi on myös nousussa (Järvinen ym. 2011: 131–132). Makrolidien käytön on todettu lisäävän erytromysiininresistenssiä. Suomessa sulfa-trimetopriimiresistenssi on lisääntynyt pneumokokeilla 1980-luvun lopulta aina 1990-luvulle asti. Tämän jälkeen resistenssin lisääntyminen on ollut hitaampaa. (Kärpänoja ym. 2008: 2480–2482.)

4.6 *Streptococcus pyogenes*

Streptococcus pyogenes on A-ryhmän beta-hemolyyttinen streptokokki. Se on kapselilinen, anaerobinen grampositiivinen kokkibakteeri. *S. pyogeneksellä* on useita tekijöitä, jotka vaikuttavat sen taudinaiheuttamiskykyyn, esimerkiksi kapselissa sijaitseva M-proteiini. Kyseinen bakteerilaji aiheuttaa lapsille ja aikuisille hyvin monenlaisia infektioita. Yleisin sen aiheuttamista taudeista on nielurisatulehdus. Se aiheuttaa myös välikorvan tulehduksia, nenän sivuontelon tulehduksia, ihoinfektioita, tulirokkoa ja keuhkokuumetta. Jälkitaudit ovat tyypillisiä seurauksia *S. pyogeneksen* aiheuttamille infektioille. (Vuopio-Varkila – Syrjänen – Kotilainen 2010: 102–105; Larsen 2000: 358–361.)

A-streptokokit ovat luonnostaan herkkiä penisilliinille, kefalosporiineille, makrolideille sekä klindamysiinille. *S. pyogenes* on maailmanlaajuisesti herkkä beetalaktaamiantibiootteja kohtaan (Gracia ym. 2008: 52). Streptokokkien herkkyys uusille fluorokinoloneille on alentunut. *S. pyogenes* -kantojen makrolidiresistenssi poikkeaa alueellisesti. Alueellisen resistenssitason kohotessa hoidon tulee perustua herkkyysmääritykseen. (Vuopio-Varkila ym. 2010: 107–108.) Makrolidiherkkyys testataan aina erytromysiini-

kiekkolla. Jos kanta on resistentti erytromysiinille, se on resistentti myös muille makrolideille. (Järvinen ym. 2011: 132.)

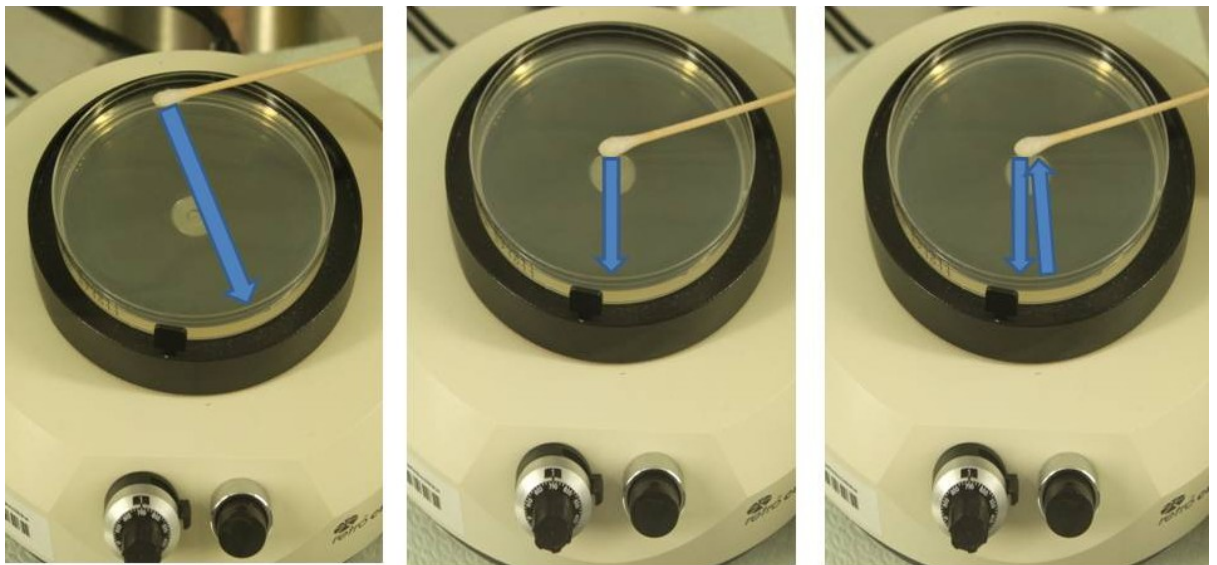
5 Tutkimustehtävä

Antibioottiherkkyysmäärittämisen suorittamisesta on annettu suosituksia usean eri järjestön taholta. Suomessa käytetään EUCAST -komitean asettamaa suositusta. Välillä tulee kuitenkin tilanteita, jolloin suosituksessa kuvatuista suoritustavoista joudutaan poikkeamaan. Esimerkiksi viikonloppuisin herkkyysmaljat voivat olla suositeltua kauemmin huoneenlämmössä ennen kuin ne siirretään kasvuolosuhteisiin. Työmme tarkoituksena ja tavoitteena oli selvittää vaikuttaako antibioottiherkkyysmäärittämisen suosituksesta poikkeaminen kiekkomenetelmästä saataviin tuloksiin. Selvitimme onko kiekkoherkkyysmäärittämisen suorittamisessa yksittäisiä tekijöitä, jotka vaikuttavat merkittävästi tuloksiin. Alaongelmilla pyritään löytämään vastauksia tutkimuksen pääongelmaan (Hirsjärvi – Remes – Sajavaara 2005: 117–119). Olemme tehneet tutkittavista tekijöistä alaongelmia, joiden avulla pyrimme saamaan vastauksia pääongelmaamme. Pääongelmamme on ”Mitkä tekijät vaikuttavat antibioottiherkkyysmenetelmän tuloksiin?”. Työssämme on useampia samantasoisia alaongelmia, joihin päädyimme yhdessä ohjaajien kanssa.

1. Onko bakteerisuspension levitystavalla merkitystä bakteerimaton paksuuteen ja tasaisuuteen?
2. Vaikuttaako bakteerisuspension vahvuus estorenkaiden halkaisijoihin tai bakteerimaton paksuuteen?
3. Vaikuttaako tunnin viive ennen bakteerisuspension levittämistä herkkyysmaljalle bakteerisolujen hengissä säilymiseen 0,5 McFarlandin vahvuudessa bakteerisuspensiossa?
4. Vaikuttaako tunnin viive ennen kasvuolosuhteisiin siirtämistä bakteerisolujen hengissä säilymiseen herkkyysmaljalla, jolle on lisätty antibioottikiekot? Tämän toteutamme vain herkkyysmaljoilla, joille on levitetty 0,5 McFarlandin vahvuista bakteerisuspensiota.

Bakteerisuspension levitystavasta on annettu suositus, jossa levittämisen apuna tulee käyttää dreijaa. Tämän tarkemmin ohjeistuksessa ei ole määritetty suspension levitys-

tapaa. Suosituksissa todetaan, että bakteeripesäkkeiden tulee olla maljalla tasaisesti, niin etteivät ne olisi liian lähellä tai kaukana toisistaan. Päivittäisessä laboratoriotyössä on käytössä hyvin monenlaisia tapoja levittää bakteerisuspensiota herkkyysmaljalle. Työssämme tutkimme kolmea erilaista levitystapaa (kuvio 7). Tavassa yksi bakteerisuspensiosta kostutettu pumpulitikku kuljetetaan herkkyysmaljan yläreunasta alareunaan asti. Tavassa kaksi kostutettu pumpulitikku kuljetetaan herkkyysmaljan puolestavälistä maljan reunaan asti. Tavassa kolme puolestaan kostutettu pumpulitikku kuljetetaan herkkyysmaljan puolestavälistä maljan reunaan ja takaisin puoleenväliin. Teke-
miemme havaintojen mukaan nämä ovat yleisimpiä levitystapoja päivittäisessä laboratoriotyössä.



Levitystapa 1

Levitystapa 2

Levitystapa 3

Kuvio 7. Tutkittavat levitystavat dreijaa apuna käyttäen.

Levitystapoja tutkimme vain 0,5 McFarlandin vahvuisella bakteerisuspensiolla. Päätimme, että tutkimme bakteerisuspension levitystapaa muuten normaalisti etenevän määrityksen kohdalla. Tällöin voisimme todeta herkkyysmääritykseen mahdollisesti vaikuttavan levitystavan helpommin. Tutkiessamme muita tekijöitä, levitimme bakteerisuspension yhteisesti sovitulla tavalla. Valitsimme levitystavaksi tavan kolme, sillä se tuntui meistä helpoimmalta tavalta levittää bakteerisuspensio. Standardoidun ohjeen mukaan optimaalisen bakteerisuspension vahvuuden tulisi olla 0,5 McFarlandia. Suspension vahvuus perustuu bakteerisolujen määrään keittosuolaliuoksessa. Selvitimme, vaikuttaako bakteerisuspension vahvuus estorenkaiden halkaisijoihin. Bakteerisuspen-

sion ollessa vahvempi kuin suositeltava vahvuus, on suspensiossa enemmän bakteerisoluja, jolloin estorenkaiden halkaisijoiden tulisi olla pienempiä.

EUCASTin standardoimassa suosituksessa suositellaan, että bakteerisuspensio levitetään herkkyysmaljalle 15 minuutin kuluessa sen valmistamisesta. Suspensio tulee kuitenkin levittää viimeistään tunnin kuluttua sen valmistamisesta. Suspension levittäminen 15 minuutin kuluessa saattaa kuitenkin joissain tilanteissa ylittyä, kuten viikonloppuisin. Tämän vuoksi tutkimme, vaikuttaako tunnin viive merkittävästi tutkittavien bakteerilajien hengissä säilymiseen bakteerisuspensiossa ennen herkkyysmaljalle levittämistä. Jos bakteerisolut kuolevat suspensiossa ennen sen levittämistä maljalle, herkkyysmaljalle ei synny bakteeripesäkkeitä.

Tässä työssä kutsutaan kiekotetuksi maljaksi herkkyysmaljaa, jolle on lisätty antibioottikiekot. EUCASTin suosituksessa suositeltu aika, joka saisi kulua antibioottien lisäämisen ja herkkyysmaljan kasvuolosuhteisiin siirtämisen välillä on maksimissaan 15 minuuttia. Myös tämä aika saattaa ylittyä työelämässä. Tämän vuoksi säilytimme osaa 0.5 McFarlandin vahvuisella bakteerisuspensiolla levitettyjä kiekotettuja maljoja huoneenlämmössä tunnin ajan. Vaativimpien lajien bakteerisolut voivat kuolla kiekotettujen maljojen odottaessa huoneenlämmössä ennen kasvuolosuhteisiin siirtämistä. Tutkimme, näkyykö tunnin viive estorenkaiden halkaisijoiden koossa.

Bakteerimaton eli maljalla olevan bakteerikasvuston paksuutta on vaikea arvioida. Se perustuu silmämääräiseen arvioon. Hyvä bakteerimatto on tasainen, jossa bakteeripesäkkeet ovat tiheästi vierekkäin, mutta ne eivät saa olla päällekkäin. Bakteerimaton tasaisuus vaikuttaa antibioottien ympärille muodostuvien estorenkaiden halkaisijoiden kokoon ja mittaamiseen.

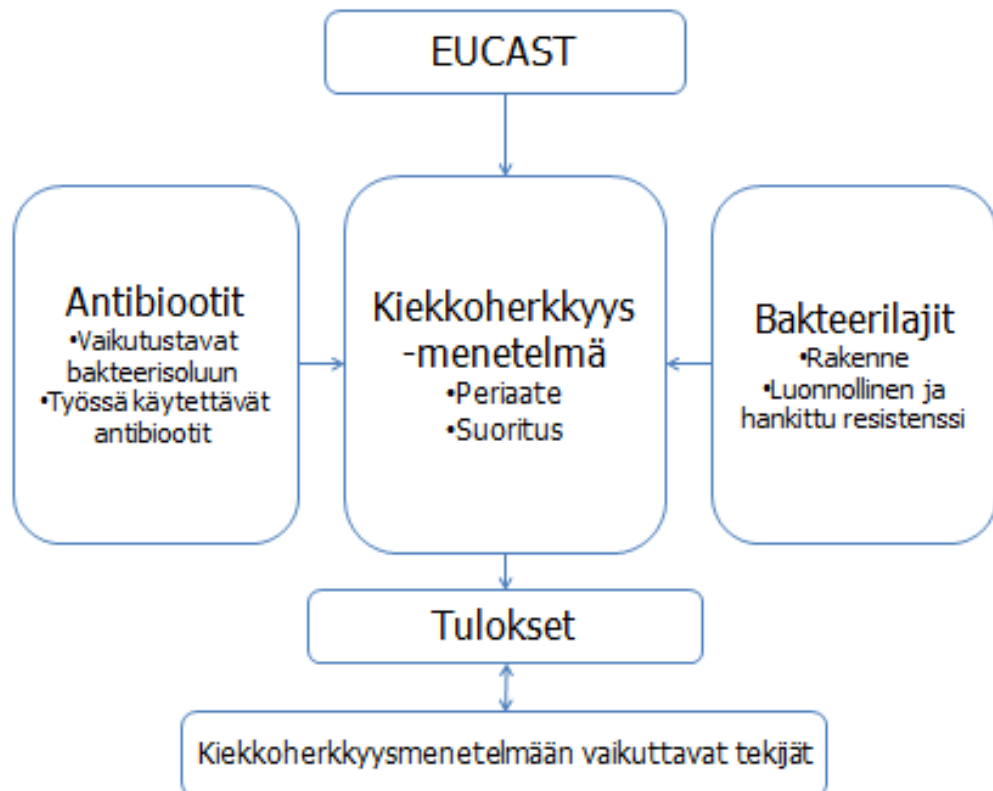
6 Tutkimusmenetelmät ja aineiston käsittely

Tutkimusmenetelmät voidaan jakaa kvantitatiivisiin ja kvalitatiivisiin tutkimusmenetelmiin, jotka voidaan myös yhdistää tutkimusta tehdessä (Vilkkä 2005: 49, 55; Hirsjärvi ym. 2005: 127–129). Käytimme kvalitatiivista tutkimusmenetelmää apuna kvantitatiivisen tutkimuksen alkuvaiheessa, saadaksemme käsityksen päivittäisessä laboratorio-

diagnostiikassa käytettävistä työtapoista. Toteutimme esikartoituksen kvalitatiivisella menetelmällä ja työn kokeellisen osuuden kvantitatiivisella menetelmällä.

Kvantitatiivisessa ja opinnäytetyömme kaltaisessa selittävässä tutkimuksessa voidaan käyttää hypoteeseja. Työssämme alaongelmien lisäksi apuna toimivat kaksi keskeistä hypoteesia: ”Suspension levitystavat eivät vaikuta bakteerimaton paksuuteen” ja ”Tulokset eroavat bakteerilajien välillä”. Hypoteesien tulisi perustua aikaisempiin tutkimuksiin ja teorian tietoon (Hirsjärvi ym. 2005: 149–150; Vilka 2007: 24–26; 132–133).

Viitekehystä voidaan käyttää teoriaosan pohjana ja se tukee kvantitatiivista menetelmää (Vilka 2005: 21). Työmme viitekehysten (kuvio 8), keskeisin käsite on kiekkoherkkyysmenetelmä. Se käsittää kiekkoherkkyysmenetelmän yleiset periaatteet ja suorittaminen Tärkeitä teoria osa-alueita työssämme ovat myös antibiootit ja bakteerilajit. EUCAST -komitean antama suositus määrittelee kiekkoherkkyysmenetelmän toteutusta.



Kuvio 8. Työmme pohjana käytetty viitekehys.

Käyttämämme tutkimusstrategia oli kokeellinen tutkimus. Kokeellinen tutkimus kuuluu kvantitatiivisen tutkimuksen tutkimustyyppeihin (Hirsjärvi ym. 2005: 180; 125–130; Heikkilä 2004: 15). Työssämme on useampia tutkittavia muuttujia. Päätimme, että jo-

kaista tutkittavaa työvaiheeseen vaikuttavaa tekijää tarkastellaan erikseen. Tämä tarkoittaa sitä, että jokainen tekijä on ainoana poikkeavana muuttujana muuten ohjeiden mukaan suoritettavassa herkkyysmäärittämisessä. Toimimalla näin meidän oli helpointa ja luotettavinta todeta mahdollisesti vaikuttava tekijä.

Selittävän kvantitatiivisen tutkimuksen tarkoituksena on selvittää tutkittavaa asiaa ja esittää niiden syy-seuraus -suhteita. Syy-seuraus -suhteiden osoittaminen vaatii suurta aineistoa. (Vilkkä 2005: 51; Vilkkä 2007: 19; Hirsjärvi ym. 2005: 129.) Voimme pitää työtämme selittävänä tutkimuksena, vaikka pienestä aineistosta johtuen emme pystyneet osoittamaan aineistostamme syy-seuraus -suhteita. Selittävää tutkimusmenetelmää tukee se, että pyrimme selvittämään, vaikuttavatko eri työvaiheet kiekkoherkkyysmenetelmällä tehtävän antibioottiherkkyysmäärittämis tulokseen. Kokeellisessa osuudessa tutkimusaineistomme koostui herkkyysmaljoista, joille muodostui estorenkaat. Valmistimme itse tutkimusaineistomme, joten emme käyttäneet tavallisia kokeellisen osuuden aineistonkeruumenetelmiä.

Havaintoyksikkönämme toimi kiekotettu malja. Muuttujia olivat: bakteerilajit ja -kannat, bakteerisuspension vahvuus, viive suspension levittämisessä herkkyysmaljalle, viive kiekotetun herkkyysmaljan siirtämisessä kasvuolosuhteisiin, levitystavat, bakteerimaton paksuus ja antibioottikiekkujen estorenkaat. Tutkimusaineistomme ei ole jakautunut normaalisti, minkä vuoksi käytimme jakaumasta riippumattomia testejä eli ei-parametrisiä testejä. Yhdessä tilastotieteen, tietotekniikan ja matematiikan lehtori Päivi Leskinen kanssa pohdimme, mitä testejä aineistomme käsittelyyn kannattaa käyttää. Haasteita toi se, että aineistomme oli pieni ja toistoja oli vähän. Sen vuoksi käytimme pienelle aineistolle sopivia tarkkoja testejä.

Tunnuslukuja käytetään yleensä kun muuttujan arvot ovat suorasti jakautuneet (Holopainen – Pulkkinen 2008: 78–80; Heikkilä 2004: 82–83). Työmme muuttujat eivät ole suorasti jakautuneet, mutta ajoimme siitä huolimatta niille muutamia tunnuslukuja. Ajamamme tunnusluvut olivat keskiarvo, mediaani, minimi ja maksimi sekä keskihajonta. Käyttämämme Mann-Whitneyn testi on kahden riippumattoman otoksen testi. Sen avulla voidaan selvittää kuinka kahden eri luokan mediaanit ovat jakautuneet. Se siis havaitsee jakaumien sijainnissa olevat erot. (Holopainen – Pulkkinen 2008: 195–197; Heikkilä 2004: 234.) Käytimme myös usean riippumattoman otoksen testiin kuuluvaa Kruskal-Wallis H testiä. Sen avulla voidaan selvittää miten kolmen otoksen ja-

kaumat eroavat toisistaan. Friedmanin testi luokitellaan usean riippuvan otoksen testiksi. Sen avulla selvitimme, kuinka lähellä estorenkaiden toistot ovat toisiaan. Merkitystaso kuvaa sitä, kuinka suurella riskillä saatu ero tai riippuvuus johtuu sattumasta. Valitsimme merkitystasoksi 0,05, koska se on kirjallisuuden mukaan riittävä taso opinäytetyössä. (Heikkilä 2004: 194–195, 233.)

7 Toteutus

Saimme opinnäytetyömme aiheen helmikuussa 2011 HUSLABin kliinisen mikrobiologian bakteriologian osastolta. Ohjaajinamme toimivat sairaalamikrobiologi Eveliina Tarkka, laboratoriohoitaja Hanna Ihala sekä opettajaohjaaja Tuula Kurkinen. Työhön tarvittavat sopimukset allekirjoittivat HUSin vastuhenkilö Martti Vaara ja Metropolia Ammattikorkeakoulun koulutuspäällikkö Hannele Pihlaja huhtikuussa 2011. Toukokuussa teimme osastolla esikartoituksen, jossa pieni osa bakteriologian osaston henkilökunnasta vastasi kirjallisesti kyselyymme. Pääsimme harjoittelemaan dreijaamista ja herkkyysmääritysten lukemista bakteriologian osastolla ennen kokeellisen osuuden suorittamista. Työmme kokeellisen osuuden suoritimme 23.5–1.6.2011.

7.1 Esikartoitus

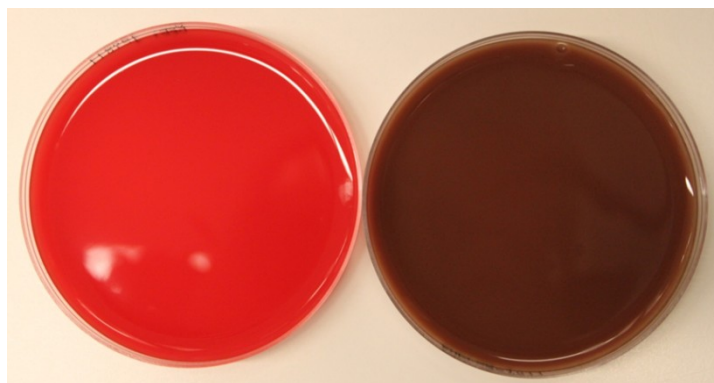
Esikartoituksen tarkoituksena oli selvittää, miten henkilökunta suorittaa herkkyysmäärityksiä käytännössä. Teimme haastattelulomakkeen (liite 1) ja meidän oli tarkoitus haastatella henkilökuntaa ja kirjata itse heidän vastauksensa ylös. Suoritimme esikartoituksen kuitenkin niin, että yhdeksän henkilökunnan jäsentä sai täyttää haastattelulomakkeen itsenäisesti. Sen jälkeen he palauttivat lomakkeet nimettöminä. Emme käyttäneet tulosten käsittelyyn erillistä ohjelmaa, koska keräsimme vastauksia vain yhdeksän kappaletta.

Saatujen vastausten perusteella saimme selville, että vastanneet eivät yleensä tarkista bakteerisuspension vahvuutta densitometrillä tai vertaa suspension vahvuutta McFarlandin standardiin. Bakteerisuspension vahvuus arvioidaan silmämääräisesti, kokemuksen mukaan. Vastausten perusteella selvisi myös, että viive ennen bakteerisuspension levittämistä herkkyysmaljalle vaihtelee tekijästä ja päivän työmäärästä riippuen minuutista reiluun tuntiin. Esikartoituksen vastausten perusteella työntekijät noudattavat EU-

CASTin suosituksessa annettua ohjetta poistaa pumpulitikusta ylimääräinen bakteerisuspensio painamalla sitä putkea vasten. Tällä pyritään takaamaan tasaisen bakteerimaton muodostuminen herkkyysmaljalle. Selvitimme myös, kuinka kauan kiekotetut maljat odottavat ennen lämpökaappiin siirtämistä. Arkisin herkkyysmaljojen siirtäminen tapahtuu välittömästi antibioottikiekkojen lisäämisen jälkeen, mutta viikonloppuisin aikaa voi kulua jopa yli tunti.

7.2 Työn suoritus

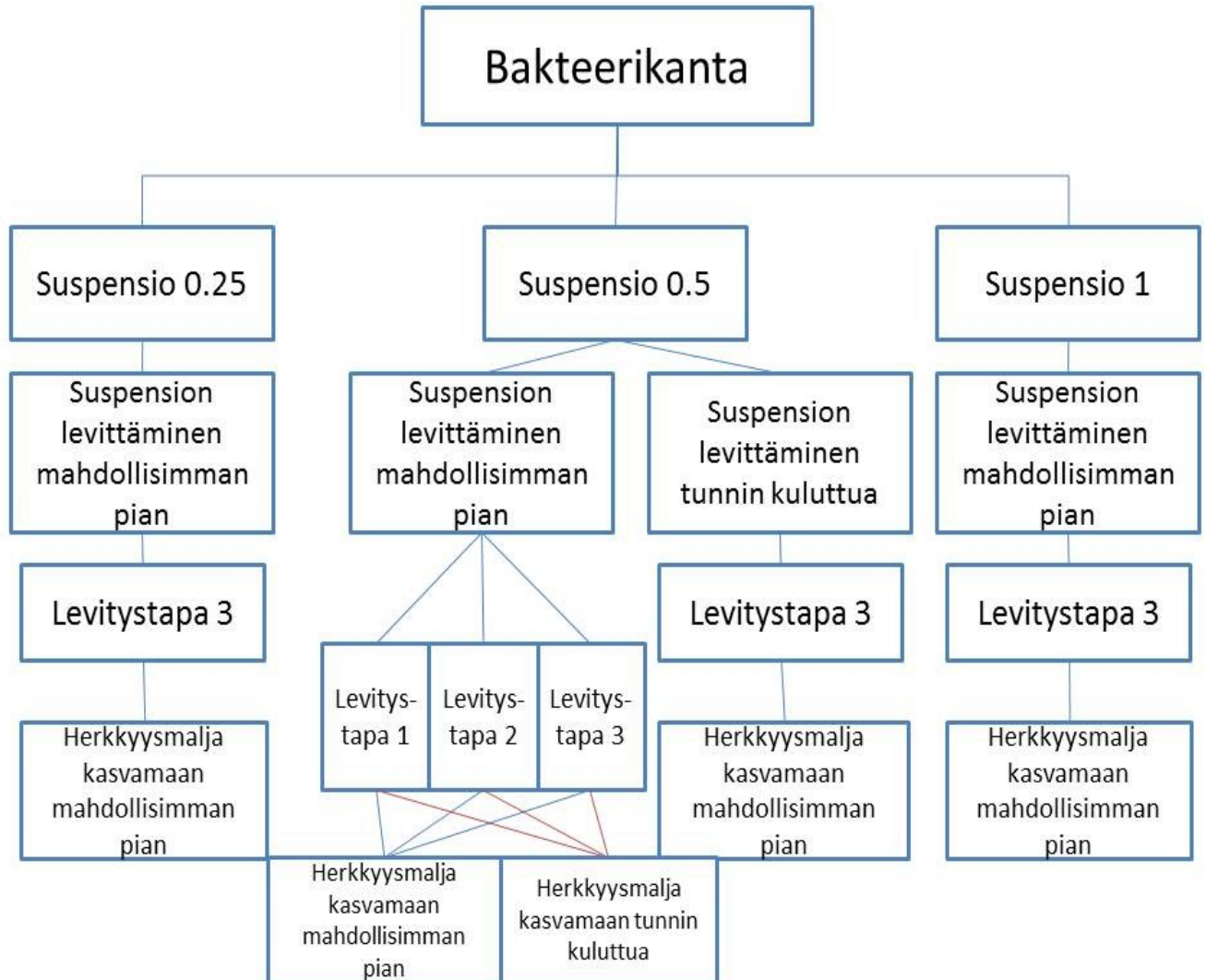
Osan aineistomme bakteerikannoista saimme bakteriologian osaston maljakontrolli työpisteestä. Loput kannoista oli taltioitu maitoglyseriiniputkissa -70 °C. Bakteerilajien puhtasviljelmät teimme suklaa- ja verimaljoille (kuvio 9). Suklaamaljoja käytimme *H. influenzae*, *S. pneumoniae* ja *S. pyogenes* bakteerilajeille ja kasvatimme niitä yön yli CO₂-kaapissa (liite 2). Verimaljoja puolestaan käytimme *E. coli*, *S. aureus* ja *K. pneumoniae* bakteerilajeille ja kasvatimme niitä yön yli lämpökaapissa. Puhtasviljelyn tarkoituksena oli varmistaa, että haluttu bakteerikanta kasvaa maljalla ilman kontaminaatiota. Ohjeet puhtasviljelmämaljojen valintaan saimme ohjaajiltamme. Työhömmme tarvittavat puhtasviljely- ja herkkyysmaljat saimme HUSLABin klinisen mikrobiologian bakteriologian elatusaineyksiköltä, joka valmisti tarvittavat maljat.



Kuvio 9. Veri- ja suklaamalja.

Teimme yhden bakteerikannan suspensiovahvuuden työvaiheineen (kuvio 10) kerrallaan. Valmistimme käytettävät bakteerisuspensiot 0,9 % keittosuolaliuokseen. Mittasimme jokaisesta lasisesta suspensioputkesta taustan ennen kuin sekoitimme siihen bakteeripesäkkeitä, jotta suspension vahvuus olisi mahdollisimman todenmukainen. Bakteeripesäkkeiden lisäämisen jälkeen sekoitimme suspensiota Vortex-sekoittajalla. Tämän jälkeen mittasimme vahvuuden densitometrillä. Tasan haluttua bakteerisuspen-

sion vahvuutta on todella vaikea saavuttaa, joten sallimme 0,03 heiton jokaisessa bakteerisuspensiossa. Teimme suspension aina tuoreimman puhtasviljelmän yksittäisistä pesäkkeistä laminaarikaapissa, välttääksemme mahdolliset kontaminaatiot.



Kuvio 10. Kokeellisen osuuden työvaihekaavio.

Jokaiselle bakteerilajille on oma antibioottipaneeli ja tarvittaessa lisäantibioottipaneeli, joita tässä työssä käytimme yhteensä kahdeksaa erilaista. Antibioottipaneeli on kokkelma, johon on valittu tavallisimpia hoidossa käytettäviä bakteerilajiin tehoavia antibiootteja. *H. influenzaelle* käytimme HE I ja HE II antibioottipaneeleja, *S. pneumoniaelle* PNC-paneelia, *S. pyogenekselle* STR-paneelia, *S. aureukselle* STA-paneelia ja *K. pneumoniaelle* sekä *E. colille* SA-paneelia (liite 3). Työssämme käytimme myös bakteerikantoja, joiden herkkyys on alentunut. Osalle näistä kannoista käytimme antibioottipaneelien lisäksi lisäantibioottipaneeleita, joita käytetään myös päivittäisessä laboratoriodiag-

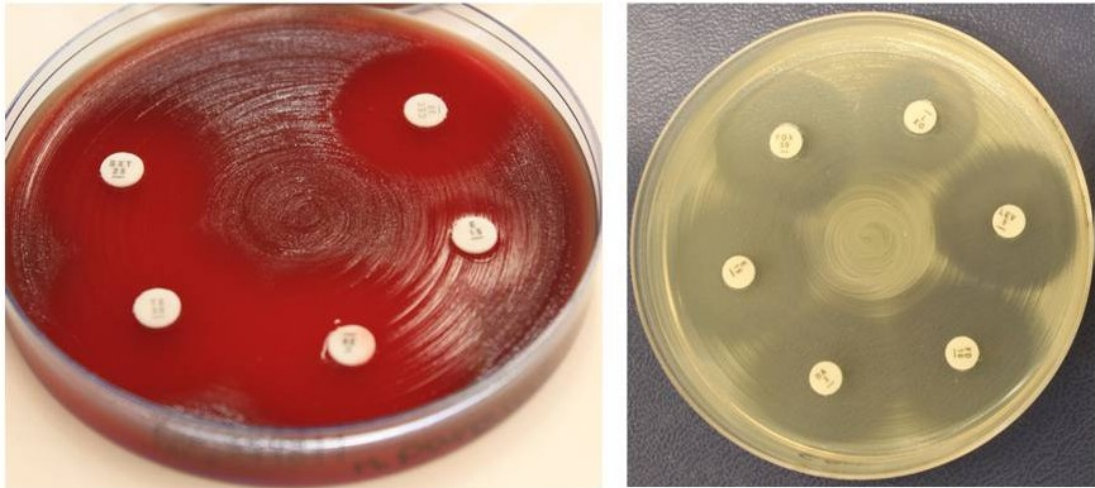
nostiikassa. *S. aureuksen* herkkyydeltään alentuneen kannan lisäantibiottipaneeli oli STA-LI ja *K. pneumoniaen* ja *E. colin* lisäpaneeli oli SA-LI. *S. pyogeneksen* ja *S. pneumoniaen* herkkyydeltään alentuneille kannoille emme käyttäneen lisäantibiottipaneelija.

Jokaisesta bakteerisuspensiosta teimme neljä toistoa samaan aikaan. Tämä mahdollisti saatujen tulosten vertailun keskenään, jolloin pystyimme arvioimaan työpöytätoistettavuutta. Herkän bakteerikannan kohdalla yhdellä toistolla tarkoitamme yhtä herkkyysmaljaa, jolle antibiottikiekot oli lisätty vain yhdestä antibiottipaneelistä. Poikkeuksena oli *H. influenzae* -laji, jonka herkällä kannalla käytimme kahta herkkyysmaljaa ja kahta antibiottipaneelia. Herkkyydeltään alentuneen kannan kohdalla yhdellä toistolla tarkoitamme puolestaan kahta herkkyysmaljaa, joista toisella oli normaali antibiottipaneeli ja toisella lisäantibiottipaneeli. Jaoimme jokaisen työvaiheen niin, että molemmat meistä tekivät kaksi toistoa jokaisesta bakteerikannan työvaiheesta. Tällaisella työjaolla pyrimme karsimaan tekijästä johtuvat mahdolliset vaikutukset tuloksiin.

Valmistimme 0,5 McFarlandin vahvuiset bakteerisuspensiot kaikille tutkittaville bakteerikannoille. Merkitsimme muistiin tarkan kellon ajan milloin suspensiot oli tehty. Valmiista bakteerisuspensioista teimme herkkyysmaljat mahdollisimman pian suspensioiden valmistamisesta. Levitimme 0,5 McFarlandin vahvuiset suspensiot herkkyysmaljoille käyttämällä kolmea eri levitystapaa. Levittämisen jälkeen lisäsimme maljoille heti antibiottikiekot kiekkoannostelijalla. Siirsimme herkkyysmaljat kiekotuksen jälkeen bakteerilajien vaatimiin kasvuolosuhteisiin mahdollisimman pian. 0,5 McFarlandin vahvuisista bakteerisuspensioista teimme myös herkkyysmaljat, jotka odottivat huoneenlämmössä tunnin ajan antibiottikiekkojen lisäämisen jälkeen. Tunnin kuluttua siirsimme ne kasvamaan bakteerilajin vaatimiin olosuhteisiin. Levitimme bakteerisuspension myös näille herkkyysmaljoille kolmella eri tavalla. Samasta 0,5 McFarlandin vahvuisesta bakteerisuspensiosta teimme uudet herkkyysmaljat tasan tunnin kuluttua suspension valmistamisesta, käyttämällä vain levitystapaa kolme. Lisäsimme maljoille heti antibiottikiekot, jonka jälkeen siirsimme ne mahdollisimman pian bakteerilajin vaatimiin kasvuolosuhteisiin (liite 2). Muuttujana oli siis tunnin viive ennen bakteerisuspension levittämistä herkkyysmaljoille.

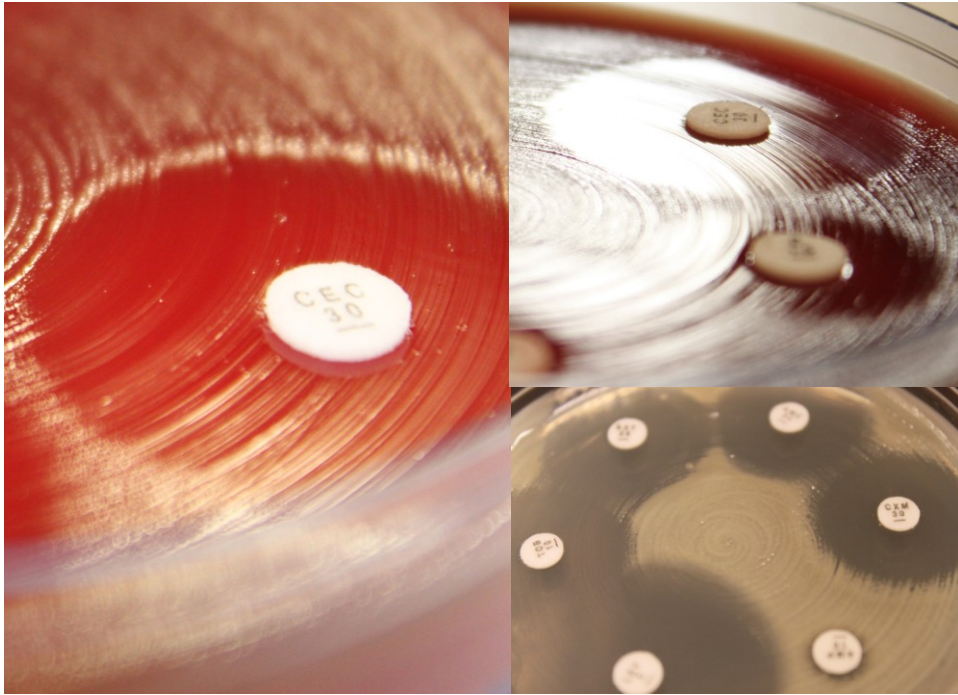
Mittasimme estorenkaiden halkaisijat herkkyysmaljoilta aina seuraavana päivänä. Tulosten mittaaminen herkkyysmaljoilta osoittautui aikaa vieväksi. Tästä johtuen emme

tehneet kaikille bakteerikannoille 0,5 vahvuista suspensiota työvaiheineen samana päivänä, vaan jaoimme bakteerikannat kahdelle päivälle. Yhteensä 0,5 McFarlandin vahvuisista bakteerisuspensioista teimme ja mittasimme 476 herkkyysmaljaa (liite 4). Jokaisessa herkkyysmaljassa oli vähintään viisi antibioottikiekkoa, joiden ympärille muodostui estorenkaat (kuvio 11). Estorenkaita mitattaessa noudatimme EUCASTin laatimia mittausohjeita lukuun ottamatta tummaa taustaa. Mittasimme jokaisen estorenkkaan millimetrin tarkkuudella antibioottikiekkoa lähinnä olevasta kasvusta.



Kuvio 11. Estorenkaita rikastetulla Müller-Hinton ja tavallisella Müller-Hinton herkkyysmaljoilla.

0,25 McFarlandin vahvuinen suspensio on laimeampi kuin EUCASTin suosittama suspensiovahvuus 0,5. Tarkoituksena oli tutkia vaikuttaako laimeampi eli vähäsoluisempi bakteerisuspensio muodostuvien estorenkaiden kokoon tai herkkyysmaljalle muodostuvan bakteerimaton paksuuteen. Valmistimme 0,25 McFarlandin vahvuiset bakteerisuspensiot kaikille tutkittaville bakteerikannoille. Tällä suspensiovahvuudella maljamäärä oli huomattavasti pienempi kuin 0,5 McFarlandin vahvuisella suspensiolla. Levitimme bakteerisuspension herkkyysmaljoille ainoastaan tavalla kolme, heti kun suspensio oli valmistettu. Kun olimme levittäneet bakteerisuspension, lisäsimme herkkyysmaljoille heti antibioottikiekkot. Laitoimme kiekkotetut maljat välittömästi bakteerikohtaisiin kasvulosuhteisiin. 0,25 McFarlandin vahvuisesta bakteerisuspensiosta valmistimme ja mittasimme yhteensä 68 herkkyysmaljaa. Estorenkaiden halkaisijat (kuvio 12) mittasimme seuraavana päivänä herkkyysmaljojen valmistamisesta.



Kuvio 12. Erilaisia estorenkaita.

Teimme jokaisesta bakteerikannasta myös suspensiovahvuuden 1,0 McFarlandia. Tämä suspensiovahvuus on vahvempi kuin EUCASTin suosittelema suspensiovahvuus. Myös tämän bakteerisuspension vahvuuden kohdalla levitimme suspension herkkyysmaljoille käyttämällä ainoastaan levitystapaa kolme. Levitimme valmistetun bakteerisuspension herkkyysmaljoille mahdollisimman pian sen valmistamisen jälkeen. Lisäsimme herkkyysmaljoille heti bakteerikantakohtaiset antibioottikiekot ja siirsimme herkkyysmaljat välittömästi bakteerilajin vaatimiin kasvuolosuhteisiin. Seuraavana päivänä luettavia herkkyysmaljoja oli yhteensä 68. Kaiken kaikkiaan teimme ja mittasimme herkkyysmaljoja 620, joista kahdeksan herkkyysmaljaa oli uusintoja.

8 Tulokset

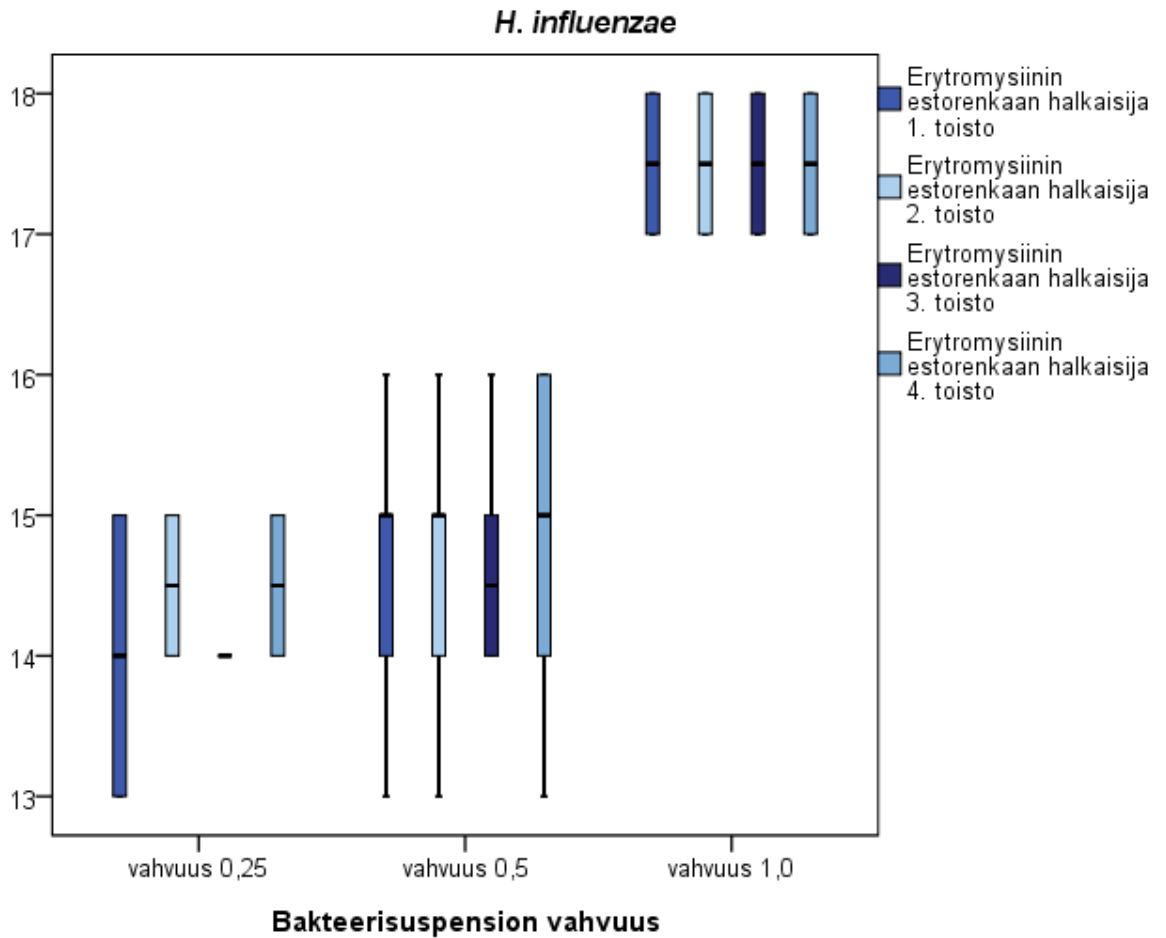
Tulosten perusteella bakteerisuspension vahvuus vaikutti tilastollisesti merkitsevällä tavalla estorenkaiden halkaisijoihin neljän bakteerilajin ja tiettyjen antibioottien kohdalla. Bakteerilajit, joiden kohdalla bakteerisuspension vahvuus oli merkitsevä tekijä, olivat *H. influenzae*, *S. pneumoniae*, *S. pyogenes* ja *S. aureus*. Vastaavasti bakteerilajien *E.coli* ja *K. pneumoniae* kohdalla bakteerisuspension vahvuus ei vaikuttanut tilastollisesti merkitsevästi estorenkaiden halkaisijoihin. Vertailtavien antibioottien määrässä

ei voitu ottaa huomioon lisääntiioottipaneelien antibiootteja, sillä niitä käytettiin ainoastaan tietyillä bakterikannoilla, joiden herkkyys oli alentunut.

Taulukko 2. Bakterilajikohtaiset antibiootit, joissa bakterisuspension vahvuudella oli havaittavissa tilastollista merkitsevyyttä estorenkaiden halkaisijoissa.

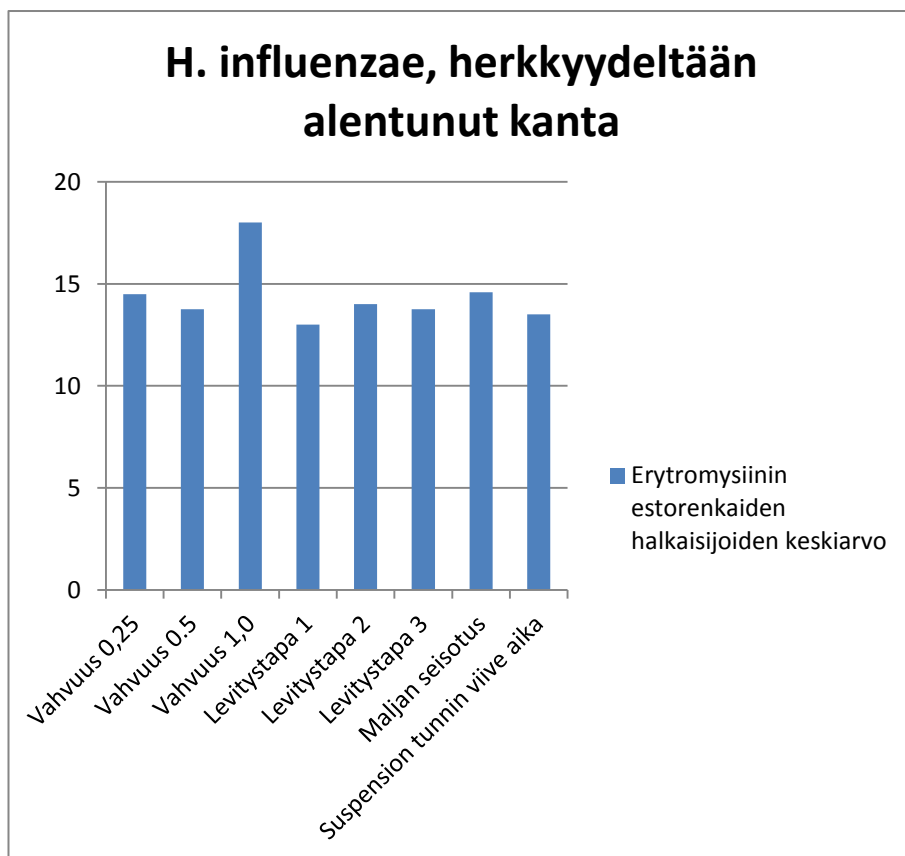
Bakterilaji	Antibiootit, joiden kohdalla suspensiovahvuus vaikutti tilastollisesti merkitsevästi	Vertailtavien antibioottien määrä
<i>H. influenzae</i>	1. kloramfenikoli 2. erytromysiini 3. siprofloksasiini	9 kpl
<i>S. pneumoniae</i>	1. vankomysiini 2. tetrasykliini	6 kpl
<i>S. pyogenes</i>	1. penisilliini 2. kefalotiini 3. vankomysiini	5 kpl
<i>S. aureus</i>	1. levofloksasiini 2. fusidiinihappo	6 kpl

H. influenzae -lajin kohdalla bakterisuspension vahvuus vaikutti antibioottien kloramfenikolin, erytromysiinin ja siprofloksasiinin estorenkaiden halkaisijoihin (liite 5). Kaikkien näiden antibioottien kohdalla havaitsimme, että suspensiovahvuuden ollessa 1,0 McFarlandia estorenkaat olivat suurempia kuin muilla suspensiovahvuuksilla. Emme kuitenkaan voi pitää kyseisiä havaintoja merkitsevinä, sillä ne ovat epäloogisia. Kun vaikuttavana antibioottina oli erytromysiini, estorenkaiden halkaisijat olivat suurempia suspensiovahvuuden ollessa 1,0 McFarlandia (kuvio 13).



Kuvio 13. Bakteerisuspensioiden vahvuuksien vaikutus *H. influenzae* -lajin estorenkaiden halkaisijoihin kun vaikuttavana antibioottina oli erytromysiini. X-akselilla näkyvät suspensiovahvuudet ja Y-akselilla estorenkaiden halkaisijat millimetreinä. Laatikko-jaanat kuvastavat vaihteluväliä estorenkaan koossa, vaihteluväliin sijoittuvat bakteerilajin molempien kantojen estorenkaiden koot. Laatikko kuvaa kvartiiliväliä, jonka sisään sijoittuu 50 % vaihteluvälin tuloksista. Kuviossa voidaan havaita myös maksimi- ja minimiarvot sekä mediaani. Kuviossa nähdään kaikki neljä toistoa.

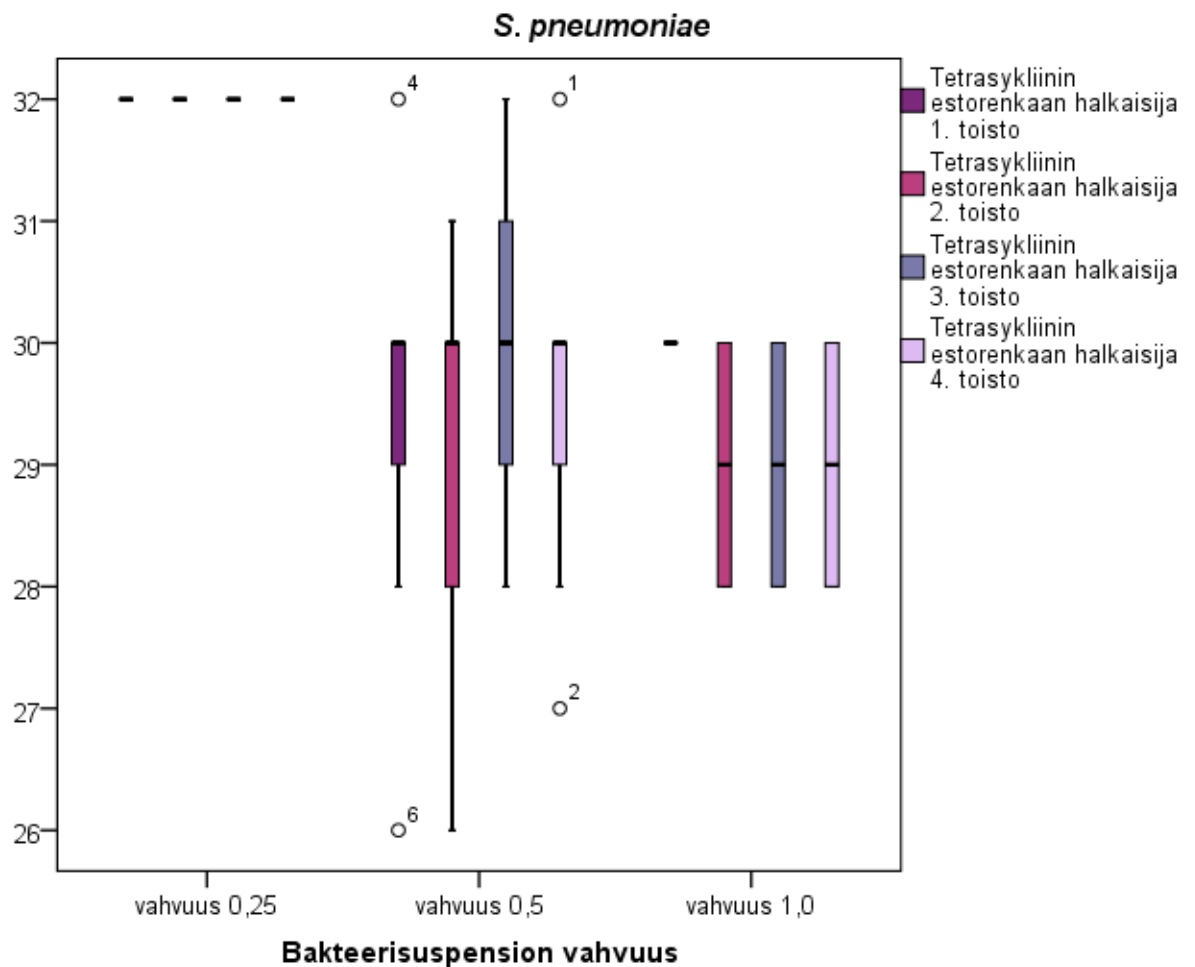
Kuviossa 13 erot suspensiovahvuuksien välillä on esitetty *H. influenzae* -lajikohtaisesti siten, että siihen sisältyy tilastollisten testien vaatimuksista johtuen sen molemmat herkkyydeltään eroavat kannat. Estorenkaiden halkaisijat eri muuttujien kohdalla on havainnollistettu kuviossa 14 *H. influenzae* -kantakohtaisesti.



Kuvio 14. *H. influenzae* -lajin herkemmän ja herkkydeltään alentuneiden kantojen estorenkaiden halkaisijat millimetreinä eri muuttujien kohdalla. Vaikuttavana antibioottina erytromysiini. Jokaista muuttujaa verrataan 0,5 McFarlandin vahvuisen suspension pylvääseen. Estorenkaiden

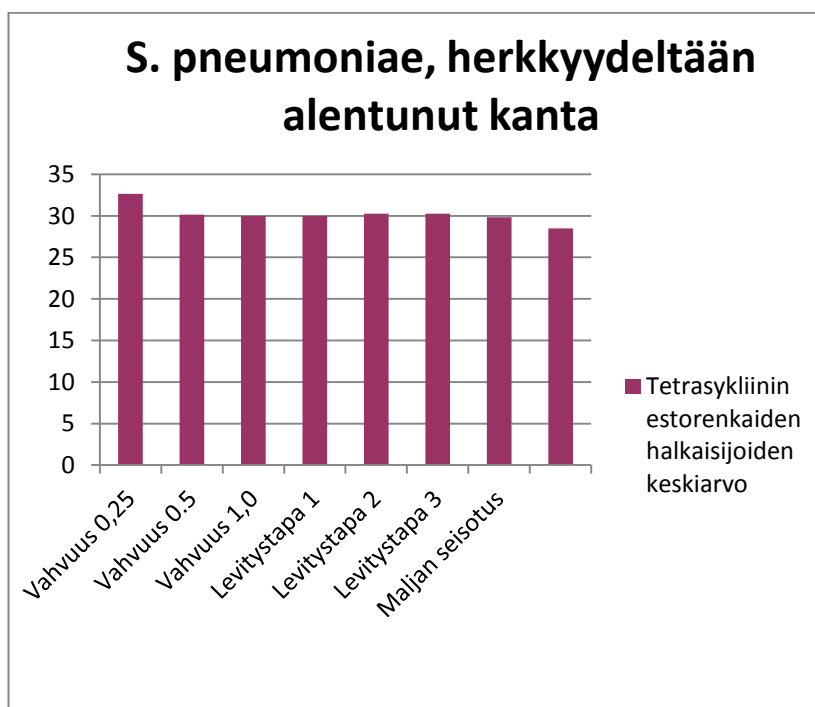
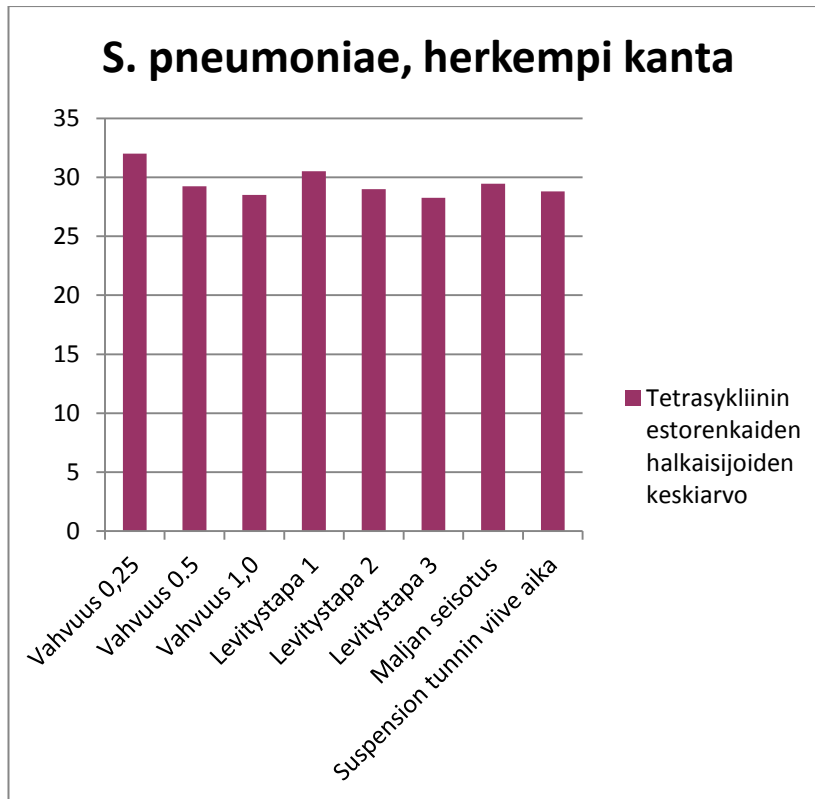
halkaisijoiden mitoissa ei ole huomioitu antibioottikiekon halkaisijaa (6 mm). Jokainen pyläs koostuu neljän toiston keskiarvosta.

S. pneumoniae -lajin kohdalla havaitsimme tilastollisen merkitsevyyden vankomysiiniin ja tetrasykliiniin kohdalla. Tetrasykliiniin ollessa vaikuttavana antibioottina havaitsimme tilastollinen merkitsevyyden kolmen toiston kohdalla. Kun suspensiovahvuus oli 0,25 McFarlandia, estorenkään halkaisijat olivat suurempia kuin muilla suspensiovahvuuksilla (kuvio 15). Kun vaikuttavana antibioottina oli vankomysiini, totesimme estorenkaiden koossa tilastollista merkitsevyyttä kaikissa neljässä toistossa (liite 5).



Kuvio 15. Bakterisuspensioiden vahvuuksien vaikutus *S. pneumoniae* -lajin estorenkaiden halkaisijoihin kun vaikuttavana antibioottina oli tetrasykliini. Suspensiovahvuuden ollessa 0,25 McFarlandia kaikki mittausarvot sijoittuvat 32 mm kohdalle. Ympyrä kuvaa havaintoa, jonka etäisyys laatikon ylä- tai alareunasta on yli 1.5 kertaa kvartiiliväli.

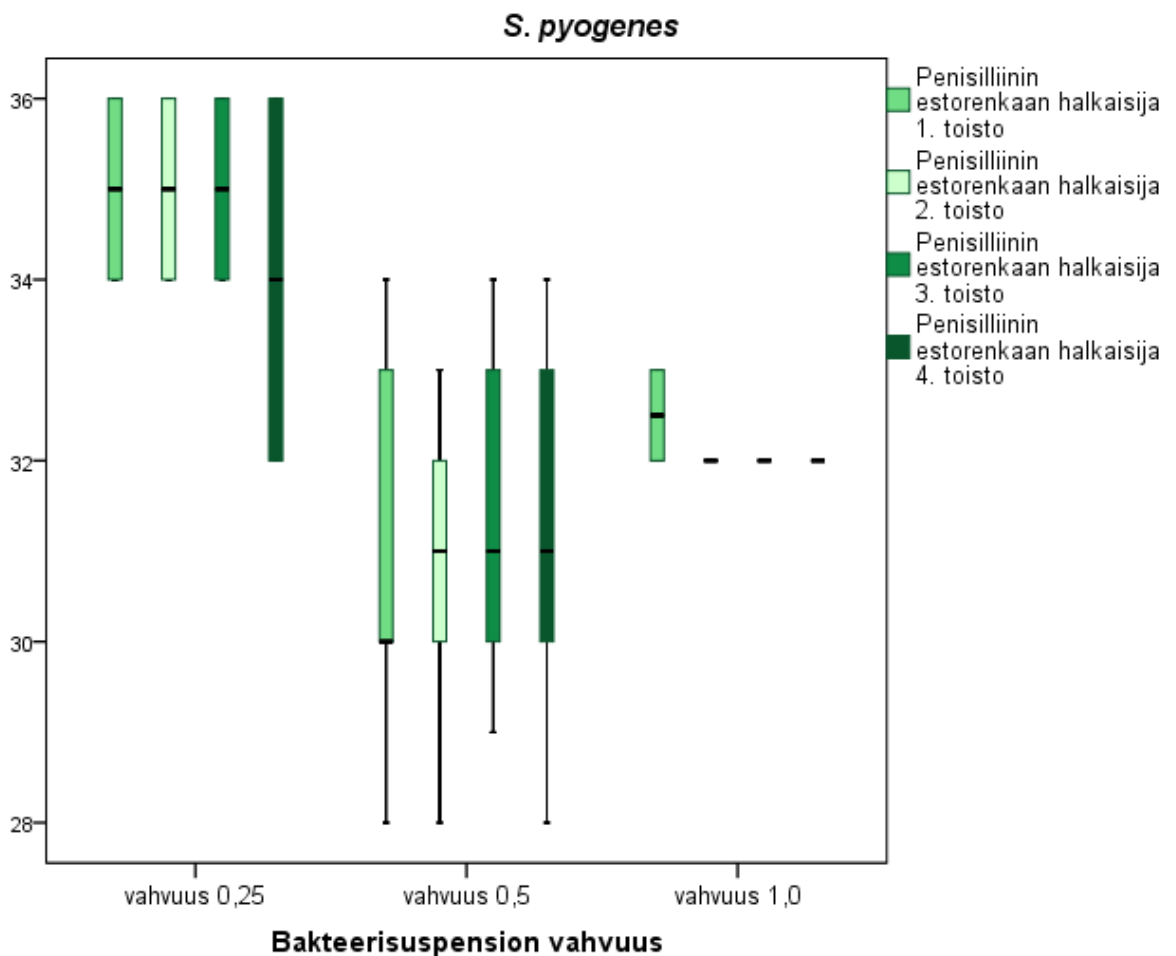
Kuviossa 16 on havainnollistettu miten eri muuttujat vaikuttavat tetrasykliinin estorenkaiden halkaisijoihin *S. pneumoniae* -lajin herkkydeltään eroavien kantojen kohdalla. Erot muuttujien kohdalla voidaan havaita luotettavimmin kantakohtaisesti.



Kuvio 16. *S. pneumoniae* -lajin herkemmän ja herkkydeltään alentuneiden kantojen estorenkaiden halkaisijat millimetreinä eri muuttujien kohdalla. Vaikuttavana antibioottina tetrasykliini.

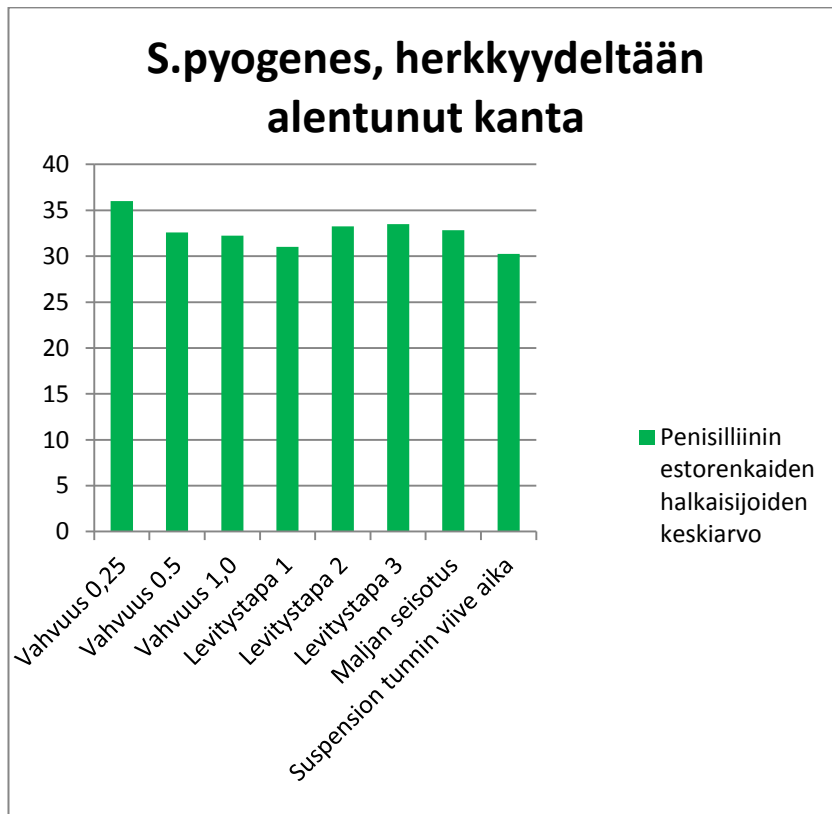
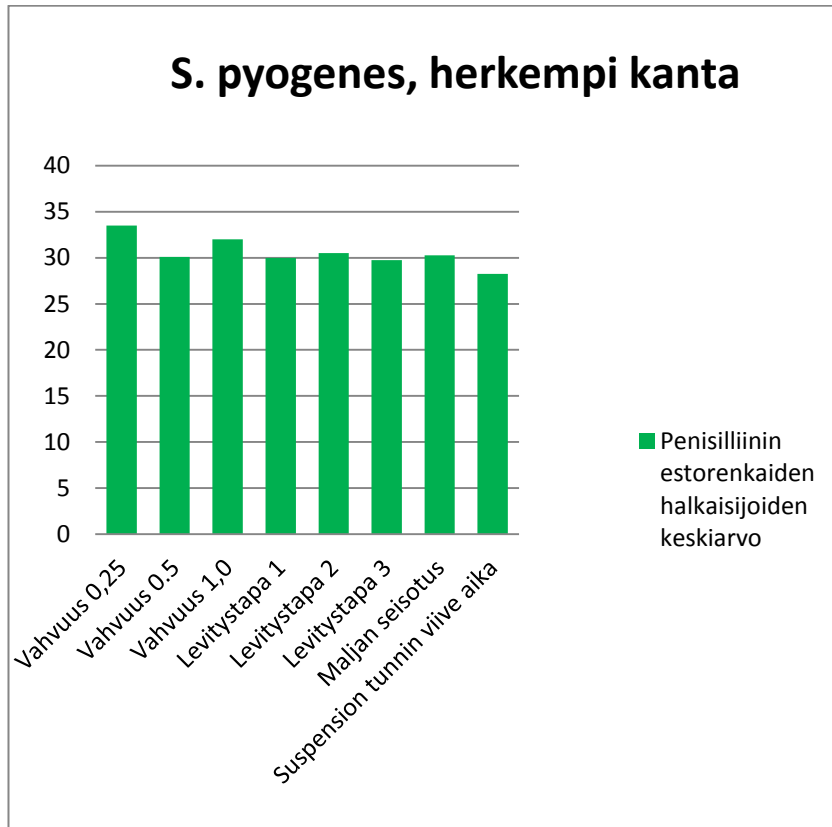
Jokaista muuttujaa verrataan 0,5 McFarlandin vahvuisen suspension pylvääseen. Estorenkaiden halkaisijoiden mitoissa ei ole huomioitu antibioottikiekon halkaisijaa (6 mm).

S. pyogenes -lajin kohdalla bakteerisuspension vahvuus vaikutti penisilliinin, kefalotiinin ja vankomysiinin estorenkaksiin. Havaitsimme penisilliinin ja kefalotiinin kohdalla tilastollinen merkitsevyys vain kahdessa toistossa. Vankomysiinin kohdalla erot estorenkaiden halkaisijoissa esiintyi kaikissa toistossa. Havaitsimme estorenkaiden halkaisijoiden koossa eroja, kun suspensiovahvuus oli 0,25 McFarlandia ja vaikuttavana antibioottina oli penisilliini (kuvio 17). Bakteerisuspension vahvuuden ollessa 0,25 McFarlandia estorenkaiden halkaisijat olivat suurempia. Havaitsimme myös kefalotiinin ja vankomysiinin kohdalla eroja estorenkaiden halkaisijoissa (liite 5).



Kuvio 17. Bakteerisuspensioiden vahvuuksien vaikutus *S. pyogenes* -lajin estorenkaiden halkaisijoihin kun vaikuttavana antibioottina oli penisilliini. Suspensiovahvuuden ollessa 1,0 McFarlandia lähes kaikki mittausarvot sijoittuvat 32 mm kohdalle.

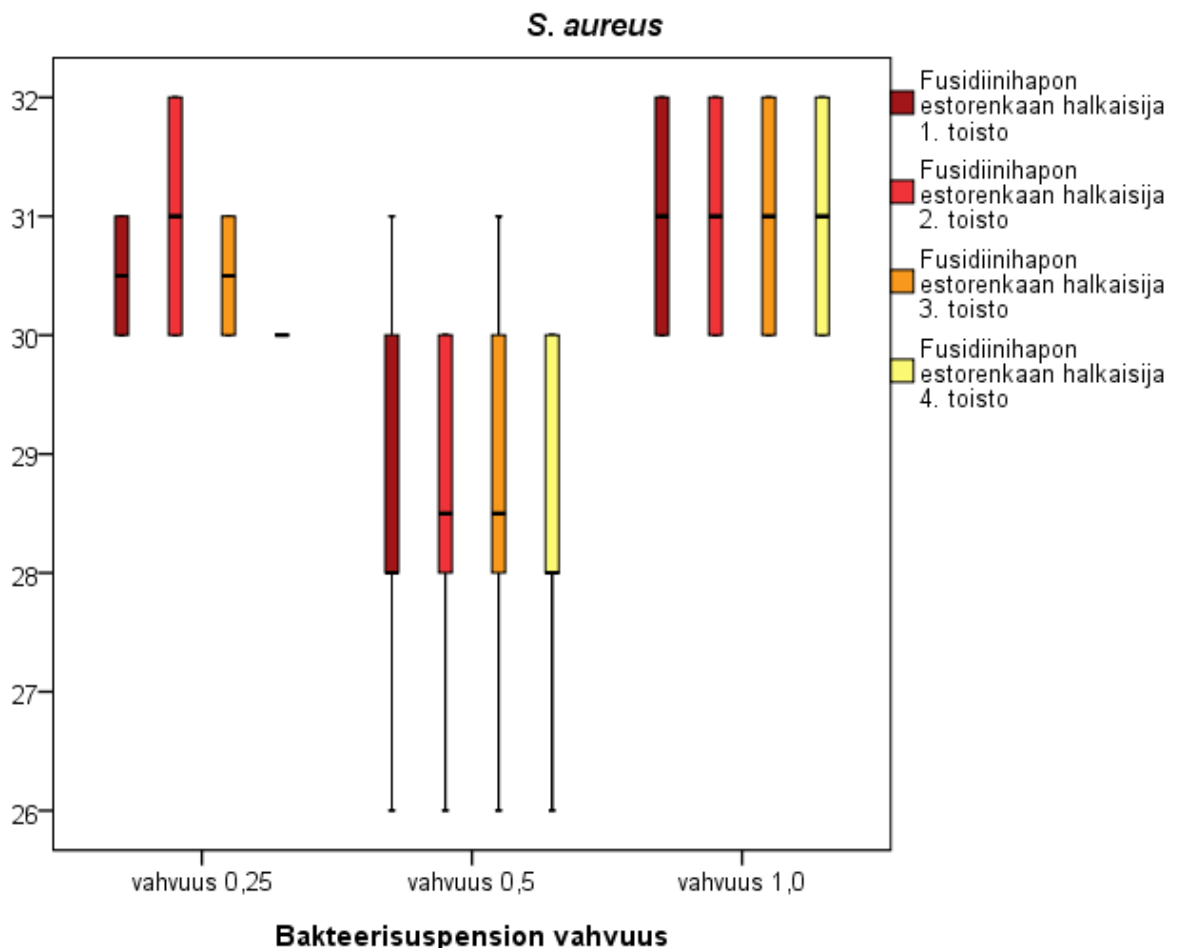
Kuviossa 18 on havainnollistettu miten eri muuttujat vaikuttavat penisilliinin estorenkaiden halkaisijoihin *S. pyogenes* -lajin herkkyydeltään eroavien kantojen kohdalla.



Kuvio 18. *S. pyogenes* -lajin herkemmän ja herkkydeltään alentuneiden kantojen estorenkaiden halkaisijat millimetreinä eri muuttujien kohdalla. Vaikuttavana antibioottina penisilliini. Jo-

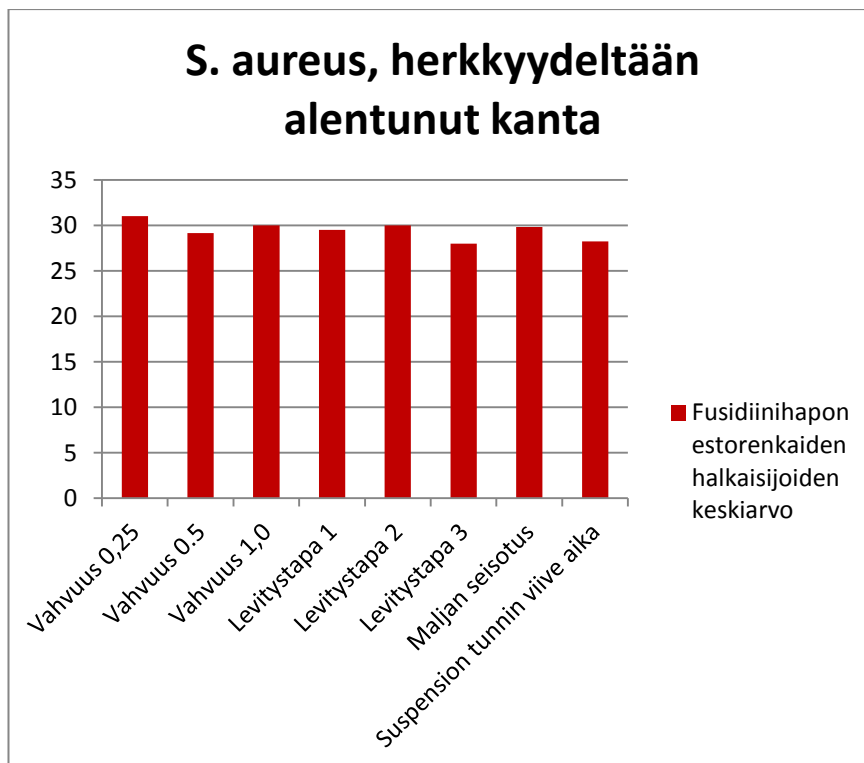
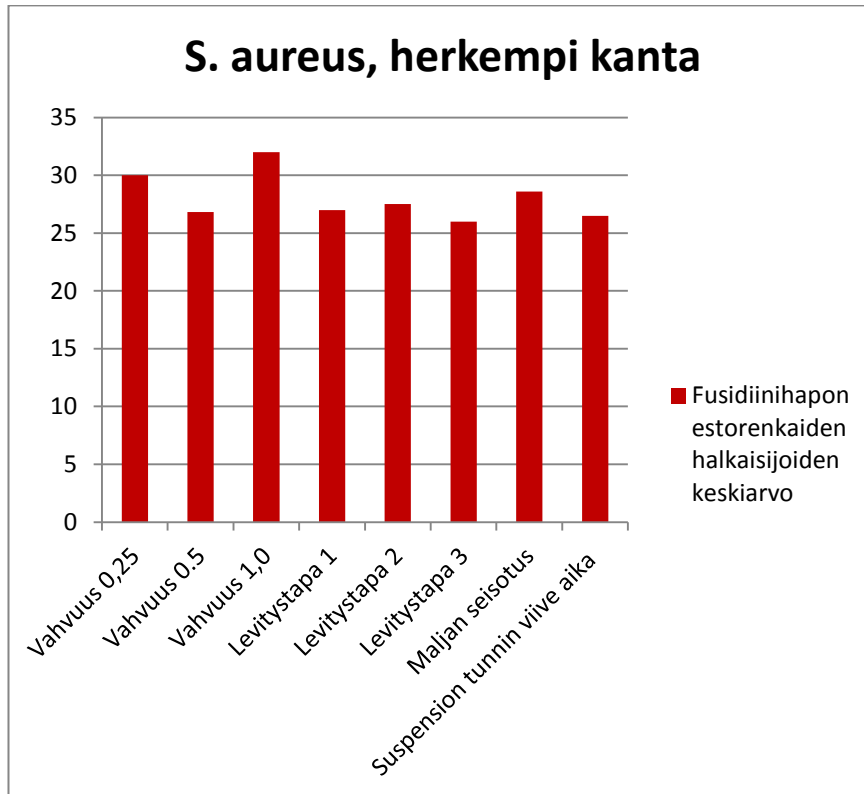
kaista muuttujaa verrataan 0,5 McFarlandin vahvuisen suspension pylvääseen. Estorenkaiden halkaisijoiden mitoissa ei ole huomioitu antibioottikiekon halkaisijaa (6 mm).

S. aureus -lajilla bakteerisuspension vahvuus vaikutti estorenkaiden halkaisijoihin levofloksasiinin ja fusidiinihapon kohdalla. Nämä esiintyivät vain kahdessa toistossa. Suspensiovahvuuden ollessa 0,25 McFarlandia tai 1,0 McFarlandia fusidiinihapon estorenkaiden halkaisijat olivat hieman suurempia kuin suspensiovahvuudella 0,5 McFarlandia (kuvio 19). Levofloksasiinin kohdalla suspensiovahvuuden vaikutus estorenkaiden kokoon ei ole yhtä selvä kuin fusidiinihapolla. Totesimme kuitenkin, että suspensiovahvuuden ollessa 1,0 McFarlandia estorenkaiden halkaisijat eroavat hieman muista suspensiovahvuuksista (liite 5).



Kuvio 19. Bakteerisuspensioiden vahvuuksien vaikutus *S. aureus* -lajin estorenkaiden halkaisijoihin kun vaikuttavana antibioottina oli fusidiinihappo.

Kuviossa 20 on havainnollistettu miten eri muuttujat vaikuttavat fusidiinihapon estorenkaiden halkaisijoihin *S. aureus* -lajin herkkyydeltään eroavien kantojen kohdalla.



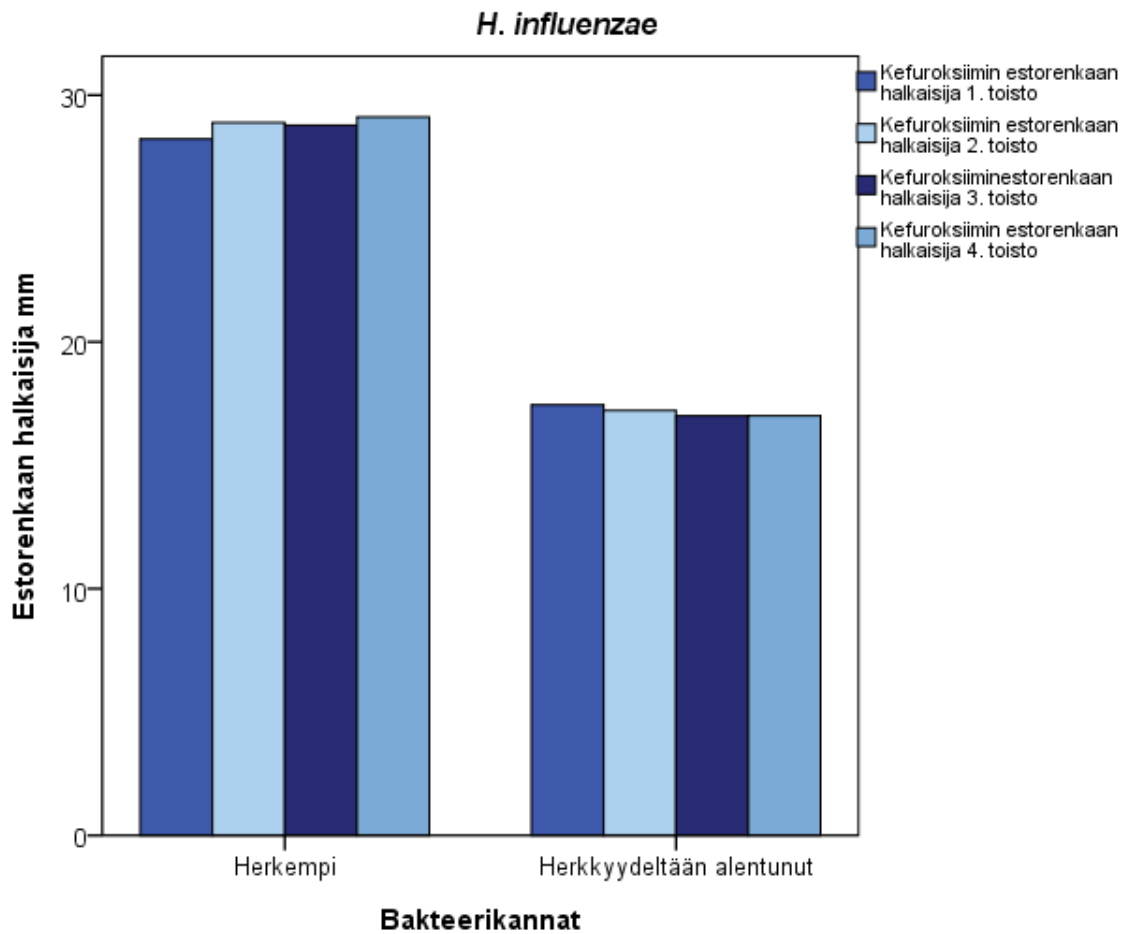
Kuvio 20. *S. aureus* -lajin herkemmän ja herkkyydeltään alentuneiden kantojen estorenkaiden halkaisijat millimetreinä eri muuttujien kohdalla. Vaikuttavana antibioottina fusidiinihapon. Jokaista muuttujaa verrataan 0,5 McFarlandin vahvuisen suspension pylvääseen. Estorenkaiden halkaisijoiden mitoissa ei ole huomioitu antibioottikiekon halkaisijaa (6 mm).

Tulosten perusteella jokaisen kuuden bakteerilajin kannat vaikuttivat tilastollisesti merkitsevästi joidenkin antibioottien estorenkaiden halkaisijoihin (taulukko 3). Herkän kannan estorengas on halkaisijaltaan oletettavasti suurempi kuin herkkydeltään alentuneen kannan. Kannan vaikutusta estorenkaiden halkaisijoihin pystyimme tutkimaan ainoastaan niillä antibiooteilla, jotka olivat yhteisiä sekä herkälle että herkkydeltään alentuneelle bakteerikannalle.

Taulukko 3. Antibiootit, joissa on tilastollista eroa eri kantojen välillä.

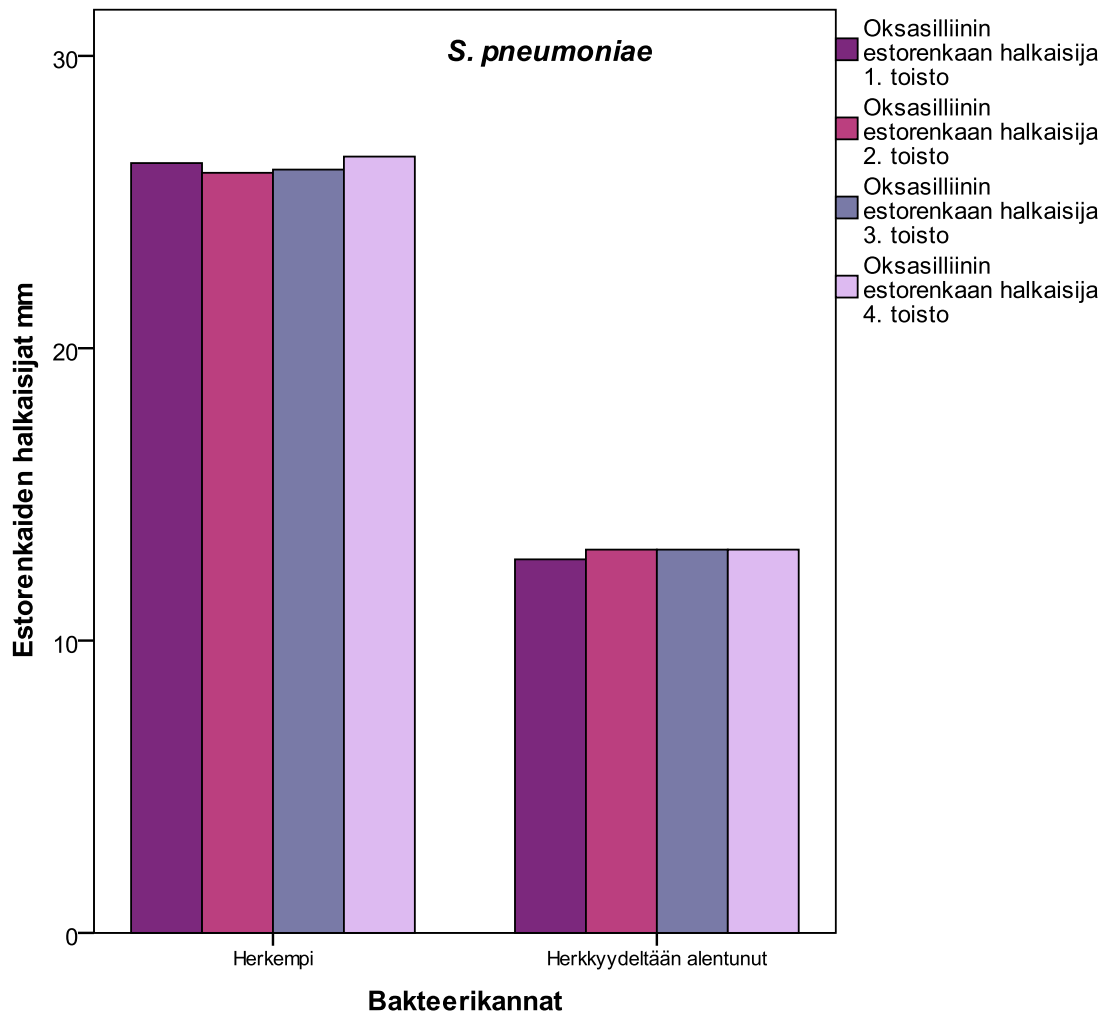
Bakteerilaji	Antibiootit, joiden kohdalla bakteerilajin kanta vaikutti tilastollisesti merkitsevästi	Vertailtavien antibioottien kokonaismäärä
<i>H. influenzae</i>	1. Sulfa-trimetopriimi 2. Tetrasykliini 3. Erytromysiini 4. Kefaklori 5. Kefuroksiimi 6. Amoksisilliini-klavuliinihappo 7. Ampisilliini	9 kpl
<i>S. pneumoniae</i>	1. Sulfa-trimetopriimi 2. Oksasilliini 3. Erytromysiini 4. Klindamysiini	6 kpl
<i>S. pyogenes</i>	1. Penisilliini 2. Erytromysiini 3. Klindamysiini 4. Kefalotiini	5 kpl
<i>S. aureus</i>	1. Klindamysiini 2. Erytromysiini 3. Kefoksitiini 4. Oksasilliini 5. Levofloksasiini	6 kpl
<i>E. coli</i>	1. Kefuroksiimi	6 kpl
<i>Kle. pneumoniae</i>	1. Levofloksasiini 2. Tobramysiini 3. Sulfa-trimetopriimi 4. Amoksisilliini-klavuliinihappo 5. Kefuroksiimi	6 kpl

H. influenzae -kantojen kohdalla havaitsimme, että yhdeksästä tutkittavasta antibiootista seitsemän kohdalla kannat vaikuttivat estorenkaiden halkaisijoihin. Bakteerikantojen väliset erot estorenkaiden halkaisijoissa olivat antibiootista riippuvaisia (liite 6). *H. influenzae* -kantojen väliset erot kefuroksiimin kohdalla on havainnollistettu kuviossa 21. Muut antibiootit, joiden kohdalla bakteerikannat vaikuttivat estorenkään halkaisijaan, löytyvät liitteestä 6.



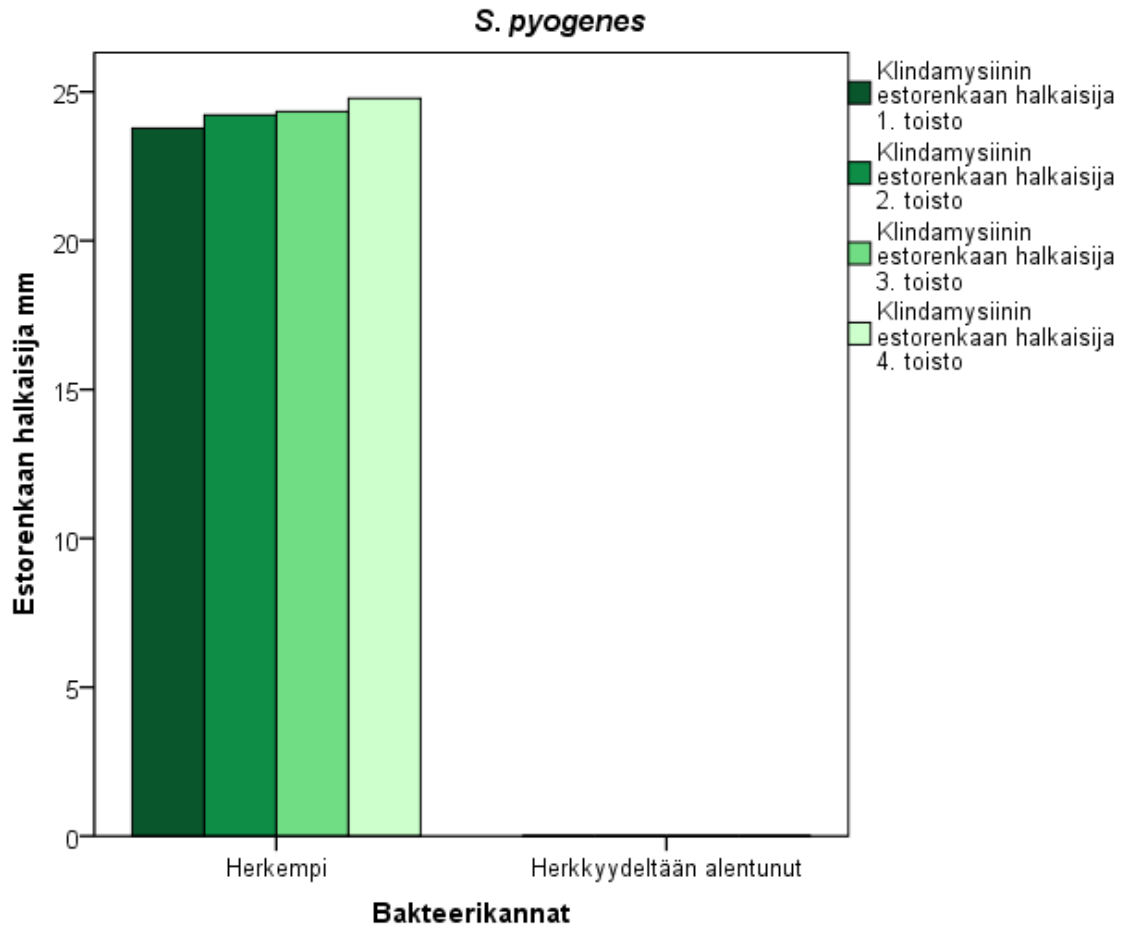
Kuvio 21. *H. influenzae* -lajin herkkydeltään eroavien kantojen vaikutus kefurkosiimiantibiootin estorenkaiden halkaisijoihin. Kuviossa näkyvät kaikki neljä toistoa. Estorenkaiden halkaisijoiden koossa ei ole huomioitu antibioottikiekon halkaisijaa (6 mm).

S. pneumoniae -kannat vaikuttivat kuudesta vertailtavasta antibiootista neljän antibiootin estorenkaiden halkaisijoihin. Kantojen väliset erot oksasilliinin kohdalla tulevat ilmi kuviossa 22. *S. pneumoniae* -kantojen vaikutus muihin antibiootteihin oli selvempi (liite 6). Sulfa-trimetopriimin ja erytromysiinin kohdalla herkkydeltään alentunut kanta oli täysin resistentti vaikuttaville antibiooteille. Niille ei siis muodostunut estorengasta. Klindamysiinin kohdalla erot kantojen välisillä estorenkaiden halkaisijoilla ovat pienemmät.



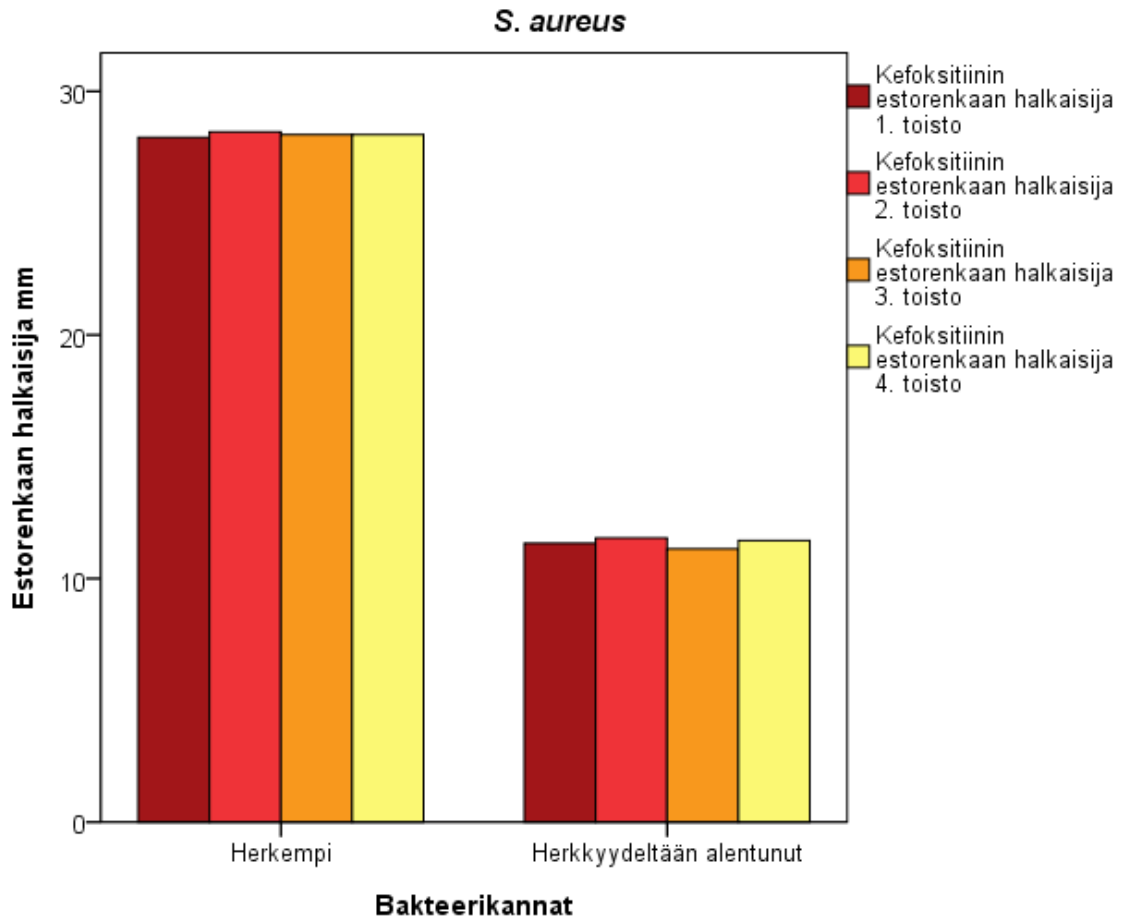
Kuvio 22. *S. pneumoniae* -lajin herkkydeltään eroavien kantojen vaikutus oksasilliinantibiootin estorenkaiden halkaisijoihin.

S. pyogenes -kannat aiheuttivat tilastollisesti merkitseviä eroja estorenkaiden halkaisijoissa neljän antibiootin kohdalla viidestä tutkittavasta antibiootista. Kahden antibiootin kohdalla erot kantojen välillä olivat selkeitä, johtuen herkkydeltään alentuneen kannan täydestä resistenssistä tutkittavia antibiootteja kohtaa. Puolestaan kahdella muulla antibiootilla kantojen aiheuttamat erot olivat selvästi pienemmät (liite 6). Kuviossa 23 nähdään kantojen aiheuttamat erot klindamysiinantibiootin kohdalla.



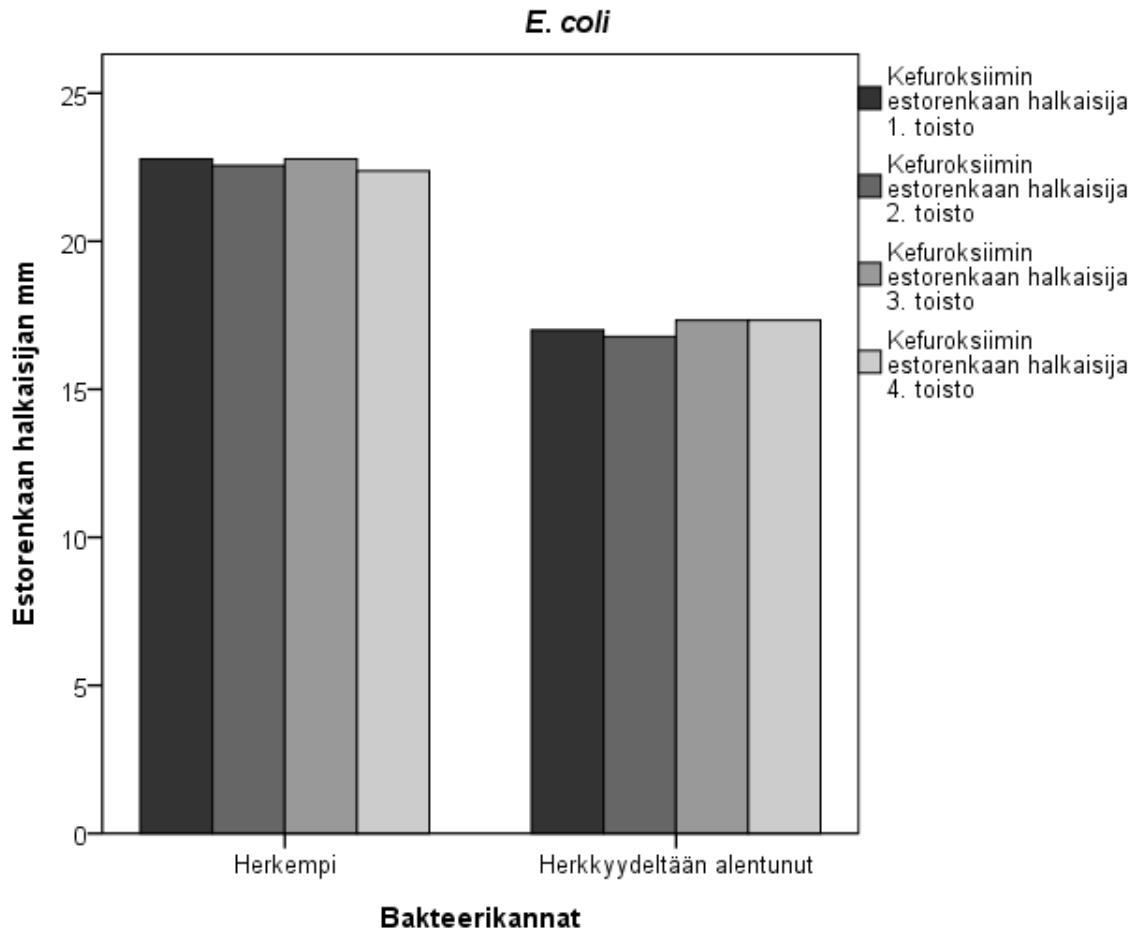
Kuvio 23. *S. pyogenes* -lajin herkkyydeltään eroavien kantojen vaikutus estorenkaiden halkaisijoihin klindamysiinin kohdalla. Estorenkaiden halkaisijoiden koossa ei ole huomioitu antibioottikiekkon halkaisijaa (6 mm). Herkkyydeltään alentunut kanta on täysin resistentti tutkittavalle antibiootille.

S. aureus -lajin kohdalla tutkimme kantojen vaikutusta estorenkaiden halkaisijoihin kuuden eri antibiootin kohdalla. Viiden antibiootin kohdalla kantojen välillä oli eroa (liite 6). Kantojen erot estorenkaiden halkaisijoissa vaihtelivat suuresti antibiootista riippuen. Erot kefoksitiinin kohdalla tulevat ilmi kuviossa 24. Herkkyydeltään alentuneen kannan kefoksitiiniestorenkaiden halkaisijat olivat huomattavasti pienemmät kuin herkemmän kannan estorenkaiden halkaisijat.



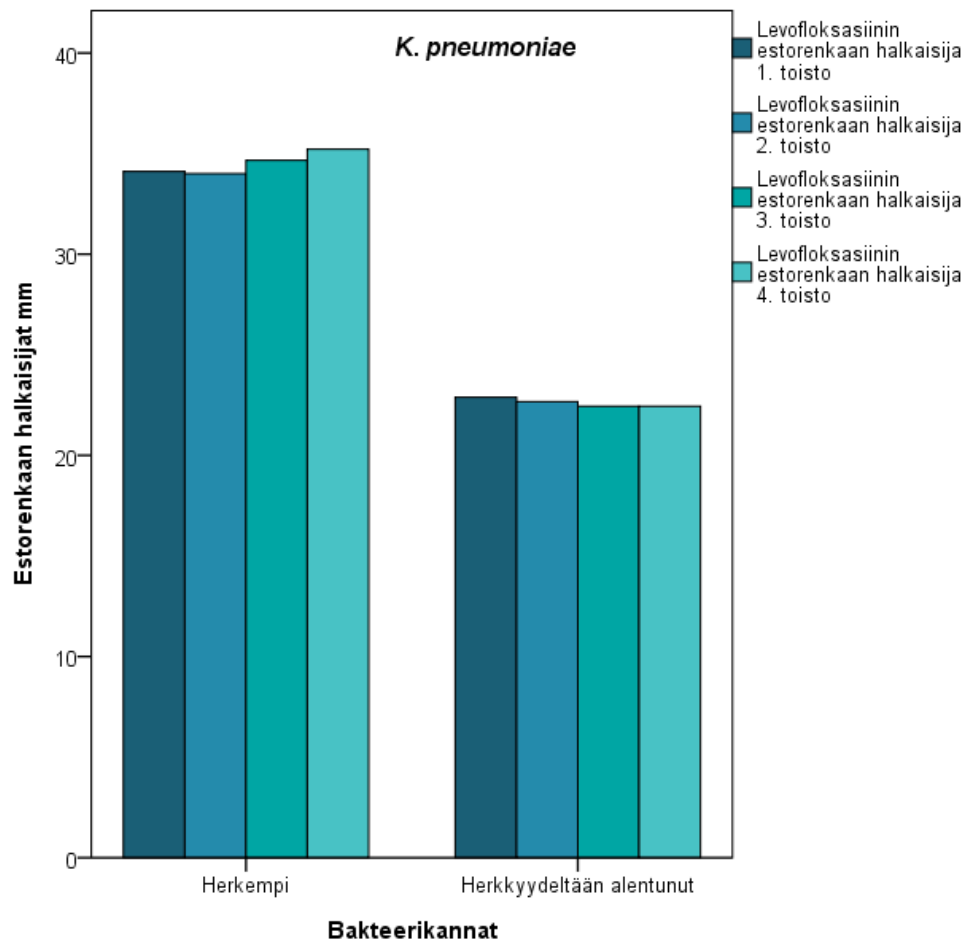
Kuvio 24. Kantojen vaikutus estorenkaiden halkaisijoihin kefoksiiniin kohdalla *S. aureus*-lajilla.

Kuudesta tutkittavasti antibiootista kantojen vaikutus estorenkaiden halkaisijoihin todettiin vain yhden antibiootin kohdalla *E. coli*-lajilla. Antibiootti, jonka kohdalla kantojen aiheuttamat erot vaikuttivat, oli kefuroksiimi (kuvio 25). Kantojen välinen ero estorenkaiden halkaisijoissa oli kohtalainen.



Kuvio 25. *E. coli*-kantojen väliset erot estorenkaiden halkaisijoissa kun vaikuttavana antibiootina oli kefuroksiimi.

K. pneumoniae -kantojen vaikutusta estorenkaiden halkaisijoihin tutkimme kuudella eri antibiootilla. Tilastollista merkitsevyyttä kannan vaikutuksesta estorenkaiden halkaisijoihin esiintyi viiden antibiootin kohdalla (liite 6). Levofloksasiinin kohdalla kantojen väliset estorenkaiden halkaisijat erosivat toisistaan selvästi (kuvio 26).



Kuvio 26. *K. pneumoniae* -kantojen väliset erot estorenkaiden halkaisijoissa kun vaikuttavana antibioottina oli levofloksasiini.

Tilastollisten tulosten perusteella kolmella eri bakteerisuspension levitystavalla ei esiintynyt eroja. Emme siis voineet osoittaa tilastollista merkitsevyyttä tutkittavien bakteerilajien kohdalla. Tutkimamme kuuden bakteerilajin kohdalla emme pystyneet osoittamaan, että bakteerisuspension levittäminen herkkyysmaljalle vasta tunnin kuluttua suspension valmistamisesta, vaikuttaisi bakteerisolujen hengissä säilymiseen. Suspension levittäminen herkkyysmaljalle tunnin kuluttua valmistamisesta, ei vaikuttanut estorenkaiden halkaisijoihin. Työn kokeellisen osuuden aikana tarkastelimme bakteerimaton paksuutta visuaalisesti. Emme huomanneet eroa herkkyysmaljojen välillä, joille suspensio oli levitetty mahdollisimman pian tai vasta tunnin kuluttua valmistamisesta. Visuaalisen tarkastelun perusteella emme voineet osoittaa, että herkkyysmaljan säilyttäminen huoneenlämmössä tunnin ajan, ennen siirtämistä bakteerilajin vaatimiin kasvuolosuhteisiin, olisi vaikuttanut bakteerien hengissä säilymiseen. Tilastollisten tulosten perusteella herkkyysmaljan säilytys tunnin ajan huoneenlämmössä ei vaikuttanut estorenkaiden halkaisijoihin.

9 Pohdinta

Työssämme käytimme kuutta bakteerilajia ja jokaisesta lajista kahta herkkydeltään eroavaa kantaa. Käytettävät bakteerilajit ovat *Escherichia coli*, *Haemophilus influenzae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes* ja *Streptococcus pneumoniae*. Valitut bakteerilajit ovat yleisimpiä, kliinisesti merkittäviä taudinaiheuttajabakteereita ja eroavat toisistaan rakenteensa ja biokemiallisten ominaisuuksiensa perusteella.

Tilastollisesti analysoidut tulokset ovat bakteerilajikohtaisia ja ainoastaan suuntaa-antavia. Toistojen vähäisyydestä johtuen emme voi yleistää tuloksia. Toistojen lukumäärän päätimme yhdessä ohjaajiemme kanssa. Tulosten suuntaa-antavuus johtuu esimerkiksi siitä, että toistojen lukumäärät suspensiovahvuuksilla 0,25 ja 1,0 McFarlandia olivat huomattavasti pienemmät kuin 0,5 suspensiovahvuudessa. Tarkoituksenamme oli selvittää, mitkä tekijät vaikuttavat antibioottilukemien tuloksiin. Tulosten perusteella voimme päätellä, että bakteerisuspension vahvuus vaikutti antibioottilukemien tuloksiin eli estorenkaiden halkaisijoihin. Kahden bakteerilajin kohdalla bakteerisuspensiovahvuus vaikutti vankomysiinin estorenkaiden halkaisijoihin. Tuloksia tarkastellessa huomasimme, että vankomysiiniantibiootin kohdalla suspensiovahvuuden ollessa 0,25 McFarlandia estorenkaiden halkaisijat olivat hieman suurempia. Vankomysiinin kohdalla havainnoimme myös, että molemmissa antibioottipaneeleissa, joissa se esiintyi, oli bakteerisuspension vahvuudella vaikutusta estorenkaiden halkaisijoihin.

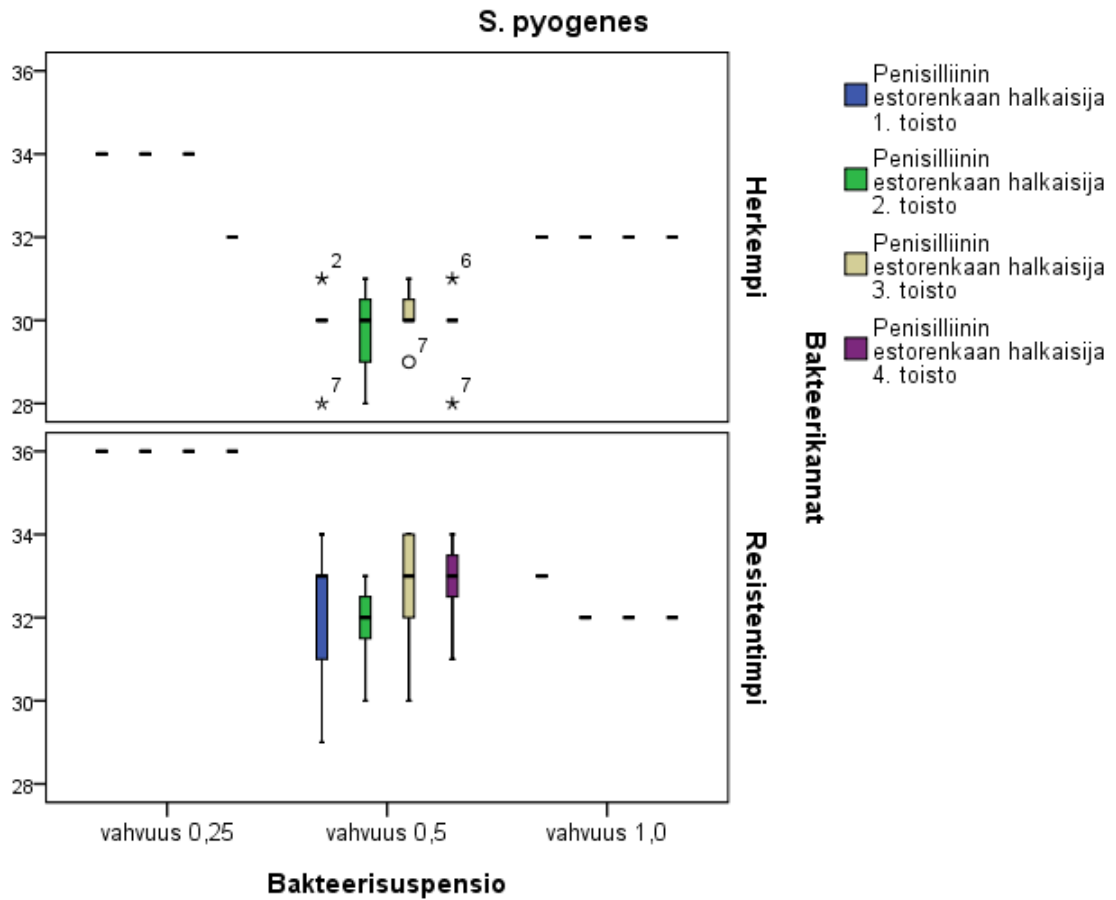
Tutkittavissa tekijöissä ilmenevät tilastolliset merkitsevyydet totesimme tilastollisilla testeillä, jotka jouduimme toteuttamaan bakteerilajikohtaisesti. Tilastolliset testit eivät pystyneet antamaan luotettavia tuloksia bakteerikantakohtaisesti, sillä silloin tarvittava aineisto olisi ollut liian pieni. Tällaisten analyysien tekemiseen olisi tarvittu myös useamman muuttujan tilastollisia testejä, jotka oli mahdotonta toteuttaa. Bakteerikantakohtaiset kuviot on tehty käyttäen pohjana tilastollisissa testeissä ilmenneitä merkitseviä eroja bakteerilajikohtaisesti. Tämän vuoksi teimme bakteerikantakohtaiset taulukot ainoastaan niistä bakteerilajikohtaisista antibiooteista, joilla olimme havainneet eroa. Eri tekijöiden vaikutus estorenkaiden halkaisijoihin tulee luotettavimmin esiin kantakohtaisesti esitettynä. Kantakohtaiset pylväskuviot eivät ole täysin luotettavia mutta ne ovat suuntaa-antavia.

Bakteerisuspension vahvuuden vaikutusta estorenkaiden halkaisijoihin kuvaavissa tuloksissa oli joidenkin bakteerilajien kohdalla havaittavissa epäloogisuutta. Bakteerisuspensiovahvuuden 1,0 McFarlandia tulisi aiheuttaa pienempiä estorenkaita kuin laimeammat suspensiovahvuudet 0,5 ja 0,25 McFarlandia. Joidenkin tulosten kohdalla näin ei kuitenkaan ollut, vaan suspensiovahvuus 1,0 McFarlandia antoi jopa suurempia estorenkaita. Kyseessä ei voi olla sekaannus, jossa työn suoritusvaiheessa olisimme levittäneet suspensiovahvuudet väärin merkatuille herkkyysmaljoille, sillä suoritimme eri bakteerisuspensiovahvuuksien työvaiheet eri päivinä. Voi kuitenkin olla mahdollista, että kyseessä olisi mittausvirhe, varsinkin *H. influenzae* -lajin kohdalla, joka vaatii rikastetun Müller-Hinton maljan. Emme siis osaa perustella tulosten osittaista epäloogisuutta.

Oletuksena oli, että bakteerilajin sisäiset kannat aiheuttavat eroavaisuuksia estorenkaiden halkaisijoissa bakteerilajikohtaisesti. Kolmen antibiootin kohdalla pystyimme toteamaan, että jokaisessa antibioottipaneelissa, jossa kyseiset antibiootit esiintyivät, kanta vaikutti estorenkkaan kokoon. Kefuroksiimi esiintyi yhteensä kahdessa antibioottipaneelissa. Molemmissa paneeleissa havaitsimme bakteerikannan vaikutuksen estorenkkaasiin. Huomasimme kefuroksiimin estorenkaiden halkaisijoiden erot kantojen välillä kolmella bakteerilajilla. Erytromysiini puolestaan esiintyi neljässä eri antibioottipaneelissa ja havaitsimme erot estorenkaiden halkaisijoissa neljällä eri bakteerilajilla. Klindamysiini esiintyi kolmessa paneelissa ja havaitsimme erot tuloksissa kolmella eri bakteerilajilla. Nämä huomiot tukevat mahdollisesti sitä, että tulokset ovat bakteerikanta- ja antibioottikohtaisia.

Aineistomme pienen määrän vuoksi emme voineet selvittää, vaikuttaako bakteerisuspension vahvuus tilastollisesti merkitsevästi eri tavoin bakteerilajin herkkyydeltään eroaviin kantoihin. Jotta bakteerisuspension vahvuuden vaikutus bakteerikantoihin olisi voitu selvittää, olisimme joutuneet käyttämään kolmen muuttujan tilastollisia analyysejä. Tällaisten analyysien käyttäminen on haasteellista ja vaatisi erinomaista tilastollisten analyysien hallintaa. Jos olisimme käsitelleet bakteerikannat erillisinä muuttujina, havaintojen määrä olisi ollut niin vähäinen, että tuloksista olisi tullut epäluotettavia. Pystyimme aineistomme pohjalta muodostamaan kuvioita bakteerisuspension vaikutuksista bakteerikantoihin (kuvio 27). Kuvion antama informaatio ei kuitenkaan ole täysin luotettavaa, sillä emme pysty sanomaan, ovatko kuviossa mahdollisesti esiintyvät erot

tilastollisesti merkitseviä puuttuvien tarkkojen analyysiarvojen vuoksi. Tämän vuoksi esitimme kantakohtaiset erot tekijöiden vaikutuksista Excel -pohjaisina kuvioina.



Kuvio 27. Bakteerisuspensiovahvuuden vaikutus *S. pyogenes*-lajin herkkyydeltään eroaviin kantoihin vaikuttavan antibiootin ollessa penisilliini. Ympyrä kuvaa havaintoa, jonka etäisyys laatikon ylä- tai alareunasta on yli 1,5 kertaa kvartiiliväli. Tähti puolestaan kuvaa havaintoa, jonka etäisyys laatikon reunasta on yli 3 kertaa kvartiiliväli.

Tulosten perusteella emme pystyneet osoittamaan, että bakteerisuspension levitysvälillä olisi ollut vaikutusta bakteerimaton paksuuteen tai sen tasaisuuteen. Tunnin viive ennen bakteerisuspension levittämistä herkkyysmaljoille ei näyttänyt vaikuttavan bakteerilajien hengissä säilymiseen 0,5 McFarlandin vahvuudessa suspensiossa. On myös todennäköistä, että kiekotettujen herkkyysmaljojen säilyttäminen huoneenlämmössä tunnin ajan ennen kasvuolosuhteisiin siirtämistä ei vaikuttanut tutkittavien bakteerilajien hengissä säilymiseen. Tavoitteemme oli selvittää, onko päivittäisessä laboriodiagnostiikassa mahdollista poiketa annetusta suosituksesta kiiretilanteissa niin, että tulokset pysyvät luotettavina. Tulokset olivat kuitenkin niin suuntaa-antavia, että emme voi varmuudella todeta, vaikuttaako suosituksesta poikkeaminen herkkyystulosten luotettavuuteen.

Hypoteesimme ”Tulokset eroavat bakteerilajien välillä” piti paikkaansa, kun tutkimme bakteerisuspensioiden vahvuuksien vaikutusta estorenkaiden halkaisijoihin. Bakteerilajista riippuen erot estorenkaiden halkaisijoissa ilmentyivät eri antibioottien kohdalla. Tutkittavista bakteerilajeista kahdella suspensiovahvuus ei vaikuttanut tilastollisesti merkitsevällä tavalla. Tulokset erosivat bakteerilajien välillä myös tutkittaessa bakteerikantojen vaikutusta estorenkaiden halkaisijoihin. Asettamamme hypoteesi ”Suspension levitystavat eivät vaikuta bakteerimaton paksuuteen” osoittautui tässä työssä todeksi. Visuaalisen tarkastelun perusteella emme havainneet, että erilaisilla levitystavoilla olisi ollut vaikutusta bakteerimaton paksuuteen. Emme pystyneet sanomaan herkkyysmaljoista, millä tutkittavista kolmesta levitystavasta bakteerisuspensio oli niille levitetty. Levitystavasta riippumatta tasaisen bakteerimaton saamiseksi on erityisen tärkeää levittää bakteerisuspensio herkkyysmaljalle tarpeeksi kuivalla pumpulitikulla. Pumpulitikua tulee liikuttaa tasaisella vauhdilla pyörittäen ja riittävän hitaasti. Suspension levittäminen liian märällä pumpulitikulla voi aiheuttaa liian paksun bakteerimaton. Huomasimme, että erityisesti levitystavassa kaksi tulee kiinnittää huomiota suspension huolelliseen levitykseen. Jos levitys tehdään edellä mainitulla tavalla liian nopeasti, voi lopputuloksena olla raidallinen bakteerimatto. Bakteerimaton raidallisuus saattaa häiritä estorenkaiden mittaamista. Tehtyjen herkkyysmaljojen visuaalisen tarkastelun perusteella voimme päätellä, että suspension levitystavalla ei ole niin suurta merkitystä kuin huolellisella ja tarkalla työskentelyllä.

Tilastollisten tulosten perusteella voimme nostaa esille muutamia jatkotutkimusaiheita. Huomasimme, että bakteerisuspension vahvuus saattaa aiheuttaa muutoksia herkkyystuloksissa. Suspension vahvuuden vaikutusta estorenkaiden halkaisijaan olisi hyvä tutkia enemmän, useammalla toistolla ja mahdollisesti suurempia suspension vahvuuseroja käyttäen. Suurempien vahvuuserojen tutkiminen saattaisi antaa lisätietoa, sillä tutkimamme suspensiovahvuudet eivät eronneet paljon toisistaan. On kuitenkin todennäköistä, että suspension vahvuus on merkittävä tekijä luotettavan herkkyystuloksen kannalta sillä se oli tilastollisesti merkittävänä tekijänä neljän bakteerilajin kohdalla kuudesta. Esikartoituksestamme selvisi, että bakteriologian osastolla henkilökunta ei tarkista tai kontrolloi bakteerisuspension vahvuutta. Jos suspensiovahvuus todella on merkittävä tekijä herkkyysmääritystuloksissa, suspension vahvuuden mittaaminen olisi tarpeellista. Jos jokaisen bakteerisuspension vahvuuden mittaaminen on liian aikaa vievää, säännöllinen suspension mittaaminen edes muutaman kerran viikossa voisi olla

ratkaisu optimaalisen bakteerisuspension tekemiseen. Kontrolloidessa säännöllisesti suspensiovahvuutta esimerkiksi densitometrin avulla visuaalinen hahmotus oikean vahvuudesta bakteerisuspensiosta kehittyy ja säilyy.

Tutkimamme tunnin viive bakteerisuspension levittämisessä on EUCASTin antaman ohjeistuksen mukaan pisin mahdollinen aika, jonka jälkeen bakteerisuspensio on välittömästi levitettävä herkkyysmaljalle. Olisi hyödyllistä selvittää vaikuttavatko pidemmät bakteerisuspension levittämissiiveet herkkyystuloksen luotettavuuteen. Tekemästämme esikartoituksesta selvisi myös, että bakteerisuspensio saattaa joissain tilanteissa odottaa tuntiakin kauemmin ennen herkkyysmaljalle levittämistä. Tämän työn tulosten perusteella voisi myös olla mielenkiintoista tutkia, onko joillakin tekijöillä yhteisvaikutuksia. Esimerkiksi, jos bakteerisuspensio on vahvuudeltaan liian laimea ja sen levittämissiive herkkyysmaljalle poikkeaisi huomattavasti suosituksista, niin vaikuttaako se herkkyysmäärityksen tuloksiin ja luotettavuuteen.

Teimme tutkittavan aineiston itse bakteerikannoista. Tämä vaatii hyvää toistettavuutta työtavoissa. Toistettavuutta lisäsimme jakamalla toistomäärät puoliksi. Tällä pystyimme minimoimaan kädenjäljen vaikutusta tuloksiin. Ennen tämän työn toteuttamista meillä oli hyvin vähän kokemusta herkkyystulosten lukemisesta. Saimme hieman harjoitella estorenkaiden halkaisijoiden mittaamista ennen kokeellista osuutta. Muutaman päivän harjoittelu ei kuitenkaan tuo estorenkaiden mittaamiseen rutiinia. Mitattujen estorenkaiden halkaisijoiden perusteella voimme todeta, että työn toistettavuus oli luotettavaa. Tulosten perusteella työn suorittaja ei vaikuttanut lopputulokseen. Toistojen väliset erot olivat niin pieniä, että pystyimme vertailemaan tuloksia luotettavasti. Tuloksissa esiintyvät pienet erot saattavat korostua pienestä aineistomäärästä johtuen. Estorenkaiden halkaisijoiden tulkinnassa pienet mittauserot olivat työssämme hyväksyttäviä. Halkaisijoita mitattaessa on voinut tapahtua mittausvirheitä, jotka saattavat selittää joidenkin tulosten epäloogisuutta. Tarkoituksenamme oli, että molemmat olisivat mitanneet kaikki estorenkaat. Työtä tehdessämme huomasimme, että tämä olisi ollut liian aikaa vievää. Päädyimme siihen, että jaoimme herkkyysmaljat puoliksi bakteerikanta-kohtaisesti. Estorenkaita mitattaessa vertailimme saamiamme toistojen tuloksia keskenään. Jos niissä esiintyi huomattavia poikkeavuuksia tai toisen oli hankala saada mittaus tulosta, toinen mittasi kyseisen estorenkaan. Koimme, että rikastetulla Müller-Hinton agarmaljoille olevia estorenkaita oli haastavampi mitata. Välillä tuli myös tilanteita, jolloin estorenkaiden selviä reunoja oli vaikea hahmottaa, jolloin halkaisijan mittaaminen

oli haastavaa. Tuloksia tarkasteltaessa huomasimme, että olisi ollut parempi, jos molemmat olisivat mitanneet kaikkien estorenkaiden halkaisijat. Tällöin olisimme voineet laskea yksittäisille estorenkaiden halkaisijoille keskiarvot ja olisimme näin saaneet luotettavampia tuloksia.

Estorenkaita mitattaessa huomasimme, että herkkyysmaljoilla, joilla olisi pitänyt kasvaa herkkyydeltään alentunut *E. coli* kanta, kasvoikin *E. colin* herkkä kanta. Huomasimme tämän siitä, että *E. colin* herkkyydeltään alentuneen kannan antibioottipaneelissa tulisi tiettyjen estorenkaiden olla täysin antibioottikiikkoon kiinni kasvaneita. Antibioottilisäpaneelissa tulisi ilmetä niin sanottu pöllökuvio. Pöllökuviot muodostuvat herkkyysmaljoille, jos kyseessä on ESBL-kanta. Tämä ESBL-kannoille tyypillinen pöllökuvio muodostuu, kun antibioottipaneelissa on sijoitettu amoksisilliini-klavulaanihappokiekkoketasidiimikiekkon ja kefotaksiimikiekkon väliin. Herkkyysmaljoilla, joilla olisi pitänyt kasvaa herkkyydeltään alentunut *E. coli* kanta, ei ilmennyt tiettyjä antibioottiresistenssejä eikä pöllökuvioita. Tästä päättelimme, että olimme tehneet herkkyysmaljat herkän *E. colin* 0,25 McFarlandin vahvuisella bakteerisuspensiolla emmekä herkkyydeltään alentuneen *E. colin* 0,25 McFarlandin vahvuisella bakteerisuspensiolla. Bakteerisuspensioita valmistettaessa, meillä oli laminaarikaapissa ainoastaan *E. colin* molempien kantojen puhdasviljelmät. Tästä johtuen voimme olla varmoja, että herkkyysmaljoilla, joilla pitikin kasvaa *E. colin* herkkä kanta, kasvoi todella se. Teimme herkkyydeltään alentuneelle *E. coli* -kannalle uuden 0,25 vahvuisen suspension herkkyysmaljoineen.

Bakteerimaton paksuuden arvioimiseen ei ole olemassa mitään standardoitua keinoa. Työelämässä bakteerimaton paksuuden arviointi perustuu visuaaliseen tarkasteluun. Kokeilimme valokuvien avulla saada itsellemme mallikuvia sopivan paksuisesta ja liian ohuesta bakteerimatosta. Ajatuksenamme oli, että bakteerimattoja olisi voinut verrata mallikuviiin. Mallikuvat olisivat näin ollen toimineet visuaalisen arvioinnin tukena. Mallikuvista ei kuitenkaan erottunut bakteerimaton paksuuden erot tarpeeksi selvästi. Tämän vuoksi arvioimme bakteerimaton paksuutta ainoastaan silmämääräisesti. Huomasimme, että kaikki bakteerisuspension vahvuudet vaikuttivat *K. pneumoniaen* kohdalla bakteerimaton paksuuteen. Jokaisen kolmen tutkittavan suspensiovahvuuden kohdalla *K. pneumoniaen* bakteerimatto vaikutti visuaalisesti tarkasteltuna paksulta. Bakteerisuspension vahvuus ei tässä työssä vaikuttanut bakteerimaton paksuuteen muiden bakteerilajien kohdalla. Tämä havainto on kuitenkin vain suuntaa-antava, sillä toteutustavoistamme johtuen emme voineet tarkastella saman bakteerilajin erivahvui-

sista suspensioista tehtyjä herkkyysmaljoja rinnakkain, niin että ne olisivat kasvaneet yhtä kauan. Bakteerimattojen paksuuden vertaaminen erivahvuisten suspensioiden kesken olisi ollut luotettavampaa, jos olisimme toteuttaneet kaikki työvaiheet samalle bakteerilajille saman päivän aikana.

Otimme itse jokaisen työssämme esiintyvän valokuvan. Teimme itse kuvattavan materiaalin HUSLABin kliinisen mikrobiologian bakteriologian osastolla. Valokuvaaminen oli haastavaa etenkin rikastettujen Müller-Hinton herkkyysmaljojen kohdalla. Oli haastavaa saada kuvista tarpeeksi tarkkoja, jotta estorenkaiden reunat erottuisivat selvästi. Ongelmana oli myös herkkyysmaljojen aiheuttama kiilto.

Opinnäytetyössämme tutkittavien herkkyysmaljojen kokonaismäärä oli 620 (liite 4). Aluksi, aiheen saatuaamme, maljojen kokonaismäärä oli 1728. Tämä määrä perustui siihen, että aluksi tarkoituksemme oli tutkia kolmea levitystapaa jokaisessa suspensiovahvuudessa. Totesimme kuitenkin, että kyseinen määrä ei ole soveltuva opinnäytetyöhön. Teimme itse laskelmia ja päädyimme nykyiseen maljamäärään (620). Saimme pienennettyä maljamäärää tutkimalla bakteerisuspension levitystapoja vain suspensiovahvuudessa 0,5 McFarlandia. Tämä mahdollisti myös sen, että tutkimme vain yhtä muuttujaa kerrallaan. Toteutustapa ja maljamäärä sopi myös ohjaajille. Aineistomäärästä tuli sopiva kahden henkilön opinnäytetyö.

Kokonaisotantaa suositellaan, kun tutkimusaineisto jää pieneksi. Kirjallisuuden mukaan tutkimusaineistoa pidetään pienenä, jos havaintoyksiköitä on alle sata. (Vilka 2007: 52.) Emme tehneet otantaa aineistostamme, vaan huomioimme työssämme kokonaisuotannon mukaisesti jokaisen havaintoyksikön vähäisten toistojen takia. Bakteerilajit eroavat toisistaan muun muassa käytettävien antibioottivalikoimien suhteen. Tästä johtuen ongelmaksemme muodostui se, että jouduimme analysoimaan bakteerilajit omina ryhminään. Tämä puolestaan aiheutti sen, että aineistomme bakteerilajikohtaisesti oli todella pieni. Sen vuoksi saimme tuloksista esille vain karkeita eroja. Pienestä aineistosta huolimatta käytimme kvantitatiivista tutkimusmenetelmää, sillä saimme tulokset numeraalisessa muodossa. Tilastollisena merkitsevyytasona käytimme 0,05.

Kaikki esikartoituksemme kysymykset eivät toimineet haluamillamme tavoilla. Jos kysymykset olisi esitelty haastatellen, niin kuin olimme suunnitelleet, kysymyksiä olisi voitu tarvittaessa tarkentaa. Esimerkiksi yhdessä kysymyksessä tarkoituksenamme oli

saada vastaus siihen, mitä levitystapaa käytetään bakteerisuspension levittämisessä herkkyysmaljalle. Vastauksista kävi ilmi, että vastaajat eivät olleet ymmärtäneet kysymyksenasettelua. Muodostimme esitutkimuksemme kysymykset yhdessä ohjaajiemme kanssa. Tiukan aikataulun vuoksi emme ehtineet suorittaa kysymysten testausta. Haastattelussa olisi hyvä kysyä vastaajan taustatietoja, joilla on merkitystä tutkimuksen kannalta (Vilkkä 2005: 109–110). Olisi ollut mielenkiintoista kysyä esikartoitukseen vastanneilta heidän työssäoloaika ja suhteuttaa se muihin vastauksiin.

Aiheeseen liittyviä aikaisempia relevantteja tutkimuksia oli hyvin hankala löytää. Ohjaajammekaan eivät osanneet neuvoa, mistä aikaisempia tutkimuksia aiheeseen liittyen löytyisi. Löysimme muutaman arvovaltaisen aiheeseen liittyvän tutkimuksen, jotka CLSI on julkaissut. Valitettavasti kyseiset julkaisut olivat sen verran hintavia, 250 ja 1000 dollaria, joten meillä ei ollut mahdollisuutta saada niitä käyttöömmee.

Eettisyyskysymykset eivät olleet ongelma tässä työssä. Käyttämistämme bakteerikannoista ei käynyt ilmi potilastietoja. Bakteerikannat ovat taltioitu muun muassa potilasnäytteistä, mutta potilastietojen niissä ei näy. Kannat on taltioitu juoksevilla numeroinnilla, josta potilastietoja ei pysty jäljittämään.

Lähteet

- Antimicrobial Susceptibility Testing (Agar Disk Diffusion Method). 61–74. Verkkodokumentti. <www.cdc.gov/ncidod/dbmd/diseaseinfo/cholera/ch9.pdf>. Luettu 22.3.2011.
- Arendrup, Maiken – Dahl Knudsen, Jenny – Tvenstrup Jensen, Elsebeth – Jensen, Inge Panum – Frimodt-Møller, Niels 2001. Prevalence of and Detection of Resistance to Ampicillin and other β -lactam antibiotics in *Haemophilus influenzae* in Denmark. Department of Clinical Microbiology 33. 266–271.
- Bergman, Miika – Huikko, Solja – Huovinen, Pentti – Paakkari, Pirkko – Seppälä, Helena and the Finnish Study Group for Antimicrobial Resistance (FiRe Network) 2006. Macrolide and Azithromycin Use are Linked to Increased Macrolide Resistance in *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 50 (11). 3646–3650. [Huom. 50 on lehden vuosikerta eli volyymi, 11 lehden numero.]
- Bergman, Miika. Mikrobilääkeresistenssi Suomessa. Verkkodokumentti. <http://www.ktl.fi/attachments/osastot/infe/ttraportti/2bergman_abpaiva181110.pdf>. Luettu 30.8.2011.
- Carlson, Petteri – Koskela, Markku 2011. Bakteriologiset tutkimukset. Teoksessa Hedman, Klaus – Heikkinen, Terho – Huovinen, Pentti – Järvinen, Asko – Meri, Seppo – Vaara, Martti (toim.) *Infektiosairaudet. Mikrobiologia, immunologia ja infektiosairaudet*, kirja 3. Helsinki: Duodecim. 37–53.
- EUCAST disk diffusion method for antimicrobial susceptibility testing 2010. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Verkkodokumentti. <http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Disk_test_documents/EUCAST_disk_diffusion_method_v1.1.pdf>. Luettu 16.2.2011.
- Gagliotti, C. – Balode, A. – Baquero, F. – Degener, J. – Grundmann, H. – Gür, D. – Jarlier, V. – Kahlmeter, G. – Monens, G. – Monnet, D. L. – Rossoline, G. M. – Suetens, C. – Weist, K – Heuer, O. – the EARS-Net Participants 2011. *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*: bad news and good news from the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net, formerly EARSS), 2002 to 2009. Verkkodokumentti. <www.eurosurveillance.org>. Luettu 1.9.2011.
- Gracia, Matilde – Diaz, Carolina – Coronel, Pilar – Gimeno, Mercedes – Garcia-Rodas, Rocío – Rodriguez-Cerrato, Violeta – del Prado, Gema – Huelves, Lorena – Ruiz, Vicente – Naves, Plinio F.L. – Ponte, Maria-Carmen – Granizo, Juan Jose – Soriano, Francisco 2008. Antimicrobial susceptibility of *Streptococcus pyogenes* in Central Eastern, and baltic European Countries, 2005 to 2006: the cefditoren surveillance program. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 52–56.
- Heikkilä, Tarja 2004. Tilastollinen tutkimus. 5. uudistettu painos. Helsinki: Edita.
- Hindler, Janet A – Jorgensen, James H 2000. Procedures in antimicrobial susceptibility testing. Teoksessa Mahon, Connie R – Manuselis, George (toim.): *Textbook of Diagnostic Microbiology*. Philadelphia: W.B Saunders Company. 62–96.

- Hirsjärvi, Sirkka - Remes, Pirkko - Sajavaara, Paula 2005. Tutki ja kirjoita. 11. painos. Jyväskylä: Gummerus Kirjapaino Oy
- Holopainen, Martti – Pulkkinen, Pekka 2008. Tilastolliset menetelmät. 5.–6. painos. Helsinki: WSOY.
- Hudzicki, Jan 2009. Kirby-Bauer Disk Diffusion Susceptibility Test Protocol. Verkkodokumentti. <<http://www.microbelibrary.org/component/resource/laboratory-test/3189-kirby-bauer-disk-diffusion-susceptibility-test-protocol>>. Luettu 15.10.2011.
- Hunt, A. C. – Edwards, B. – Girvan, E. K. – Cosgrove, B. – Edwards, G. F. S. – Gould, I. M. 2011. Methicillin- Resistant Staphylococcus aureus in Northeastern Scotlans in 2003 to 2007: Evolving Strain Distribution and Resistance Patterns. Journal of Clinical Microbiology 49 (5). 1975–1978. [Huom. 49 on lehden vuosikerta eli volyyymi, 5 lehden numero.]
- Imöhl, Matthias – Reinert, Ralf René – Mutscher, Christina – van der Linden Mark 2010. Macrolide susceptibility and serotype specific macrolide resistance of invasive isolates of *Streptococcus pneumonia* in Germany from 1992 to 2008. BMC Microbiology.
- Järveläinen, Harri A – Miettinen, Minja 2001. Bakteerirakenteiden aiheuttama akuutti tulehdusvaste. Duodecim. 2015. Verkkodokumentti. <http://www.duodecimlehti.fi/web/guest/etusivu?p_p_id=dlehtihaku_view_article_WAR_dlehtihaku&p_p_action=1&p_p_state=maximized&p_p_mode=view&p_p_col_id=column1&p_p_col_count=1&dlehtihaku_view_article_WAR_dlehtihaku__spage=%2Fportlet_action%2Fdlehtihakuartikkeli%2Fviewarticle%2Faction&dlehtihaku_view_article_WAR_dlehtihaku_tunnus=duo92541&dlehtihaku_view_article_WAR_dlehtihaku_p_auth=>>. Luettu 22.3.2011.
- Järvinen, Asko – Vaara, Martti, – Huovinen, Pentti – Liippo, Kari – Vasankari, Tuula 2011. Bakteerilääkkeet. Teoksessa Hedman, Klaus – Heikkinen, Terho – Huovinen, Pentti – Järvinen, Asko – Meri, Seppo – Vaara, Martti (toim.) Infektiosairaudet. Mikrobiologia, immunologia ja infektiosairaudet, kirja 3. Helsinki: Duodecim. 112–204.
- Järvinen, Asko 2006. Mikrobilääkkeen oikea annostelu. Suomen Sairaalahygienialehti 24 (4). 171–177. [Huom. 24 on lehden vuosikerta eli volyyymi, 4 lehden numero.] Luettavissa myös sähköisesti osoitteessa <http://www.terveysportti.fi/kotisivut/sivut.koti?p_sivusto=1334>.
- Kahlmeter, G. – Brown, D. F.J. – Goldtein, F. W. – MacGowan, A.P. – Mouton, J. W. – Odenholt, I. – Rodloff, A – Soussy, C-J. – Steinbakk, M. – Soriano, F. –Stetsiouk, O 2006. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) Technical Notes on antimicrobial susceptibility testing. Clinical Microbiology and Infection 12 (6). 501–503. [Huom. 12 on lehden vuosikerta eli volyyymi, 6 lehden numero.]

- Kahlmeter, Gunnar – Brown, Derek F.J 2004. Harmonization of antimicrobial break-points in Europe – Can It Be Achieved. *Clinical Microbiology Newsletter* 24 (6). 187–192. [Huom. 24 on lehden volyymi eli vuosikerta, 6 lehden numero] Luettavissa myös sähköisesti osoitteessa <http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/4ESCMID_Library/3Publications/EUCAST_Documents/Publications/Clin_Micoro_News_1024.pdf>.
- Kahlmeter, Gunnar – Brown, Derek F.J. – Goldstein Fred W. – MacGowan, Alasdair P. – Mouton, Johan W. – Österlund, Anders – Rodloff, Arne – Steinbakk, Martin – Urbaskova, Pavla – Vatopoulos, Alkiviadis 2003. European harmonization on MIC breakpoints for antimicrobial susceptibility testing of bacteria. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 52. 145–148. Luettavissa myös sähköisesti osoitteessa <http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/4ESCMID_Library/3Publications/EUCAST_Documents/Publications/Antimicrobial_Chemotherapy_2003.pdf>.
- Kauma, Heikki – Virolainen-Julkunen, Anni 2010. Pneumokokki. Teoksessa Hedman, Klaus – Heikkinen, Terho – Huovinen, Pentti – Järvinen, Asko – Meri, Seppo – Vaara, Martti (toim.) *Mikrobiologia. Mikrobiologia, immunologia ja infektiosairaudet*, kirja 1. Helsinki: Duodecim. 112–121.
- Koletar, Susan L 2000. Antimicrobial mechanisms of action. Teoksessa Mahon, Connie R – Manuselis, George (toim.): *Textbook of Diagnostic Microbiology*. Philadelphia: W.B Saunders Company. 52–61.
- Kronvall, Göran 2010. Antimicrobial resistance 1979–2009 at Karolinska hospital, Sweden: normalized resistance interpretation during a 30-year follow-up on *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* resistance development. *The Author* 118 (9). 621–639. [Huom. 118 on lehden vuosikerta eli volyymi, 9 lehden numero.]
- Kärpänoja, Pauliina – Nissinen, Antti – Huovinen, Pentti – Sarkkinen, Hannu 2004. Disc diffusion susceptibility testing of *Haemophilus influenzae* by NCCLS methodology using low-strength ampicillin and co-amoxiclav discs. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 53. 660–663.
- Kärpänoja, Pauliina – Nyberg, Solja T. – Bergman, Miika – Voipio, Tinna – Paakkari, Pirkko – Huovinen, Pentti – Sarkkinen, Hannu 2008. Connection between Trimethoprim-Sulfamethoxazole Use and Resistance in *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, and *Moraxella catarrhalis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 52 (7). 2480–2485. [Huom. 52 on lehden vuosikerta eli volyymi, 7 lehden numero.]
- Käyhty, Helena – Peltola, Heikki 2010. Hemofilukset. Teoksessa Hedman, Klaus – Heikkinen, Terho – Huovinen, Pentti – Järvinen, Asko – Meri, Seppo – Vaara, Martti (toim.) *Mikrobiologia. Mikrobiologia, immunologia ja infektiosairaudet*, kirja 1. Helsinki: Duodecim. 166–169.
- Lalitha, M.K. *Manual on Antimicrobial Susceptibility Testing*. Verkkodokumentti. <<http://www.ijmm.org/documents/Antimicrobial.doc>>. Luettu 16.8.2011.

- Larsen, Hal S. – Connie R. Mahon 2000. Staphylococci. Teoksessa Mahon, Connie R – Manuselis, George (toim.): Textbook of Diagnostic Microbiology. Philadelphia: W.B Saunders Company. 327–342.
- Larsen, Hal S. 2000. Streptococcaceae. Teoksessa Mahon, Connie R – Manuselis, George (toim.): Textbook of Diagnostic Microbiology. Philadelphia: W.B Saunders Company. 345–371.
- Lääkealan turvallisuus ja kehittämiskeskus 2010. Fimea. Verkkodokumentti. <<http://spc.nam.fi/indox/nam/html/nam/humspc/2/581842.pdf>>. Luettu 12.9.2011.
- Lääkealan turvallisuus ja kehittämiskeskus 2011a. Fimea. Verkkodokumentti. <<http://spc.nam.fi/indox/nam/html/nam/humspc/0/151510.pdf>>. Luettu 12.9.2011.
- Lääkealan turvallisuus ja kehittämiskeskus 2011b. Fimea. Verkkodokumentti. <<http://www.fimea.fi/laaketieto/valmisteyhteenvetot/humspc>>. Luettu 12.9.2011.
- Lääkeluettelo 2011. Orion Pharma. Verkkodokumentti. <[http://spcam.orion.fi/laakeluettelo/Tiedosto/A-PEN\(4119\).html](http://spcam.orion.fi/laakeluettelo/Tiedosto/A-PEN(4119).html)>. Luettu 1.9.2011.
- M02-A10: Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard - Tenth Edition 2011. CLSI. Verkkodokumentti. <http://www.clsi.org/source/orders/categories.cfm?section=Antimicrobial_Susceptibility_Testing&CAT=AST>. Luettu 16.10.2011.
- Madigan, Michael T – Martinko, John M – Parker, Jack 2000. Brock Biology of Microorganisms. Upper Saddle River, New Jersey: Prentice- Hall.
- Mahon, Connie R. – Manuselis, George 2000: Enterobacteriaceae. Teoksessa Mahon, Connie R – Manuselis, George (toim.): Textbook of Diagnostic Microbiology. Philadelphia: W.B Saunders Company. 463–511.
- Manuselis, George – Barmishan, Jean 2000. Haemophilus species, Hacek group, Pasteurella, Brucella, and Francisella species. Teoksessa Mahon, Connie R – Manuselis, George (toim.): Textbook of Diagnostic Microbiology. Philadelphia: W.B Saunders Company. 425–444.
- Manuselis, George – Mahon, Connie R 2000. Bacterial Cell Structure, Physiology, Metabolism, and Genetics. Teoksessa Mahon, Connie R – Manuselis, George (toim.): Textbook of Diagnostic Microbiology. Philadelphia: W.B Saunders Company. 2–24.
- Meurman, Olli – Nissinen, Antti 2006. Bakteerilääkeherkkyyskierrojen säilyminen ja säilyttäminen. Moodi 6. 205–206.
- Meurman, Olli 2006. Pääkirjoitus. Suomen Sairaalahygienialehti 24 (4). 166. [Huom. 24 on lehden vuosikerta eli volyyymi, 4 lehden numero.] Luettavissa myös sähköi-

sesti osoitteessa

<http://www.terveysportti.fi/kotisivut/sivut.koti?p_sivusto=1334>.

- Myllyniemi, A-L 2010. Bakteerien antibioottiherkkyiden tutkiminen kiekkoherkkyyssmenetelmällä. Evira. Verkkodokumentti.
<www.evira.fi/...rehututkimus/evira3484_v5_antibioot_herkk_kiekkoherkmenetkiek.pdf>. Luettu 22.3.2011.
- Mäkelä, Pirjo H. 2002. Ihmisen aktiivinen taistelu taudinaiheuttajamikrobeja vastaan: mikrobilääkkeet. Teoksessa Salkinoja-Salonen (toim.) Mikrobiologian perusteita. Jyväskylä: Gummerrus. 510–511.
- Neonakis, IK – Stylianou, K – Daphnis, E – Maraki, S 2011. First case of resistance to tigecycline by *Klebsiella pneumoniae* in a European University Hospital. *Indian Journal of Medical Microbiology* 29 (1). 78–79. [Huom. 29 on lehden vuosikerta eli volyyymi, 1 lehden numero.]
- Nissinen, Antti 2002. Bakteerin lääkeaine herkkyiden määrittäminen. Teoksessa Salkinoja-Salonen (toim.): Mikrobiologian perusteita. Jyväskylä: Gummerrus. 532–533.
- Nissinen, Antti 2006a. Bakteerin lääkeherkkyiden määrittäminen. *Moodi* 6. 202–204.
- Nissinen, Antti 2006b. Herkkyysmäärittäminen. *Moodi* 6. 201.
- Nissinen, Antti 2009. Bakteerin lääkeherkkyiden määrittäminen kiekkomenetelmällä versio 6. Verkkodokumentti.
<<http://www.finres.fi/fileadmin/files/standardi/kiekkomenetelma.pdf>>. Luettu 13.2.2011.
- Puhakka, Jaakko – Salkinoja-Salonen, Mirja 2002. Bakteerien solukuori. Teoksessa Salkinoja-Salonen (toim.) Mikrobiologian perusteita. Jyväskylä: Gummerrus. 98–111.
- Puhakka, Jaakko – Salkinoja-Salonen, Mirja 2002. Bakteerit ja arkit, yleistä. Teoksessa Salkinoja-Salonen (toim.) Mikrobiologian perusteita. Jyväskylä: Gummerrus. 92–97.
- Salkinoja-Salonen, Mirja 2002. Maljaviljely. Teoksessa Salkinoja-Salonen (toim.) Mikrobiologian perusteita. Jyväskylä: Gummerrus. 57–58.
- Salkinoja-Salonen, Mirja 2002. Mikrobin kasvu. Teoksessa Salkinoja-Salonen (toim.) Mikrobiologian perusteita. Jyväskylä: Gummerrus. 183–209.
- Salkinoja-Salonen, Mirja 2002. Mikrobilääkkeiden vaikutuskohteet mikrobisolussa ja käyttö. Teoksessa Salkinoja-Salonen (toim.) Mikrobiologian perusteita. Jyväskylä: Gummerrus. 518–525.
- Salkinoja-Salonen, Mirja – Puhakka, Jaakko 2002. Ribosomit ja genomi. Teoksessa Salkinoja-Salonen (toim.) Mikrobiologian perusteita. Jyväskylä: Gummerrus. 154–164.

- Salkonoja-Salonen, Mirja – Puhakka, Jaakko 2002. Solukalvo eli plasmamembraani. Teoksessa Salkinoja-Salonen (toim.) Mikrobiologian perusteita. Jyväskylä: Gummerrus. 112–119.
- Siitonen, Anja – Vaara, Martti 2010. Escherichia, Salmonella, Shigella ja Yersinia. Teoksessa Hedman, Klaus – Heikkinen, Terho – Huovinen, Pentti – Järvinen, Asko – Meri, Seppo – Vaara, Martti (toim.) Mikrobiologia. Mikrobiologia, immunologia ja infektiosairaudet, kirja 1. Helsinki: Duodecim. 177–195.
- Skurnik, Mikael 2010. Bakterigenetiikka. Teoksessa Hedman, Klaus – Heikkinen, Terho – Huovinen, Pentti – Järvinen, Asko – Meri, Seppo – Vaara, Martti (toim.): Mikrobiologia. Mikrobiologia, immunologia ja infektiosairaudet, kirja 1. Helsinki: Duodecim. 41–55.
- Terveyskirjasto. Duodecim. Verkkodokumentti.
<http://www.terveyskirjasto.fi/terveyskirjasto/tk.koti?p_artikkeli=Ilt03292>. Luettu 12.9.2011.
- Tissari, Päivi – Anttila, Veli-Jukka 2010. Muu Enterobacteriaceae-heimo. Teoksessa Hedman, Klaus – Heikkinen, Terho – Huovinen, Pentti – Järvinen, Asko – Meri, Seppo – Vaara, Martti (toim.) Mikrobiologia. Mikrobiologia, immunologia ja infektiosairaudet, kirja 1. Helsinki: Duodecim. 196–199.
- Vaara, Martti – Skurnik, Mikael – Sarvas, Matti 2010. Bakterisolun rakenne ja toiminta. Teoksessa Hedman, Klaus – Heikkinen, Terho – Huovinen, Pentti – Järvinen, Asko – Meri, Seppo – Vaara, Martti (toim.) Mikrobiologia. Mikrobiologia, immunologia ja infektiosairaudet, kirja 1. Helsinki: Duodecim. 14–40.
- Vaara, Martti 2006. Bakteerien luonnollinen resistenssi ohjaa laboratorioita valitsemaan, mitä herkkyysmäärittämiä tehdään. Suomen Sairaalahygienialehti 24 (4). 178–181. [Huom. 24 on lehden vuosikerta eli volyymi, 4 lehden numero.] Luettavissa myös sähköisesti osoitteessa
<http://www.terveysportti.fi/kotisivut/sivut.koti?p_sivusto=1334>.
- Vaara, Martti 2009. Tauteja aiheuttavien mikrobien evoluutio haasteena lääketieteelle. Duodecim. 2001–2006. Verkkodokumentti.
<http://www.duodecimlehti.fi/web/guest/uusinnumero?p_p_id=dlehtihaku_view_article_WAR_dlehtihaku&p_p_action=1&p_p_state=maximized&p_p_mode=view&dlehtihaku_view_article_WAR_dlehtihaku__spage=%2Fportlet_action%2Fdlehtihakuartikkeli%2Fviewarticle%2Faction&dlehtihaku_view_article_WAR_dlehtihaku_tunnus=duo98316&dlehtihaku_view_article_WAR_dlehtihaku_p_frompage=uusinnumero>. Luettu 29.8.2011.
- Valmisteyhteenveto 2002. Verkkodokumentti.
<<http://spc.nam.fi/indox/nam/html/nam/humspc/1/240441.pdf>>. Luettu 12.9.2011.
- Valmisteyhteenveto 2010. Verkkodokumentti.
<<http://spc.nam.fi/indox/nam/html/nam/humspc/0/305540.pdf>>. Luettu 12.9.2011.

- Vilen, Heikki 2006. Mu in vitro Transposition Technology in Functional Genetics and Genomics: Applications on Mouse and Bacteriophages. Verkkodokumentti. <<http://ethesis.helsinki.fi/julkaisut/bio/bioja/vk/vilen/tiiviste.html>>. Luettu 8.9.2011.
- Vilkka, Hanna 2005. Tutki ja kehitä. Helsinki: Tammi.
- Vilkka, Hanna 2007. Tutki ja mittaa: Määrällisen tutkimuksen perusteet. Helsinki: Tammi.
- Vuento, Risto – Vaara, Martti 2010. Bakteereiden luonnollinen ja hankittu resistenssi. Teoksessa Anttila, Veli-Jukka – Hellstén, Soile – Rantala, Arto – Routamaa, Marianne – Syrjälä, Hannu – Vuento, Risto (toim.): Hoitoon liittyvien infektioiden torjunta. 6. painos. Porvoo: Suomen Kuntaliitto. 68–77.
- Vuento, Risto 2006. Bakterilääkkeiden jaottelu. Suomen Sairaalahygienialehti 24 (4). 168–170. [Huom. 24 on lehden vuosikerta eli volyyymi, 4 lehden numero.] Luettavissa myös sähköisesti osoitteessa <http://www.terveysportti.fi/kotisivut/sivut.koti?p_sivusto=1334>.
- Vuento, Risto 2010. Tartunnan aiheuttajat ja tartuntatavat. Teoksessa Anttila, Veli-Jukka – Hellstén, Soile – Rantala, Arto – Routamaa, Marianne – Syrjälä, Hannu – Vuento, Risto (toim.): Hoitoon liittyvien infektioiden torjunta. 6. painos. Porvoo: Suomen Kuntaliitto. 43–56.
- Vuopio-Varkila, Jaana – Kuusela, Pentti – Kotilainen, Pirkko 2010. Staphylococcus aureus. Teoksessa Hedman, Klaus – Heikkinen, Terho – Huovinen, Pentti – Järvinen, Asko – Meri, Seppo – Vaara, Martti (toim.) Mikrobiologia. Mikrobiologia, immunologia ja infektiosairaudet, kirja 1. Helsinki: Duodecim. 83–97.
- Vuopio-Varkila, Jaana – Syrjänen, Jaana – Kotilainen, Pirkko 2010. A-ryhmän streptokokki. Teoksessa Hedman, Klaus – Heikkinen, Terho – Huovinen, Pentti – Järvinen, Asko – Meri, Seppo – Vaara, Martti (toim.) Mikrobiologia. Mikrobiologia, immunologia ja infektiosairaudet, kirja 1. Helsinki: Duodecim. 102–109.

Esikartoituslomake

Miten valmistatte bakteerisuspension ja tarkistatte sen oikean vahvuuden?

Käyttekö McFarlandin standardia bakteerisuspensiota valmistettaessa? Entä densitometriä?

Kuinka kauan bakteerisuspensio seisoo ennen viljelyä. (yleinen arvio)

Miten viljelette bakteerisuspension maljalle? Miksi?

Miten varmistatte bakteerimaton tasaisuuden ja sen ettei malja kasva liian paksusti?

Kuinka kauan aikaa kuluu, ennen kuin kiekotetut maljat siirtyvät lämpökaappiin arkisiin? Entä viikonloppuisin? (yleinen arvio)

Bakteerikantojen kasvuolosuhteet ja käytetyt agarmaljat

	Kantanumero	Puhdasviljelmä malja	Puhdasviljelmän kasvuolosuhde	Herkkyyshalja	Herkkyyshaljan kasvuolosuhde	Antibiottipaneli
<i>H. influenzae</i> (herkkä)	NCTC 8468 T-15505	Suklaamalja	5%CO ₂ +35°C	Rikastettu Müller-Hinton (MH-F)	5 % CO ₂ +35°C	HE I ja II
<i>H. influenzae</i> (alentunut herkkyys)	Maljakontrolli T-91773	Suklaamalja	5 % CO ₂ +35°C	Rikastettu Müller-Hinton (MH-F)	5 % CO ₂ +35°C	HE I ja II
<i>S. pneumoniae</i> (herkkä)	Maljakontrolli T-111362	Suklaamalja	5 % CO ₂ +35°C	Rikastettu Müller-Hinton (MH-F)	5 % CO ₂ +35°C	PNC
<i>S. pneumoniae</i> (alentunut herkkyys)	Maljakontrolli T-110415	Suklaamalja	5 % CO ₂ +35°C	Rikastettu Müller-Hinton (MH-F)	5 % CO ₂ +35°C	PNC
<i>S. pyogenes</i> (herkkä)	ATCC 19615 T-9119	Suklaamalja	5 % CO ₂ +35°C	Rikastettu Müller-Hinton (MH-F)	5 % CO ₂ +35°C	STR
<i>S. pyogenes</i> (alentunut herkkyys)	Maljakontrolli T-110413	Suklaamalja	5 % CO ₂ +35°C	Rikastettu Müller-Hinton (MH-F)	5 % CO ₂ +35°C	STR
<i>E. coli</i> (herkkä)	ATCC 25922 T-9112	Verimalja	+35°C lämpökaappi	Müller-Hinton (MH)	+35°C lämpökaappi	SA
<i>E. coli</i> (alentunut herkkyys)	Maljakontrolli T-111241	Verimalja	+35°C lämpökaappi	Müller-Hinton (MH)	+35°C lämpökaappi	SA ja SA-LI
<i>S. aureus</i> (herkkä)	ATCC 25923 T-9118	Verimalja	+35°C lämpökaappi	Müller-Hinton (MH)	+35°C lämpökaappi	STA
<i>S. aureus</i> (alentunut herkkyys)	ATCC 43300 T-24843	Verimalja	+35°C lämpökaappi	Müller-Hinton (MH)	+35°C lämpökaappi	STA ja STA-LI
<i>K. pneumoniae</i> (herkkä)	ATCC 13883 T-15505	Verimalja	+35°C lämpökaappi	Müller-Hinton (MH)	+35°C lämpökaappi	SA
<i>K. pneumoniae</i> (alentunut herkkyys)	Maljakontrolli T-110369	Verimalja	+35°C lämpökaappi	Müller-Hinton (MH)	+35°C lämpökaappi	SA ja SA-LI

Työssä käytetyt antibioottipaneelit ja antibioottien SIR -rajat

H. influenzae -lajille käytettävät antibioottipaneelit.

HE I paneeli	Lyhenne	S	R
Sulfa-trimetopriimi	SXT	23	19
Tetrasykliini	TE	24	20
Kloramfenikoli	C	28	24
Erytromysiini	E	50	11
Kefaklori	CEC	>18	18

HE II paneeli	Lyhenne	S	R
Siprofloksasiini	CIP	23	22
Kefuroksiimi	CXM	25	21
Amoksisilliini-klavu- liinihappo	AMC	20	19
Ampisilliini	AMP	16	15?

S. pneumoniae -lajille käytettävä antibioottipaneeli.

PNC paneeli	Lyhenne	S	R
Sulfa-trimetopriimi	SXT	18	14
Vankomysiini	VA	16	15
Tetrasykliini	TE	23	19
Oksasilliini	OX	20	19
Erytromysiini	E	22	18
Klindamysiini	DA	19	18

S. pyogenes -lajille käytettävä antibioottipaneeli.

STR paneeli	Lyhenne	S	R
Penisilliini	P	18	17
Erytromysiini	E	21	17
Klindamysiini	DA	17	16
Kefalotiini	KF	18	14
Vankomysiini	VA	13	12

K. pneumoniae ja *E. coli* -lajeille käytettävät antibioottipaneelit.

SA paneeli	Lyhenne	S	R
Ampisilliini	AMP	14	13
Levofloksasiini	LEV	22	18
Tobramysiini	TOB	16	12
Sulfa-trimetopriimi	SXT	16	12
Amoksisilliini-klavu- liinihappo	AMC	17	16
Kefuroksiimi	CXM	18	17

SA-LI paneeli (lisäpaneeli)	Lyhenne	S	R
Kefotaksiimi	CTX	21	17
Kefalotiini	KF	18	14
Piperasilliini-tatso- baktaami	TZP	18	14
Meropeneemi	MEM	22	15
Keftaziidiimi	CAZ	22	18
Amoksisilliini-klavu- liinihappo	AMC	17	16

S. aureus -lajeille käytettävät antibioottipaneelit

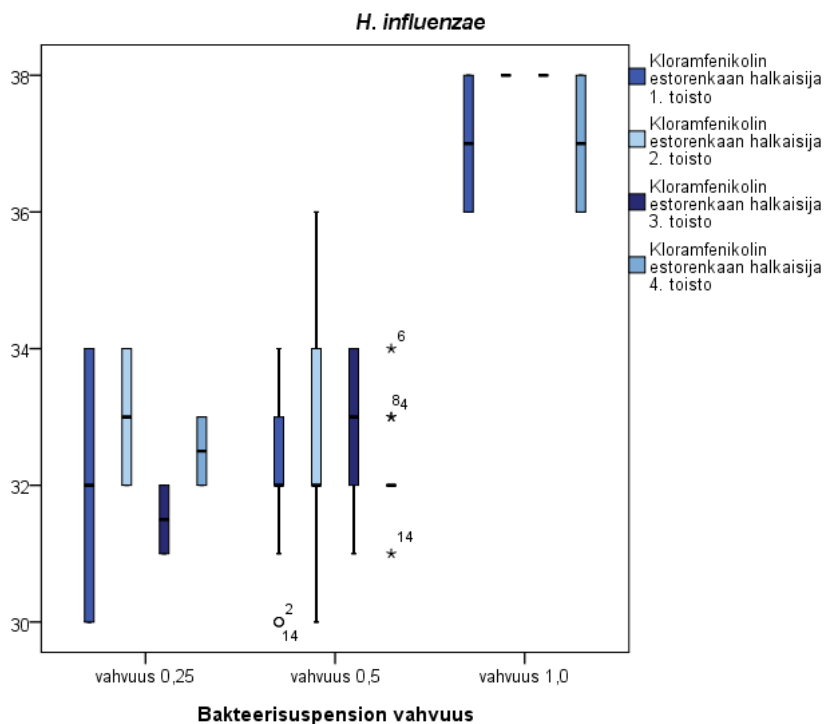
STA paneeli	Lyhenne	S	R
Klindamysiini	DA	22	18
Erytromysiini	E	21	17
Kefoksitiini	FOX	22	21
Oksasilliini	OX	13	10
Levofloksasiini	LEV	22	18
Fusidiinihappo	FD	24	23

STA-LI paneeli (lisäpaneeli)	Lyhenne	S	R
Sulfa-trimetopriimi	SXT	17	13
Vankomysiini	VA	12	11
Netilmysiini	NET	18	17
Linetsolidi	LZD	19	18
Rifampisiini	RD	26	22
Tetrasykliini	TE	22	18

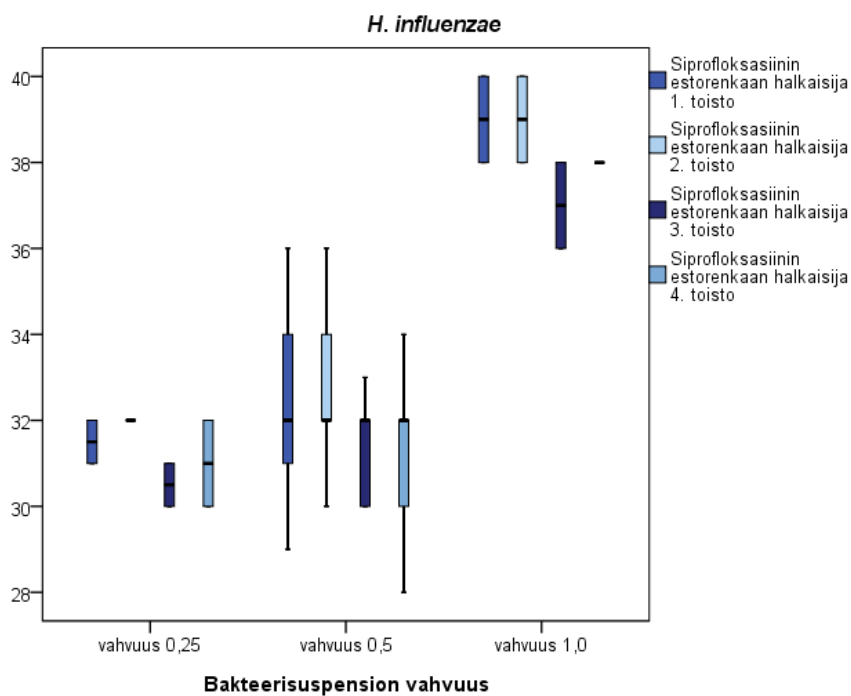
Käytettyjen herkkyysmaljojen lukumäärä bakteerikantakohtaisesti

	Antibiotti-paneeli	Käytetyt maljat suspensiossa 0.25 McFarland	Käytetyt maljat suspensiossa 0.50 McFarland	Käytetyt maljat suspensiossa 1,0 McFarland
<i>H. influenzae</i> (herkkä)	HE I ja II	8 kpl	56 kpl	8 kpl
<i>H. influenzae</i> (alentunut herkkyys)	HE I ja II	8 kpl	56 kpl	8 kpl
<i>S. pneumoniae</i> (herkkä)	PNC	4 kpl	28 kpl	4 kpl
<i>S. pneumoniae</i> (alentunut herkkyys)	PNC	4 kpl	28 kpl	4 kpl
<i>S. pyogenes</i> (herkkä)	STR	4 kpl	28 kpl	4 kpl
<i>S. pyogenes</i> (alentunut herkkyys)	STR	4 kpl	28 kpl	4 kpl
<i>E. coli</i> (herkkä)	SA	4 kpl	28 kpl	4 kpl
<i>E.coli</i> (alentunut herkkyys)	SA ja SA-LI	8 kpl	56 kpl	8 kpl
<i>K. pneumoniae</i> (herkkä)	SA	4 kpl	28 kpl	4 kpl
<i>K. pneumoniae</i> (alentunut herkkyys)	SA ja SA-LI	8 kpl	56 kpl	8 kpl
<i>S. aureus</i> (herkkä)	STA	4 kpl	28 kpl	4 kpl
<i>S. aureus</i> (alentunut herkkyys)	STA ja STA-LI	8 kpl	56 kpl	8 kpl
Yhteensä		68 kpl	476 kpl	68 kpl

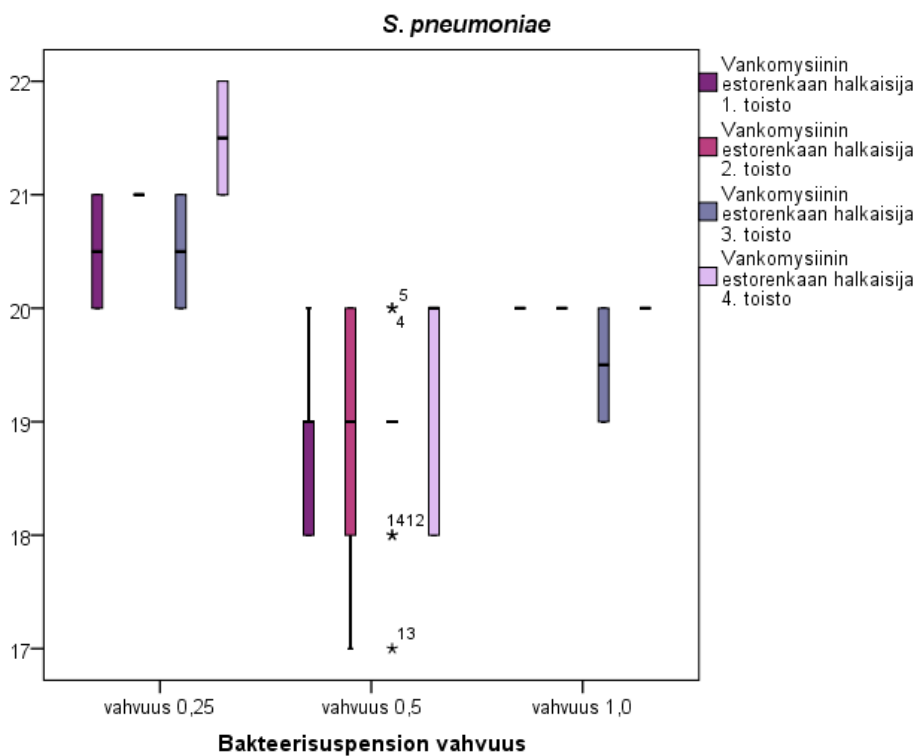
Erivahvuisten bakteerisuspensioiden vaikutus estorenkaiden halkaisijoihin antibiootti- ja bakteerilajikohtaisesti



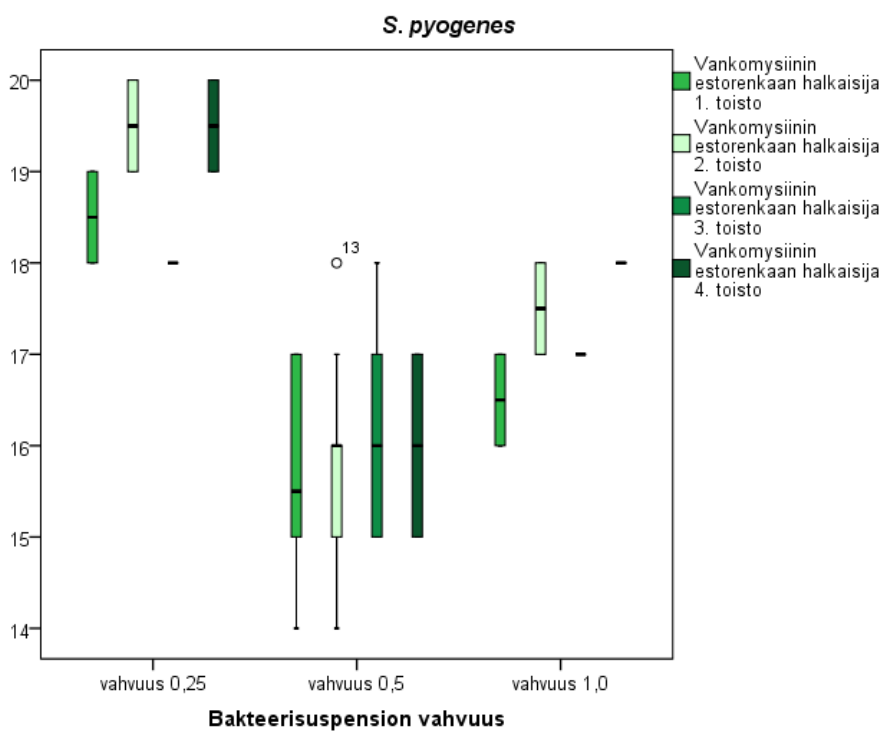
Erivahvuisten bakteerisuspensioiden vaikutus *H. influenzae* -lajin estorenkaiden halkaisijoihin kun vaikuttavana antibioottina oli kloramfenikoli.



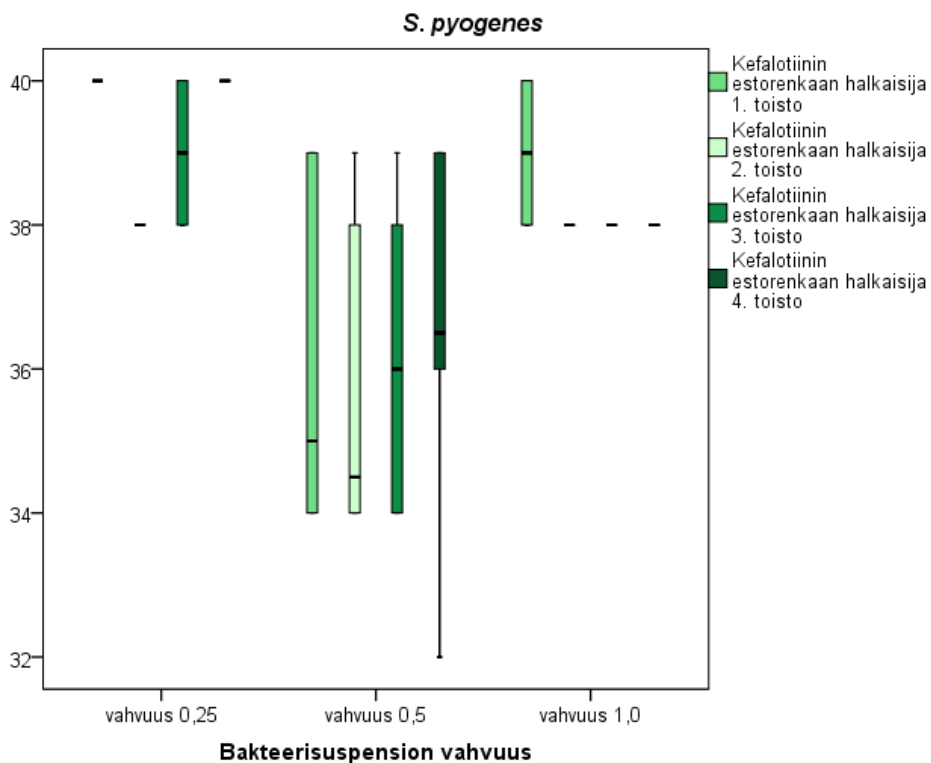
Erivahvuisten bakteerisuspensioiden vaikutus *H. influenzae* -lajin estorenkaiden halkaisijoihin kun vaikuttavana antibioottina oli siprofloksasiini.



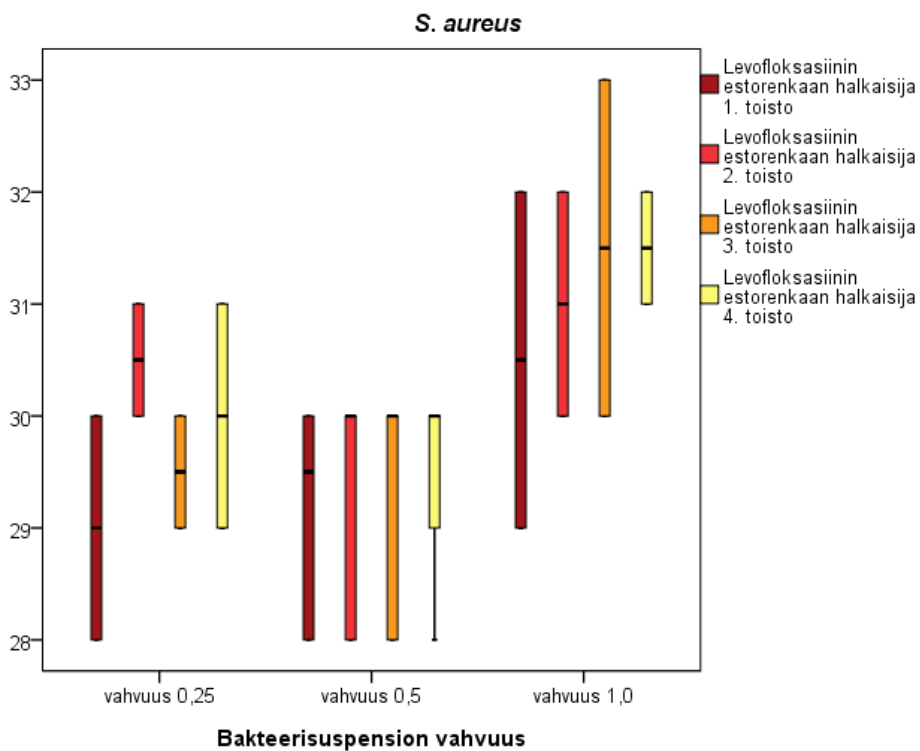
Erivahvuisten bakteerisuspensioiden vaikutus *S. pneumoniae* -lajin estorenkaiden halkaisijoihin kun vaikuttavana antibioottina oli vankomysiini.



Erivahvuisten bakteerisuspensioiden vaikutus *S. pyogenes* -lajin estorenkaiden halkaisijoihin kun vaikuttavana antibioottina oli vankomysiini.

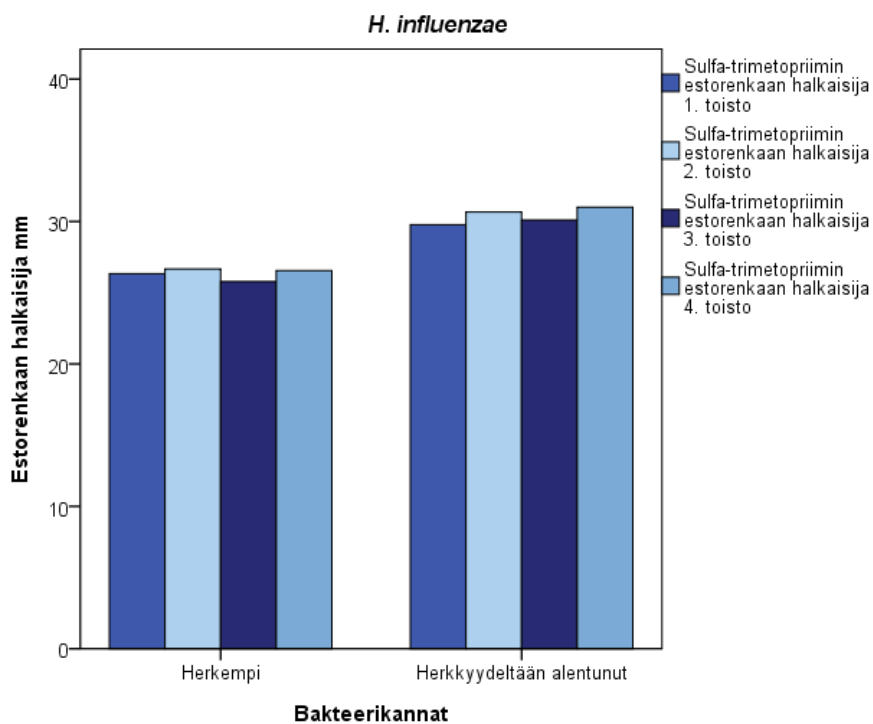


Erivahvuisten bakteerisuspensioiden vaikutus *S. pyogenes* -lajin estorenkaiden halkaisijoihin kun vaikuttavana antibioottina oli kefalotiini.

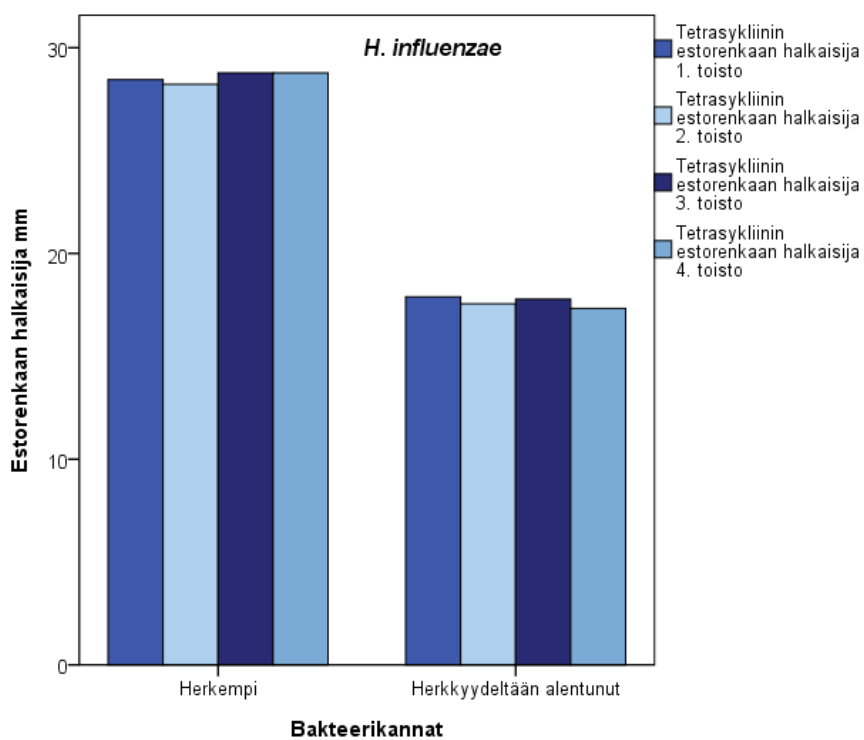


Erivahvuisten bakteerisuspensioiden vaikutus *S. aureus* -lajin estorenkaiden halkaisijoihin kun vaikuttavana antibioottina oli levofloksasiini.

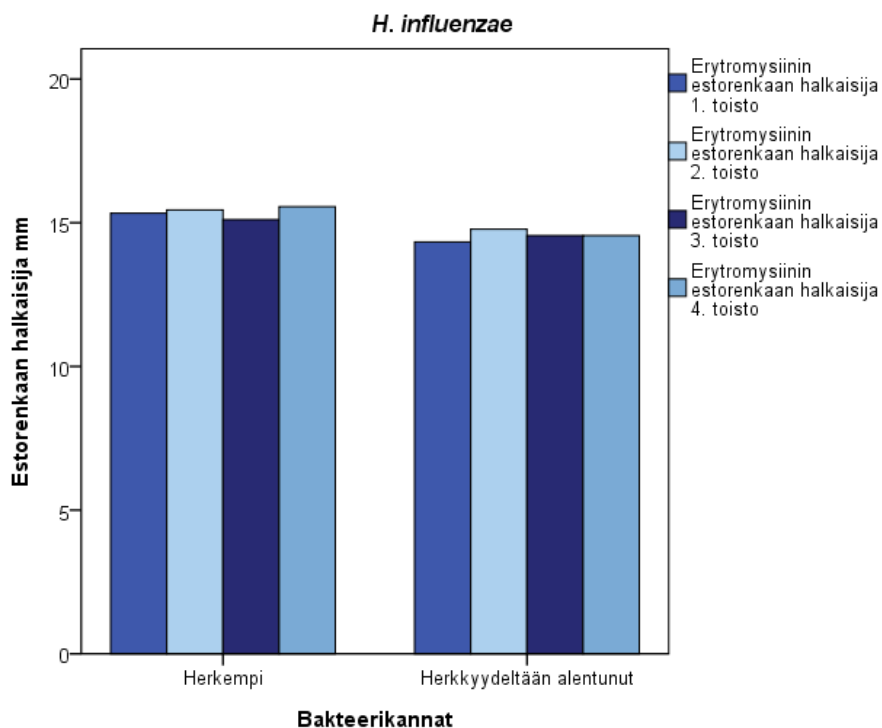
Bakteerilajin herkkyydeltään eroavien kantojen vaikutus tutkittaviin antibiootteihin.



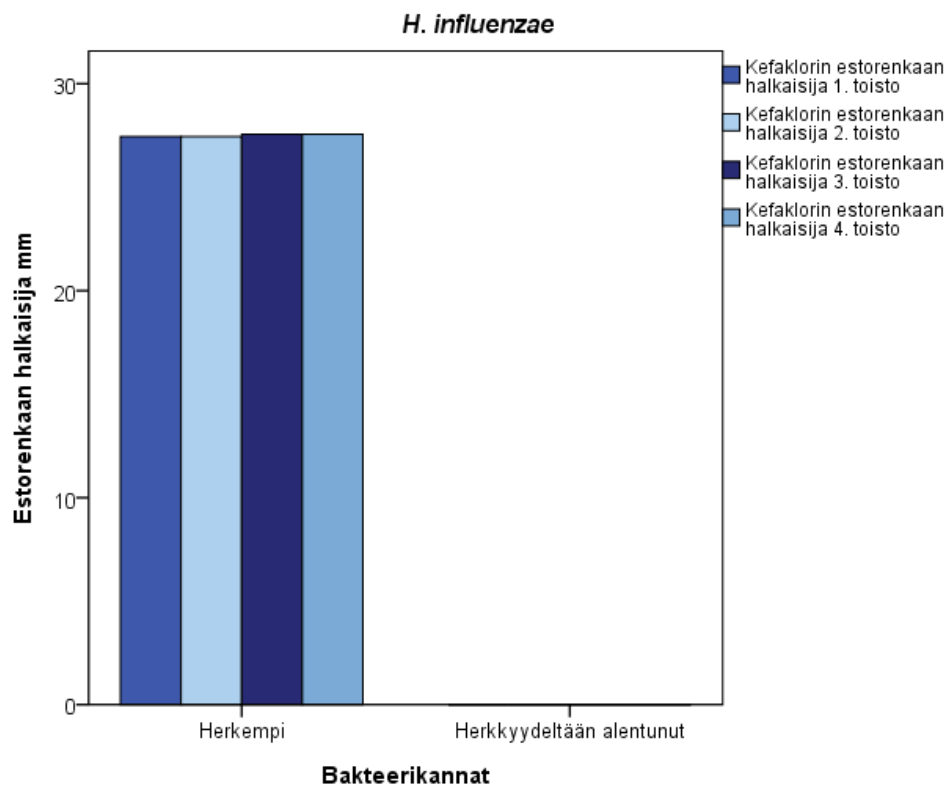
Kantojen vaikutus estorenkaiden halkaisijoihin *H. influenzae* -lajilla vaikuttavan antibiootin ollessa sulfa-trimetopriimi.



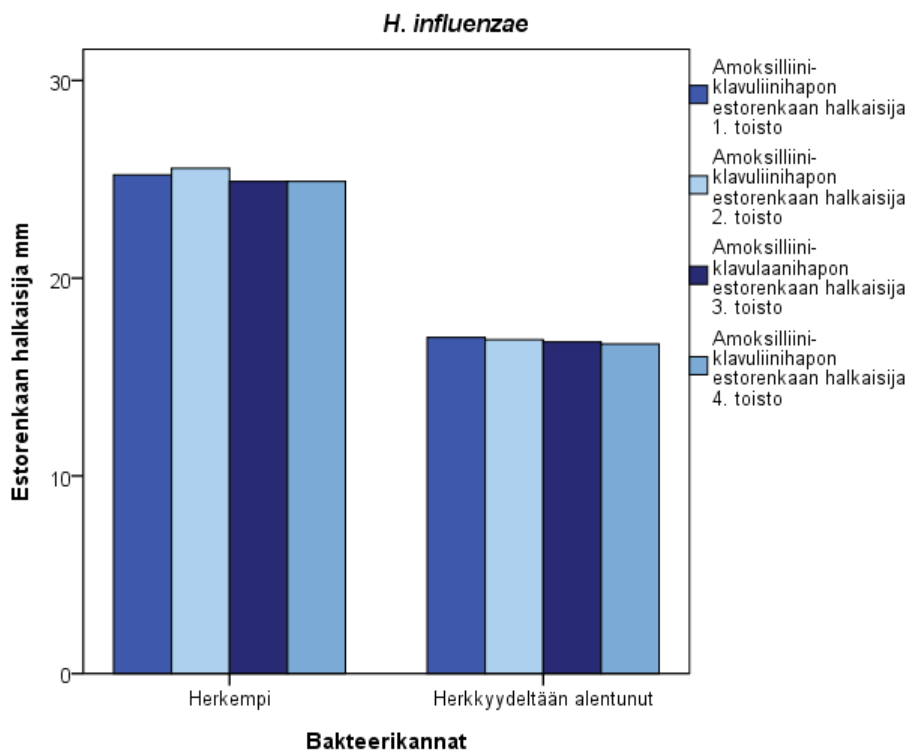
Kantojen vaikutus estorenkaiden halkaisijoihin *H. influenzae* -lajilla vaikuttavan antibiootin ollessa tetrasykliini.



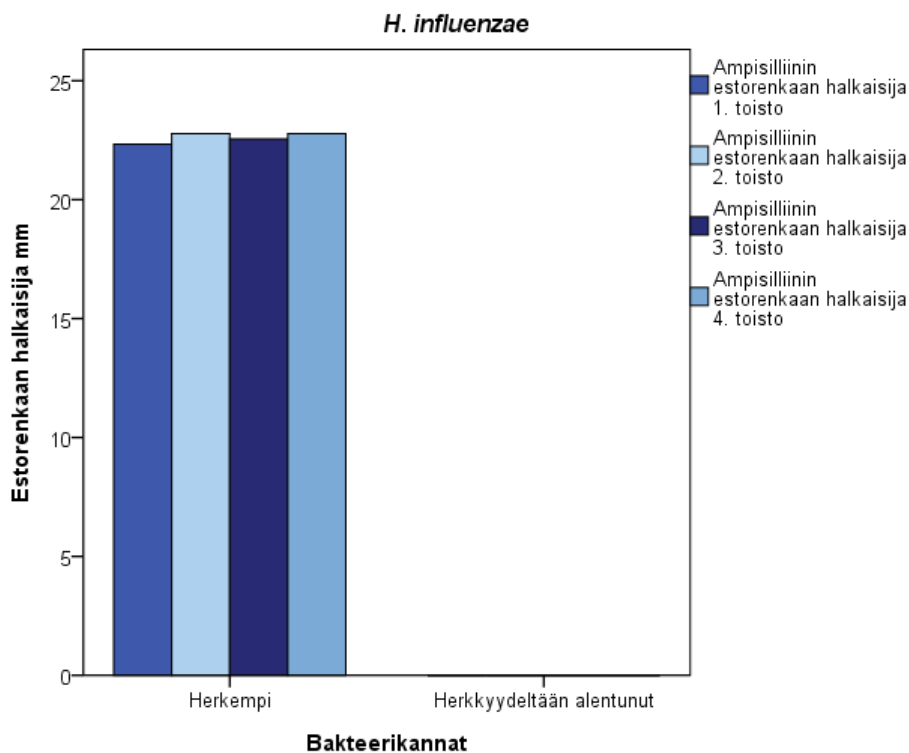
Kantojen vaikutus estorenkaiden halkaisijoihin *H. influenzae*-lajilla vaikuttavan antibiootin ollessa erytromysiini.



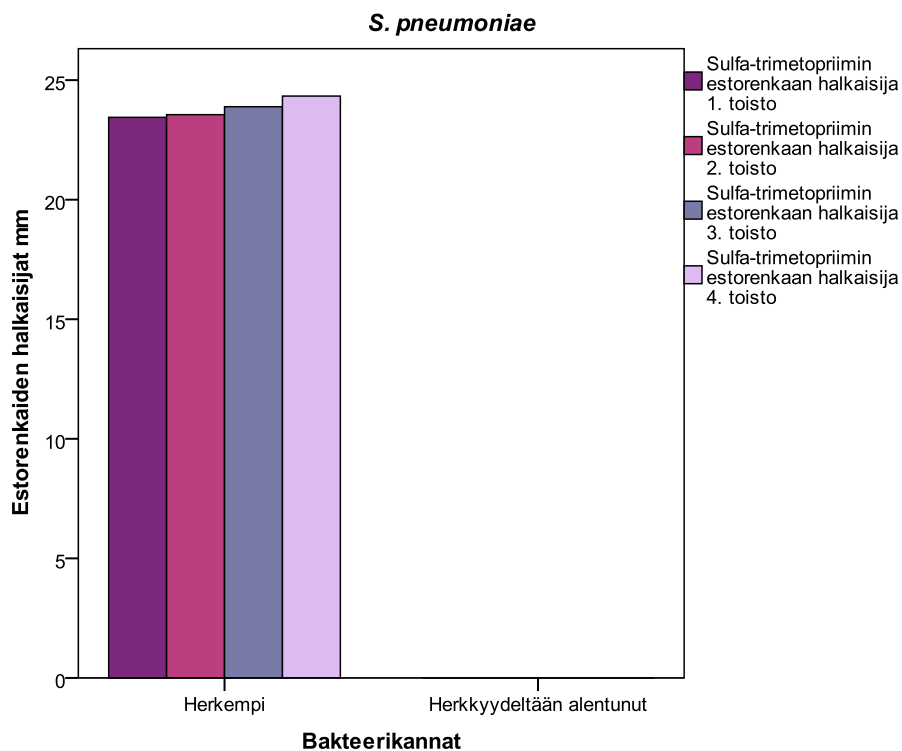
Kantojen vaikutus estorenkaiden halkaisijoihin *H. influenzae*-lajilla vaikuttavan antibiootin ollessa kefaklori.



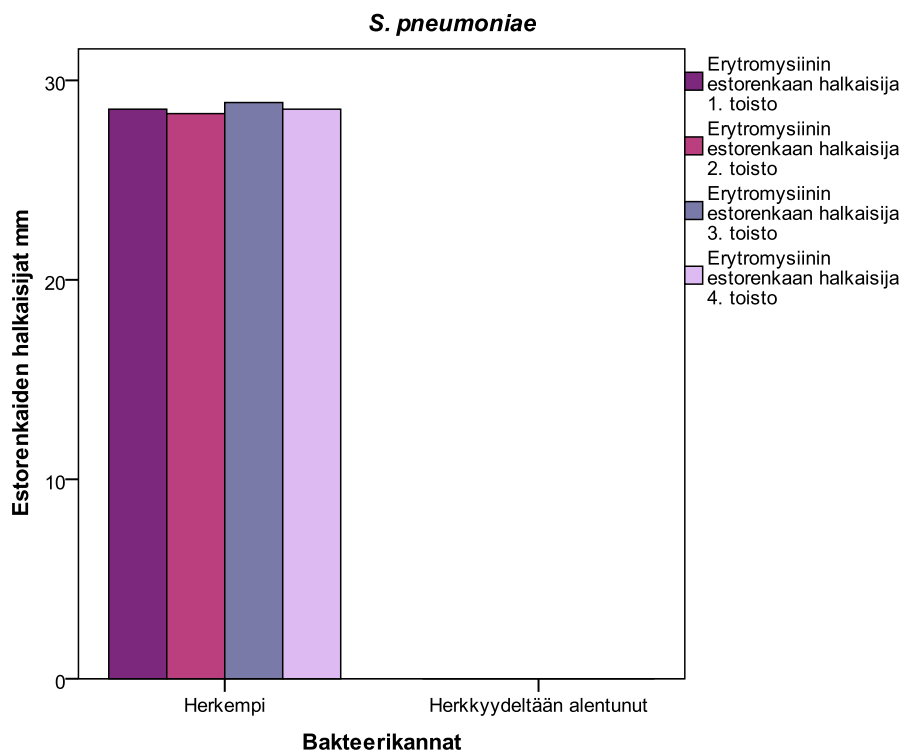
Kantojen vaikutus estorenkaiden halkaisijoihin *H. influenzae* -lajilla vaikuttavan antibiootin ollessa amoksisilliini-klavuliinihappo.



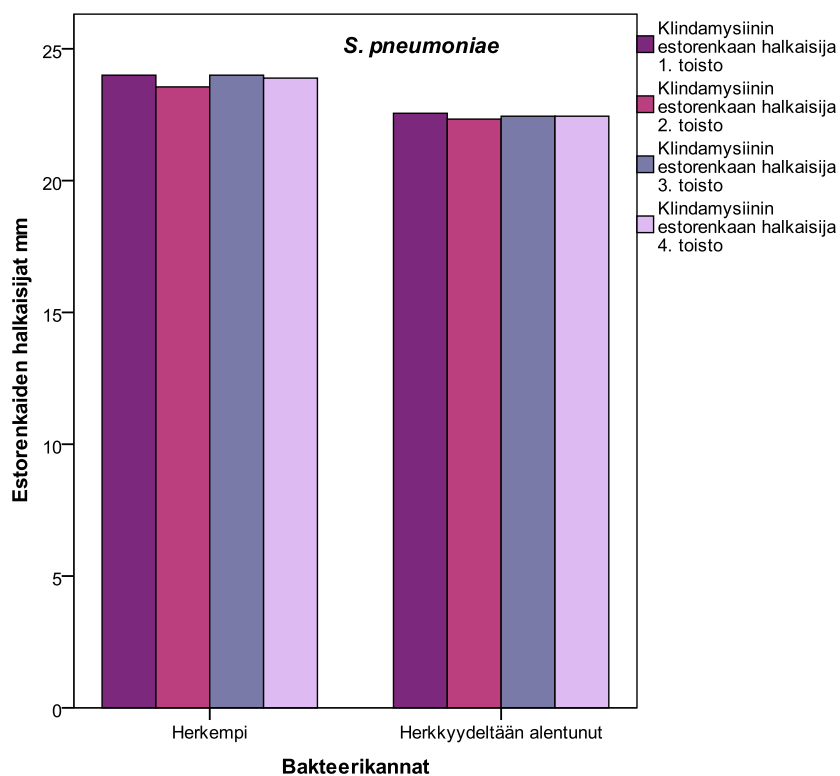
Kantojen vaikutus estorenkaiden halkaisijoihin *H. influenzae* -lajilla vaikuttavan antibiootin ollessa ampisilliini.



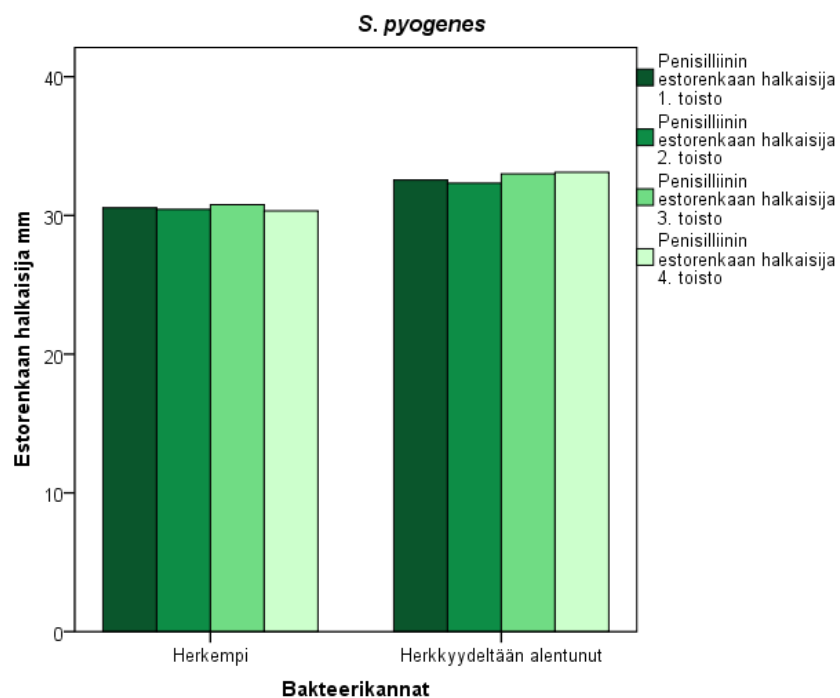
Kantojen vaikutus estorenkaiden halkaisijoihin *S. pneumoniae* -lajilla vaikuttavan antibiootin ollessa sulfa-trimetopriimi.



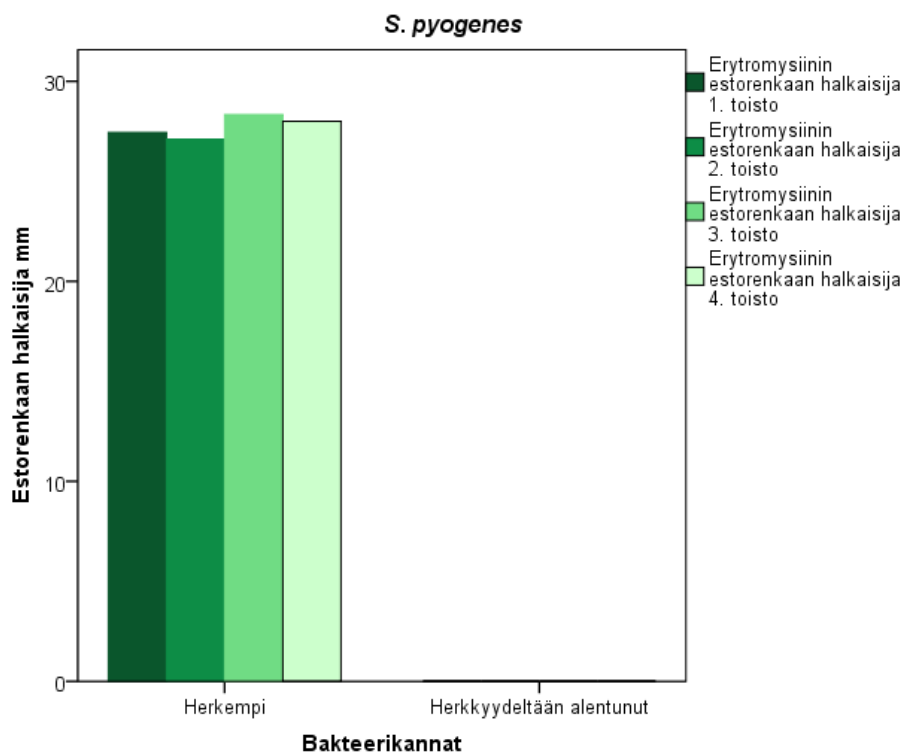
Kantojen vaikutus estorenkaiden halkaisijoihin *S. pneumoniae* -lajilla vaikuttavan antibiootin ollessa erytromysiini.



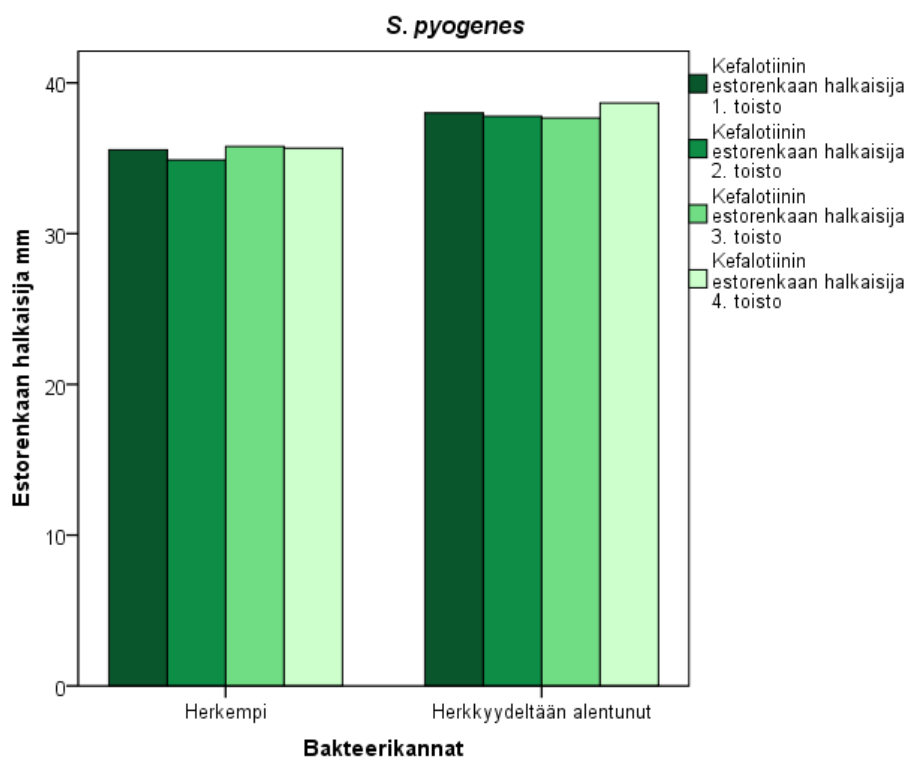
Kantojen vaikutus estorenkaiden halkaisijoihin *S. pneumoniae* -lajilla vaikuttavan antibiootin ollessa klindamysiini.



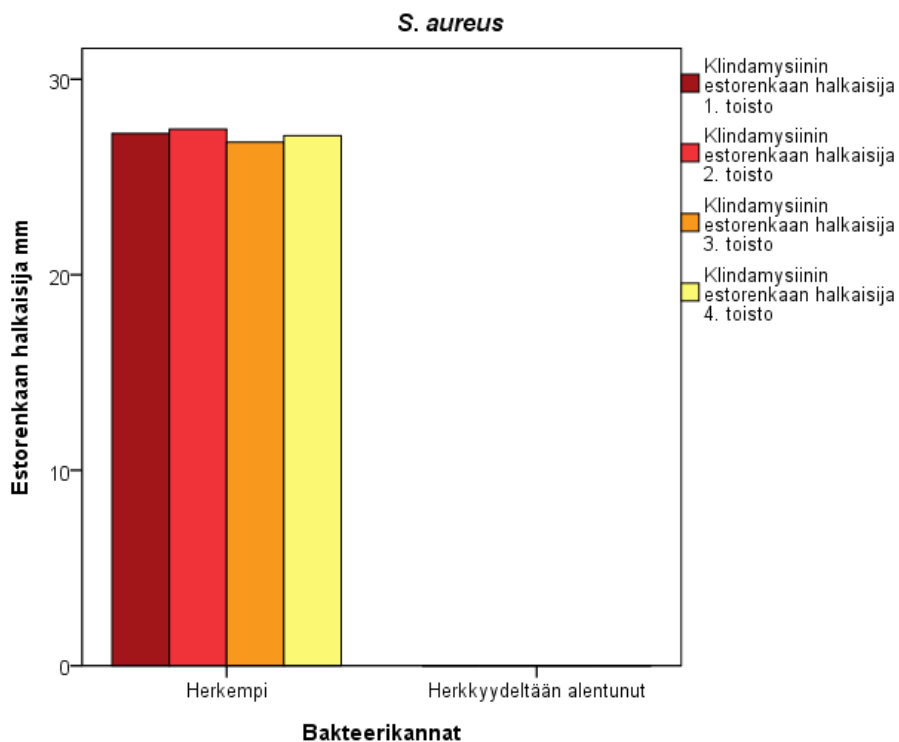
Kantojen vaikutus estorenkaiden halkaisijoihin *S. pyogenes* -lajilla vaikuttavan antibiootin ollessa penisilliini.



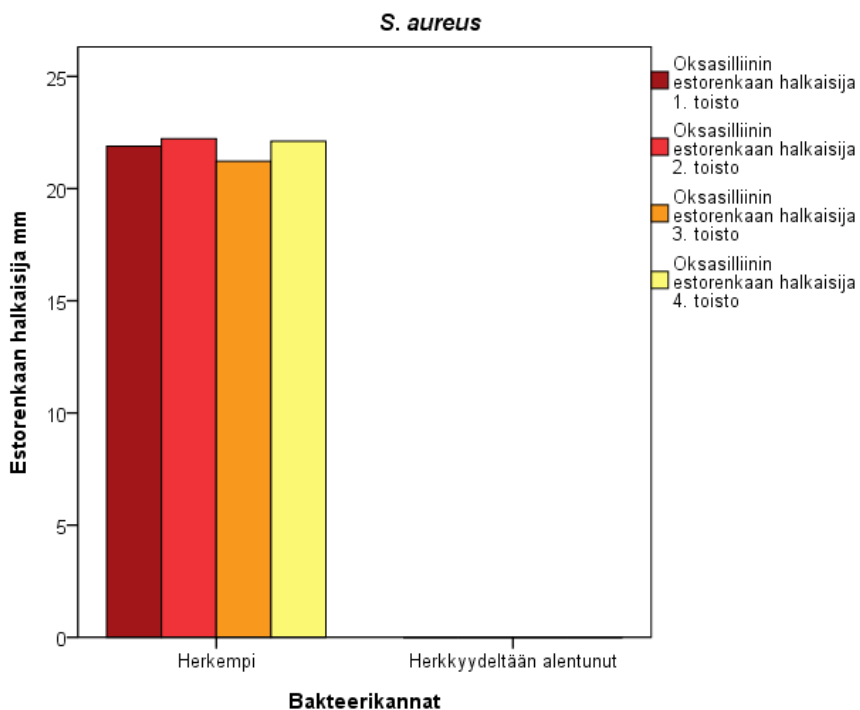
Kantojen vaikutus estorenkaiden halkaisijoihin *S. pyogenes* -lajilla vaikuttavan antibiootin ollessa erytromysiini.



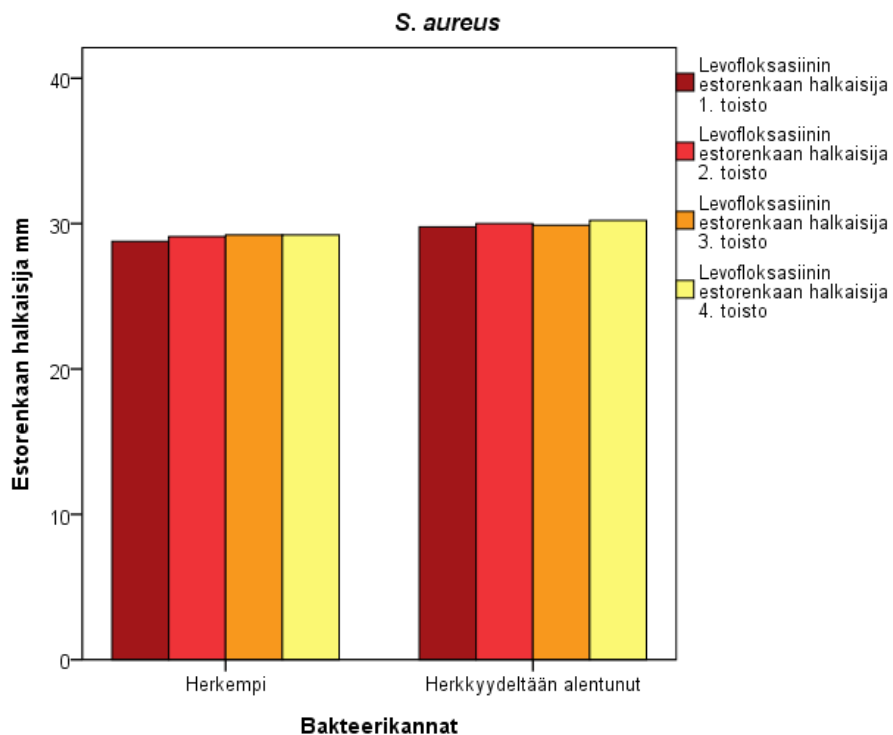
Kantojen vaikutus estorenkaiden halkaisijoihin *S. pyogenes* -lajilla vaikuttavan antibiootin ollessa kefalotiini.



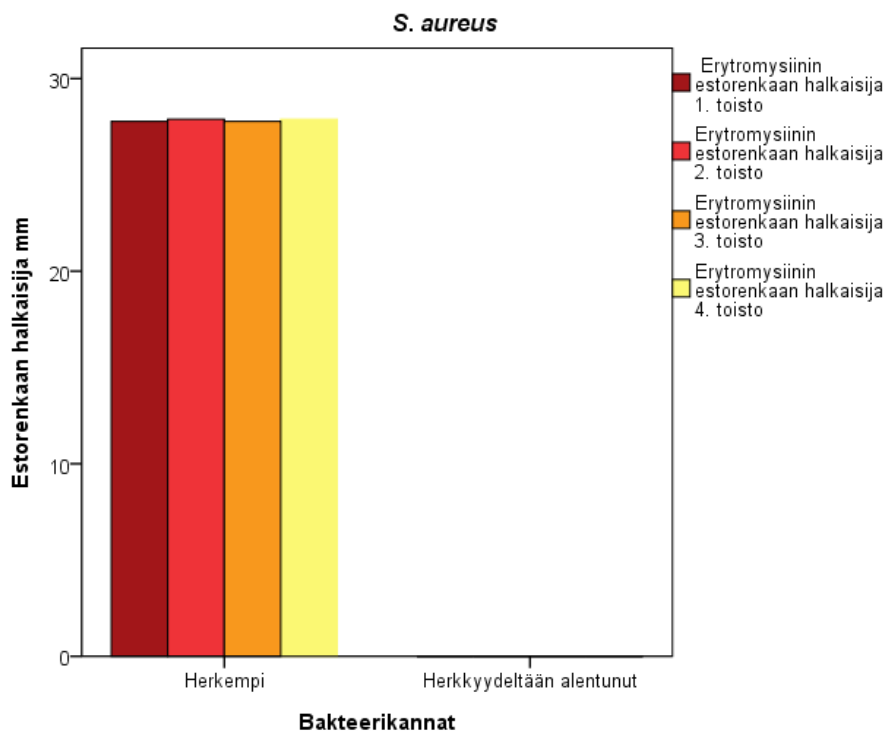
Kantojen vaikutus estorenkaiden halkaisijoihin *S. aureus* -lajilla vaikuttavan antibiootin ollessa klindamysiini.



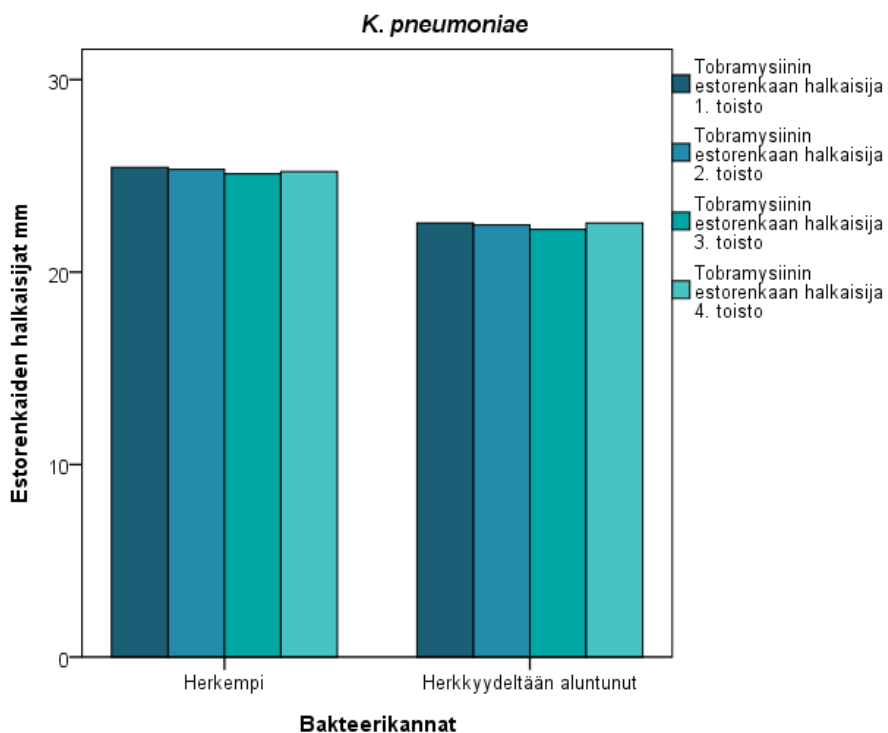
Kantojen vaikutus estorenkaiden halkaisijoihin *S. aureus* -lajilla vaikuttavan antibiootin ollessa oksasilliini.



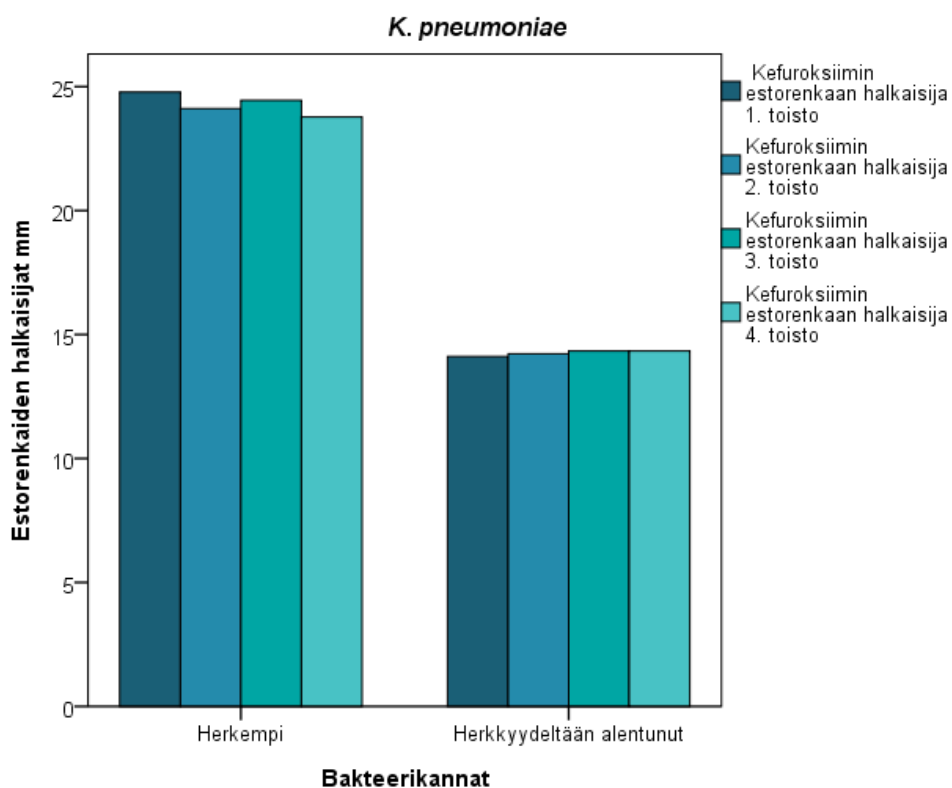
Kantojen vaikutus estorenkaiden halkaisijoihin *S. aureus* -lajilla vaikuttavan antibiootin ollessa levofloksasiini.



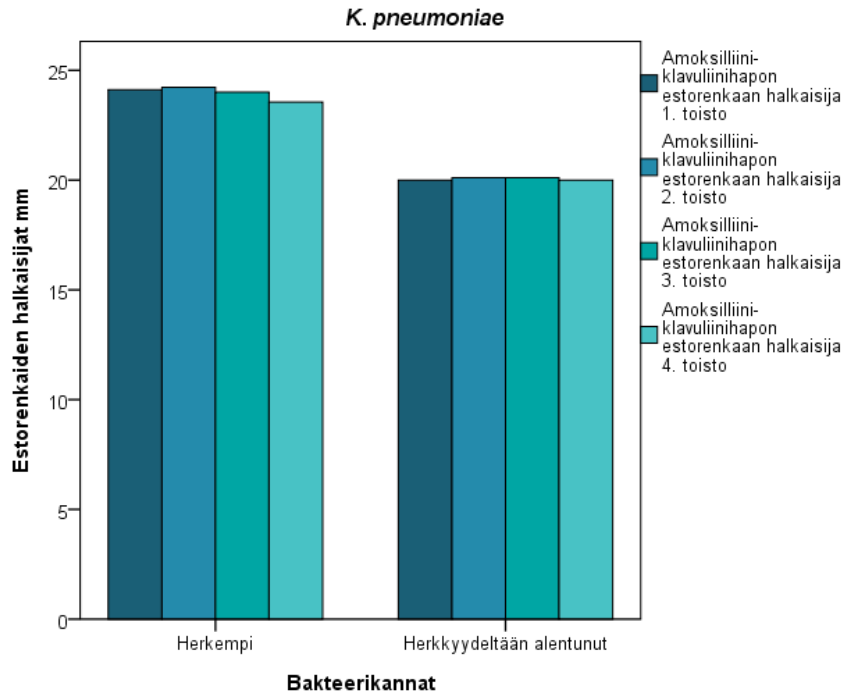
Kantojen vaikutus estorenkaiden halkaisijoihin *S. aureus* -lajilla vaikuttavan antibiootin ollessa erytromysiini.



Kantojen vaikutus estorenkaiden halkaisijoihin *K. pneumoniae* -lajilla vaikuttavan antibiootin ollessa tobramysiini.

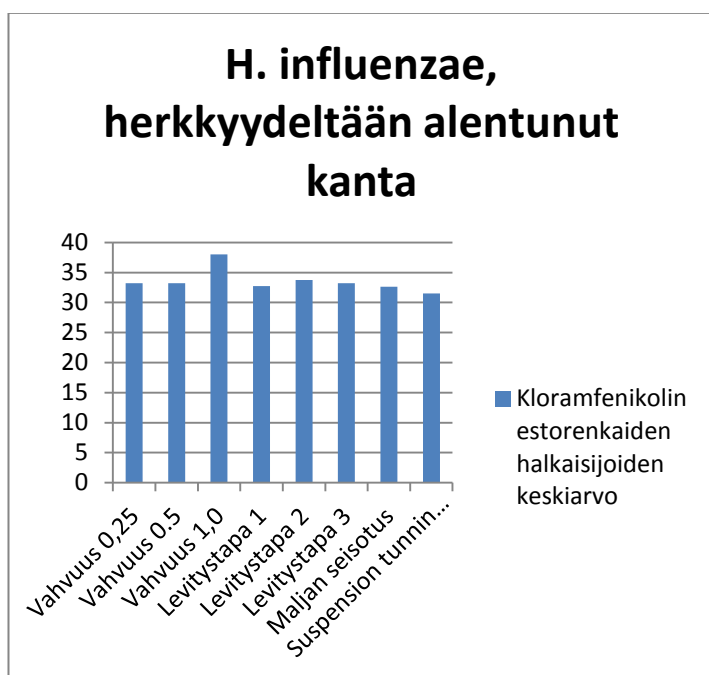
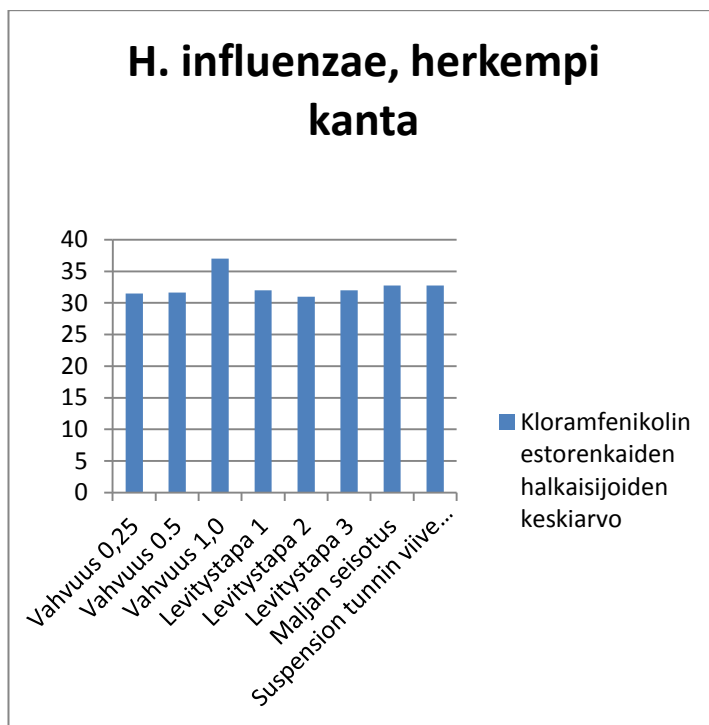


Kantojen vaikutus estorenkaiden halkaisijoihin *K. pneumoniae* -lajilla vaikuttavan antibiootin ollessa kefuroksiimi.

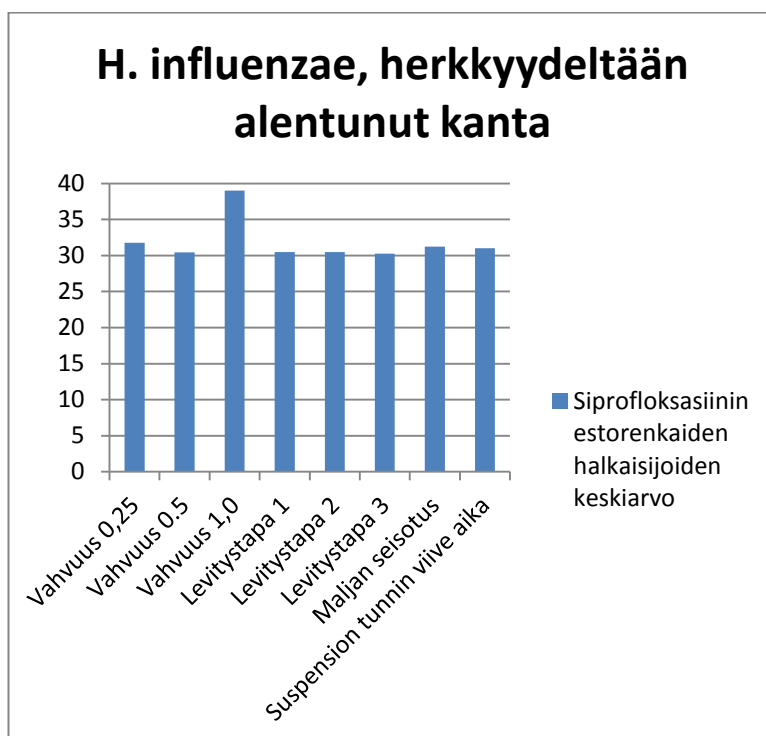
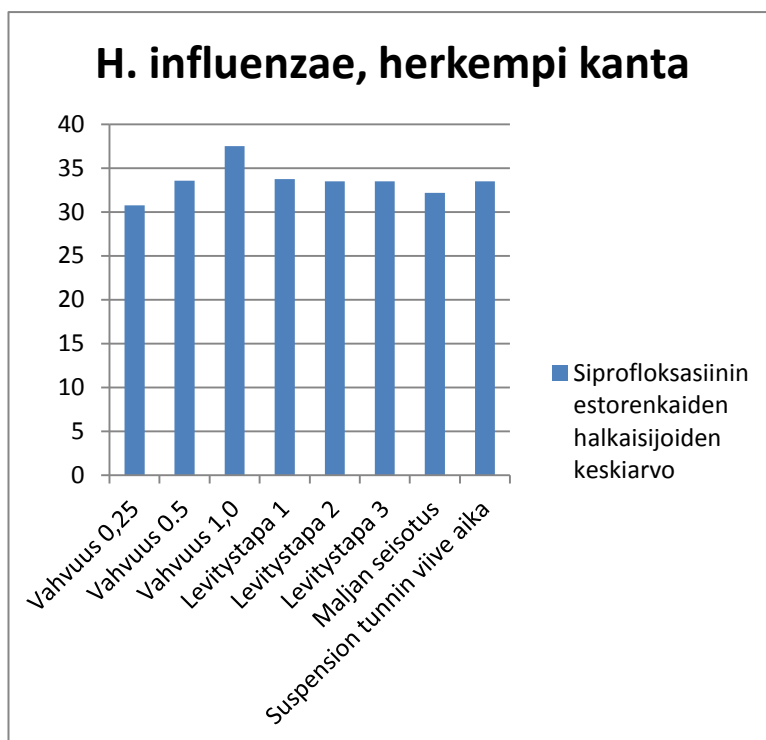


Kantojen vaikutus estorenkaiden halkaisijoihin *K. pneumoniae* -lajilla vaikuttavan antibiootin ollessa amoksisilliini-klavuliinihapo.

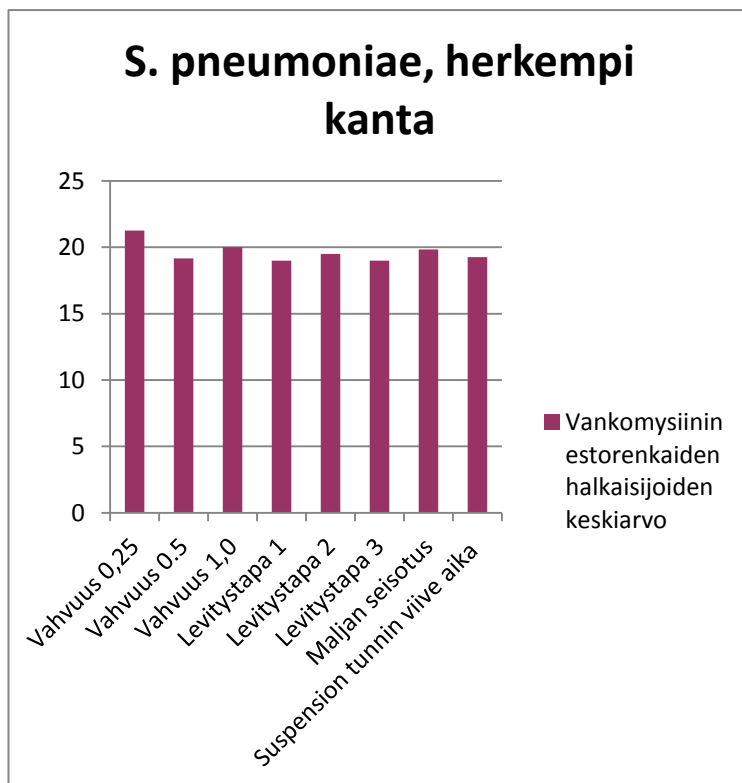
Erot estorenkaiden halkaisijoissa eri muuttujien kesken bakterikan- takohtaisesti



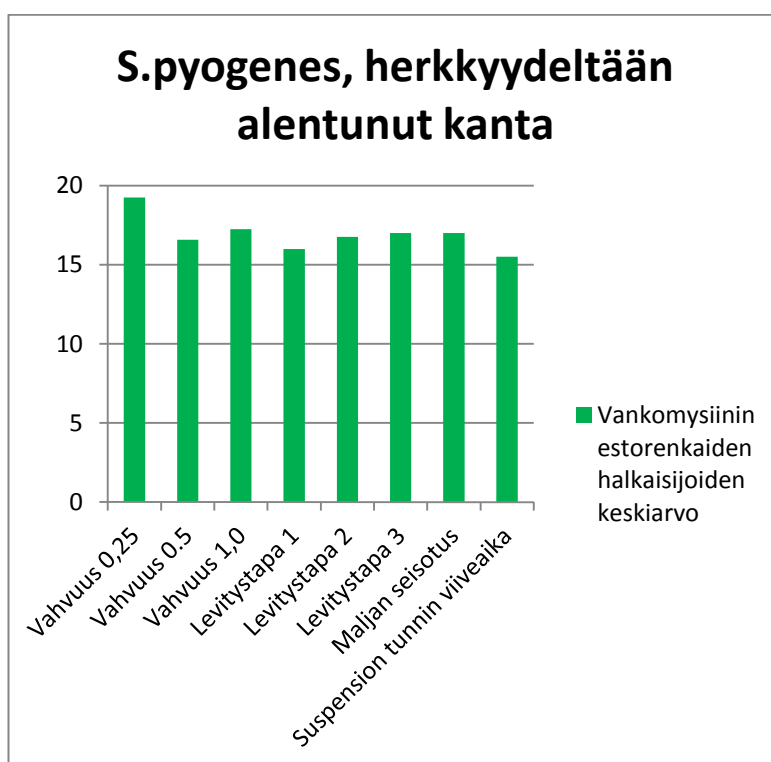
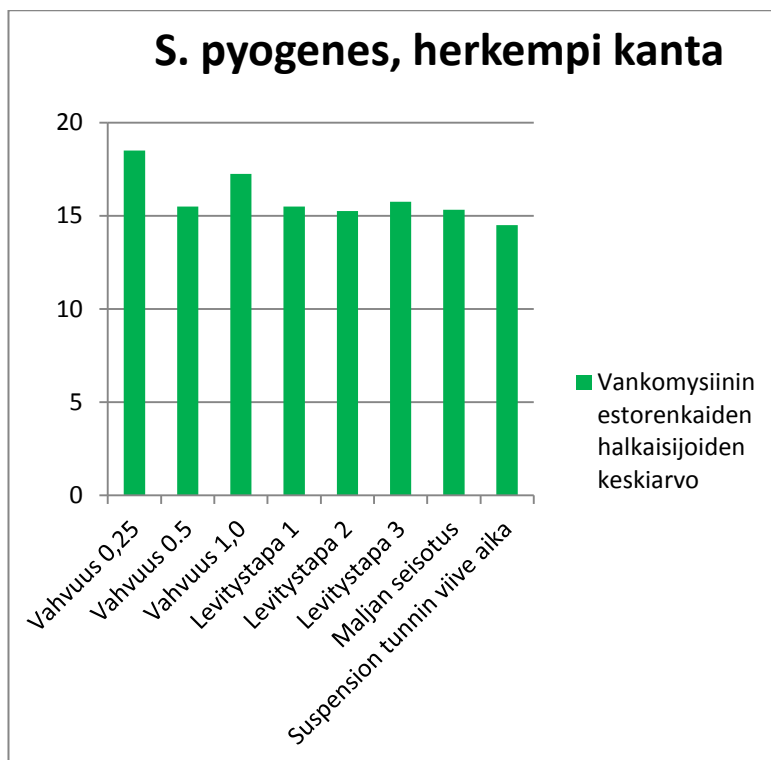
H. influenzae -lajin herkemmän ja herkkydeltään alentuneiden kantojen estorenkaiden halkaisijat millimetreinä eri muuttujien kohdalla. Vaikuttavana antibioottina kloramfenikoli. Jokaista muuttujaa verrataan 0,5 McFarlandin vahvuisen suspension pylvääseen. Estorenkaiden halkaisijoiden mitoissa ei ole huomioitu antibioottikiekon halkaisijaa (6 mm). Jokainen pylväs koostuu neljän toiston keskiarvosta.



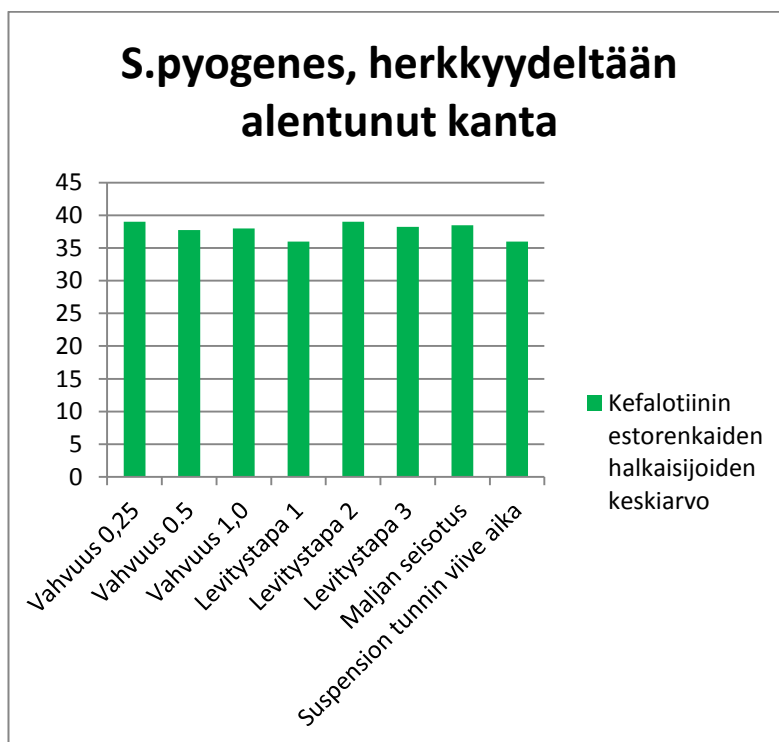
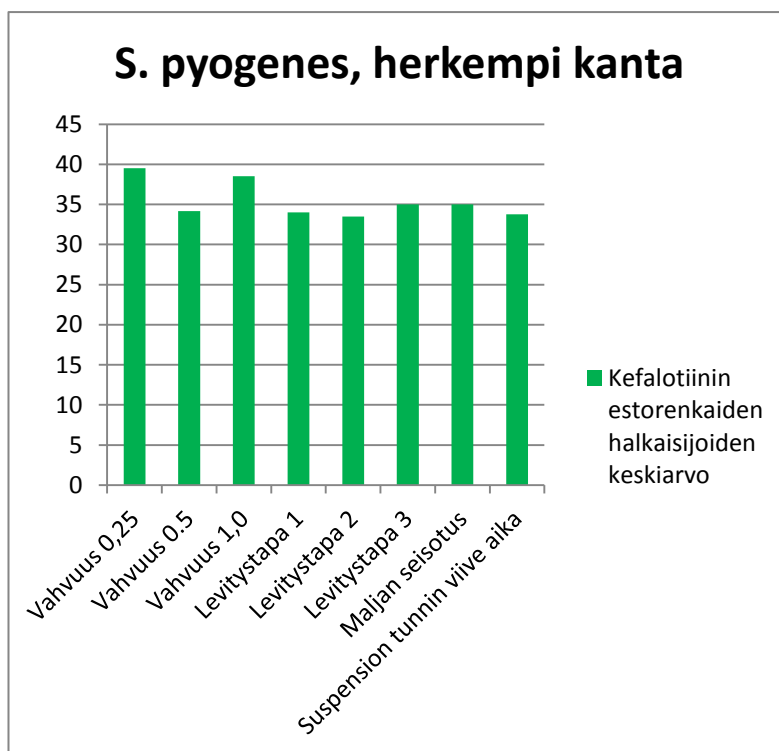
H. influenzae -lajin herkemman ja herkkydeltään alentuneiden kantojen estorenkaiden halkaisijat millimetreinä eri muuttujien kohdalla. Vaikuttavana antibioottina siprofloksasiini. Jokaista muuttujaa verrataan 0,5 McFarlandin vahvuisen suspension pylvääseen. Estorenkaiden halkaisijoiden mitoissa ei ole huomioitu antibioottikiekon halkaisijaa (6 mm). Jokainen pylväs koostuu neljän toiston keskiarvosta.



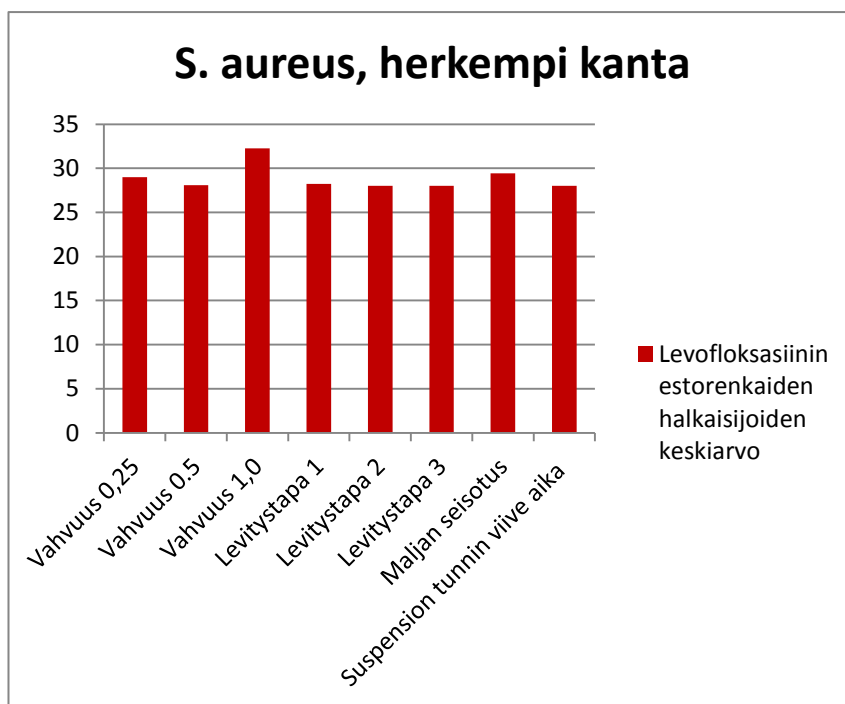
S. pneumoniae -lajin herkemmän ja herkkydeltään alentuneiden kantojen estorenkaiden halkaisijat millimetreinä eri muuttujien kohdalla. Vaikuttavana antibioottina vankomysiini. Jokaista muuttujaa verrataan 0,5 McFarlandin vahvuisen suspension pylvääseen. Estorenkaiden halkaisijoiden mitoissa ei ole huomioitu antibioottikiekon halkaisijaa (6 mm). Jokainen pylväs koostuu neljän toiston keskiarvosta.



S. pyogenes -lajin herkemmän ja herkkyydeltään alentuneiden kantojen estorenkaiden halkaisijat millimetreinä eri muuttujien kohdalla. Vaikuttavana antibioottina vankomysiini. Jokaista muuttujaa verrataan 0,5 McFarlandin vahvuisen suspension pylvääseen. Estorenkaiden halkaisijoiden mitoissa ei ole huomioitu antibioottikiekon halkaisijaa (6 mm). Jokainen pylväs koostuu neljän toiston keskiarvosta.



S. pyogenes -lajin herkemmän ja herkkyydeltään alentuneiden kantojen estorenkaiden halkaisijat millimetreinä eri muuttujien kohdalla. Vaikuttavana antibioottina kefalotiini. Jokaista muuttujaa verrataan 0,5 McFarlandin vahvuisen suspension pylvääseen. Estorenkaiden halkaisijoiden mitoissa ei ole huomioitu antibioottikiekon halkaisijaa (6 mm). Jokainen pylväs koostuu neljän toiston keskiarvosta.



S. aureus -lajin herkemmän ja herkkydeltään alentuneiden kantojen estorenkaiden halkaisijat millimetreinä eri muuttujien kohdalla. Vaikuttavana antibioottina levofloksasiini. Jokaista muuttujaa verrataan 0,5 McFarlandin vahvuisen suspension pylvääseen. Estorenkaiden halkaisijoiden mitoissa ei ole huomioitu antibioottikiekon halkaisijaa (6 mm). Jokainen pylväs koostuu neljän toiston keskiarvosta.